

科学研費補助金研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19059010

研究課題名（和文） 胸腺における自己形成と自己認識

研究課題名（英文） Thymic microenvironments for shaping T cell repertoire

研究代表者

高濱 洋介 (TAKAHAMA YOUSUKE)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授

研究者番号：20183858

研究成果の概要（和文）：

自己と非自己の識別を担う T リンパ球の抗原認識特異性レパトア確立機構を明らかにすべく、胸腺微小環境に焦点を置いた解析を進めた。その結果、胸腺髄質での自己寛容確立に必要なケモカイン、胸腺髄質上皮細胞の増殖と機能を促進するサイトカイン、胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現されキラー T 細胞の正の選択に必要な新規プロテアソームをそれぞれ同定した。また、胸腺髄質上皮細胞に発現され自己寛容の確立に重要な Aire について、胸腺髄質上皮細胞の分化に重要な分子であることを明らかにした。更に、胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞の分化と分岐の機構解析に着手した。

研究成果の概要（英文）：

T lymphocytes are the cells that play an essential role in distinguishing non-self from self. T lymphocytes acquire this ability through shaping a repertoire of recognition specificity during the development in the thymus. However, how T lymphocytes are generated and selected in the thymus is still not well understood. This study identified (1) chemokines that are produced by thymic medullary epithelial cells and are essential for establishment of self-tolerance, (2) cytokines that are essential for the growth and development of thymic medullary epithelial cells, (3) proteasomes that are expressed in thymic cortical epithelial cells and are essential for positive selection of immunocompetent CD8 T lymphocytes. In addition, (4) we revealed that Aire regulates the development of thymic medullary epithelial cells, and (5) we begun the analysis how medullary and cortical thymic epithelial cells are generated from common epithelial progenitor cells.

交付決定額：

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	31,500,000	0	31,500,000
2008 年度	31,500,000	0	31,500,000
2009 年度	42,500,000	0	42,500,000
2010 年度	52,100,000	0	52,100,000
2011 年度	45,000,000	0	45,000,000
総計	202,600,000	0	202,600,000

研究分野：タンパク質分解による細胞・個体機能の制御

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、自己識別、自己寛容、胸腺、胸腺微小環境、胸腺上皮細胞、胸腺プロテアソーム、 β 5t, Aire, RANKL, CCL21, XCL1

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む脊椎動物の生体防御に中心的役割を担うTリンパ球は胸腺で分化する。胸腺内でのTリンパ球分化においては、自己反応性Tリンパ球の排除「負の選択」や、自己免疫応答を抑制する制御性T細胞の生成など、自己識別とりわけ自己寛容成立に必要なプロセスが内包されている。このうち、「負の選択」を特徴づけるTリンパ球内の分子シグナル解明については、抗原受容体の強い凝集に始動され Grb2, Jnk/p38 キナーゼ, Bax/Bak/Bim 等を経るアポトーシス誘導経路の概要が明らかにされている。しかし、制御性T細胞の胸腺内生成機構については未だ殆ど明らかにされていない。一方、中枢性寛容をもたらす自己構成成分としては、従来、胸腺内に存在する細胞の主要組織適合抗原によって提示される正常蛋白由来ペプチドの総体が漠然と想定されてきた。しかし近年、元来特定の体組織にのみ発現される組織特異的遺伝子群（例えばインシュリンや甲状腺ホルモンなど）が胸腺髄質上皮細胞に網羅的かつ系統的に発現されることがわかってきた。この特徴的な遺伝子発現機構の全貌は未だ明らかではないが、その一部は髄質上皮細胞に発現される Aire によることが示され、事実ヒトやマウスでの Aire 遺伝子の欠失や変異は多彩な組織特異的自己免疫病に至ることもわかってきた。このように、自己分子発現に至る髄質上皮形成、制御性T細胞の生成、更には髄質に蓄積される樹状細胞の本態と寄与など、胸腺微小環境の本質解明を対象にした研究は、自己識別と自己寛容の成立機構解明に向けて新たな重要課題の焦点として注目されるようになってきた。

