

機関番号：34318

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590495

研究課題名（和文） 成熟胸腺における上皮前駆細胞とそのニッチの解析

研究課題名（英文） Analysis of TEC progenitors and their niche in the adult thymi

研究代表者

糸井 マナミ (ITOI MANAMI)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・准教授

研究者番号：00257833

研究成果の概要(和文):本研究では胸腺上皮前駆細胞とその胸腺内分布領域を特定するために、生後マウス胸腺における増殖性の上皮細胞の特徴とその分布領域について解析した。生後マウス胸腺には皮質および髄質上皮前駆細胞が存在し、それらの維持には Foxn1 転写調節因子が関与することが示唆された。また、増殖性の上皮細胞は成獣マウス胸腺では主に髄質領域に分布するが新生仔期までは皮質および髄質領域の両方に分布することから皮質および髄質上皮前駆細胞が異なる領域で発生することが示唆された。

研究成果の概要(英文): To identify the thymic epithelial progenitor cells and their niche in the adult thymi, we analyzed the phenotypes of proliferating epithelial cells and their distribution in the post-natal thymi. Our results suggest that Foxn1-positive cell population includes cortical and medullary epithelial progenitor cells, and they distribute in the medulla of the adult thymi though they exist in the specific regions of the cortex and the medulla in the newborn thymi.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：発生・分化、細胞・組織、再生医学、Foxn1

1. 研究開始当初の背景

胸腺上皮細胞は放射線やステロイド剤耐性であることより成熟胸腺では増殖しないと考えられてきたが、近年定常状態での胸腺上皮細胞の増殖が報告され (Gray et al., Blood. 2006. 108(12):3777)、成熟胸腺においても上皮細胞の turnover が起こっている可能性が示された。このことから成熟胸腺に

においても上皮幹細胞および前駆細胞が存在することが示唆されたが、その詳細はあきらかとなっていない。

我々は、ヌードマウスの欠損の原因遺伝子である Foxn1 転写調節因子が、器官形成初期の胸腺原基では殆どの上皮細胞に発現し上皮細胞における機能分子：Delta-like (DLL) 4 や CCL25 の発現に必須であるが、成獣胸腺では多くの上皮細胞がこれらの機能分子を

発現しているにもかかわらず Foxn1 の発現を失うことから Foxn1 はこれらの機能分子の発現維持には必ずしも必要でないことを示した (Itoi et al., Int. Immunol., 2007. 19 (2) :127)。このことから、Foxn1 は全ての胸腺上皮細胞の分化初期に発現し上皮細胞の分化を誘導するが、一部の上皮細胞群を除いて多くの上皮細胞が分化の途中で Foxn1 の発現を失うことが示唆され、成獣胸腺で見られる Foxn1 陽性細胞としては、一部の成熟上皮細胞および胸腺上皮幹細胞・前駆細胞を含む未分化な上皮細胞である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、成獣胸腺の Foxn1 陽性で細胞周期にいる上皮細胞 (Ki67 陽性細胞) について、細胞表面分子および細胞内マーカー分子発現を Flowcytometry および cytospin 標本を用いた蛍光染色により解析し、さらにそれらの分子発現を定量的 RT-PCR で検討することにより、胸腺上皮前駆細胞の特徴を明らかにする。さらに、成獣胸腺における増殖性上皮細胞の局在領域を検討することにより上皮幹細胞もしくは前駆細胞ニッチ領域を特定しその領域を構築するストローマ細胞について種々のストローマ細胞マーカー分子の発現やサイトカイン・接着分子およびシグナル分子の発現について解析することにより上皮幹細胞もしくは前駆細胞の維持・増殖・分化に関わるニッチの特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 成獣胸腺に存在する Foxn1 陽性 Ki67 陽性細胞の解析

① Foxn1 プロモーターで EGFP を発現するマウス (Foxn1::EGFP, C57BL/6 遺伝子背景) の胸腺を酵素処理 (collagenase, DNase) により単離細胞とし、EGFP、Ki67 と胸腺上皮細胞表面マーカー (EpCAM, Ly51, UEA-1) について蛍光免疫染色し FACS 解析を行った。

② Cytospin 標本による解析

①と同様に調整した Foxn1::EGFP マウスの胸腺単離細胞より cytospin 標本を作製し、EGFP、Ki67 と胸腺上皮細胞マーカー (Keratin) について蛍光免疫染色した。

(2) 胸腺上皮幹細胞もしくは前駆細胞を含む細胞分画における遺伝子発現の解析

1、2の結果より、胸腺上皮細胞活性を示した細胞分画の遺伝子発現について、定量的 RT-PCR により細胞増殖に関わる因子や幹細胞因子の発現について検討した。

(3) 成獣胸腺における上皮幹細胞もしくは前駆細胞の局在領域の解析

新生仔および成獣 C57BL/6 マウス胸腺について免疫組織学的検討により Foxn1 陽性 Ki67 陽性細胞および BrdU 標識 (250mg/kg, iv., 1回/日×3日間) による増殖性上皮細胞の分布を検討した。

