

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19130

研究課題名(和文) 胸腺上皮細胞亜集団の分岐メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the development of thymic epithelial cells

研究代表者

大東 いずみ (OHIGASHI, Izumi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・准教授

研究者番号：00596588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：5tの転写制御メカニズムを明らかにすることにより、上皮前駆細胞から皮質、髄質上皮細胞分岐を担う分子メカニズムの解明を目指した。Foxn1は胸腺器官形成に必須な転写因子であり、Foxn1欠損マウスでは5t発現が検出されない。そこで、Foxn1が5t転写を制御する可能性について検討したところ、Foxn1は胸腺皮質上皮細胞において5tタンパク翻訳開始点近傍の配列に結合し、5tの発現を制御することが明らかになった。また、Foxn1による5tの発現制御は、胸腺でのCD8+T細胞の適切な産生に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The thymus is an organ that produces functionally competent T cells that protect us from pathogens and malignancies. Foxn1 is a transcription factor that is essential for thymus organogenesis; however, the direct target for Foxn1 to actuate thymic T cell production is unknown. Here we show that a Foxn1-binding cis-regulatory element promotes the transcription of 5t, which has an essential role in cortical thymic epithelial cells to induce positive selection of functionally competent CD8+ T cells. A point mutation in this genome element results in a defect in 5t expression and CD8+ T cell production in mice. The results reveal a Foxn1-5t transcriptional axis that governs CD8+ T cell production in the thymus

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 獲得免疫 胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

T細胞による自己と非自己の識別は、生体に侵入した外来微生物から自己生体を守る獲得免疫システムにとって欠かすことのできない性状であり、健康な生体の成長と維持に必要である。T細胞による自己・非自己の識別能の異常は、免疫不全症や自己免疫疾患などの重篤な慢性疾患をもたらす。特に、自己免疫疾患は罹患者数が多く、種類は多岐にわたり、厚生労働省が定める特定疾患に指定されている難病も多いが、治療法は対症療法であり、根本的治療法の確立に向けてのアプローチが必要とされている。

T細胞は胸腺で分化・成熟し、自己と非自己の識別能を獲得する。胸腺は、皮質上皮細胞と髄質上皮細胞により特徴づけられる皮質と髄質の両微小環境により構成されており、それぞれの微小環境は異なる機能を持ち合わせることで、多様な外来抗原に反応でき、自己に寛容なT細胞を作り上げる。皮質では、皮質上皮細胞上で発現する主要組織特異的抗原複合体に結合した自己抗原を認識できるT細胞が「正の選択」により選別される。いっぽう髄質では、髄質上皮細胞や樹状細胞が末梢組織で機能する多くの自己抗原となるタンパク質を発現し、正の選択により選別されたT細胞の中から、自己抗原に強く反応する自己反応性T細胞を「負の選択」により排除するとともに、制御性T細胞を生成することで、T細胞の中樞性寛容を成立させる。近年、獲得免疫システムの構築メカニズムの解明に向けて、従来おこなわれてきたT細胞などの血球細胞の研究に加え、上皮細胞を主体とする胸腺微小環境の研究が国際的に活発になってきており、皮質上皮細胞と髄質上皮細胞は共通の上皮前駆細胞から分化することや、皮質上皮前駆細胞や髄質上皮前駆細胞の存在が報告されている(Rossi, et al. Nature 2006; Bleul, et al. Nature 2006; Hamazaki, et al. Nat Immunol 2007; Shakib, et al. J Immunol 2009)。一方、従来は上皮前駆細胞から皮質上皮細胞と髄質上皮細胞への分化は対称的に生じると考えられていたが、最近、私たちを含め3つの研究グループが、髄質上皮細胞は上皮前駆細胞からの分化途中で、皮質上皮細胞分子を発現する過渡的な上皮前駆細胞段階を経ることを報告し、上皮細胞分化に関する新しい知見を示した(Ohigashi, et al. PNAS 2013; Baik, et al. Eur J Immunol 2013; Ribeiro, et al. J Immunol 2013)。その中でも私たちは、かねてより進めていたT細胞のレパトア形成を担う胸腺微小環境の構築に関与する分子メカニズムの解明を目指した研究の中で、皮質上皮細胞に特異的に発現され、自己抗原ペプチドを生成することによりCD8T細胞の生成に重要な役割を担う胸腺プロテアソーム構成鎖5tの発現を指標とした上皮細胞分化能解析から、髄質上皮細胞は5tを発現する上皮前駆細胞から分化することを明らかにし