2. 研究の目的

研究代表者は、CCR7 ケモカインが皮質で正の選択を受けたTリンパ球の髄質への移動を司るとの発見をもとに(Immunity 2002, J Exp Med 2004, Immunity 2006)、組織特異的自己寛容成立および制御性T細胞生成における髄質移動ならびに髄質上皮細胞と樹状細胞の連携機構の解明を目指した。また、正と負の選択分岐を特徴づける分子シグナルの解析(Nature 1994, Immunity 1998)とりわけ Bcl-2 分子群に会合する新規リンパ球生存調節因子 IAN 分子群の発見をもとに(PLoS Biol 2006)、正と負の選択や制御性T細胞の生成に関与する胸腺微小環境分子の解明を目指した。研究分担者は、Aire による自己寛容成立制御が髄質上皮細胞における組織特異的遺伝子転写制御に留まらない可能性を示した実績 (J Exp Med 2004, J Immunol 2005, J Clin Invest 2006) をもとに、Aire を介した胸腺内Tリンパ球分化制御

と自己寛容成立機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

胸腺微小環境を構成する胸腺ストローマ細胞とりわけ胸腺上皮細胞の安定的な分離精製法を樹立し、これらの細胞亜集団の遺伝子発現をマイクロアレイ等で解析した。

遺伝子の機能解析には、必要に応じてノックアウトマウスやノックインマウスの作出を行った。

正と負の選別を含む自己識別能・自己寛容の解析、自己免疫疾患発症の解析は、必要に応じて TCR トランスジェニックマウス等との交配を行い、マウス個体を対象にした生理的・病理的な形質解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胸腺髄質での自己寛容確立に必要なケモカインの同定：

CCR7 ノックアウトマウスまたは CCR7 リガンド欠損マウスにおける胸腺細胞の胸腺微小環境局在と、CCR7 ノックアウト TCR トランスジェニックマウスにおける負の選択の効率の解析から、CCR7 ケモカインを介したTリンパ球の皮質から髄質への移動が胸腺髄質上皮細胞の提示する組織特異的自己抗原に対するTリンパ球の負の選択による自己寛容確立に必須であることを明らかにした(PNAS 2009)。

また、胸腺髄質上皮細胞が産生する組織特異的自己抗原に対する負の選択に、胸腺内を動き回る樹状細胞が貢献することも明らかにされ、更に、胸腺髄質上皮細胞が胸腺髄質上皮細胞に固有の核内因子 Aire 依存性にケモカイン XCL1 を産生し、XCL1 による胸腺内樹状細胞の髄質中央部への誘引が、胸腺における制御性T細胞の産生に重要であり自己寛容の確立に必要であることを明らかにした(J Exp Med 2011)。

(2) 胸腺髄質上皮細胞の増殖と機能を促進するサイトカインの同定：

正の選択をうけたTリンパ球を髄質へと誘引する CCR7 ケモカインの発現と、全身の臓器に発現される自己抗原の遺伝子発現に関与する核内因子 Aire の発現を指標に、機能的な髄質上皮細胞の分化および増殖を定性的および定量的に評価する技術を確立した。そのうえで、髄質上皮細胞に発現される遺伝子のマイクロアレイ解析を行うことで、正の選択をうけた胸腺Tリンパ球によって発現される RANKL が髄質上皮細胞の増殖を誘導することを明らかにした。また、RANKL と同じく TNF ファミリーに属する CD40L に補完的な機能があることが明らかになった(Immunity 2008a-c)。

また、胸腺髄質上皮細胞の増殖と自己寛容確立能に重要な RANKL は、生後には正の選択をうけた胸腺Tリンパ球に由来するが、胎生後期から新生仔期には V γ 5 陽性の $\gamma\delta$ T細胞に由来することを明らかにした (Immunity 2012)。

