

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03441

研究課題名(和文) 胸腺上皮細胞の多様性による自己免疫疾患の発症抑制

研究課題名(英文) Diversity of thymic epithelial cells contributing to suppressing autoimmunity

研究代表者

秋山 泰身 (Akiyama, Taishin)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50327665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺髄質上皮細胞は、自己免疫疾患の発症抑制に不可欠な役割を持つ。その機能には極めて多種類の組織特異的自己遺伝子の発現が重要であるが、組織特異的遺伝子の多様性を維持する機構には不明な部分が多い。本課題においてシングルセル解析を行うことで、胸腺髄質上皮細胞はクロマチン構造とそれに制御される遺伝子発現が異なる多様な分化状態の細胞集団であることを実証した。また、異なる組織特異的遺伝子発現プロファイルを持つ細胞へ分化する過程において転換点となる、増殖性髄質上皮細胞を同定した。これらの組織特異的遺伝子発現の多様性は、制御転写因子の発現に加えて、多様な分化状態を保持することにより成立すると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性である自己免疫疾患の発症を抑制する機構を理解することは、治療法や予防法を開発するために重要な課題である。胸腺を構成する上皮細胞は、極めて多種類の自己遺伝子を発現することで、自己免疫疾患の発症を抑制するが、その制御機構には不明な点が多く残されている。本研究で、胸腺上皮細胞の遺伝子発現やクロマチン構造を1細胞レベルで解析した。その結果、胸腺上皮細胞が様々な分化状態で存在し、その分化状態の多様性が、胸腺上皮細胞全体での遺伝子発現の多様性に寄与することが判明した。また、胸腺上皮細胞の分化状態の多様性を維持するために重要な増殖活性の高い胸腺上皮細胞の亜集団が存在することを実証した。

研究成果の概要(英文)：Thymic medullary epithelial cells (mTECs) play a crucial role in suppressing the development of autoimmune diseases. Their function depends on the expression of a wide array of tissue-specific genes, although the mechanisms that maintain this diversity remain unclear. In this study, single-cell RNA-seq and ATAC-seq analysis revealed that mTECs represent a heterogeneous population characterized by distinct chromatin structures and gene expression profiles. By utilizing the Fucci technology, we identified transiently amplifying mTECs as a critical transition point in the differentiation process leading to cells with diverse tissue-specific gene expression profiles. This diversity in gene expression is likely established through maintaining various differentiation states, in conjunction with the expression of specific regulatory transcription factors.

研究分野：免疫学・分子生物学

キーワード：胸腺 自己免疫 シングルセル解析 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腺における T 細胞の選択機構は、自己免疫疾患の発症抑制に重要である。T 細胞が胸腺で分化する際、自己組織の抗原を認識する T 細胞 (自己応答性 T 細胞) が一定頻度で生じる。しかしながら、それらの多くは胸腺内で除去される。この機構が不全になると、自己免疫疾患の発症を引き起こす。自己応答性 T 細胞を胸腺内で除去する過程に、胸腺髄質領域に局在する上皮細胞 (以下、髄質上皮細胞) が必要である。髄質上皮細胞は、(インシュリンのような) 組織特異的に発現する自己遺伝子を多種類、異所的に発現し、そこから翻訳されたタンパク質は、自己抗原として提示される。胸腺で分化途中の T 細胞が提示された自己抗原を認識した場合、アポトーシスを起こし (あるいは制御性 T 細胞に変換され) 結果として、自己応答性 T 細胞は胸腺外に流出する前に除去される。

髄質上皮細胞は、極めて多種類の組織特異的遺伝子を発現する。これまで、その制御に転写因子 Aire の重要性が報告されている。一方で AIRE に加えて他の転写因子の寄与が報告されているが、各転写因子がどの細胞で機能し、極めて多種類にわたる組織特異的遺伝子を制御するのが不明である。

2. 研究の目的

胸腺髄質上皮細胞の多様性を明らかにし、組織特異的遺伝子発現の多様性を形成するメカニズムを理解する。AIRE に加えて AIRE に依存せずに遺伝子発現を制御する転写因子 ASCL1 に着目し、これらの転写因子を発現する胸腺髄質上皮細胞サブセットの同定および遺伝子発現プロファイルを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 胸腺上皮細胞のシングルセル解析

