

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590580

研究課題名(和文) 胸腺髄質上皮幹細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of medullary thymic epithelial stem cells

研究代表者

濱崎 洋子 (Hamazaki, Yoko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10362477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は今回、自己複製能を有する胸腺髄質上皮細胞の幹細胞(mTECSC)をマウス胸腺から同定することに成功しました。胸腺髄質上皮細胞の形成不全に起因する自己免疫疾患を発症するマウスにmTECSCを移植すると、個体のほぼ生涯にわたり正常な髄質上皮細胞を供給し続け、疾患の発症をほぼ完全に抑制することができました。また、胸腺退縮に先行してmTECSCの活性が低下すること、その一方でT細胞側の異常によりT細胞産生ができないマウスでは、その活性が年をとっても高く維持されていることが明らかになりました。以上の結果は、胸腺組織の活動と免疫機能を制御する方法論の開発にも大きく貢献すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Medullary thymic epithelial cells (mTECs) are crucial for central T cell self-tolerance. We demonstrate that implantation of embryonic TECs expressing claudin-3 and claudin-4 (Cld3,4) in a medulla-defective thymic microenvironment restores medulla formation and suppresses multiorgan autoimmunity throughout life. A minor SSEA-1(+) fraction within the embryonic Cld3,4(hi) TECs contained self-renewable clonogenic TECs, capable of preferentially generating mature mTECs in vivo. Adult SSEA-1(+)Cld3,4(hi) TECs retained mTEC reconstitution potential, although the activity decreased. The clonogenicity of TECs also declined rapidly after birth in wild-type mice, whereas it persisted in Rag2 knock out adult mice with defective thymopoiesis. The results suggest that unipotent mTEC-restricted stem cells that develop in the embryo have the capacity to functionally reconstitute the thymic medulla long-term, thus ensuring lifelong central T cell self-tolerance.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 中枢性自己寛容 胸腺上皮細胞 幹細胞 胸腺退縮 自己免疫疾患 Aire

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺は T 細胞の産生と自己免疫寛容の成立に必須の中枢リンパ組織であり、主に正の選択を担う皮質領域と、負の選択を担う髄質領域とからなる。これまで胸腺細胞がナイーブ T 細胞へと分化を遂げる過程について、主に胸腺細胞側に発現する分子や液性因子の機能解析を通じて分子レベルで極めて詳細な解析がなされてきた。その一方で、この過程を制御する胸腺ストロマである胸腺上皮細胞 (Thymic epithelial cells: TECs) の発生・分化過程に関しては不明な点が多かった。

しかしながら近年、胸腺環境に関する研究に大きな進展がもたらされた。一つは自己免疫性多腺性内分泌不全症 I 型の原因遺伝子として同定された *Aire* の発見 (Annu Rev Immunol. 2009;27:287-312.) であり、今一つは胸腺皮質上皮細胞に特異的なプロテアソーム B5t の発見である (Curr Opin Immunol. 2008;20(2):192-6.)。これらの遺伝子の同定とその表現型解析は、胸腺上皮細胞側の単一遺伝子の異常あるいは発生・機能異常が、直接 T 細胞の発生異常や自己免疫疾患を誘導しうることを明らかにし、胸腺上皮細胞は自己を学ぶための MHC と増殖因子の供給、T 細胞系列へのコミットメントを担うだけでなく、T 細胞選択過程をより高次元で制御しうることを明らかにしたという点において、免疫学研究全般に対しても大きなインパクトをもたらした。

一方最近、各臓器を長期間維持する組織幹細胞が次々と同定されているが (Cell Stem Cell. 2010;7(6):656-70.)、胸腺組織では主に発生初期の胸腺原基に、髄質・皮質両方に分化可能な上皮前駆細胞および髄質・皮質各々の前駆細胞が存在することがこれまでに示されている (Eur J Immunol. 2009 Jul;39(7):1694-9.)。しかしながら、幹細胞を特徴付ける単一細胞レベルの自己複製能、組織中に長期間維持され生涯にわたる組織構造の維持に関わる能力の有無については示されておらず、幹細胞と呼ぶべき細胞の同定には至っていない。

申請者はこれまでに、管腔構造を有する重層上皮層からなる胸腺原基の最上層の上皮細胞に認められるクローディン (Cld) の発現が、その後も一貫して髄質上皮細胞 (medullary TECs: mTECs) の一部に維持されることを発見し、さらには胸腺発生初期過程のマウス胎児から Cld 陽性細胞を回収し移植実験を行うことによって、発生初期の Cld 陽性細胞が mTEC の前駆細胞であることを証明した (Nat Immunol. 2007;8(3):304-11.)。その後の研究で、この Cld 陽性 mTEC 前駆細胞に由来する成熟した mTECs が少なくとも数か月間、腎被膜下に移植した胸腺内で検出されることを見出している。胸腺上皮細胞の turnover が意外にも早く 2-3 週間であることに鑑みると (Blood. 2006;108(12):3777-85.)、胎

