

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460577

研究課題名(和文) 胸腺微小環境の構築に対するAire機能の解明

研究課題名(英文) Expression of Ly6C/6G defines a novel Aire-dependent subset of medullary thymic epithelial cells with tolerogenic function

研究代表者

森本 純子 (MORIMOTO, Junko)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：20451396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺髄質上皮細胞(mTEC)は組織特異的自己抗原(TRA)を発現することによって、自己抗原と強く反応するT細胞に対して細胞死を誘導する(負の選択)。mTECはAireの発現を含め、主にその分化段階によっていくつかのサブセットに分類されている。私達は分化マーカー以外にmTECの多様性を特徴づける分子の探索を行った結果、新たにLy6ファミリー分子であるLy6CおよびLy6Gを発現するmTECが存在することを見いだした。さらにLy6C/6GがmTECの新たなマーカー分子となるとともに、Ly6C/6G陽性mTECが中枢性寛容の成立に重要な役割を担うサブセットであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Medullary thymic epithelial cells (mTECs) are a heterogeneous population in terms of the spectrum of tissue-restricted antigens (TRAs) expressed from each cell for ensuring the elimination of autoreactive T-cells. Because of these heterogeneities, it is unclear whether mTECs are composed of any particular subsets possessing unique properties for their developmental pathway and/or immunological function. Here, we report a distinct mTEC subset characterized by expression of Ly6 family protein. Ly6C/6G+ mTECs, constituting 5-15% of mature mTECs, were preferentially localized at the cortico-medullary junction, and expressed high levels of TRAs. Remarkably, Ly6C/6G+ mTECs were absent in Aire-deficient mice, suggesting that this subset requires Aire and/or Aire+ mTECs for its production. We suggest that Ly6C/6G+ mTECs serve as an important source of TRAs for efficient cross-presentation during establishment of self-tolerance.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

(1)胸腺における T 細胞分化の全貌解明は、免疫学・血液学研究の大きな柱であり 1)T 前駆細胞/T 細胞の分化のための内的プログラムを明らかにする研究、2)T 細胞を指示する間質組織(stroma)の役割(T 前駆細胞/T 細胞-間質組織間の相互作用を含む)を理解しようとする 2 つのアプローチが両軸をなす。我々は T 細胞レパトア形成における後者 (stroma) の役割を研究しており、特に胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) の働きを mTEC 特異的に発現する転写因子 Aire (autoimmune regulator)の機能を通して理解したいと考えている。

(2)Aire は遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子であるため、Aire の存在により成立する negative selection niche としての mTEC の意義を理解し、自己寛容の成立機構のみならず自己免疫疾患の原因究明を目指している。

2. 研究の目的

胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) に特異的に発現する転写因子 Aire の機能解明は、自己寛容の成立機構のみならず、自己免疫疾患発症のメカニズムについての理解が大きく進展すると期待される。事実、ヒトにおいては Aire 遺伝子の異常が autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)を引き起こすことは良く知られている。現在、Aire は mTEC からの多様な組織特異的自己抗原(TSA)の転写を直接制御することで負の選択に寄与するというモデルが提唱されている (転写モデル)。しかしながら我々は Aire が mTEC の成熟過程を制御する分化誘導因子として作用するという新たなモデル(成熟化モデル)を提唱し、様々な Aire 遺伝子改変マウスを作製・駆使して中枢性寛容を担う胸腺微小環境の構築化における Aire の役割を明らかにすることで、Aire 依存的な自己寛容成立の解明に取り組む。Aire の機能解明は、難治性炎症性疾患を含む様々な自己免疫疾患の病態解明につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 新規の胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) を探索し、RNA シークエンスを行うことにより、新規胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。

(2) Aire 発現細胞を選択的に除去できるノックインマウス等を用いて、Aire が mTEC にどのような分化誘導作用を持つか、さらに Aire⁺mTEC による自己免疫疾患発症制御メカニズムを解析した。

