

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670234

研究課題名(和文)自己応答性T細胞を除去する機構の不完全性による癌免疫監視の強化

研究課題名(英文)Contribution of imperfect elimination of self-reactive T cells in the thymus to tumor immune surveillance

研究代表者

秋山 泰身(AKIYAMA, TAISHIN)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50327665

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)：免疫系は病原体や癌に反応するが、自己組織には反応しない。胸腺髄質上皮細胞は、自己抗原に反応するT細胞に加えて癌細胞に反応するT細胞を除去することで、免疫系による識別機構を制御している。本研究では、胸腺髄質上皮細胞の機能を微調整する機構の個体における役割について検討を行った。その結果、胸腺髄質上皮細胞の機能は、ネガティブフィードバック制御により微調整されることで、癌に対する免疫応答を保証していることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、癌免疫監視の理解や、癌に対する免疫応答の強化法の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Immune system efficiently responds to various pathogens and tumors as non-self, but not against self-tissues. T lymphocytes (T cells) play a pivotal role on such discrimination between self and non-self. Epithelial cells in the thymic medulla (mTECs) eliminate self-tissue reactive T cells and also can delete T cells responsive to tumors in the thymus, thereby playing critical roles on discrimination between self and non-self by T cells. In this study, we investigated how fine tuning of the mTEC function contributes to the self- and non-self discrimination. We found that a negative feedback regulation of mTEC function ensures efficient immune responses to tumors. This study would provide some important information regarding tumor immune surveillance and contributes to developing efficient tumor immune therapies.

研究分野：分子免疫学

キーワード：癌免疫 自己免疫 T細胞 胸腺

### 1. 研究開始当初の背景

T細胞が胸腺で分化する際に、自己抗原に対する免疫寛容が誘導される。この自己免疫寛容の誘導機構に髄質上皮細胞が重要である。胸腺髄質上皮細胞は、通常は末梢組織特異的に発現する抗原(以下、組織特異的抗原と省略)を多種類にわたって微量に発現する。胸腺で提示された組織特異的抗原を高親和性で認識するT細胞は、アポトーシスで除去されるか、制御性T細胞へ分化する。胸腺髄質上皮細胞の分化不全、機能不全マウスは自己免疫疾患を発症することから、この機構は自己免疫抑制に必須と考えられている。

胸腺髄質上皮細胞による自己寛容の誘導機構が完全に機能するには、組織特異的抗原を提示する抗原提示細胞が、T細胞を全てスキャンする必要あり、確率論的に一部のT細胞はこの機構を受けないと予想できる。実際、自己応答性T細胞の一部は、胸腺から末梢組織に逃れることが報告されている。すなわち、胸腺で自己応答性T細胞を除去する機構は固有に不完全である。

申請者らは、これまでにRANKLシグナルが胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導することを明らかにしてきた。さらに、RANKLシグナルは、自身のデコイレセプターOPGを発現誘導することで、ネガティブフィードバック制御を受けており、この機構は機能的な胸腺髄質上皮細胞の分化を“負に”制御していることが判明した。不思議なことに、この機構は、生体にとって有益なはずの自己免疫寛容の誘導機構を抑制することになる。

一方で、胸腺髄質上皮細胞は、癌関連抗原を異所的に発現し、結果として癌に应答するT細胞の除去や癌に浸潤する制御性T細胞の誘導を行っていることが報告された。

### 2. 研究の目的

上記の背景より、RANKL-RANK-OPGのネガティブフィードバック制御により胸腺髄質上皮細胞の分化を負に制御する機構は、自己抗原に対して应答するT細胞の一部を積極的に残存させ、自己組織由来である癌に対する免疫応答を促進する、との仮説に至った。

本研究課題は、この仮説をマウスモデルにより検証することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 髄質上皮細胞の分化を微調整するネガティブフィードバック機構が不全なマウスへの癌細胞株の移植

OPG欠損マウスの胸腺ストローマをヌードマウスに移植後、可移植性の同系マウス由来癌細胞を移植し、癌の増大や癌免疫の状態を検討する。

#### (2) 髄質上皮細胞の分化を微調整するネガティブフィードバック機構が不全なマウスへの発癌剤投与

OPG欠損マウスの胸腺ストローマをヌー

ドマウスに移植後、発癌剤を投与し、癌の増大を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 髄質上皮細胞の分化を微調整するネガティブフィードバック機構が不全なマウスへの癌細胞株の移植