た(PNAS 2013)。この結果を受けて、5tを発現する上皮前駆細胞から髄質上皮細胞への分化が、個体の発生や老化に応じてどのように変化し、胸腺の維持、再生、退縮にどのように寄与するのかを明らかにするために、5t発現細胞の分化能トレースをおこない、胎生期、新生仔期、成体期に存在する5t陽性上皮前駆細胞は、それぞれどのような割合で、どのように胸腺の形成、維持、再生に寄与しているのかを明らかにしつつある。しかし、5tを発現する上皮前駆細胞から、どのように5tの発現を保つ皮質上皮細胞と、5tの発現が抑制された髄質上皮細胞へと分岐するのか、その分子メカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでの研究結果を受け、5tをはじめとする胸腺上皮前駆細胞で発現する皮質関連分子に着目し、これらの発現制御メカニズムを明らかにすることにより、皮質関連分子を発現する上皮前駆細胞から髄質上皮細胞と皮質上皮細胞への分岐メカニズム解明の端緒を開くことができるのではないかとこの着想に至った。これを明らかにすることにより、T細胞の抗原特異性レパトア形成を担う機能的な胸腺微小環境構築の本質理解へ向けての理論的根拠を示し、胸腺上皮細胞の再構築による自己免疫疾患をはじめとする免疫疾患の根本的治療法開発を目指した理論的基盤構築を図る。

3. 研究の方法

私たちは以前、胸腺上皮細胞分化に必須な転写因子であるFoxn1を欠損するマウスの胸腺原基では5tの発現が見られないことを報告しており(Ripen, et al. Eur J Immunol 2011)、Foxn1が5tの発現を正に制御することが予想された。さらに先行実験において、5tの発現を緑色蛍光タンパク質Venusの発現で検出可能な5t-Venusマウスの胎仔胸腺を、髄質上皮細胞への分化に重要なTNFファミリーサイトカインRANKLの存在下で培養したところ、Venusの発現が低下するとの結果を得ており(未発表)、RANKLシグナルが5tの発現を負に制御することが考えられる。また、皮質上皮細胞と髄質上皮細胞での遺伝子発現を比較したマイクロアレイ解析結果から、発現差分がみられる転写因子がいくつか存在する。

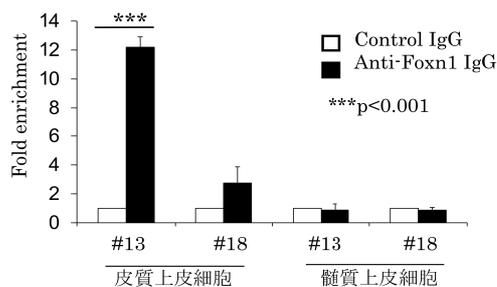
そこで、5tゲノム領域下に緑色蛍光タンパク質EGFPを結合し、5tの発現をEGFP発現で検出可能にしたレポータープラスミドと、皮質上皮細胞または髄質上皮細胞で発現がみられ、5tゲノム領域に結合可能な配列が存在する転写因子の発現プラスミドを細胞株に共発現するレポーターアッセイにより、5tの発現を正または負に制御する転写因子を同定するとともに、5tゲノム上の転写制御領域の同定をおこなった。また、5t

ゲノム上の転写因子結合領域を欠損するノックインマウスの作製に着手し、5tの発現制御を担う分子メカニズムを検証した。

4. 研究成果

5tの全ゲノム領域14kbにはFoxn1が認識する配列のcore配列であるACGC配列が全部で18箇所検出された。In vitro DNA免疫沈降アッセイにおいて、これら18箇所のFoxn1結合候補領域とFoxn1タンパクの結合について検討したところ、翻訳開始点の80bp上流(site #13)の領域にFoxn1が結合することが明らかになった。そこで、site #13を含む5tの翻訳開始点から1kb上流の領域下に緑色蛍光タンパクEGFPを繋いだレポータープラスミドとsite #13のcore配列、およびnon-core配列に変異を挿入したレポータープラスミドを作製し、Foxn1発現プラスミドと共にHEK293T細胞に導入し、Foxn1によるEGFP発現制御をフローサイトメトリー解析で検討した。その結果、Foxn1の発現によってレポーター遺伝子の発現上昇が検出されたが、site #13のcore配列に変異を入れると、Foxn1の発現下においても、EGFPの発現上昇はキャンセルされた。一方、site #13のnon-core配列に変異を入れても、Foxn1によるEGFP発現の上昇は障害されなかった。また、マウスの胸腺皮質上皮細胞と髄質上皮細胞を対象に、Foxn1のsite #13への結合をクロマチン免疫沈降アッセイで検討したところ、皮質上皮細胞ではFoxn1のsite #13への結合が検出されたが、5tの3'ゲノム調節領域上にあるsite #18や、髄質上皮細胞におけるsite #13への結合は低かった(図1)。

