

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659246

研究課題名(和文) 脱分化型胸腺上皮細胞株を用いた自己・非自己識別制御の解析とその検証

研究課題名(英文) Analysis and varification on self-and nonself-recognition mechanism in progenitor like thymic epithelila cell lines

研究代表者

笠井 道之 (KASAI, Michiyuki)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・学術研究員

研究者番号：10194705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：胸腺を構成する上皮細胞膜上の自己ペプチド+MHC分子複合体は胸腺内T細胞分化に重要な役割を果たすが、その発現を制御する分子機構の理解はまだまだ不十分である。胎仔胸腺から単層培養法で樹立した複数の胸腺上皮細胞株は機能性分子FoxN1を発現していなかった。胎児胸腺を消化酵素で分散した上皮細胞分画を一定期間凝集培養するとその細胞は培養開始時と同程度のFoxN1を発現したが、FoxN1発現誘導した胸腺上皮細胞株と同様に胸腺再構築能力をほとんど有していなかった。今後は、FoxN1を恒常的に発現する胸腺上皮細胞株で胸腺再構成能力と自己ペプチドとMHC分子複合体の発現制御を調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：The complexes consisting of self-peptides plus MHC molecules on thymic epithelial cells play important roles for intrathymic T cell-development. However, the molecular mechanisms for formation and expression of such complexes are not understood well. Firstly, it was revealed that thymic epithelial cell lines established by monolayer culture hardly expressed FoxN1, one of functional molecules for T cell-development. In turn, upon aggregation culture of an epithelial cell-fraction prepared from fetal thymus, the epithelial cells expressed the almost same FoxN1-expression level as that in freshly isolated epithelial cells. Those epithelial cells as well as the FoxN1-inducible epithelial cell lines hardly had an ability to re-construct thymic microenvironment. In future, I am going to proceed with the two plans, the establishment of thymic epithelial cell lines stably expressing FoxN1 and the investigation for formation and expression mechanisms of the MHC complexes in these cell lines.

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：胸腺上皮細胞株 胸腺皮質上皮細胞 胸腺髄質上皮細胞 胸腺微小環境 MHC複合体 自己抗原 自己ペプチド

1. 研究開始当初の背景

胸腺内では胸腺上皮細胞を主体に構成される微小環境で未熟 T 細胞の分化・選択の制御が行われる。その選択過程は分化途上の T 細胞上の T 細胞受容体と胸腺を構成する多様な皮質および髄質上皮細胞サブセット上の提示された自己抗原分子由来ペプチド + MHC 分子複合体との相互作用により制御され、MHC 拘束性と自己寛容性を獲得した T 細胞へと成熟する。しかし、胸腺上皮細胞の各サブセットにおける自己抗原分子由来ペプチド + MHC 分子複合体形成と提示に関する分子制御機構に対する理解はいまだ不十分である。胸腺上皮から脱分化型の上皮細胞株を樹立し、それらの細胞株から多様な胸腺皮質および胸腺髄質上皮細胞サブセットへ再分化誘導可能な培養系を構築する。その 2 つの培養系の間で、分化した各胸腺上皮サブセットの自己抗原分子の発現制御機構および抗原提示制御機構を比較解析し、複合体形成の分子制御機構について新規知見を得る。さらに、それらの細胞株を用いた胸腺器官培養法でその新規知見の重要性を検証する。胸腺自己抗原分子由来ペプチドと MHC 分子との複合体形成の分子制御機構に関する本質的な知識構築を目指した。