胎齢15.5のBalb/c背景OPG欠損マウス(およびコントロール野生型マウス)より胎仔胸腺を単離し、2-deoxyguanosineの存在下で胸腺器官培養を行った。ついで、4個のOPG欠損胸腺ストローマ(あるいは野生型胸腺ストローマ)をBalb/cヌードマウスに移植した(以下、この移植マウスをOPG/nudeマウスおよびWT/nudeマウスと表記)。胸腺ストローマを移植して6週間後、マウス癌細胞株MethAをOPG/nude(WT/nude)マウスの皮下に移植した。癌細胞を移植後、癌細胞の増殖に伴う癌の増大を測定し、WT/nudeマウスに比べてOPG/nudeマウスの癌の増大の変化を検討したところ、OPG/nudeマウスでは、癌の増大が有意に亢進した(図1)。

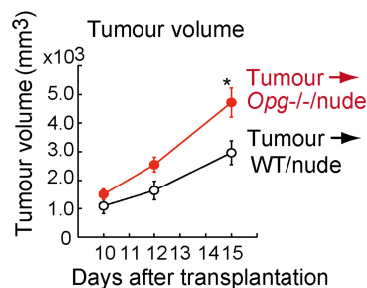


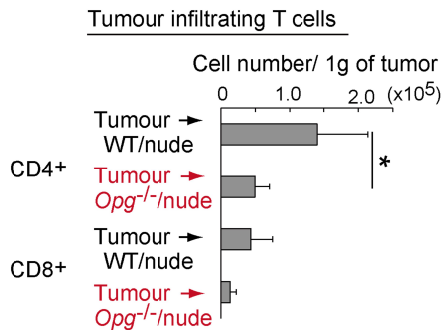
図1. 胸腺ストローマ移植ヌードマウスへ移植した癌細胞由来の癌の大きさ

OPG欠損あるいは野生型マウス胸腺ストローマ移植マウスに癌細胞を移植した(各々Opg-/-/nudeとWT/nude)。移植後の癌の大きさを測定した。

癌が増大したOPG/nudeマウスおよびWT/nudeマウスから癌を採取し、癌に存在するCD4あるいはCD8陽性T細胞の割合と絶対数をフローサイトメーターより検討したところ、OPG/nudeマウス由来の癌では、どちらのT細胞も減少していた(図2)。

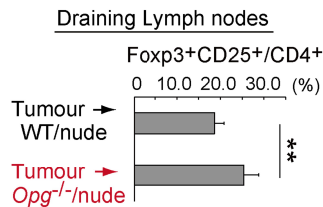
また、所属リンパ節に存在する制御性T細胞の割合がOPG/nudeでは増加していた(図3)。

ついで、癌が増大したOPG/nudeマウスおよびWT/nudeマウスより血清を採取し、癌細胞由来のタンパク質に対する抗体価が変化しているのか検討した。得られる血清を1次抗体として用いて癌細胞株を免疫組織染色した。その結果、OPG/nudeマウスでは、癌細胞に対する抗体価が減少していた(図4)。



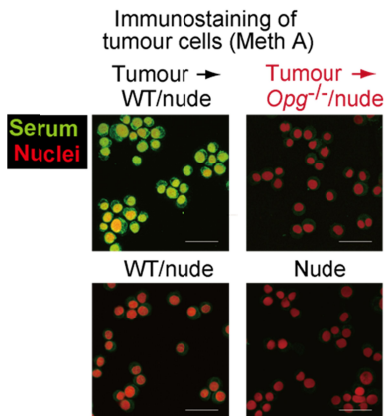
**図 2. 胸腺ストローマ移植したマウスで増大した癌に浸潤した T 細胞の解析**

OPG 欠損あるいは野生型マウス胸腺ストローマ移植マウスに癌細胞を移植した (各々 Opg<sup>-/-</sup>/nude と WT/nude)。移植後の癌に浸潤した T 細胞をフローサイトメーターで解析し、癌 1g あたりの細胞数を決定した。



**図 3. 胸腺ストローマ移植したマウスで増大した癌の所属リンパ節の制御性 T 細胞**

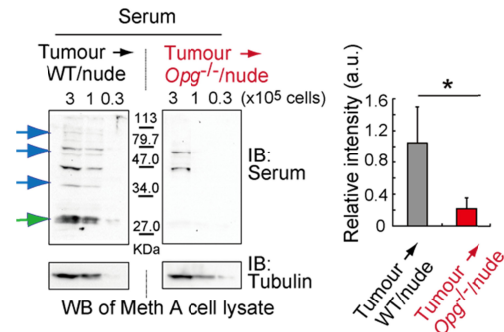
OPG 欠損あるいは野生型マウス胸腺ストローマ移植マウスに癌細胞を移植した (各々 Opg<sup>-/-</sup>/nude と WT/nude)。移植後の癌の所属リンパ節に存在する T 細胞をフローサイトメーターで解析した。