4 週齢の雌マウスの胸腺を採取し、コラゲナーゼで単細胞とした。これらの細胞を上皮細胞マーカーである EpCAM、造血系細胞マーカー CD45、赤血球マーカー TER119 で染色し、CD45 陰性 TER119 陰性 EpCAM 陽性細胞を、胸腺上皮細胞としてセルソーターで分取した。シングルセル RNA-seq 解析では、分取した胸腺上皮細胞を Chromium instrument (10x Genomics) にロードし、シングルセルのエマルジョンを形成させた。シングルセルエマルジョンは、Chromium Single Cell 3 Reagent Kits で cDNA を合成し、ついで次世代シーケンスを行った。シーケンスデータは Cell Ranger により解析した。UMAP 次元削減やクラスタリングは Seurat パッケージを利用して行い、可視化した。

シングルセル ATAC 解析では、分取した胸腺上皮細胞に界面活性剤を作用させ、細胞核を調製した。細胞核は Chromium instrument (10x Genomics) にロードし、エマルジョンを形成させ、シングルセル核とした。シングルセル核エマルジョンから Chromium Next GEM Single-Cell ATAC Reagent Kits により scATAC ライブラリーを調製、次世代シーケンスを行った。シーケンスデータは Cell Ranger ATAC により解析した。UMAP 次元削減やクラスタリングは Seurat パッケージを利用して行い、可視化した。

(2) Fucci マウス解析

細胞周期を蛍光タンパク質の発現と分解でモニター可能な Fucci マウスを用い、蛍光シグナルを指標に胸腺上皮細胞を G2/M 期、G1 期、G0 期に分離した。G2/M 期の細胞を採取し、RNA-seq 解析を行った。

(3) 再構成胸腺器官培養

Fucci マウスより G0 期以外の細胞を分取

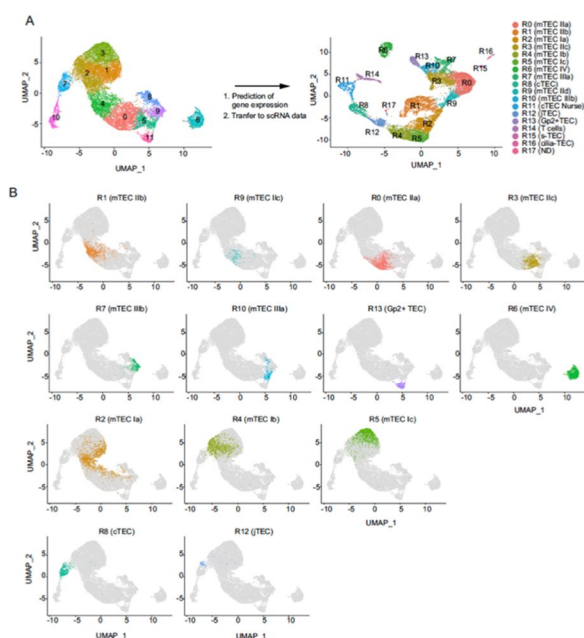


図1. シングルセルRNA-seqとシングルセルATAC-seqデータの統合解析
A. シングルセルRNA-seqとシングルセルATAC-seqのUMAP次元削減結果
B. シングルセルATAC-seqデータのクロマチン構造情報をシングルセルRNA-seqデータの遺伝子情報の統合

し、単細胞とした胎仔胸腺と混合、再構成胸腺を作成した。再構成胸腺を培養後、コラゲナーゼにより単細胞とした。細胞を上皮細胞マーカーなどで染色後、Fucci 蛍光シグナルを指標にフローサイトメーターで Fucci マウス由来細胞を分取して、RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胸腺上皮細胞の多様性