2. 研究の目的

胸腺内部における微小環境（胸腺微小環境）は、骨髄由来の T 前駆細胞が胸腺内に移住した後、分化・成熟し T 細胞レパートリーを形成するまでのプロセスを支持するケモカイン、サイトカイン、接着分子および自己ペプチドと MHC 分子との複合体（自己ペプチド MHC 複合体）などの“機能分子”を提供する“場”である。その胸腺内微小環境の主要構成細胞が胸腺上皮細胞である(Y. Takahama, 2012)。胸腺上皮細胞に発現する機能分子に関する研究は、胸腺を消化酵素処理により分散した細胞をセルソーターで分画し、ストローマ細胞や未熟 T 細胞と凝集・器官培養した後、機能分子の発現を解析すると共に微小環形成能力や未熟 T 細胞の分化・選択を制御する機能を解析し、さらに機能分子の発現について胸腺の組織学的検証を加える手法が採られてきた。ところが、分離可能な細胞数は胸腺全体の細胞数の 0.1%以下にすぎず、この程度の細胞数では機能分子の分子制御機構を分子生物学的あるいは生化学的な解析によって十分検証することは困難である。皮質および髄質上皮細胞サブセット上の自己抗原分子由来ペプチドと MHC 分子との複合体は、分化途上の T 細胞

がその複合体との相互作用によって CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞サブセットへの分化および MHC 拘束性と自己寛容性を有する T 細胞受容体レパートリーを形成する上で重要なリガンドである。しかし、分子生物学的あるいは生化学的解析に適した均一性と細胞数を安定的に調製することが難しいため、各皮質と髄質上皮細胞サブセットにおける自己抗原分子由来ペプチドと MHC 分子との複合体形成の分子制御機構に対する理解はいまだ十分ではない。この研究は、これまでに樹立した胸腺上皮細胞株の機能性分子の発現に関する再調査を含め、機能性分子を発現するあるいはその発現を誘導することができる新たな胸腺上皮細胞株の樹立を試み、機能性の評価、検証を行い、未熟 T 細胞の分化・選択の制御における胸腺自己抗原分子由来ペプチド + MHC 分子複合体形成の分子制御機構に関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

平成 23 年度：低 Ca^{2+} 濃度 MEM 培地（SMEM 培地）を使用し単層培養法で胎生 15 から 16 日目の胸腺からサイトケラチン 5 および 8 を指標にクローン化したサイトケラチン 5 陰性 8 陽性の胸腺皮質部由来上皮細胞株（TEC1-4C18, TEC1-2）およびサイトケラチン 5 陽性 8 陰性の髄質部由来上皮細胞株（TEC1C6, TEC3-10）を用いて(M. Kasai, 1991) (Figure 1) これまでに報告された胸腺上皮細胞における上皮細胞のマーカー分子および機能性分子の発現程度について、フローサイトメーターと定量的 PCR 法により調べた。

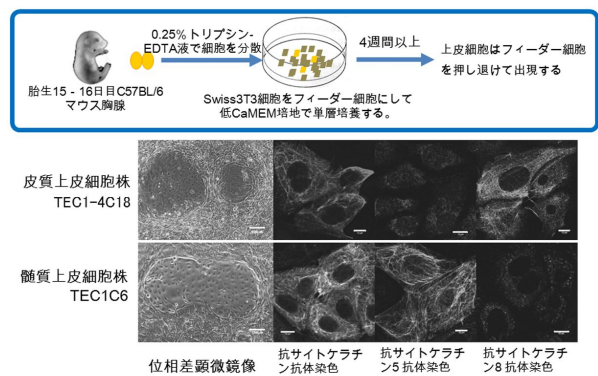


Figure 1: 低 Ca^{2+} 濃度 MEM 培地 (SMEM 培地) を使用し単層培養法で胎生 15 から 16 日目の胸腺からサイトケラチン 5 および 8 を指標にクローン化したサイトケラチン 5 陰性 8 陽性の胸腺皮質部由来上皮細胞株 (TEC1-4C18) およびサイトケラチン 5 陽性 8 陰性の髄質部由来上皮細胞株 (TEC1C6) を樹立した。

平成 24 年度： $\beta 5t$ の発現をコードする領域に緑蛍光タンパク質 (Venus) をノックインしたアレルを持つトランスジェニックマウスのヘテロ接合体マウス ($\beta 5t^{Venus/+}$ マウス) の胎生 15 日目胸腺を消化酵素で分散し浮遊状態にした後に単層培養した場合と再凝集し培養