生期の Cld 陽性 mTEC 前駆細胞はマウス個体のほぼ生涯にわたって mTECs の恒常的な産生に貢献している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでの研究で同定した胎生期の Cld 陽性 mTEC 前駆細胞のポテンシャルを詳細に解析し、この分画が mTECs の long-term repopulating cells あるいは幹細胞を含む可能性について検証する。これにより、胸腺組織の維持・退縮機構の解明、さらには *Aire* 遺伝子の欠損・異常や mTEC の発生異常などに起因する自己免疫疾患に対する治療応用の可能性提示に資することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- 1) 胎生期 mTEC 前駆細胞分画の in vivo における mTEC 長期再構成能および機能的ポテンシャルの評価

発生初期に同定される Cld を発現する mTEC 前駆細胞の幹細胞としてのポテンシャルを明らかにするために、これを mTEC 発生の欠陥により自己免疫疾患を呈する *aly/aly* マウスの胸腺ストロマと混合して胸腺 organoid を作製し、それをヌードマウス腎被膜下に移植して、正常な胸腺髄質構造が形成されるか、髄質上皮の供給をどのくらいの期間維持できるか、自己免疫疾患の表現型を回避できるかについて検討した。

- 2) マウス胸腺上皮コロニーアッセイ法の確立と自己複製能の検討

マウス胸腺上皮細胞のコロニーアッセイを確立し、mTEC 前駆細胞分画のコロニー形成能について検討した。また、形成されたコロニーを継代することにより、最も重要な幹細胞の定義である自己複製能について検討を行った。

- 3) 胸腺退縮とコロニー形成能との関連性の検討

様々な週齢の胸腺上皮細胞のコロニー形成能を比較することにより、コロニー形成能が胸腺退縮の過程でどのように変化するのかを検討した。

## 4. 研究成果

上述した 1) 2) 3) に対応して記載する。

- 1) *Aire* 発現胸腺髄質上皮細胞を欠き臓器特異的自己免疫疾患を呈する *aly/aly* マウス胸腺に胎生期 mTEC 前駆細胞分画を移植すると、*Aire* 発現髄質上皮細胞をマウス個体の中で一年半以上にわたり供給可能であること

が明らかになった。また、この移植により *aly/aly* マウスで認められる臓器特異的自己免疫応答、すなわち末梢組織へのリンパ球の浸潤や自己抗体の産生等は、ほぼ完全に抑制可能であることが明らかになった。以上の結果から、胎生期 mTEC 前駆細胞分画は、中枢性自己寛容を担う機能的な髄質上皮細胞を個体のほぼ生涯にわたり維持可能な能力を有する細胞を含むことが示された。一般的に、臓器を構成する細胞の維持機構はターンオーバーの速さによって異なるとされている。例えば、比較的ターンオーバーの早い腸や皮膚では幹細胞が新たな細胞を産生することで維持されることが多く、肝臓や膵臓など細胞の回転の遅い臓器では分化した細胞が分裂することで維持される場合もある。胸腺上皮細胞のターンオーバーが比較的早いことに鑑みると、移植に用いた胎生期 mTEC 前駆細胞分画の中に、胸腺髄質上皮の幹細胞が存在する可能性が高いと考えられた。

2) 1) の結果を受けて、「マウス胸腺上皮コロニーアッセイ法」の確立を試みた。様々な条件検討を行い、フィーダー細胞にマイトマイシン C 処理した ST0 細胞を用い、3:1 mixture of DMEM, and Ham's F-12 培地に、10% KnockOut Serum Replacement (KSR)、0.4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  hydrocortisone, 10<sup>-10</sup> M cholera toxin (Wako), 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  insulin, 2  $\times 10^{-9}$  M 3,3,5-triiodo-L-thyronine, 10 ng ml<sup>-1</sup> recombinant mouse epidermal growth factor を添加した培地を用いることで、効率的に TEC コロニーを形成することが可能となった。この系を用いて、胎生 14 日齢の胸腺の mTEC 前駆細胞分画に、幹細胞の重要な定義である「自己複製能」を有する細胞がこの分画に含まれるか否かについて検証を行った。その結果、移植した ClD3,4 を発現する前駆細胞分画の中で、SSEA1 陽性の分画に高い *in vivo* 再構成能と *in vitro* 自己複製能を示す細胞が存在することが明らかとなった。これらの結果から、胸腺上皮の、特に髄質上皮の維持に関わる「幹細胞」と定義しうる細胞が初めて同定されるに至った。