4. 研究成果

(1) 成獣胸腺に存在する Foxn1 陽性 Ki67 陽性細胞の解析

酵素処理により単離した成獣マウス胸腺ストローマ細胞の FACS 解析の結果より、成獣マウス胸腺において、EpCAM 陽性 Ki67 陽性の増殖性上皮細胞の 73% が Foxn1 (EGFP) 陽性であることが示された (図 1 A)。また、Cytospin 標本を用いた検討より、成獣マウス胸腺において 52.5% の上皮細胞が Foxn1 (EGFP) 陽性であり、全上皮細胞中の Ki67 陽性細胞は 3.4% に対して Foxn1 (EGFP) 陽性細胞中の Ki67 陽性細胞は 5.5% であることから、増殖性の上皮細胞は Foxn1 陽性分画に濃縮されることが分かった (図 1 B)。これらることより、成獣マウス胸腺において増殖性の上皮細胞の多くは Foxn1 陽性であることが示された。

また、Foxn1 (EGFP) 陽性 Ki67 陽性細胞の一部は Ly51 陽性または UEA-1 陽性分画にも認められ、成獣マウス胸腺には皮質および髄質上皮前駆細胞が存在することが示唆された。

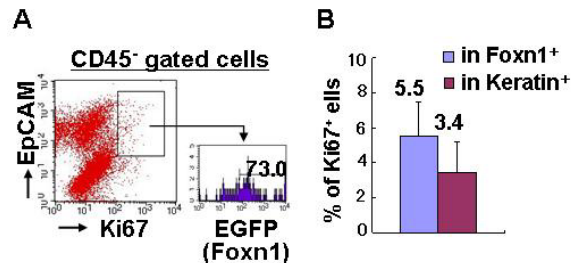


図 1

(2) 胸腺上皮幹細胞もしくは前駆細胞を含む細胞分画における遺伝子発現の解析

Foxn1 (EGFP) 陽性 EpCAM 陽性分画および Foxn1 (EGFP) 陰性 EpCAM 陽性分画をセルソーターにより分取し、各分画における遺伝子発現を検討したところ、Foxn1 (EGFP) 陰性分画に比べて Foxn1 (EGFP) 陽性分画において胸腺上皮細胞発生期に発現が見られる Pax1, Pax9 および Six1 の発現が高いことが示され (図 2)、Foxn1 陽性細胞に胸腺上皮前駆細胞が含まれる可能性が示された。

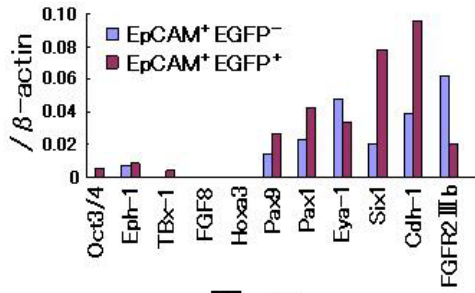


図 2

(3) 成獣胸腺における上皮幹細胞もしくは前駆細胞の局在領域の解析

成獣マウス胸腺凍結切片を用いた免疫組織学的検討により生後胸腺において Foxn1 陽性 Ki67 陽性の増殖性上皮細胞は主に髄質領域に見られることが分かった (図 3、矢頭)。さらに、BrdU 投与による増殖細胞標識法を行い、BrdU 陽性 Foxn1 陽性細胞の分布を BrdU 投与 1 日後および 3 週間後に免疫組織学により検討したところ、標識 1 日後には BrdU 陽性 Foxn1 陽性細胞は成獣マウス胸腺の主に髄質領域に認められた。また、標識 3 週後の胸腺においても少数の BrdU 陽性 Foxn1 陽性細胞が髄質領域に認められ、髄質領域に細胞周期のきわめて遅い上皮細胞が存在することが明らかとなった (図 4、矢頭)。これらことから、生後マウス胸腺髄質領域には上皮前駆細胞が存在することが示唆された。一方、新生仔期においては、増殖性の上皮細胞は髄質領域だけでなく皮質領域の特定領域に存在することが示され、皮質および髄質上皮前

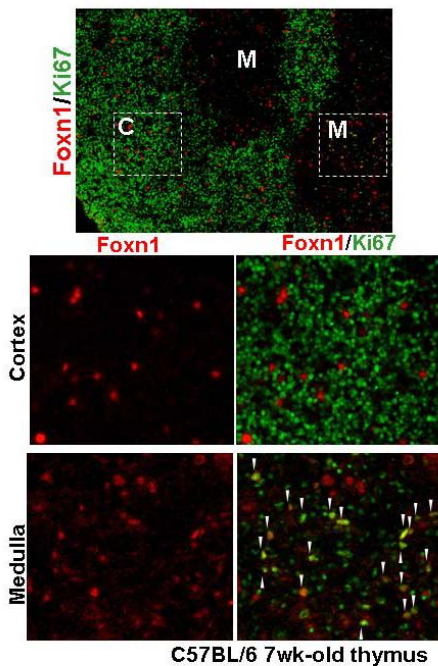


図 3

駆細胞はそれぞれ胸腺内の異なる領域で発生することが示唆された。これらの皮質および髄質上皮前駆細胞が生後いつまで維持されるのか、どのような維持・分化の制御を受けているかが今後の検討課題である。