(3) 胸腺皮質での正の選択に必要なプロテアソームの同定：

胸腺上皮細胞に発現される遺伝子の探索およびノックアウトマウスの形質解析等から、胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現され、CD8 陽性キラーT細胞の生成に必要なプロテアソーム構成鎖 β 5t を同定した (Science 2007)。

また、 β 5t ノックアウトマウスと種々の TCR トランスジェニックマウスの交配実験等により、 β 5t を含む胸腺プロテアソームは、胸腺皮質上皮細胞に固有のクラス 1 MHC 複合体レパトアを発現させることで、生体防御に有用で機能的な CD8 T細胞のレパトア形成を担うことを明らかにした (Immunity 2010)。

(4) 胸腺髄質上皮細胞に発現される Aire の解析：

Aire 遺伝子の発現制御下に蛍光タンパク質を発現するノックインマウスを樹立し、Aire 発現および非発現の胸腺髄質上皮細胞を対象に自己抗原の発現を解析した。Aire 依存的自己抗原遺伝子の発現はもっぱら Aire 発現細胞から認められたのに対し、Aire 非依存的自己抗原遺伝子の発現は Aire 発現細胞と Aire 非発現細胞の両方から検出された。他方、免疫組織染色から Aire 欠損マウスの Aire 発現細胞に形態変化と分布異常を認めたことから、Aire は胸腺髄質上皮細胞における一部の自己抗原遺伝子の発現に関わるとともに、胸腺髄質上皮細胞の分化に対しても重要な働きを持つことが明らかになった (J Exp Med 2008)。

また、Aire 遺伝子は、ES 細胞をはじめ胎生初期にも発現することも明らかにされた (J Exp Med 2010)。

更に、モデル自己抗原 ovalbumin を Aire 遺伝子座に組換えたマウスを作出し ovalbumin 応答性 TCR トランスジェニックマウスおよび Aire 欠損マウスと交配させることによって、自己抗原応答性 T細胞の胸腺内排除における Aire 発現細胞の解析を進めると共に、Cre recombinase とヒトエストロゲン受容体リガンド結合領域変異体との融合タンパク質 (Cre-ER) Aire 遺伝子座に挿入したノックインマウスを樹立することで、Aire 発現細胞のターンオーバー (半減期) について解析を進めている (未発表)。

(5) 胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞

の分岐機構の解析：

皮質上皮細胞特異的に発現される分子として見いだした胸腺プロテアソーム構成鎖 β 5t の遺伝子座に Cre 遺伝子を組み換えることで皮質上皮細胞特異的に遺伝子を改変させるマウスを作出した。Cre 発現に応じて蛍光タンパク質を不可逆的に発現するレポーターマウスとの交配により、胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞の共通前駆細胞に β 5t が発現することを明らかにしつつある (未発表)。

(6) 意義：

生体の自己を認識することで個体を防御する免疫システムは、すべての生物の生存維持に不可欠である。なかでも自己と非自己の識別を担当する Tリンパ球の抗原認識特異性レパトア確立は、ヒトを含む脊椎動物の生存と健康に必須であり、その不全は自己免疫疾患または免疫不全症につながる。本研究の成果は、Tリンパ球レパトア形成を担う胸腺微小環境の分子本態解明につながり、レパトア形成の再構築に基づく免疫疾患の根本的治療法の開発に近づくと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 64 件)

- ① Roberts NM, White AJ, Jenkinson WE, Turchinovich G, Nakamura K, Withers DR, McConnell FM, Desanti GE, Benezech C, Parnell SM, Cunningham AF, Paolino M, Penninger J, Simon K, Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y, Caamano JH, Hayday AC, Lane PJ, Jenkinson EJ, Anderson G. Rank signaling links the development of invariant $\gamma\delta$ T cell progenitors and Aire⁺ medullary epithelium. **Immunity**. 36:427-437 (2012) [査読有] DOI:10.1016/j.immuni.2012.01.016
- ② Lei Y, Mat Ripen A, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker L, Bosl M, Hollander GA, Hayashi Y, de Waal Malefyt R, Nitta T, Takahama Y. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. **J Exp Med**. 208:383-394 (2011) [査読有] DOI:10.1084/jem.20102327
- ③ Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Mat Ripen A, Ishimaru N, Koyasu S, Tanaka K, Takahama Y. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8⁺ T cells.