(図1) クロマチン免疫沈降アッセイ



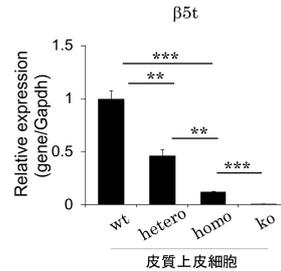
これらのことから、Foxn1は胸腺皮質上皮細胞においてsite #13を介して5tの発現を制御することが明らかになった。

そこで、Foxn1による5tの発現制御を体内で検討するために、site #13のcore配列に変異を挿入したノックインマウスを作製した。胸腺上皮細胞における5tの発現を検討したところ、ノックインホモマウスでは5tタンパク、及びmRNAの発現が低下した(図2)。

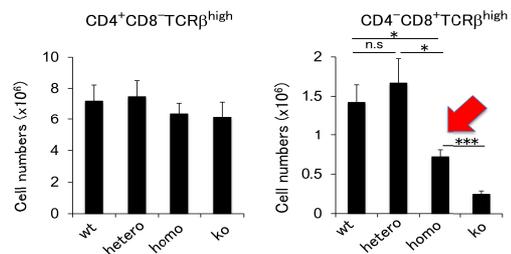
5tは胸腺でのCD8T細胞の産生に重要な分子であるため、ノックインマウスの胸腺におけるT細胞の産生についてフローサイトメトリー解析で検討を行った。CD4-CD8-細胞、

CD4+CD8+細胞、CD4+CD8-細胞の生成はsite #13の変異による影響を受けなかったが、ノックインホモマウスのCD4-CD8+細胞数は野生型マウスやヘテロマウスと比較すると有意に低下していた(図3)。

(図2) 皮質上皮細胞でのβ5t発現



(図3) 胸腺細胞数



さらに、ノックインホモマウスの二次リンパ組織におけるCD8+T細胞数も野生型マウスやヘテロマウスと比較すると有意に低下していた。一方、CD4+T細胞数はsite #13の変異によって影響は受けなかった。さらに、ノックインホモマウスの胸腺皮質上皮細胞と髄質上皮細胞を対象に、Foxn1のsite #13への結合をクロマチン免疫沈降アッセイで検討したところ、皮質上皮細胞ではFoxn1のsite #13への結合が低下していた。これらのことから、in vivoにおいてもFoxn1はsite #13を介して胸腺皮質上皮細胞における5tの発現を制御することが明らかになった。

しかし、Foxn1は髄質上皮細胞にも発現する。このため、Foxn1に加え他の転写制御因子が皮質上皮細胞特異的な5tの転写、または、髄質上皮細胞における5tの転写の抑制を担うことにより、皮質髄質上皮細胞への分岐を制御している可能性が考えられる。そこで、皮質上皮細胞と髄質上皮細胞での遺伝子発現を解析したマイクロアレイの結果から、発現差分が見られた転写因子を抽出し、in vitroレポーターアッセイで5t転写制御の有無を検討した。これまでに、RANKの下流分子であるRelB、髄質上皮細胞で発現が高いNKx2.6、Cdx1、Mxd1、Elf3、皮質上皮細胞で発現が高いGfil、Ets1による5t転写制御を検討したが、これらの転写因子は5tの転写を促進、または抑制しないことが明らかになった。さらに、皮質上皮細胞と比較して髄質上皮細胞で発現が高かった転写因子Elf5、UTF1、Sp6を欠損するマウスの胸腺を入手し、皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の分化についてHE染色、並びに蛍光免疫組織染色で検討