マウス胸腺上皮細胞のシングルセル遺伝子発現解析とシングルセル ATAC 解析を行い、多様性を検討した。マウス(4週齢雌マウス)の胸腺上皮細胞についてドロプレットベースのシングルセル RNA-seq 解析を行い、UMAP 次元削減とクラスタリングを行ったところ、胸腺上皮細胞は17個のクラスターに分類された。一方、シングルセル ATAC 解析データについても、同様な UMAP 次元削減とクラスタリングを行ったところ、11のクラスターに分類された。シングルセル RNA-seq 解析から得られる遺伝子発現情報とシングルセル ATAC 解析から得られるクロマチンアクセシビリティ情報を統合した(図1)。その結果、シングルセル RNA 解析から得られるクラスターとシングルセル ATAC から得られるクラスターは高い相関があることが判明した。すなわち、胸腺上皮細胞はクロマチン構造と遺伝子発現の違いに基づく、少なくとも11の細胞種に分類できることが判明した。

(2) 髄質上皮細胞サブセットにおける AIRE と ASCL1 の発現

AIRE と ASCL1 が各々どのサブセットに発現しているのか調べたところ、AIRE はシングルセル RNA-seq でのクラスター R0, R1, R9 に主に発現し、ASCL1 は R1, R2, R4, R5 に主に発現することが判明した。すなわち、AIRE と ASCL1 は異なる細胞サブセットで発現し、遺伝子発現を制御しているが、R1 クラスターだけは例外的に AIRE と ASCL1 の両者を発現することが判明した。さらに R1 クラスターを詳細に調べたところ、他のクラスターに比べて増殖マーカーを高く発現することが判明した。以上から、髄質上皮細胞は AIRE を高く発現し、ASCL1 の発現が低い細胞、ASCL1 を高く発現し、AIRE の発現が低い細胞、AIRE も ASCL1 も発現しない細胞、AIRE と ASCL1 の両者を発現する細胞に分類され、各々で特徴的な遺伝子発現プロファイルを持つと推測できる。

(3) AIRE と ASCL1 を発現する増殖性髄質上皮細胞の解析

AIRE と ASCL1 の両者を発現する細胞サブセットは、髄質上皮細胞の成熟マーカーである CD80 と増殖マーカーを高く発現する。そこで CD80 と増殖性を指標に細胞の分取を行い、その遺伝子発現プロファイルを検討した。増殖性細胞の分取には、細胞周期を蛍光タンパク質の発現と分解でモニターできる Fucci マウスを利用した。Fucci マウスを解析したところ、細胞表面マーカー CD80 が高い細胞画分の一部が、細胞周期の M 期の状態であることが判明した。ついで、蛍光を指標に M 期の細胞を分取、AIRE の発現を免疫組織染色法で確認し、目的の AIRE 陽性増殖性髄質上皮細胞であると結論した。

増殖性 AIRE 陽性(同時に ASCL1 陽性)髄質上皮細胞と非増殖性 AIRE 陽性(ASCL1 陰性)髄質上皮細胞を採取し、RNA-seq 法により遺伝子発現を解析した。その結果、非増殖性細胞では AIRE 依存的に発現する組織特異的遺伝子の発現が高かった。一方、増殖性細胞では、AIRE が発現するにも関わらず、AIRE 依存的に発現する組織特異的遺伝子の発現が低いことが判明した。一方、AIRE 非依存的な組織特異的遺伝子は発現しており、ASCL1 による制御を受ける可能性がある。

以上の結果を踏まえて、増殖性 AIRE 陽性細胞は、非増殖性 AIRE 陽性細胞へ分化する前の一過性増殖細胞であると予想した。その検証のため、分化追跡実験を行った。増殖性 AIRE 陽性細胞を分取し、胎仔胸腺細胞と混合、胸腺組織を再構成させた。再構成した胸腺組織を培養後にコラゲナーゼにより単細胞とし、フローサイトメーターで確認したところ、混合した増殖性 AIRE 陽性細胞は非増殖性細胞に分化していた。さらに分化した細胞を1細胞ごとに分取し、シングルセル RNA-seq 解析を行ったところ、増殖性 AIRE 陽性細胞は、非増殖性 AIRE 陽性細胞に加えて、AIRE も ASCL1 も発現しない髄質上皮細胞へ分化することが判明した。