3) 個体の加齢に伴い、獲得免疫応答能は低下し炎症性素因や自己免疫応答の増大といった傾向が徐々に顕著となるが、これらの兆候をまとめて「免疫老化」と呼ぶ。胸腺組織の退縮は、こうした免疫老化現象が顕著となる以前から起き、免疫系で最も早期に認められる加齢変化の一つである。胸腺組織における加齢変化は T 細胞側・ストロマ系、両方に認められるものの、最近の研究から胸腺退縮の原因は主にストロマである胸腺上皮細胞側に起因すると考えられており、ヒトでは 1 歳を過ぎるころからすでに胸腺ストロマの変化が始まっているとさえ言われる。こうした背景から、胸腺上皮の維持に関わる細胞の活性が、週齢と共にどのように変化するのか

を知ることは、胸腺退縮機構を理解する上で極めて重要であると考えられる。そこで、胸腺上皮細胞の *in vitro* コロニー形成能を、マウス胎齢・週齢追って検討を行った。その結果、非常に興味深いことに、コロニー形成能は生後すぐ急速に低下することが明らかとなった。胸腺上皮のターンオーバーが数週間であることを考えると、出生直後に起きる幹細胞の活性低下の影響は、3 - 4 週齢の時点で上皮細胞数の減少として現れ始めると想定されるが、これは胸腺組織の大きさ・上皮細胞の数がともに 4 週齢でピークとなりその後徐々に退縮に向かうという事実と矛盾しない。また興味深いことに、T 細胞産生が DN3 で停止している Rag2KO マウスでは成体でもコロニー形成能は高く保たれることが明らかになった。幹細胞の活性を反映すると想定される *in vitro* コロニー形成能が生後すぐ顕著に低下する分子メカニズムは現在のところ明らかではないが、以上の結果は、髄質上皮幹細胞の活性低下の原因は、加齢そのものではなく、出生前後に極めて活発に T 細胞産生を行った結果である可能性が高い。胸腺退縮のメカニズムやその意義はまだ議論の多いところであるが、我々のえた知見から、少なくともある一定の T 細胞産生をすることによって、胸腺髄質上皮幹細胞の活性、引いては胸腺の活動が抑制されることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. [Hamazaki Y, Sekai M, Minato N.](#) Medullary thymic epithelial stem cells: role in thymic epithelial cell maintenance and thymic involution. **Immunol Rev.** 2016 May;271(1):38-55. doi: 10.1111/imr.12412. Review. (査読有)
2. Baik S, Sekai M, [Hamazaki Y](#), Jenkinson WE, Anderson G. Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK<sup>+</sup> medullary epithelial progenitors. **Eur J Immunol.** 2016 Apr;46(4):857-62. doi: 10.1002/eji.201546253. (査読有)
3. [Hamazaki Y.](#) Adult thymic epithelial cell (TEC) progenitors and TEC stem cells – Models and mechanisms for the development and maintenance of thymic epithelial cells. **Eur J Immunol.** 2015 Nov;45(11):2985-93. doi: 10.1002/eji.201545844. Epub 2015 Sep 30. Review. (Invited review) (査読有)
4. Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, [Hamazaki Y](#), Minato N, Hollander GA,