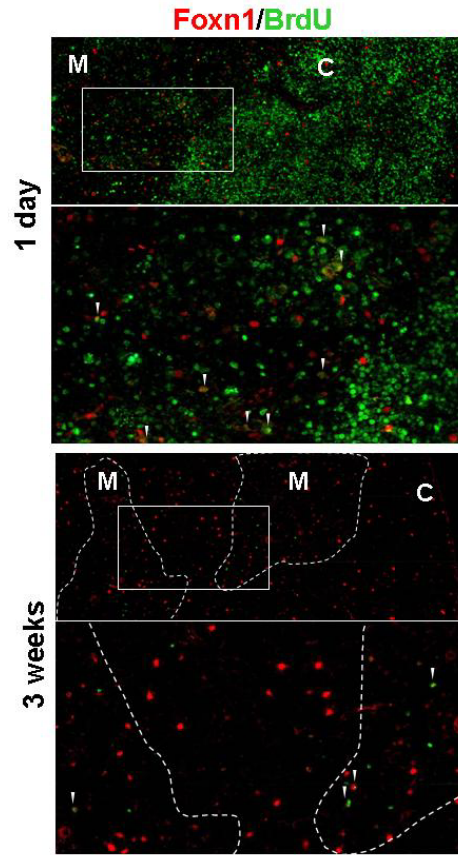


図 4

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Guo Y, Miyazaki M, Itoi M, Satoh R, Iwama A, Amagai T, Kawamoto H, Kanno M. Polycomb group gene Bmi1 plays a role in the growth of thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2011. 41(4):1098-1107. 査読有
- ② Vroegindeweyj E, Crobach S, Itoi M, Satoh R, Zuklys S, Happe C, Germeraad WT, Cornelissen JJ, Cupedo T, Hollander GA, Kawamoto H, van Ewijk W. Thymic cysts originate from Foxn1 positive thymic medullary epithelium. *Mol Immunol.* 2010. 47(5):1106-1113. 査読有
- ③ Mori K, Itoi M, Tsukamoto N, Amagai

T. Foxn1 is essential for vascularization of the murine thymus anlage. Cell Immunol. 2010. 260:66-69. 査読有

- ④ Masuda K, Germeraad WT, Satoh R, Itoi M, Ikawa T, Minato N, Katsura Y, van Ewijk W, Kawamoto H. Notch activation in thymic epithelial cells induced development of thymic microenvironments. Mol Immunol. 2009. 46(8-9):1756-1767. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 糸井マナミ：胸腺皮質上皮細胞分化と機能発現における Foxn1 の役割. 第 21 回京都 T 細胞カンファレンス. 2011. 6. 10. 京都.
- ② Itoi M : Foxn1 is differentially required for cTEC and mTEC function. EThyme-Rolduc Meeting. 2011. 5. 22. Leeuwenhorst, NL.
- ③ 糸井マナミ：胸腺皮質および髄質上皮細胞の分化における転写因子 Foxn1 の役割. 日本胸腺研究会. 2011. 2. 5. 長崎.
- ④ Itoi M: Foxn1 is differently required for the cortical and medullary epithelial cell development. The 2nd Synthetic immunology Workshop. 2010. 12. 17. Kyoto.
- ⑤ Itoi M: The role of Foxn1 in the mature epithelial cells and epithelial progenitor cells in the postnatal thymi. 14th International Congress of Immunology. 2010. 8. 23. Kobe.
- ⑥ Itoi M: The role of Foxn1 in mature epithelial cells and epithelial progenitor cells in the postnatal thymi. ThymOzVI: An International Workshop on T Lymphocytes. 2010. 3. 19. Heron Island. Australia.
- ⑦ Itoi M: Foxn1 expression in proliferating epithelial cells in the postnatal mouse thymus. Proceedings of the Japanese Society for Immunology. 2009. 12. 2. Osaka.
- ⑧ Itoi M: Characterization of Foxn1-positive cells in the postnatal mouse thymus. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference.

2009. 6. 2. Kyoto.

[その他]

ホームページ等

http://www.meiji-u.ac.jp/faculty/dep_immu/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸井 マナミ (ITOI MANAMI)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・准教授

研究者番号：00257833

(2) 研究分担者

雨貝 孝 (AMAGAI TAKASHI)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授

研究者番号：80094407

塚本 紀之 (TSUKAMOTO NORIYUKI)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・講師

研究者番号：80319524

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：