**図 4. 胸腺ストローマ移植したマウスに癌を移植後の血清中で検出される抗癌細胞抗体の検出**

OPG 欠損あるいは野生型マウス胸腺ストローマ移植マウスに癌細胞を移植した (各々 Opg<sup>-/-</sup>/nude と WT/nude)。移植後のマウス血清を 1 次抗体として (緑)、癌細胞を蛍光染色した。細胞核は PI (赤) で染色した。

また癌細胞株の細胞抽出液を対象とし、血清を 1 次抗体としたウエスタンブロッティングを行い、OPG/nude マウス由来では、癌細胞に対する抗体価が減少していることを確認した (図 5)。

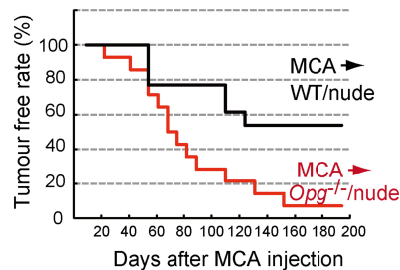


**図 5. 胸腺ストローマ移植したマウスに癌を移植後の血清中で検出される抗癌細胞抗体の検出**

OPG 欠損あるいは野生型マウス胸腺ストローマ移植マウスに癌細胞を移植した (各々 Opg<sup>-/-</sup>/nude と WT/nude)。移植後のマウス血清を 1 次抗体として癌細胞抽出物をウエスタンブロットで検出した。右図は緑矢印のバンドを定量した結果。\* p<0.05。

**(2) 髄質上皮細胞の分化を微調整するネガティブフィードバック機構が不全なマウスへの発癌剤投与**

胎齢 15.5 の Balb/c 背景 OPG 欠損マウス (およびコントロール野生型マウス) より胎仔胸腺を単離し、2-deoxyguanosine の存在下で胸腺器官培養を行った。ついで、4 個の OPG 欠損胸腺ストローマ (あるいは野生型胸腺ストローマ) を Balb/c ノードマウスに移植した。胸腺ストローマを移植して 6 週後、発癌物質であるメチルコランスレンをマウスの皮下に投与した。発癌剤投与マウスの癌の発生を検討したところ、OPG/nude マウスでは癌の発生率が有意に高かった (図 6)。



**図 6. 胸腺ストローマ移植したマウスに発癌剤を投与後に癌が発生する割合**

OPG 欠損あるいは野生型マウス胸腺ストローマ移植マウスに発癌剤を処理した (各々 Opg<sup>-/-</sup>/nude と WT/nude)。癌を生じないマウスの割合を示した。

以上の 2 つの実験結果より、ネガティブ

フィードバック制御により胸腺髄質上皮細胞の分化を負に制御する機構は、自己抗原に対して応答するT細胞の一部を積極的に残存させ、自己組織由来である癌に対する免疫応答を促進する、と結論した。

これらの成果は、癌免疫監視の理解や、癌に対する免疫応答の強化する方法を開発する上での重要な知見に成ると期待される。

#### 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14件)

1. Tateishi R, Akiyama N, Miyauchi M, Yoshinaga R, Sasanuma H, Kudo T, Shimbo M, Shinohara M, Obata K, Inoue J, Shirakawa M, Shiba D, Asahara H, Yoshida N, Takahashi S, Morita H, and \*Akiyama T.  
Hypergravity provokes a temporary reduction in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocyte number and a persistent decrease in medullary thymic epithelial cell frequency in mice.  
*Plos one.*, 2015, 10: e0141650 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0141650
2. Varney M, Niederkorn M, Konno H, Matsumura T, Gohda J, Yoshida N, Akiyama T, Christie S, Fang J, Miller D, Jerez A, Karsan A, Maciejewski J, Meetei M, Inoue J, and Starezyński D.  
Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor/TRAF6 signaling.  
*J. Exp. Med.*, 2015, 212: 1967-1985 (査読あり) doi: 10.1084/jem.20141898.
3. Seki T, Yamamoto M, Taguchi Y, Miyauchi M, Akiyama N, Yamaguchi N, Gohda J, Akiyama T, Inoue J.  
Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-Venus knock-in mice.  
*J. Biochem.*, 2015, 158: 485-495(査読あり) doi: 10.1093/jb/mvv064
4. Shinzawa M., Konno H., Qin J., Akiyama N., Miyauchi M, Ohashi H., Miyamoto-Sato E., Yanagawa H., \*Akiyama T, and Inoue J.  
Catalytic subunits of the phosphatase calcineurin interact with NF-κB-inducing kinase (NIK) and attenuate NIK-dependent gene expression.  
*Sci. Rep.*, 2015, 5: 10758 (査読あり) doi: 10.1038/srep10758