以上の研究から、胸腺髄質上皮細胞は分化に伴い、組織特異的遺伝子の発現プロファイルが変化するが、その転換点が AIRE と ASCL1 の両者を発現する増殖性細胞であると思われる。今後、増殖性 AIRE 陽性細胞を詳細に解析することで、組織特異的遺伝子の多様性獲得に重要な機構が明らかになると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Katayama Yotaro, Yokota Ryo, Akiyama Taishin, Kobayashi Tetsuya J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Machine Learning Approaches to TCR Repertoire Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 858057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.858057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyao Takahisa, Miyauchi Maki, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Integrative analysis of scRNA-seq and scATAC-seq revealed transit-amplifying thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e73998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.73998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 YAMAMOTO Mizuki, GOHDA Jin, AKIYAMA Taishin, INOUE Jun-ichiro	4. 巻 97
2. 論文標題 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) plays crucial roles in multiple biological systems through polyubiquitination-mediated NF- B activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 145 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.97.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama Taishin, Suzuki Toru, Yamamoto Tadashi	4. 巻 42
2. 論文標題 RNA decay machinery safeguards immune cell development and immunological responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Immunology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.it.2021.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Taishin, Yamamoto Tadashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulation of Early Lymphocyte Development via mRNA Decay Catalyzed by the CCR4-NOT Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 715675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.715675	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishijima Hitoshi, Matsumoto Minoru, Morimoto Junko, Hosomichi Kazuyoshi, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin, Oya Takeshi, Tsuneyama Koichi, Yoshida Hideyuki, Matsumoto Mitsuru	4. 巻 208
2. 論文標題 Aire Controls Heterogeneity of Medullary Thymic Epithelial Cells for the Expression of Self-Antigens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100692	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Teruya, Hashikawa Chie, Okabe Kohtarō, Yokote Yuya, Chirifu Mami, Toma-Fukai Sachiko, Nakamura Narushi, Matsuo Mihoko, Kamikariya Miho, Okamoto Yoshinari, Gohda Jin, Akiyama Taishin, Semba Kentarō, Ikemizu Shinji, Otsuka Masami, Inoue Jun-ichiro, Yamagata Yuriko	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural analysis of TIFA: Insight into TIFA-dependent signal transduction in innate immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61972-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Taishin, Horie Kenta, Hinoi Eiichi, Hiraiwa Manami, Kato Akihisa, Maekawa Yoichi, Takahashi Akihisa, Furukawa Satoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 How does spaceflight affect the acquired immune system?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-020-0104-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito-Kureha Taku, Miyao Takahisa, Nishijima Saori, Suzuki Toru, Koizumi Shin-ichi, Villar-Briones Alejandro, Takahashi Akinori, Akiyama Nobuko, Morita Masahiro, Naguro Isao, Ishikawa Hiroki, Ichijo Hidenori, Akiyama Taishin, Yamamoto Tadashi	4. 巻 11
2. 論文標題 The CCR4-NOT deadenylase complex safeguards thymic positive selection by down-regulating aberrant pro-apoptotic gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19975-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Tatsuya, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 12
2. 論文標題 In Pursuit of Adult Progenitors of Thymic Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 621824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.621824	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenta Horie, Nobuko Akiyama, Taishin Akiyama
2. 発表標題 AIRE leaves footprints on chromatin for immunological self-tolerance
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya Ishikawa, Nobuko Akiyama, Taishin Akiyama
2. 発表標題 CXCR4 defines transit-amplifying cells of medullary thymic epithelial cells
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山 泰身
2. 発表標題 自己免疫を抑制する胸腺内 T 細胞選択機構
3. 学会等名 Rheumatology Conference 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山 伸子
2. 発表標題 胸腺腫の1細胞遺伝子発現解析
3. 学会等名 第41回日本胸腺研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahisa Miyao , Tatsuya Ishikawa, Kenta Horie , Yuki Takakura, Mio Hayama , Nobuko Akiyama, Taishin Akiyama
2. 発表標題 Integrative single cell RNA Seq and ATAC Seq Analysis of thymic epithelial cells revealed transit amplifying cells expressing AIRE
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taishin Akiyama
2. 発表標題 Single Cell RNA-seq Analysis of Human Thymic Epithelial Neoplasms
3. 学会等名 RIKEN IMS Joint Human and Mouse Cell Atlas Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taishin Akiyama
2. 発表標題 Single Cell RNA-seq Analysis of Human Thymic Epithelial Neoplasms
3. 学会等名 RIKEN IMS Joint Human and Mouse Cell Atlas Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関