

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659241

研究課題名（和文）胸腺髄質人工器官の構築による自己免疫疾患治療法開発への挑戦

研究課題名（英文）The challenge for the development of therapy for autoimmune disorder by the establishment of artificial thymic medullary organ

研究代表者

大東 いずみ (OHIGASHI IZUMI)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：00596588

研究成果の概要（和文）：胸腺上皮細胞の分化分岐機構の解明は、胸腺上皮細胞の再構築による自己免疫疾患の根本的な治療法開発へ向けての理論的基盤構築につながる。しかし、胸腺上皮細胞分化分岐機構はいまだ明らかにされていない点が多く残されている。そこで、胸腺上皮細胞の分化分岐を制御する分子・細胞機構を明らかにするために、レポーターマウスを用いた上皮細胞分化能追跡をおこなった。その結果、髄質上皮細胞は皮質上皮細胞特異的な胸腺プロテアソーム構成鎖である $\beta 5t$ を発現する前駆細胞から分化することが明らかになった。これらの結果は、胸腺微小環境の本質理解の一助になるとともに、自己免疫疾患の根本的な治療法開発へ向けての理論的根拠を提供しうる。

研究成果の概要（英文）：As a step toward the establishment of an artificial thymic organ which could contribute to the treatment of autoimmune disease, the differentiation potential of thymic epithelial cells was examined. The objectives of this examination were to understand the molecular and cellular mechanisms underlying the separate development of the thymic cortical epithelial cell and thymic medullary epithelial cell lineages. We generated mice that express the recombinase Cre instead of $\beta 5t$, a proteasome subunit that is abundant in thymic cortical epithelial cells and not detected in other cell types, including thymic medullary epithelial cells. By crossing $\beta 5t$ -Cre knock-in mice with loxP-dependent GFP reporter mice, we found that the vast majority of thymic medullary epithelial cells are differentiated from $\beta 5t$ -expressing progenitors. These results will help for the understanding of the nature of thymic microenvironment, and will give rational for the development of treatment for autoimmune disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：免疫寛容・自己免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは生体防御の要である。外来抗原を攻撃するだけではなく、自己生体構成物質に対する自己免疫寛容性は、生体防御を担う上でも重要な性質である。胸腺髄質上皮細胞は、末梢組織に存在する組織特異的タンパク質を発現し、成熟過程にあるTリンパ球に抗原として提示することによって「負の選択」により自己反応性細胞を排除するため、自己免疫寛容の成立に必須な役割を担っている (Derbinski, et al. Nat. Immunol 2:1032, 2001)。胸腺髄質での負の選択が不完全であると、自己反応性Tリンパ球が胸腺から移出され、自己免疫疾患を引き起こす。申請者らはこれまでに、自己免疫寛容の成立と胸腺髄質に注目した研究をおこなっており、ケモカインであるCCR7によるTリンパ球の皮質から髄質への誘導が、自己免疫寛容の成立に必須であることを示してきた (Immunity 24:165, 2006)。また、サイトカイン RANKL が胸腺髄質細胞の増殖と髄質形成に関わり、自己寛容の成立を担っている分子であることを示した (Immunity 29:438 2008)。

一方、胸腺が末梢Tリンパ球に対して与える影響に関してはほとんど研究されていない。しかし、胸腺髄質には、循環血流を介して末梢Tリンパ球が再移入することが知られており (Kirberg, et al. J. Immunol 181:1207, 2008)、そのメカニズムと生理的意義は解明されていないが、胸腺髄質の末梢Tリンパ球に対する何らかの役割が期待される。

これらの知見に基づき、胸腺髄質上皮細胞を用いた人工免疫器官を構築することにより、末梢自己反応性Tリンパ球に対する「負の選択」が可能なのではないか、との仮説をたてるに至った。

2. 研究の目的

胸腺上皮細胞は、皮質と髄質とに分かれ、複雑な3次元ネットワークである胸腺微小環境を形成し、Tリンパ球の分化・成熟を厳密に制御している。胸腺髄質は、Tリンパ球の自己免疫寛容性の獲得の場であり、皮質で正の選択を受けた細胞のうち、組織特異的抗原に強く反応する自己反応性Tリンパ球を負の選択により除去する。また、胸腺髄質には、末梢Tリンパ球が循環血流を介して胸腺に再移入することが知られているが、その生理的意義はよく分かっていない。

そこで本研究では、これらの胸腺髄質の特性に着目し、自己反応性Tリンパ球アフェレ

シス(濾過除去)を担うべく胸腺髄質上皮細胞を用いた人工免疫器官を構築し、自己免疫疾患に対する根本的治療法の開発を模索する。

また、胸腺髄質上皮細胞は、胸腺皮質上皮細胞と共通の前駆細胞から分化することが知られている (Rossi, et al. Nature 22: 988, 2006; Bleul et al, Nature 22: 992, 2006)。髄質上皮細胞の分化・増殖には、サイトカイン RANKL を含む Tumor necrosis factor ファミリー分子やNF κ Bシグナルが重要な因子として同定されているが、上皮前駆細胞からどのように機能の異なる髄質・皮質上皮細胞へと分化するのか、その分岐機構は不明な点が多い。そこで、機能的な髄質上皮細胞による人工胸腺器官構築への手がかりとして、胸腺上皮前駆細胞から髄質上皮細胞への分岐機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 人工胸腺器官構築方法の模索