した場合との間で胸腺上皮細胞における上皮細胞のマーカー分子および機能性分子の発現程度について、フローサイトメーターと定量的 PCR 法により調べた。さらに、凝集培養した EpCAM 陽性 EGFP 強陽性細胞を胎生 15 日目胸腺から調製した細胞と共に凝集塊を作り、5 週齢の C57BL/6 野生型マウス腎臓皮膜下に移植し胸腺再構成能力を調べた。機能性分子発現量の減少程度の経時変化については、胎生 15 日目の C57BL/6 マウス胸腺を消化酵素で分散し浮遊状態にし、その状態で 37 °C CO₂ 恒温槽で培養した場合と一度凝集した状態で培養した場合との間で一定時間ごとに細胞を回収し、全 RNA 抽出した後 cDNA を調整し定量的 PCR 法を行い、機能性分子発現量を調べた。

平成 25 年度: Doxycyclin の投与により全身性に Oct-4 の発現するマウス (Hohhdlinger, 2005) の胎生 15 日目、18 日目の胸腺と生後 18 週目の胸腺から単層培養によりサイトケラチン 5 陽性の上皮細胞株を樹立し、Oct-4 発現に伴い発現が制御される転写因子と胸腺機能性分子の発現程度について定量的 PCR 法により調べた。

4. 研究成果

平成 23 年度: IFN- γ を加えた SMEM 培地で培養した場合、両者の上皮細胞株は MHC クラス II 分子とその関連分子 (CD80 分子, インヴァリアント鎖, H2-DM 分子) と自己抗原ペプチドの産生に關与する機能性分子 (lysosomal protease 類など) を発現することは既に報告した (M. Kasai 2000)。そこで、MHC クラス I 分子とそれに結合する自己抗原ペプチドの産生に關与するプロテアソームの発現を IFN- γ 存在あるいは非存在の SMEM 培地で培養し MHC クラス I 分子の発現量を調べた。培養後両者の上皮細胞株は IFN- γ 存在下で培養した後に MHC クラス I 分子の発現量の増加が認められた (Figure 2)。

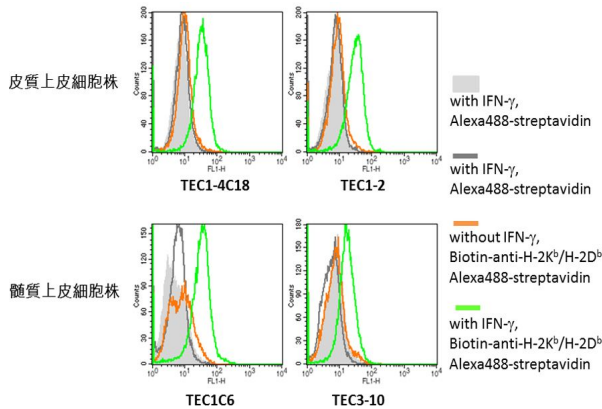


Figure 2: IFN- γ 存在あるいは非存在の SMEM 培地で培養し MHC クラス I 分子の発現量を調べた。培養後両者の上皮細胞株は IFN- γ 存在下で培養した後に MHC クラス I 分子の発現量の増加が認められた。

MHC クラス I 分子と結合する抗原ペプチドの産生に關与するプロテアソーム $\beta 5$ サブユニット異性体の発現程度をウェスタンブロット法により調べた。 $\beta 5$ サブユニットは IFN- γ の存在下あるいは非存在下で培養した後に調べた全ての皮質・髄質に由来する上皮細胞株に検出された。 $\beta 5i$ サブユニットは IFN- γ の存在下で培養した場合に発現が認められた。 $\beta 5t$ サブユニットは胸腺皮質上皮細胞特異的に発現が認められることが報告されているが、上皮細胞株の場合、IFN- γ 存在に關係なくその発現が認められなかった

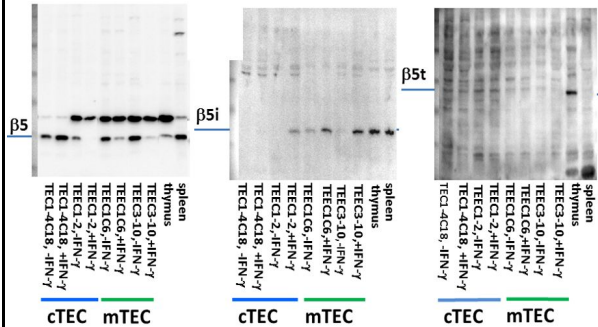


Figure 3: $\beta 5$ サブユニットは IFN- γ の存在下あるいは非存在下で培養した後に調べた全ての皮質・髄質に由来する上皮細胞株に検出された。 $\beta 5i$ サブユニットは IFN- γ の存在下で培養した場合に発現が認められた、あるいは発現程度が増加した。 $\beta 5t$ サブユニットは胸腺皮質上皮細胞特異的に発現が認められることが報告されているが、皮質・髄質に由来する上皮細胞株を用いて IFN- γ の存在下あるいは非存在下で培養した後にその発現を調べたが、どの場合でもその発現が認められなかった。

(Figure 3)。

$\beta 5t$ サブユニット以外に胸腺上皮細胞特異的なマーカー分子および機能性分子の発現程度を調べるために、IFN- γ の存在下あるいは非存在下で培養した皮質と髄質上皮細胞株から全 RNA を調製し、これまでの報告された胸腺上皮細胞マーカー分子 EpCAM、皮質上皮細胞特異的なマーカー分子 CD205、皮質上皮細胞特異的な機能性分子 $\beta 5t$ サブユニットと Tssp および髄質上皮細胞特異的な機能分子 RANK と Aire の PCR プライマーを用いてそれらの発現程度を定量的 PCR 法で調べた。EpCAM は IFN- γ の存在下あるいは非存在下で培養した後の皮質と髄質由来上皮細胞株にその発現が認められたが、CD205 は両者共にその発現程度は低かった。機能性分子の発現については、皮質と髄質胸腺上皮細胞への系列決定と分化・増殖に必要な転写因子 FoxN1 は両者胸腺上皮細胞株においてその発現量は低レベルであり、皮質上皮細胞株は自己抗原のプロセッシングで機能するプロテアーゼ (thymoproteasomes を構成する $\beta 5t$ サブユニットおよび Tssp) をほとんど発現せず、髄質上皮細胞株も髄質上皮細胞の分化・成熟に働く RANK 分子および自己組織に特異的な抗原の発現に必須な転写因子 Aire を発現していないことが判明した (Table 1)。

	mRNA expression measured by quantitative PCR						
	Foxn1	EpCAM	CD205	beta5t	TSSP	Rank	Aire
Day15 Fetal Thymus	1	1	1	1	1	1	1
TEC1-4C18 (cTEC)	2.14E-03	20.8	0.154	4.47E-05	6.61E-04	6.93E-05	1.91E-05
	1.14E-03	19.0	0.170	2.13E-03	3.35E-05	ND	ND
	0.0158	20.8		4.73E-04			
+IFN-γ	2.99E-03	20.0	0.559	2.32E-05	0.0004	8.07E-05	1.04E-05
	2.49E-03	13.7	1.22	3.21E-04	7.54E-05	ND	ND
	0.0158	16.8		7.27E-04			
TEC1C6 (mTEC)	0.245	8.51	1.65E-03	7.49E-05	0.130	1.79E-05	3.91E-06
	0.258	12.1	7.28E-04	1.88E-04	0.117	ND	1.44E-04
	0.459	12.9		7.44E-04			
+IFN-γ	0.0993	5.55	1.08E-03	1.56E-05	3.34E-03	2.34E-05	8.30E-06
	0.0642	10.2	9.63E-03	2.30E-04	0.0412	ND	ND
	0.786	12.8		1.29E-03			