5. Blackburn J, Kawasaki K, Pomtaveetus T, Kawasaki M, Otsuka-Tanaka Y, Miake Y, Ota MS, Watanabe M, Hishinuma M, Nomoto T, Oommen S, Ghafoor S, Harada F, Nozawa-Inoue K, Maeda T, Peterková R, Lesot H, Inoue J, Akiyama T, Schmidt-Ullrich R, Liu B, Hu Y, Page A, Ramírez A, Sharpe PT and Ohazama A.  
Excess NF-κB induces ectopic odontogenesis in embryonic incisor epithelium.  
*J. Dent. Res.*, 2015, 94:121-128 (査読あり)

6. \*Akiyama T, Tateishi R, Akiyama N., Yoshinaga R, and Kobayashi TJ.  
Positive and negative regulatory mechanisms for fine-tuning cellularity and functions of medullary thymic epithelial cells  
*Front. Immunol.* 2015, 6: 461 (査読あり) doi: 10.3389/fimmu.2015.00461

7. 秋山泰身、良永理子、秋山伸子  
転写因子 Spi-B による免疫寛容制御機構  
臨床免疫・アレルギー科、Vol. 65, No. 3, 185-190 (2015) (査読なし)

8. 秋山泰身、秋山伸子  
胸腺髄質上皮細胞と確率論的な自己寛容誘導  
感染 炎症 免疫、Vol. 45-4, 66-67 (2015) (査読なし)

9. 秋山伸子、秋山泰身  
胸腺髄質上皮細胞分化のネガティブフィードバック制御  
病理と臨床、Vol. 33, No. 7, 703-707 (2015) (査読なし)

10. 秋山泰身、立石涼介、良永理子、秋山伸子  
胸腺依存的な自己寛容にかかわる遺伝子発現  
臨床免疫・アレルギー科、Vol. 64, No. 10, 404-409 (2015) (査読なし)

11. 秋山泰身、立石涼介、秋山伸子  
自己免疫疾患と胸腺髄質上皮細胞  
病理と臨床、Vol. 33, No. 7, 703-707 (2015) (査読なし)

12. Akiyama N., Shinzawa M., Miyauchi M., Yanai H., Tateishi R., Shimo Y., Ohshima D., Matsuo K., Sasaki I., Hoshino K., Wu G., Yagi S. Inoue J., Kaisho T., and \*Akiyama T.  
Limitation of immune tolerance-inducing thymic epithelial cell development by Spi-B-mediated negative feedback regulation.  
*J. Exp. Med.*, 2014, 211: 2425-2438 (査読あり) doi: 10.1084/jem.20141207.

13. \*Akiyama T, Shiraiishi T., Qin J., Konno H., Akiyama N., Shinzawa M., Miyauchi M., Takizawa N., Yanai H., Ohashi H., Miyamaoto-Sato E., Yanagawa H., Yong W., Shou W., and Inoue J.

Mitochondria–nucleus shuttling FK506-binding protein 51 interacts with TRAF proteins and facilitates the RIG-I-like receptor-mediated expression of type I IFN

*PLoS One*. 2014, 9: e95992 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0095992

14. 秋山泰身、小林徹也  
免疫システムとロバストネス。  
細胞工学 Vol.33, No.1, 55-60 (2014) (査読なし)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 秋山泰身  
ETS ファミリー転写因子 Spi-B は髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する  
第 24 回京都 T 細胞会議、2014 年 5 月 16 日、「芝蘭会館 (京都)」

2. Taishin Akiyama  
Mitochondria–nucleus shuttling FK506- binding protein 51 interacts with TRAF proteins and facilitates the RIG-I-like receptor-mediated expression of type I IFN  
第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 11 日、「京都国際会議場 (京都)」

3. Taku Ito-Kureha, Taishin Akiyama  
T cell-specific CNOT3 deletion alters thymic T cell development and provokes autoimmunity.  
第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、「京都国際会議場 (京都)」

4. CNOT3 is important for thymocyte development through the regulation of TCR-mediated cell death signaling.  
Taku Ito-Kureha, Taishin Akiyama  
第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 19 日、「札幌コンベンションセンター(札幌)」

5. Ryosuke Tateishi, Taishin Akiyama  
Analysis of the molecular mechanism regulating regeneration of medullary thymic epithelial cells.  
第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 19 日、「札幌コンベンションセンター(札幌)」

6. Kotaro Kitagawa, Taishin Akiyama, Takehito Sato  
Identification of thymic epithelial-like cells from human iPSC by ectopically expression of FOXP1 in stepwise culture system  
第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 20 日、「札幌コンベンションセンター(札幌)」

7. 秋山泰身  
RANK シグナルによる制御性 T 細胞の胸腺内分化誘導  
第 25 回京都 T 細胞会議、2015 年 5 月 15 日、「芝蘭会館 (京都)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
秋山 泰身 (AKIYAMA, Taishin)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号 : 50327665

(2)研究分担者  
無し

(3)連携研究者  
無し