野生型マウス、および、胸腺過形成を呈することが知られている Keratin5 プロモーター下に細胞周期制御因子である CyclinD1 をつないだトランスジェニックマウスの胸腺から胸腺髄質上皮細胞を単離し、髄質上皮細胞のみ、または、マウス胸腺間葉系細胞由来のストローマ細胞株と髄質上皮細胞の混合物を、高分子生体材料であるコラーゲンスポンジに播種した。また、野生型マウスの胸腺からリンパ球を除き、上皮細胞を含むストローマ細胞をコラーゲンスポンジに播種した。コラーゲンスポンジは、3種類を試用した。これらを、マウスの腎臓皮膜下に移植し、移植後3週目に移植片の組織解析をおこなった。さらに、コラーゲンスポンジに代わる高分子生体材料としてアルギネートを用い、同様の実験をおこなった。

(2) 胸腺髄質上皮細胞分化機構解析

上皮細胞分化早期から発現し、胸腺皮質上皮細胞特異的に発現する胸腺プロテアソーム構成鎖 β 5t の遺伝子座に Cre をノックインしたマウスを作製した。さらに β 5t-Cre ノックインマウスを、CAG プロモーター下に loxP-stop-loxP-EGFP をつないだトランスジェニックマウスと交配することにより、現在または過去に β 5t を発現した細胞を EGFP 発現にてトレースすることができるマウスを作製した。このマウスにおける EGFP の発現を、フローサイトメトリー解析および組織解析により検討した。

4. 研究成果

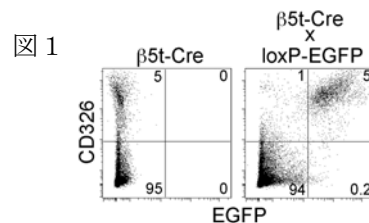
(1) 人工胸腺器官構築方法の模索

細胞と接着することで組織構造を構築しうる細胞外マトリックスの構造を模倣した足場としてコラーゲンスポンジを用い、野生型マウス胸腺より単離した髄質上皮細胞、胸腺髄質上皮細胞増殖因子であるRANKLを過剰発現させたマウス胸腺間葉系細胞由来Tst4細胞と胸腺髄質上皮細胞との混合細胞、および、上皮細胞を含む胸腺ストローマ細胞をコラーゲンスポンジに播種し、腎臓被膜下に移植した。移植片をヘマトキシリン-エオシン染色したところ、移植片に細胞の集合が確認された。しかし、移植細胞をフローサイトメーターで解析した結果、上皮細胞マーカであるCD326陽性細胞は検出されたが、胸腺髄質上皮細胞マーカであるUEA1は陰性であった。また、移植細胞からmRNAを抽出し、CD326および、胸腺髄質上皮細胞で発現し、自己免疫寛容の確立に關与する転写因子であるAireの発現を調べたところ、CD326の発現は検出されるものの、胸腺から単離したばかりの胸腺髄質上皮細胞での発現と比較すると発現が低下しており、さらには、Aireの発現は検出されなかった。また、コラーゲンスポンジの代わりとして、アルギネートを用いて同様の実験をおこなったが、胸腺器官様構造は形成されなかった。さらに、野生型マウスと同様に、K5-CyclinD1トランスジェニックマウスの胸腺髄質上皮細胞を用いた同様の実験においても、機能的な髄質上皮細胞を含む胸腺器官は形成されなかった。これらの結果から、コラーゲンスポンジやアルギネートなどの生体材料は、機能的な胸腺髄質上皮細胞の増殖および維持に適していないことが明らかになった。さらに、単離した胸腺髄質上皮細胞は、胸腺髄質上皮細胞増殖因子であるRANKL存在下においても、髄質上皮細胞としての性質を失うことが明らかとなった。

(2) 胸腺髄質上皮細胞分化機構解析

胸腺上皮細胞分化の早期から発現し、胸腺皮質上皮細胞特異的に発現する胸腺プロテアソーム構成鎖 $\beta 5t$ の遺伝子座に Cre をノックインしたマウスを作製した。このマウスにおける Cre の発現は、胸腺皮質上皮細胞特異的に検出され、髄質上皮細胞やリンパ球を含め、他の臓器では発現がみられなかった。また、この $\beta 5t$ -Cre ノックインマウスでは、 $\beta 5t$ 遺伝子の発現が欠損していることが予想され、これまでに報告されている $\beta 5t$ 欠損マウスと同様、CD8 陽性 T リンパ球が減少していることが考えられる。そこで、 $\beta 5t$ -Cre ノックインマウスの胸腺における T リンパ球分化について検討したところ、ホモ接合体マウ