(3) Aire 陽性 mTEC の研究が困難である一つの理由は、Aire が核内蛋白であるため単純に Aire 発現細胞を生細胞として分離するのが不可能であることがあげられる。この問題点を解決する目的で、我々は human CD2 遺伝子を内在性 Aire と IRES をはさんで Aire 遺伝子座に挿入したノックインマウスを樹立した(図 1)。本ノックインマウスの優れた点は正常な内在性 Aire の発現を壊すことなく hCD2 の発現を指標に、効率良く Aire 陽性 mTEC を分離できるということであるこのマウスを利用し、Aire 発現 mTEC を分離し、Aire 陽性 mTEC の機能を探索した。

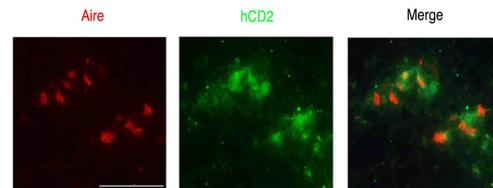


図 1: Aire/hCD2 ノックインマウスにおける Aire と hCD2 分子の免疫染色像

(4)器官培養のシステム(reaggregated thymic organ culture: RTOC)を用いて我々が新規に見出した胸腺髄質上皮細胞の分化について解析した。

(5) Aire 発現細胞をリアルタイムにモニターできる Aire/GFP ノックインマウスと、成体マウスにおいて任意のタイミングで Aire の発現履歴を解析できるタモキシフェン誘導型 Cre 遺伝子を挿入したノックインマウスとの交配によって、Aire 発現 mTEC の分化過程をモニターする実験系を構築した。本研究では、さらに RFP レポーターマウスを使用することで、タモキシフェン投与により Aire 発現 mTEC の分化プロセスの解析を行った。

4. 研究成果

(1)胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) は組織特異的自己抗原 (TRA) を発現することによって、自己抗原と強く反応する T 細胞に対して細胞死を誘導する (負の選択)。mTEC は Aire の発現を含め、主にその分化段階によっていくつかのサブセットに分類されている。私達は分化マーカー以外に mTEC の多様性を特徴づける分子の探索を行った結果、新たに Ly6 ファミリー分子である Ly6C および Ly6G を発現する mTEC が存在するを見いだした。Ly6C および Ly6G 分子の両方を認識する抗体 (Gr-1 抗体) を用いて解析した結果、Ly6C/6G 陽性 mTEC は mTEC の 10~15% を占めていた (図 2)。

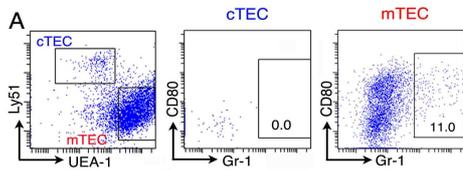


図2: Aire欠損マウスにおけるGr-1陽性mTECの欠如

さらにGr-1陽性mTECとGr-1陰性mTECを用いてRNAシーケンスを行った結果、521遺伝子がGr-1陽性mTECにおいて発現上昇していることが明らかとなった。またAire欠損マウスでは、このGr-1陽性mTECはほぼ消失していることが明らかとなった。

(2) diphtheria toxin receptor (DTR)をAire遺伝子座に挿入したAire/DTR-KIマウスを樹立し、このマウスにジフテリアトキシン(DT)の5日間連続投与を行うことで、胸腺よりAire発現細胞がほぼ完全に除去できることを確認している。本研究では、DT投与後のGr-1陽性mTECの出現について解析したところ、出現の順番としては、Aire陰性Gr-1陽性、続いてAire陽性Gr-1陰性、そしてAire陽性Gr-1陽性mTECであることが明らかとなった。

(3) Aire/hCD2ノックインマウスを用いてhCD2陽性(Aire陽性)Gr-1陰性mTECおよびhCD2陽性Gr-1陽性mTECをソーターを用いて分離した。この2種類のmTECを用いていくつかの組織特異的自己抗原(TRA)の発現を解析した結果、Gr-1陽性mTECにおいてGr-1陰性mTECと比較すると、TRAの発現が高いことが明らかとなった。

(4) RTOCのシステムを用いてGr-1陽性mTECの分化について解析したところ、Gr-1の発現は永久的なものではなく、むしろ一過性であることが示された。さらにGr-1の発現とその維持にはAire陽性mTECの存在が必要であることが明らかとなった。

(5) これまで我々はAire発現mTECは細胞死に至る前に、Aireの発現を失うpost-Aireのstageを経ることを報告してきた。今回、AireのLineage tracingシステムを用いた解析より、Ly6C/6G陽性mTECはpost-Aire stageを経ることなく速やかに細胞死に至ることが明らかとなった。これはLy6C/6G陽性mTECがTRAを高発現し、樹状細胞と近接しているという結果と併せて考えると、このmTECがcross-presentationに適したサブセットであることが示唆された。

我々はさらに興味深いことに、NODやNZBW-F1マウスといった自己免疫疾患発症マウスにおいてはLy6C陽性mTECの減少

を認めた。本研究結果より、Ly6C/6GがmTECの新たなマーカー分子となるとともに、Ly6C/6G陽性mTECが中枢性寛容の成立に重要な役割を担うサブセットであることが示唆された。

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4件)

Kawano H, Nishijima H, Morimoto J, Hirota F, Morita R, Mouri Y, Nishioka Y, Matsumoto M. Aire Expression Is Inherent to Most Medullary Thymic Epithelial Cells during Their Differentiation Program. *J Immunol*. 2015 Dec 1;195(11):5149-5158. doi: 10.4049/jimmunol.1501000. Epub 2015 Oct 26. 査読有り

Nishijima H, Kitano S, Miyachi H, Morimoto J, Kawano H, Hirota F, Morita R, Mouri Y, Masuda K, Imoto I, Ikuta K, Matsumoto M. Ectopic Aire Expression in the Thymic Cortex Reveals Inherent Properties of Aire as a Tolerogenic Factor within the Medulla. *J Immunol*. 2015 Nov 15;195(10):4641-4649. doi: 10.4049/jimmunol.1501026. Epub 2015 Oct 9. 査読有り

Mouri Y, Nishijima H, Kawano H, Hirota F, Sakaguchi N, Morimoto J, Matsumoto M. NF- κ B-inducing kinase in thymic stroma establishes central tolerance by orchestrating cross-talk with not only thymocytes but also dendritic cells. *J Immunol*. 2014 Nov 1;193(9):4356-4367. doi: 10.4049/jimmunol.1400389. Epub 2014 Sep 26. 査読有り

Nishikawa Y, Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hirota F, Takahashi S, Luche H, Fehling HJ, Mouri Y, Matsumoto M. Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells reveals a requirement for Aire in their maturation program. *J Immunol*. 2014 Mar 15;192(6):2585-2592. doi: 10.4049/jimmunol.1302786. Epub 2014 Feb 10. 査読有り

[学会発表](計4件)

Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Yasuhiro Mouri, Hitoshi Nishijima, Mitsuru Matsumoto 『Expression of Ly6 family protein defines a novel Aire-dependent subset of medullary thymic epithelial cells with tolerogenic function』第19回武田科学振興財団 生命科学シンポジウム 2017年1月20日~21日 武田薬品研究所、(大阪府・吹田市)

森本純子、松本満 『Ly6C/6G を発現する新規胸腺髄質上皮細胞サブセットの機能解析』四国免疫フォーラム、2016年6月25日、高知大学、(高知県・南国市)

Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Yasuhiro Mouri, Hitoshi Nishijima, Mitsuru Matsumoto 『Novel Aire-dependent lineage(s) of thymic medullary epithelial cells expressing Ly6 family protein』眉山国際免疫シンポジウム2016年3月3日～4日、徳島大学、(徳島県・徳島市)

Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Yasuhiro Mouri, Hitoshi Nishijima, Mitsuru Matsumoto 『A novel Aire-dependent subset of thymic medullary epithelial cells expressing Ly6 family protein』日本免疫学会、2015年11月18日～20日、札幌コンベンションセンター、(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 純子 (MORIMOTO, Junko)
徳島大学・先端酵素学研究所・助教
研究者番号：20451396

(2) 研究分担者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)
徳島大学・先端酵素学研究所・教授
研究者番号：60221595