Table 1: IFN-γの存在下あるいは非存在下で培養した皮質と髄質上皮細胞株から全RNAを調製し、これまでの報告された胸腺上皮細胞マーカー分子EpCAM、皮質上皮細胞特異的マーカー分子CD205、皮質上皮細胞特異的機能性分子β5tサブユニットとTsspおよび髄質上皮細胞特異的機能性分子RANKとAireのPCRプライマーを用いてそれらの発現程度を定量的PCR法で調べた。

以上の結果は、単層培養法で樹立した胸腺皮質部由来および髄質部由来上皮細胞株はサイトケラチン5と8およびEpCAMの形態的な上皮細胞分子マーカーの発現は明瞭に認められたが、胸腺上皮細胞の機能性分子マーカーの発現量は低いことが明らかになった。

平成24年度：胎仔胸腺を浮遊状態にした後、単層培養を行って樹立した胸腺皮質部および髄質部上皮細胞株は機能分子をほとんど発現しないことが判明したが、一方、胎仔胸腺から消化酵素で一度分散した上皮細胞分画を再凝集して培養した場合、胸腺内T細胞分化を支持する能力を有していることは我々を含め多くの研究者により示されており(G. Anderson, 1993)、胸腺上皮細胞内の機能分子が発現するあるいはその発現が維持されていると考えられた。そこで、β5t^{venus/-}マウスの胎生15日目胸腺を消化酵素で分散し浮遊状態にした後単層培養した場合と浮遊状態の細胞を再凝集し培養した場合とで機能分子β5tの発現量の時間変化をGFP蛍光タンパク質の蛍光強度を指標に調べた。

浮遊状態にした直後から一日以内にその蛍光強度は減少する。続いて単層培養を行った場合はその蛍光強度はわずかに上昇するに留まるが、凝集培養を行った場合は蛍光強度が上昇することを見出した。浮遊状態にしてからセルソータによりEpCAM陽性EGFP陽性分画を分取し、その細胞分画を4日間単層培養および5日間凝集培養した後、各細胞培養群から全RNAを調製し機能分子について定量的PCRを行った。単層培養の場合はFoxN1分子をはじめとする機能性分子の発現が著しく低下するが、凝集培養の場合はFoxN1分子をはじめとする機能性分子の発現量は胎仔胸腺を直接培養した場合と同程度が最大で1/10程度の減少に留まった(Table 2)。

	Foxn1	CD205	beta5t	RANK	Aire	VCAM1	DLL1
	beta5t ^{+/+} _RTOC_5d	18.1	11.2	16.3	6.1	1.54	21.1
	29.6	13.1	10.8	7.32	5.41	14.3	22.2
	16.4	9.42	35.5	7.19	1.27	5.26	7.54
	31.6	21.6	24.5	4.11	5.41	18.8	16.2
	14.3	6.28	20.5	8.07	2.85	3.88	5.61
	3.43	3.03	5.72	5.79	0.275	1.29	1.57
beta5t ^{+/+} _mono_4d	0.306	0.739	0.0121	0.519	N.D.	0.0219	0.235
	0.331	0.727	0.0136	0.559	0.0014	0.0181	0.226
beta5t ^{+/+} _FTOC_5d	39.1	21.9	14.1	55.1	9.63	10.1	33.8
	34.5	15.3	5.498	69.1	28.2	12.7	12.3
	45.6	7.88	10.7	53.4	22.8	8.03	15.9

Table 2: 浮遊状態にしてからセルソータによりEpCAM陽性EGFP陽性分画を分取し、その細胞分画を4日間単層培養(mono)および5日間凝集培養(RTOC)した後、各細胞培養群から全RNAを調製し機能分子について定量的PCRを行った。単層培養の場合はFoxN1分子をはじめとする機能性分子の発現が著しく低下していた。一方、凝集培養の場合はFoxN1分子をはじめとする機能性分子の発現量は胎仔胸腺を直接培養した場合(FTOC)と比べて同程度が最大で1/10程度の減少に留まった。