スでは、CD4 陰性 CD8 陽性 T リンパ球が野生型マウスやヘテロ接合体マウスの 20%まで減少していた。これらの結果から、 $\beta 5t$ -Cre ノックインマウスにおける Cre の発現は、 $\beta 5t$ の発現を忠実に再現することが確認された。そこで、 $\beta 5t$ を現在または過去に発現した細胞を EGFP 発現にてトレースするために、 $\beta 5t$ -Cre ノックインマウスを EGFP レポーターマウスと交配しマウスを作製した。このマウスにおける EGFP の発現をフローサイトメーターで解析したところ、EGFP の発現は胸腺特異的にみられ、他の臓器における発現は検出されなかった。また、胸腺における EGFP の発現は、CD326 陽性である上皮細胞特異的に検出され(図 1)、上皮細胞での EGFP の発現は、胸腺皮質上皮細胞のみならず、ほとんどの髄質上皮細胞でも検出された。



さらに、胎仔期における EGFP の発現について、免疫染色で検討をおこなった。胎生期における $\beta 5t$ の発現は胎生 12.5 日頃から検出されることが報告されている (Ripen, et al, Eur J Immunol 41:1278, 2011)。 $\beta 5t$ -Cre x loxP-EGFP マウスにおける EGFP の発現も、胎生 12.75 日には検出された。おもしろいことに、少数の EGFP 陽性細胞では $\beta 5t$ タンパクが発現しておらず、これらの細胞は髄質上皮細胞の発現が始まることが知られている胸腺の中央部で検出された(図 2)。

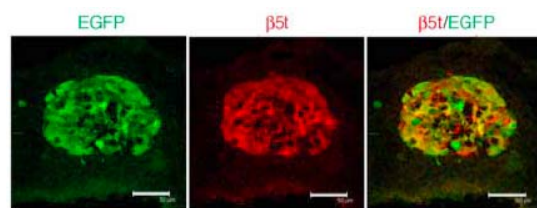


図 2

この結果と相関して、胎生 12.75 日齢の胸腺の中央部で、髄質上皮細胞マーカである Keratin5 陽性細胞で EGFP の発現が検出され、胎生期の胸腺髄質上皮細胞は、髄質上皮細胞への分化過程で $\beta 5t$ を発現した細胞であることが示唆された。さらに、機能的な胸腺髄質上皮細胞の代表として、Aire を発現する胸腺髄質上皮細胞における EGFP の発現を検討した。Aire の発現は、胎生 16.5 日齢頃から始まり、長期にわたる自己免疫寛容性の確立

には、新生仔期における Aire の発現が重要である。胎生 16.5 日齢、および生後 1 日齢の $\beta 5t$ -Cre x loxP-EGFP マウスでは、成獣マウスと同様に、90%以上の Aire 陽性髄質上皮細胞で EGFP の発現が陽性だった。これらの結果から、免疫寛容性の確立に重要な機能的な髄質上皮細胞は、皮質特異的な分子である $\beta 5t$ を発現する前駆細胞から分化するということが明らかとなった (PNAS, 2013, In press)。

これらの結果は、胸腺微小環境の本質理解の一助になるとともに、自己免疫疾患の根本的な治療法開発へ向けての理論的根拠を提供しうる。

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 6 件)

- ① Ohigashi I, Saulius Z, Sakata M (他6名) Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from $\beta 5t$ -expressing progenitor cells, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2013、査読有、In press.
- ② Takada K, Ohigashi I (他3名) Development and function of cortical thymic epithelial cells. Current Topics Microbiology and Immunology, 2013、査読有、in press.
- ③ Lkhagvasuren E, Sakata M, Ohigashi I, Takahama Y. Lymphotoxin β receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells. The Journal of Immunology、査読有、vol. 190、2013、pp. 5110-5117、DOI: 10.4049/jimmunol.1203203.
- ④ Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y The development of T lymphocytes in fetal thymus organ culture. Methods in Molecular Biology、査読有、Vol. 943、2013、pp.85-102 DOI: 10.1007/978-1-62703-128-8_6.
- ⑤ Nakagawa Y*, Ohigashi I*, Nitta T*, Sakata M*, (他4名) Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor α rearrangement in cortical thymocytes.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA、査読有、Vol.109、2012、pp. 20572-20577、DOI: 10.1073/pnas.1213069109. (*equal contribution)

- ⑥ Roberts NA (他21名、16番目)、Rank signaling links the development of invariant $\gamma \delta$ T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium, Immunity、査読有、Vol.36、2012、pp.427-437 DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.016.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大東いずみ、Analysis of cortical and medullary bifurcation mechanisms in thymic epithelial cells using cortical thymic epithelial cell-specific $\beta 5t$ -Cre knock-in mice、第41回日本免疫学会総会、2012. 12. 5、神戸国際会議場(兵庫県)
- ② 大東いずみ、胸腺皮質上皮細胞特異的 $\beta 5t$ 遺伝子座にCreをノックインしたマウスの作製、第22回 Kyoto T cell conference、2012. 7. 6、和順会館(京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大東 いずみ (OHIGASHI IZUMI)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教
研究者番号: 00596588

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高浜 洋介 (TAKAHAMA YOUSUKE)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授
研究者番号: 20183858

新田 剛 (NITTA TAKESHI)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・講師
研究者番号: 30373343