- Immunity.** 32:29-40 (2010) [査読有]
DOI:10.1016/j.immuni.2009.10.009
- ④ Nishikawa Y, Hirota F, Yano M, Kitajima H, Miyazaki J, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M.
Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells prior to end-stage terminal differentiation.
J Exp Med. 207:963-971 (2010) [査読有]
DOI:10.1084/jem.20092144
- ⑤ Nitta T, Nitta S, Lei Y, Lipp M, Takahama Y.
CCR7-mediated medulla migration of developing thymocytes is essential for negative selection to tissue-restricted antigens.
Proc Natl Acad Sci USA. 106:17129-17133 (2009) [査読有]
DOI:10.1073/pnas.0906956106
- ⑥ Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, Yano K, Ishimaru N, Hayashi Y, Matsumoto M, Matsuo K, Penninger JM, Takayanagi H, Yokota Y, Yamada H, Yoshikai Y, Inoue J, Akiyama T, Takahama Y.
The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator.
Immunity. 29:438-450 (2008) [査読有]
DOI:10.1016/j.immuni.2008.06.018
- ⑦ Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J.
The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance.
Immunity. 29:423-437 (2008) [査読有]
DOI:10.1016/j.immuni.2008.06.015
- ⑧ Irla M, Hugues S, Gill J, Nitta T, Hikosaka Y, Williams IR, Hubert FX, Scott HS, Takahama Y, Hollander GA, Reith W.
Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity.
Immunity. 29:451-463 (2008) [査読有]
DOI:10.1016/j.immuni.2008.08.007
- ⑨ Yano M, Kuroda N, Han H, Meguro-Horike M, Nishikawa Y, Kiyonari H, Maemura K, Yanagawa Y, Obata K, Takahashi S, Ikawa T, Satoh R, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M.
Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.
J Exp Med. 205:2827-2838 (2008) [査読有]
DOI:10.1084/jem.20080046
- ⑩ Matsumoto M, Zhou Y, Matsuo S, Nakanishi H, Hirose K, Oura H, Arase S, Ishida-Yamamoto A, Bando Y, Izumi K, Kiyonari H, Oshima N, Nakayama R, Matsushima A, Hirota F, Mouri Y, Kuroda N, Sano S, Chaplin DD.
Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology.
Proc Natl Acad Sci USA. 105:6720-6724 (2008) [査読有]
DOI:10.1073/pnas.0709345105
- ⑪ Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K.
Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes.
Science. 316:1349-1353 (2007) [査読有]
DOI:10.1126/science.1141915
- [学会発表] (計 146 件)
- ① Takahama Y. T lymphocyte repertoire formation in thymic microenvironments.
5th Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia Oceania. 2012年3月15日. インド ニューデリー [招待講演]
- ② Takahama Y. T-cell repertoire formation in the thymus.
Cold Spring Harbor Asia Conferences -Frontiers of Immunology in Health and Diseases-. 2010年11月9日. 中国 蘇州 [招待講演]
- ③ Takahama Y. Thymic microenvironments that shape T cell repertoire.
14th International Congress of Immunology. 2010年8月23日. 神戸 [招待講演]
- ④ Takahama Y. XCL1 regulates medullary accumulation of thymic dendritic cells

and thymic development of regulatory T cells.