- Takahama Y.  
Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors  
**Cell Rep.** 2015 Nov 17;13(7):1432-43.  
doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.012. (査読有)
5. Tahir S, Fukushima Y, Sakamoto K, Sato K, Fujita H, Inoue J, Uede T, Hamazaki Y, Hattori M, Minato N.  
A CD153+CD4+ T Follicular Cell Population with Cell-Senescence Features Plays a Crucial Role in Lupus Pathogenesis via Osteopontin Production.  
**J Immunol.** 2015 Jun 15;194(12):5725-35.  
doi: 10.4049/jimmunol.1500319. (査読有)
6. Doi K, Imai T, Kressler C, Yagita H, Agata Y, Vooijs M, Hamazaki Y, Inoue J, Minato N.  
Crucial role of the Rap G protein signal in Notch activation and leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia.  
**Sci Rep.** 2015 Jan 23;5:7978.  
doi: 10.1038/srep07978. (査読有)
7. Sekai M, Hamazaki Y, Minato N.  
Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance.  
**Immunity.** 2014 Nov 14; 41(5), 753–761.  
Correspondence  
doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.011. (査読有)
8. Mizuno R, Kamioka Y, Kabashima K, Imajo M, Sumiyama K, Nakasho E, Ito T, Hamazaki Y, Okuchi Y, Sakai Y, Kiyokawa E, Matsuda M.  
In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines.  
**J Exp Med.** 2014 Jun 2;211(6):1123-36.  
doi: 10.1084/jem.20132112 (査読有)
9. Nagatake T, Fujita H, Minato N, Hamazaki Y.  
Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine.  
**PLoS One.** 2014 Mar 6;9(3):e90638.  
Correspondence  
doi: 10.1371/journal.pone.0090638.  
(査読有)
10. Fujita H, Hamazaki Y, Noda Y, Oshima M, and Minato N.  
Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis  
**PLOS One.** 2012 7(12):e52272.
- Correspondence  
doi: 10.1371/journal.pone.0052272.  
(査読有)
- 【学会発表】(計 13 件)**  
招待公演のみ記載する
- 2016.3.3  
The Fifth Bizan Immunology Symposium at University of Tokushima (BISUT5)  
“Immune System Development, Deviation, and Regulation”  
Nichia Medical Hall, Kuramoto Campus, University of Tokushima  
Medullary thymic epithelial stem cells ensuring lifelong T-cell tolerance (招待講演)
- 2016.3.2  
Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems  
(Sponsored by MEXT Research Project on Analysis and Synthesis of Multidimensional Immune Organ Network and RIKEN IMS)  
Place: RIKEN Yokohama Research Institute 6F seminar room  
Medullary Thymic Epithelial Stem Cells Ensuring Lifelong Central T cell Tolerance (招待講演)
- 2015.9.25  
CiRA セミナー  
京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)  
Identification of Medullary Thymic Epithelial Stem Cells and Their Potential for Controlling Autoimmunity (招待講演)
- 2015.7.31  
CREATE 2015 (Cardio-Renal Interaction and Translational Research Enhancement)  
ロイヤルパークホテル (東京)  
胸腺における中枢性自己寛容の成立と胸腺退縮に伴う T 細胞の加齢変化 (招待講演)
- 2015.3.27  
日本薬学会 第 135 年会  
神戸学院大学 (神戸)  
シンポジウム「上皮を標的とした創薬研究の新展開」  
免疫系・内分泌系細胞に発現するクローニンとその意義 (招待講演)
- 2015.3.22  
日本抗加齢医学会 専門医・指導士認定委員会主催講習会 大阪国際会議場  
レクチャー  
免疫老化 (招待講演)

2015.2.7

第34回 日本胸腺研究会 相模原市立市民・大学交流センター ユニコムプラザさがみはら

ミニシンポジウム「胸腺の形成と維持 最近の話題」

中枢性免疫寛容を担う胸腺髄質上皮細胞の発生とその維持 (招待講演)

2014.12.10

第43回日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム

国立京都国際会館

Thymic microenvironments for T cell development and repertoire formation.

Identification of medullary thymic epithelial stem cells ensuring lifelong central T-cell tolerance (招待講演)

2014.12.10

第43回日本免疫学会学術集会 国立京都国際会館

オーバーヴュートーク

Thymic microenvironments: Basics, Progress and Future (招待講演)

2014.11.7

九州大学 生体防御医学研究所

The 24th Hot Spring Harbor International Symposium 「Recent Advance in Immunology and Inflammation」

Thymic Medullary Epithelial Stem Cells Ensuring Lifelong Central T-cell Tolerance (招待講演)

2014.7.19

第一回皮膚免疫カンファレンス 特別講演 東京

中枢性免疫寛容を担う胸腺上皮細胞の発生とその維持 (招待講演)

2014.7.10

第51回日本消化器免疫学会総会 教育講演 京都

中枢性免疫寛容を担う胸腺上皮細胞の発生とその維持 (招待講演)

2013.12.11.

第42回日本免疫学会学術集会 国際シンポジウム 千葉 幕張メッセ

Medullary thymic epithelial stem cells ensuring lifelong central T-cell tolerance (招待講演)

## 【図書】(計 4 件)

### 1. 濱崎洋子、湊長博

免疫老化 T細胞の加齢変化を中心に

腎臓内科・泌尿器科 in press 科学評論社

### 2. 濱崎洋子

T細胞の中枢性自己寛容を保證する胸腺髄質上皮幹細胞の同定とその制御

感染・免疫・炎症 45(4) 28-35 (2015) 羊土社

### 3. 濱崎洋子

中枢性自己寛容を保證する胸腺髄質上皮幹細胞と自己免疫疾患におけるその制御

実験医学 増刊 「自己免疫疾患」 33(12), 134-139 (2015) 羊土社

### 4. 瀬海美穂、濱崎洋子、湊長博

T細胞の中枢性自己寛容を生涯にわたり保證する胸腺髄質上皮幹細胞の同定

ライフサイエンス新着論文レビュー (2015)

DOI: 10.7875/first.author.2015.003

## 【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

濱崎 洋子 (HAMAZAKI, Yoko)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 10362477

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし