

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670231

研究課題名(和文) 胸腺内Aire非依存的な末梢抗原の発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of TRAs expression independently of Aire

研究代表者

高場 啓之(Takaba, Hiroyuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：50637444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体防御において重要な役割を果たすT細胞は胸腺と呼ばれる臓器で分化・成熟し、自己抗原に反応しないよう教育される。我々の研究より、胸腺髄質上皮細胞の転写因子Fezf2が細胞分化を制御したりAire非依存的な多数の自己抗原を発現制御したりすることで、T細胞の負の選別を制御し、全身の自己免疫疾患の発症を防いでいることが明らかとなった。今後、現在では原因が不明な多数の自己免疫疾患の病態解明や新しい治療法の確立に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：T cell repertoire selection in the thymus comprises the positive and negative selection in the cortex and medulla, respectively. A promiscuous expression of a wide array of self-antigens in the thymus is essential for the negative selection of self-reactive T cells and the regulatory T cell development, which are crucial for the establishment of central tolerance. Aire was thought to be the exclusive factor regulating the expression of tissue-restricted antigens, but Fezf2 emerged as a transcription factor playing a key role in this regulation. Fezf2 is selectively expressed in thymic medullary epithelial cells and suppresses the onset of autoimmune reactions.

研究分野：免疫

キーワード：T細胞 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

### 胸腺における T 細胞の選択

胸腺は T 細胞が創出される一次リンパ器官であり、皮質と髄質の二層構造をもつ。骨髄から胸腺の皮質へ遊走してきた T 細胞前駆細胞は、DNA 組換え酵素 RAG1/RAG2 を介して VDJ 組換えと呼ばれる遺伝子再編成機構により、およそ 10 の 15 乗もの多様な TCR を創り上げる。T 細胞前駆細胞は胸腺の皮質において、先ず TCR 鎖を発現し、その後、CD4 と CD8、そして TCR 鎖を発現する。CD4 と CD8 陽性 T 細胞(ダブルポジティブ T 細胞)は、機能型 TCR が主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex: MHC)分子とペプチドの複合体を認識する。MHC クラス I 分子を認識するダブルポジティブ T 細胞は CD8T 細胞へ分化し、MHC クラス II 分子を認識する T 細胞は CD4 T 細胞へ分化する。T 細胞の MHC 拘束性を獲得する過程は「正の選択」と呼ばれ、MHC 分子を高く発現する胸腺皮質上皮細胞(cortical thymic epithelial cell: cTEC)により行われる。cTEC は胸腺プロテアソーム特異的な触媒サブユニット Psmb11 (5t)やプロテアーゼのカテプシン L (Ctsl)やセリンプロテアーゼ 16 (Prss16)を高発現させており、特別なモチーフをもつペプチドを作成することが知られている。5t はダブルポジティブ T 細胞から CD8T 細胞への正の選択に必須の分子であり、Ctsl や Prss16 はダブルポジティブ T 細胞から CD4T 細胞への正の選択に重要である。

### 負の選択機構

胸腺の皮質で正の選択を受けた CD4 T 細胞と CD8 T 細胞は、ケモカイン受容体 Ccr7 を発現し、ケモカイン Ccl19 や Ccl21 の発現の高い髄質へと移行する。髄質へと移行した CD4T 細胞と CD8T 細胞は胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cells: mTEC)や樹状細胞(dendritic cells: DC)と相互作用する。この際、自己応答性 T 細胞は細胞死(アポトーシス)が誘導される。mTEC は、肺や肝臓などの特定の末梢臓器のみで発現の高い遺伝子(組織特異抗原, tissue-restricted antigen: TRA)を発現している(promiscuous gene expression)。TRA は mTEC や DC により抗原提示され、これに強く反応する自己応答性 T 細胞は除去される(負の選択)。しかし、TRA に反応した一部の自己応答性 T 細胞は、転写因子 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞へと分化する。以上をまとめると、T 細胞の正の選択は皮質で行われ、負の選択は髄質で行われており、この際、mTEC 由来の TRA が重要な役割を果たす。正の選択と負の選択を受けた T 細胞は胸腺を離れ、脾臓などの二次リンパ組織へ移行する。

### 胸腺上皮細胞の発生と分化

マウスの場合、胸腺は初期発生段階において、

第三鰓嚢の内胚葉上皮から作り上げられる。cTEC と mTEC は、ともに胸腺上皮前駆細胞(thymic epithelial progenitor: TEP)に由来する。TEP から cTEC や mTEC への分化には転写因子 Foxn1 が必須であり、成熟した cTEC と mTEC は妊娠後 12 日ごろから検出される。Foxn1 は cTEC において 5t や共役分子 CD83 などの正の選択に関わる遺伝子の発現を直接制御している。cTEC は網状のネットワークを形成し、サイトケラチン 8, Ly51, CD205, CD326 (EpCAM), MHC クラス I と II 分子を高発現させている。cTEC の一部は正の選択を支えるナース細胞へと分化すると考えられているが、TEP から cTEC やナース細胞への分化における分子基盤はまだよく解っていない。mTEC はサイトケラチン 5 や EpCAM, CD80, MHC クラス I と II 分子を高く発現させている。TEP から mTEC への分化は、主に三種類の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(Tnfrsf3; LT R, Tnfrsf5; CD40, Tnfrsf11a; RANK)を介して制御されていると考えられている。TEC において LT R, CD40, そして RANK のいずれか一つでも受容体の機能欠損をさせたマウスは自己免疫症状を生じることが知られている。これまで、胎児期のマウスの mTEC の初期分化には転写因子 SpiB が関わっていることや、mTEC の細胞数の維持には転写因子 Stat3 が関与することが報告されている。mTEC は、CD80 と MHC クラス II のタンパク質の発現量に依存して mTEChi と mTEClo に分けられる。mTEChi において、TRA 遺伝子の発現量が顕著に上がっていることから、mTEChi が T 細胞の負の選択に大きく寄与していると考えられている。また、髄質には DC が多く分布しており、DC も mTEC 由来の TRA を取り込んで負の選択に関与している。胸腺でのみ特定の TRA(例: インスリン)の遺伝子発現を欠失させたマウスは、加齢にともない TRA 特異的な自己抗体の産生上昇などの自己免疫症状を示す。以上の知見から、mTEC における TRA の発現は T 細胞の負の選択に極めて重要であると考えられている。T 細胞の「負の選択」と呼ばれているが、自己応答性 T 細胞を胸腺で効率よく除去させるため、胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cells: mTEC)が、からだ中のほとんどの自己成分(遺伝子)を発現させている。申請者らの研究以前では、多くの研究者が mTEC では Aire と呼ばれる転写制御因子のみがすべての自己成分(自己抗原)を制御していると考えられていた。

## 2. 研究の目的

申請者の研究スタートをした時(2013年前後)は世界中の多くの研究者がmTECのAireがどの程度のTRA遺伝子を制御しているか、マイクロアレイ法や次世代シーケンシング法により、遺伝子発現解析を行っており、多く見積もっても全体の40%程度であると予測されていた(文献)。即ち、Aire以外の自己成分遺伝子を転写制御する因子の存在が示唆されていた。Aire非依存的に自己抗原の発現を制御している因子を見出すことが出来れば、自己免疫疾患を防ぐ新たな治療戦略を考えることが可能である。申請者らはAire以外の自己成分を制御している転写制御因子を想定しmTECにおいてAire遺伝子以外で遺伝子発現量の高い転写制御因子の同定を試みた。

### <参考文献>

Samson et al., Genome Res., 2014

## 3. 研究の方法

多くの先行研究によりmTECを用いた遺伝子発現解析がなされていた。申請者らは一般のデータベースに登録されている遺伝子発現解析のデータを取得し、mTECでAireよりも高く発現している転写制御因子を探索することでAire以外の転写制御因子の同定を試みた。その上で、その転写制御因子のfloxマウスを用意し、胸腺上皮細胞のみで遺伝子欠損させたマウス(コンディショナルノックアウトマウス)を作成し、さまざまな免疫学的な解析を行った。特に、Aire欠損マウスでは加齢に伴い、自己抗体の産生上昇と炎症性細胞のさまざまな末梢組織への浸潤が見いだされる。したがって、それらの主徴がコンディショナルノックアウトマウスでも見出されるかどうかを解析した。またその制御因子によってTRA遺伝子を網羅的に同定するため、フローサイトメトリーによりmTECを回収してきて、マイクロアレイ解析を行うことでAire依存的なTRAとどの程度一致し、どの程度違うかを見積った。

## 4. 研究成果

mTECの遺伝子発現のデータプロファイルをGene Expression Omnibus(GEO)から入手し、胸腺皮質上皮細胞(Cortical thymic epithelial cell: cTEC)に比べ、mTECでのみ発現の高い遺伝子を順位付けした。すると、Aire遺伝子より上位に位置する(遺伝子発現量が高い)転写因子Fezf2が見いだされた。Fezf2は胸腺内ではmTECのみで発現しており、cTECや樹状細胞など他の細胞集団では発現していない。mTECにおいて、Fezf2はmTEChi

で高発現しているが、mTEChiとmTECloの両方で発現しており、Aireよりも多くのmTECで発現している。Fezf2の機能に関するこれまでの報告としては、神経系に関するものが多く、マウスの大脳で発現しているFezf2は脳皮質第五層の形成に必須であることや、ヒトにおいてFEZF2の変異は自閉症と強い相関があることなどが挙げられる。

mTECにおけるFezf2の機能を調べるため、我々はFezf2遺伝子欠損(ノックアウト)マウスを解析した。Fezf2ノックアウトマウスは、T細胞の正の選択は正常だが、胸腺髄質のmTECの分布に偏りが見られることやmTECの細胞数が減少している。野生型とFezf2ノックアウトマウスの胸腺におけるT細胞のTCRレパトアを比較したところ、CD4T細胞とCD8T細胞の両方で、V鎖遺伝子の使用頻度が異なっていた。この結果は、mTECのFezf2がT細胞の負の選択に寄与していることを示唆している。Fezf2ノックアウトマウスは神経系の異常により四週齢前後で死亡してしまう。そこで我々は、mTECでのみFezf2の機能を欠失させた場合のマウスの表現型を調べるために、胸腺上皮でのみFezf2を機能欠損させた(コンディショナルノックアウト)マウスを樹立した。このマウスは、加齢に伴い血清中のケモカインCcl2やイムノグロブリンの産生上昇が見いだされた。また、所属リンパ組織においてT細胞の活性化と細胞数の上昇が見いだされたので、末梢組織を観察してみたところ、肺や小腸などにおいて炎症性細胞の浸潤が見いだされた。これらの結果は、mTECにおけるFezf2の機能欠損により、胸腺内で負の選択が正常に行われず、自己応答性T細胞が末梢へ移行したために自己免疫症状が引き起こされたことが原因として考えられる。興味深いことに、Fezf2コンディショナルノックアウトマウスで炎症性細胞の浸潤が検出された組織部位は、Aire欠損マウスにおいて炎症性細胞の検出される組織部位と異なっていた(文献)。この結果は、AireとFezf2が負の選択機構において役割が異なることが原因だと考えられる。

### Fezf2によるTRA遺伝子の発現制御

mTECでのFezf2が制御している遺伝子を明らかにするために、我々は野生型とFezf2欠損mTECを用いてマイクロアレイ解析を行った。すると、野生型とFezf2欠損mTECでは、MHCクラスIやII、共役分子CD80やCD86、そしてケモカインXcl1やCcl21などの遺伝子発現に関して有意な差は見いだされなかった。しかし、Fezf2欠損により大きく低下している遺伝子の多くはTRAとして分類された。驚くべきことに、それらの遺伝子はこれまでAire非依存的なTRAとして報告されているものが多く含まれていた。実際にAire依存的な遺伝子とFezf2依存的な遺伝子を比較してみると、ほとんど一致しなかった。以上より、Fezf2はAireとは独立して特定のTRAを発現

制御していることが明らかとなった。Fezf2 依存的 TRA として挙がってきた ApoB や F2 はそれぞれ、アテローム性動脈硬化や全身性エリテマトーデスにおける自己抗体の標的抗原として報告されている。我々の研究により、Fezf2 は TRA 遺伝子のプロモーター領域に結合していることが示された。また、他のグループのクロマチン免疫沈降シーケンス解析から、Fezf2 は神経系においておよそ数千のコーディング遺伝子の発現制御をしていることが示唆された(文献 )。しかしながら、現段階ではどのように Fezf2 が mTEC において TRA 遺伝子の発現制御をしているのか、その具体的な分子基盤はまだよく解っていない。Fezf2 が TRA 遺伝子を効率よく発現誘導するためには、クロマチン構造を制御する因子が上流に存在するはずだが、未だ Fezf2 と相互作用をするクロマチン制御因子は同定されていない。一方で、我々のマイクロアレイ解析の結果から、Aire や Fezf2 によって制御されていない TRA 遺伝子は 30%程度存在するので、Aire や Fezf2 以外の TRA を制御する転写制御因子が存在する可能性がある。

#### Fezf2 遺伝子の発現制御機構

脊椎動物では Aire 遺伝子の 5' 上流に転写因子 NFkB ファミリーの DNA 結合サイトが保存されており、NFkB は Aire 遺伝子の発現誘導に重要であることが示されている。また、RANK 欠損マウスや CD40 欠損マウスでは mTEC の Aire 遺伝子の発現が低下する。これらの知見により mTEC における Aire 遺伝子の発現は、おもに RANK と CD40 シグナル経路を介した NFkB によって制御されていると考えられている。実際我々の実験でも、RANK 欠損マウスや CD40 欠損マウスの mTEC では Aire 遺伝子の発現が低下していた。しかし、これらのマウスでは mTEC における Fezf2 遺伝子の発現は低下しておらず、Fezf2 遺伝子の発現は RANK や CD40 シグナリング経路以外の経路によって制御されている可能性が考えられた。我々は、mTEC の分化に関わる LT R の欠損マウスの解析を試みた。すると、LT R 欠損マウスの mTEC では Aire 遺伝子の発現は変動していなかったが、Fezf2 遺伝子の発現が有意に低下していることが明らかとなった。この結果から、Fezf2 遺伝子発現を制御している上流の受容体の一つは LT R であることが示唆された。また、Aire 欠損マウスの mTEC では Fezf2 遺伝子の発現は変動せず、Fezf2 欠損マウスの mTEC では Aire 遺伝子の発現が変動していなかった。以上の結果から、mTEC における Aire 遺伝子と Fezf2 遺伝子の発現誘導は異なるシグナル経路により制御されていることが予想された。すなわち、mTEC には少なくとも二つの独立したシグナル経路と転写制御因子が存在し、それぞれが特定の TRA 遺伝子を発現制御している可能性がある。以上の一連の研究成果は 2015 年 11 月に Cell 誌に掲載された(文献 )。

#### <参考文献>

Anderson *et al.*, Science, 2002  
Takaba *et al.*, Cell, 2015  
Lodato *et al.*, Nat Neurosci., 2014

#### 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 1件)

Hiroyuki Takaba *et al.*, 2015, Cell 査読有 DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.013

[学会発表](計 2件)

Hiroyuki Takaba and Hiroshi Takayanagi, T cell selection mediated by Fezf2 in the thymus, KTCC international conference, 2017.3.14

Hiroyuki Takaba and Hiroshi Takayanagi, Identification of a key regulator of autoimmunity, ThymUS international conference, 2016. 6. 14

[図書](計 2件)

高場啓之、高柳広 胸腺における T 細胞の選択機構 臨床免疫・アレルギー科 2017

高場啓之 自己免疫疾患を抑制する重要因子の同定 臨床免疫・アレルギー科 2016

[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

高場 啓之 (TAKABA, Hiroyuki)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：50637444

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

高柳 広 (TAKAYANAGI, Hiroshi)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20334229

(4) 研究協力者

( )