さらに、凝集培養したEpCAM陽性EGFP陽性細胞を胎生15日目胸腺から調製した細胞と共に凝集塊を作り、5週齢のB6野生型マウス腎臓皮膜下に移植したところ、6例中1例においてFTOCの場合と同程度の胸腺を形成し、内部にGFP陽性のメッシュワーク状の構造物構築が認められた(Figure 4)。

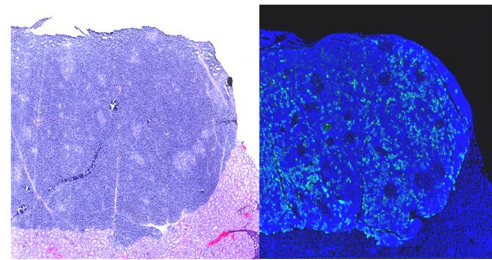


Figure 4: 凝集培養したEpCAM陽性EGFP陽性細胞を胎生15日目胸腺から調製した細胞と共に凝集塊を作り、5週齢のB6野生型マウス腎臓皮膜下に移植したところ、6例中1例においてFTOCの場合と同程度の胸腺を形成し、内部はGFP陽性のメッシュワーク状の構造物構築が認められた。

C57BL/6胎生15日目の胸腺を消化酵素で分散し浮遊状態にし、その状態で37°C CO₂恒温槽で培養した場合と一度凝集した状態で培養した場合との間で機能性分子の発現量の減少程度を定量的PCR法により調べた。浮遊状態で培養した場合に、胸腺上皮細胞機能性分子であるFoxN1分子、DLL4、β5tサブユニット、Tssp、RANK、Aireは時間と共に発現量の著しい減少が認められた。しかし、凝集状態で培養した場合、これら機能性分子の発現量の低下はわずかであった(Table 3)。

	mRNA expression measured by quantitative PCR						
	β5t	Foxn1	CD205	DLL4	VCAM	EpCAM	β-actin
0 min	100	100	100	100	100	100	100
15 min suspension	73.1	102	89.1	106	121	109	102
15 min aggregation	97.7	112	114	107	115	114	117
30 min suspension	56.0	73.0	81.7	86.0	98.8	123	135
30 min aggregation	82.0	114	108	93.7	122	122	125
60 min suspension	31.7	55.1	58.8	66.5	124	130	107
60 min aggregation	46.5	59.6	81.9	57.5	112	148	136

Table 3: C57BL/6胎生15日目の胸腺を消化酵素で分散し浮遊状態にし、その状態で37°C CO₂恒温槽で培養した場合と一度凝集した状態で培養した場合との間で機能性分子の発現量の減少程度を定量的PCR法により調べた。浮遊状態で培養した場合も凝集状態で培養した場合も、胸腺上皮細胞マーカー分子EpCAM、接着分子VCAM、MHC class I分子、およびβ-アクチン分子の発現量については著しい減少は認められなかった。一方、浮遊状態で培養した場合に、胸腺上皮細胞機能性分子であるFoxN1分子、DLL4、β5tサブユニット、Tssp、RANK、Aireは時間と共に発現量の著しい減少が認められた。しかし、凝集状態で培養した場合、これら機能性分子の発現量の低下はわずかであった。

平成25年：FoxN1は皮質と髄質胸腺上皮細胞への系列決定と分化・増殖に必要な転写因子あり、凝集培養はその発現を制御する可能性を示している。そこで、FoxN1を恒常的に発現する、あるいはその発現が誘導可能な胸腺上皮細胞株を樹

立し、凝集培養すれば、その細胞株は機能性分子を発現する可能性が高く、自己抗原の発現と自己抗原ペプチドとMHC分子との複合体形成制御について解析することが可能であると考えた。

Oct-4発現マウス胎仔胸腺から樹立した上皮細胞株はいずれもdoxycycline存在下で単層培養した場合、Oct-4転写因子を高いレベルで発現した。Oct-4転写因子と関連する脱分化関連遺伝子であるNanog転写因子もdoxycycline存在下で高いレベルの発現が認められた。しかし、Sox2転写因子については極めて低い発現レベルであった。一方、胸腺上皮細胞の分化に関係する転写因子についてはFoxn1、Six1、及びPax9の3つが明瞭な発現が認められた。特に、Foxn1はdoxycycline存在下よりも非存在下で発現の上昇が認められた (Table 4)。