Gordon Research Conference on Chemotactic Cytokines. 2010年6月1日. イタリア ルッカ [招待講演]

- ⑤ Takahama Y. Thymus-specific self-peptide repertoire shapes immunocompetent repertoire of T cells.
第39回日本免疫学会. 2009年12月2日. 大阪 [招待講演]
- ⑥ Takahama Y. Positive selection by thymoproteasome-expressing thymic epithelial cells shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells.
2nd European Congress of Immunology. 2009年9月14日. ドイツ ベルリン [招待講演]
- ⑦ Takahama Y. RANK ligand produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator.
4th Congress of the Federation of Immunology Societies of Asia-Oceania. 2008年10月18日. 台湾 台北 [招待講演]
- ⑧ Takahama Y. The chemokine system in the construction and function of the thymus.
Keystone Symposium on Chemokines and Chemokine Receptors. 2008.1.14. 米国 デンバー [招待講演]
- ⑨ Takahama Y. Thymic microenvironments for shaping T-cell repertoire.
第37回日本免疫学会. 2007年11月21日. 東京 [招待講演]
- ⑩ Takahama Y. Thymic microenvironments and central tolerance.
13th International Congress of Immunology. 2007年8月22日. ブラジル リオデジャネイロ [招待講演]

[図書] (計8件)

- ① Nitta T, Takahama Y.
Toward understanding how the immune system establishes a diverse yet self-tolerant T-cell repertoire: stepwise roles of thymic microenvironments.
Systems Biology: The Challenge of Complexity. eds. Nakanishi S, Kageyama R, Watanabe D. Springer. p71-82 (2009)

- ② Liu C, Takahama Y.
Development of helper and regulatory CD4+ T cells in the thymus.
Effector CD4+ T Cells in Health and Disease. eds. Na S, Venkataraman C. Transworld. p192-196 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: Evaluation device for fluorescent group, computer-executable evaluation program for fluorescent group, and evaluation system for fluorescent group.
発明者: Takahama Y., Nitta T, Nakano Y.
権利者: 国立大学法人徳島大学、株式会社ニコン
種類: 米国特許 PF11001
番号: 12/979,858
出願年月日: 2010年12月28日
国内外の別: 外国

名称: 蛍光集団の評価装置、コンピュータ実行可能な蛍光集団の評価プログラム、及び蛍光集団の評価システム
発明者: 高浜洋介、新田剛、中野義太郎
権利者: (株)ニコン、徳島大学
種類: 特許出願
番号: 2008-179765
出願年月日: 2008年7月10日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計2件)

名称: Method of acquiring immunological tolerance
発明者: Takahama Y.
権利者: Takahama Y., JST.
種類: U. S. Patent
番号: 7671250 B2
取得年月日: 2010年3月2日
国内外の別: 外国

[その他]

○報道

- ・徳島新聞「免疫システム制御細胞生成メカニズム解明」5/7/2011
- ・日本経済新聞「キラーT細胞生成の酵素解明」5/30/2010
- ・朝日新聞「がん攻撃キラーT細胞生成のカギは胸腺内の酵素」1/26/2010
- ・読売新聞「自己免疫疾患抑制たんぱく質を発見」12/8/2008
- ・朝日新聞「自己免疫病のカギ握るたんぱく質確認」9/29/2008

○科学コミュニケーション活動

- ・日本免疫学会主催の科学コミュニケーション活動「免疫ふしぎ未来」の創設と分担
2011/8/21 参加（東京）
2009/5/2-3 参加（東京）
2008/5/3-4 主催（東京）
2007/5/3-4 創設と主催（東京・徳島）
- ・第 14 回国際免疫学会議組織委員会主催の科学コミュニケーション活動「Immunology in Japan」の担当 2010/8/22-27（神戸）

○ホームページ

- ・<http://immsself.umin.jp>

・

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dei>

・

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高濱 洋介 (TAKAHAMA YOUSUKE)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授

研究者番号：20183858

(2) 研究分担者

松本 満 (MATSUMOTO MITSURU)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：60221595