したが、これらの転写因子は髄質上皮細胞と皮質上皮細胞の分岐分化には関与していないことが明らかになった。

現在、発現差分が見られた転写因子を欠損するマウスの胸腺を入手し組織解析を進めると共に、胎仔胸腺から髄質系細胞の中でも未熟な髄質上皮前駆細胞と、皮質髄質共通上皮前駆細胞を含む細胞集団を分離し、これらの細胞での遺伝子発現を次世代シーケンス解析で検討し、皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の分岐を担う分子の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Takahama Y, Ohigashi I, Baik S, Anderson G. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nature Review Immunology*, 17: 295-305, 2017. doi:10.1038/nri.2017.12. 査読有.
2. Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, Murata S, Takahama Y. Foxn1-b5t transcriptional axis controls CD8+ T cell production in the thymus. *Nature communications*, 8: 14419, 2017. doi:10.1038/ncomms14419. 査読有.
3. Mayer CE, Zuklys S, Zhanybekova S, Ohigashi I, Teh HY, Sansom SN, Shikama-Dorn N, Hafen K, Macaulay IC, Deadman ME, Ponting CP, Takahama Y, Holländer GA. Dynamic spatio-temporal contribution of single b5t+ cortical epithelial precursors to the thymus medulla. *European Journal of Immunology*, 46: 846-856, 2016. doi:10.1002/eji.201545995. 査読有.
4. Ohigashi I, Kozai M, Takahama Y. Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. *Immunological Reviews*, 271: 10-22, 2016. doi: 10.1111/imr.12404. 査読有.
5. Ohigashi I, Takahama Y. Flow cytometry analysis of thymic epithelial cells and their subpopulations. *Methods in Molecular Biology*, 1323: 65-73, 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-2809-5_5. 査読有.
6. 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 Reports*, 13:

1432-1443, 2015.

doi:10.1016/j.celrep.2015.10.012. 査読有.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Ohigashi I, Uddin M, Takemoto T, Takahama Y. Foxn1 binding cis-regulatory element require for optimal CD8+ T cell production in the thymus. 11th International Symposium of the institute network. 2017年1月26日~27日. 徳島大学藤井記念ホール (徳島県徳島市).
2. Kozai M, Ohigashi I, Takahama Y. CCL21 regulates T-cell self-tolerance in thymic medulla. 11th International Symposium of the institute network. 2017年1月26日~27日. 徳島大学藤井記念ホール (徳島県徳島市).
3. 大東いずみ, 竹本龍也, 高浜洋介. 胸腺におけるCD8+T細胞生成を制御するFoxn1結合シス制御領域の同定. 第39回分子生物学学会. 2016年12月1日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
4. Fujimori S, Ohigashi I, Takemoto T, Takahama Y, Takada S. The spatio-temporal activation of Wnt/b-catenin signaling in the thymic epithelial cells in mouse thymus. 第39回分子生物学学会. 2016年12月1日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
5. Uddin M, Ohigashi I, Takahama Y. Foxn1 binding cis-regulatory element require for optimal CD8+ T cell production in the thymus. Kyoto T cell Conference 第26回学術集会. 2016年5月20日. 延暦寺会館 (京都府京都市).
6. Ohigashi I, Foxn1 binding cis-regulatory element require for optimal CD8+ T cell production in the thymus. 5th Bizan symposium. 2016年3月3日. 徳島大学日亜メディカルホール (徳島県徳島市).
7. Ohigashi I, Takahama Y. The differentiation potential of b5t+ thymic epithelial progenitors. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月18日. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).
8. 大東いずみ, 高浜洋介. 成体の胸腺髄質上皮細胞は髄質系細胞によって維持・再生される. Kyoto T cell Conference 第25

回学術集会. 2015年5月15日. 京都大学
芝蘭会館 (京都府京都市).

〔図書〕(計 1件)

1. Ohigashi I, Takahama Y. Thymocyte-mTEC cross talk for self-tolerance in T cells. Elsevier Ltd. Encyclopedia of Immunology, Vol.1, 3126 (263-267), 2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大東 いずみ (OHIGASHI, Izumi)
徳島大学・先端酵素学研究所・准教授
研究者番号: 00596588

(4)研究協力者

高浜 洋介 (TAKAHAMA, Yousuke)
坂田 三恵 (SAKATA, Mie)
ウディン マイン(UDDIN, Myn)