	Expression Ratio of Transcriptional Factors						
	Oct-4	Nanog	Sox2	Foxn1	Six1	Pax1	Pax9
001,+DOX	1636	45.83	0.015	0.1285	3.554	0.2481	1.326
001,-DOX	0.172	30.67	0.0018	0.2973	4.225	0.0245	1.963
001,-DOX,+IFN- γ	0.1941	12.24	0.0211	0.7847	6.754	0.0856	1.666
002,+DOX	1.633	37.35	0.1045	0.3095	3.025	0.2566	0.8416
002,-DOX	0.185	45.32	0.0414	1.761	5.278	0.0893	0.8247
002,-DOX,+IFN- γ	0.137	20.46	0.0101	2.401	6.945	0.094	0.9632
011,+DOX	1443	129.4	0.0061	0.8049	2.437	0.0073	1.217
011,-DOX	0.1306	185.9	0.0103	3.389	1.28	0.0004	1.546
011,-DOX,+IFN- γ	0.142	115.3	0.0097	3.488	1.789	0.0016	0.898
021,+DOX	16126	0.9375	0.0126	0.5543	3.945	0.2135	3.345
021,-DOX	0.57845	1.309	0.0007	1.341	10.72	0.4413	4.249
021,-DOX,+IFN- γ	0.2349	0.1502	0.0044	1.583	17.05	0.6842	3.75
032,+DOX	2147	69.47	0.0036	1.946	4.534	0.4179	2.059
032,-DOX	0.2258	22.35	0.0129	2.233	5.258	0.0729	4.084
032,-DOX,+IFN- γ	0.0983	13.9	0.0038	1.574	5.004	0.054	2.447
040L01,+DOX	4406	12.25	0.0215	0.1639	2.757	0.3332	3.429
040L01,-DOX	0.0916	5.542	0.0089	0.5588	1.792	0.1712	2.207
040L01,-DOX,+IFN- γ	0.2103	8.647	0.004	0.6646	1.995	0.3834	2.079
Fetal thymus	0.1514	0.6864	0.0068	1.453	0.7414	0.6689	2.384
Adult thymus	1	1	1	1	1	1	1
mTEC1C6	0.3433	10.39	0.0087	0.7	0.4982	4.80E-05	2.622

Table 4: 次の3つの条件で培養した後、total RNAを抽出する。RT-PCR法を用いてfirst-strand cDNAライブラリーを作成した後、胸腺上皮細胞特異的遺伝子産物特異的プライマーを用いてQuantitative PCRを行った。

+DOX: doxycyclineを含有する培地 (10%FCS-SMEM+MEM+ 1mg/mL doxycycline) で継代培養を続けた場合。

-DOX: doxycyclineを含有する培地 (10%FCS-SMEM+MEM+ 1mg/mL doxycycline) で7日間培養した後、doxycyclineを含有しない10%FCS-SMEM+MEM培地で7-12日間培養した場合。

-DOX,+IFN- γ : doxycyclineを含有する培地 (10%FCS-SMEM+MEM+ 1mg/mL doxycycline) で7日間培養した後、doxycycline非存在下、500IU/mLのIFN- γ を加えた10%FCS-SMEM+MEM培地で7-12日間培養する場合。

即ち、上皮細胞株すべてにおいてOct-4を発現させて脱分化状態を誘導した場合はFoxn1の発現レベルは低いが、Oct-4を発現させない場合はFoxn1の発現レベルが上昇し胸腺上皮細胞が分化可能な状態になることが示唆された。そこで、胎仔胸腺から樹立した4つ細胞株 (001株,002株,011株,021株) を選び出し、doxycycline存在下单層培養した後β5tの発現をコードする領域に緑蛍光タンパク質 (Venus) をノックインしたアレラを持つトランスジェニックマウスのホモ接合体マウス (β5t^{venus/venus} マウス) の胎児胸腺ストローマ細胞と混合し細胞塊を形成した後、正常マウス腎臓皮下に移植し、4週間以降に開腹し、腎臓皮下に存在する胸腺の微小環境構造を調べた。樹立した4つの細胞株をそれぞれ胎児胸腺ストローマ細胞と混合し再構成した場合はいずれの

場合も胸腺の再構成を認めることはできなかった。この原因は凝集培養中と移植後のFoxn1の発現制御が十分でなかったことに加え、移植した細胞を特異的に検出する感度が不十分であることが考えられた。

現在は胸腺上皮細胞株に胸皮細胞分化系列を決定する転写因子Foxn1あるいは胸腺前駆上皮細胞や皮質上皮細胞に特異的に発現するサイモプロテアソームサブユニットβ5tをコードする遺伝子をEGFPレポーター遺伝子と共に導入し、フィーダー細胞と共に凝集培養しながらその発現レベルをフローサイトメーターで解析し、恒常的に転写因子を発現する細胞を選別・株化するプロセスを進めている。また、β5t分子は皮質上皮細胞に特異的に発現するサイモプロテアソームサブユニットであり皮質上皮細胞の自己抗原分子のプロセッシングに機能する分子であるが、最近Aire転写因子を発現する髄質上皮細胞サブセットを含む大部分の髄質上皮細胞はβ5t分子を発現する胸腺前駆上皮細胞に由来することが明らかになり (I. Ohigashi 2013) β5t分子は胸腺前駆上皮細胞の特異的な検出に有用なマーカー分子の一つであることが示唆されている。

従って、β5t分子上の異なるエピトープを認識する複数の単クローン抗体があれば、前駆上皮細胞の特異的な検出や皮質・髄質上皮細胞分岐チェックポイントの検出などの胸腺上皮細胞分化系列上における解析や自己抗原分子のプロセッシング分子制御機構の解析に有用と考えられた。そこで、β5t分子全長鎖またはβ5t分子のC末側ポリペプチド (242 a.a. -302 a.a.) の組み換え体産物を作製し、β5t-knock-out mouseにCFAと共に免疫することによりβ5t分子に対する単クローン抗体の作製を進めている。

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2件)

1. T. Ikeda, M. Kasai, E. Tatsukawa, M. Kamitakahara, Y. Shibata, T. Yokoi, TK. Nemoto, and K. Ioku. A bone substitute with high affinity for vitamin D-binding protein-relationship with niche of osteoclasts. J Cell Mol Med. 18(1):170-180, 2014. . 査読有
2. K. Takada, I. Ohigashi, M. Kasai, H. Nakasa and Y. Takahama
Development and Function of Cortical Thymic Epithelial Cells. Curr Top Microbiol Immunol. 373:1-17, 2013. . 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. M. Kasai, A. Bat-Erdene, and Y. Takahama
Cell-cell contact maintains $\beta 5t$ expression in cortical thymic epithelial cells.
第41回 日本免疫学会総会・学術集会
2012年12月5日、神戸国際会議場(兵庫県)
2. M. Kasai and Y. Takahama
Towards the establishment of functionally competent thymic epithelial cell lines.
The 3rd Workshop of Synthetic Immunology,
2012年5月18日、京都大学(京都府)
3. M. Kasai, H. Uono, and Y. Takahama
Expression profiles of beta 5 subunits in thymic epithelial cell lines.
第40回 日本免疫学会総会・学術集会
2011年11月27日、幕張メッセ(千葉県)

〔図書〕(計1件)

1. M. Kasai, Y. Nakagawa, K. Kondo, and Y. Takahama.
Article Title: Thymus
Encyclopedia of Human Biology (3rd Edition)
(HUBI 001800), ELSEVIER Inc., in press

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・
学術研究員

笠井 道之 (KASAI, Michiyuki)

研究者番号：10194705

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：