

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06228

研究課題名(和文) 自己免疫疾患を抑制する因子の機能解析とT細胞の負の選択機構の理解

研究課題名(英文) Negative selection of T cells by the factor suppressing autoimmunity

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)・助教

研究者番号：50637444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺で出来上がるT細胞は、われわれの獲得免疫機構の成立と維持に最も大切な細胞集団である。T細胞への分化は、胸腺のストローマ細胞の一つである髄質上皮細胞(Medullary thymic epithelial cell; mTEC)が自己抗原を提示することによって誘導される。これまでに、マウスモデルを用いた実験から、胸腺で出来上がる制御性T細胞は、一生にわたる自己免疫寛容の成立に重要であることが実証されている。われわれは、mTECでAireやFezf2によって発現誘導される自己抗原の発現量が誘導され、制御性T細胞の数や機能が変化し、自己免疫の程度や組織部位に影響を与える可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫寛容の破綻は、自己免疫疾患やアレルギー疾患を引き起こし、日常生活に大きな支障をきたす。自己免疫疾患の患者は、日本国内だけでも数百万人いると見積もられている。免疫疾患の患者数は年々増加の一途を辿り、社会的にも深刻な問題であり、根本的な治療法の確立が喫緊の課題である。自己抗原が特定されていない自己免疫疾患は多くあり、自己抗原を認識するT細胞の集団とその抗原を同定することは自己免疫疾患の根本的治療に関わる。自己抗原は胸腺内でストローマ細胞のmTECで主に発現しており、この分子基盤の解明が将来的に自己免疫の効率的な治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：T cells are one of the most important population for adaptive immune system. It is well known that T cells are generated in the thymus and the autoantigens are produced by medullary thymic epithelial cells expressing two transcriptional regulators Aire and Fezf2. In this study, we characterized the distinct features of Fezf2-dependent and Aire-dependent genes expressed in mTECs. Single cell RNA-seq analysis revealed the different expression pattern between Aire-dependent and Fezf2-dependent genes among mTECs. Our study suggest that the expression level of autoantigens might be key for the negative selection of T cells and regulatory T cell differentiation in the thymus to establish immune tolerance.

研究分野：免疫

キーワード：免疫寛容 獲得免疫 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれ哺乳類は獲得免疫システムを備えており、T細胞が中心的な役割を担っている。T細胞は、抗原受容体を介して抗原提示分子(major histocompatibility complex; MHC)上のペプチドの断片を抗原として認識することで、非自己の病原体を排除する。個体レベルで獲得免疫系が自己を攻撃しない現象は、自己免疫寛容と呼ばれる。免疫寛容の破綻は、自己免疫疾患やアレルギー疾患を引き起こし、日常生活に大きな支障をきたす。自己免疫疾患の患者数は日本国内だけでも数百万人と見積もられている。免疫疾患の患者数は年々増加の一途を辿り、社会的にも深刻な問題であり、根本的な治療法の確立が喫緊の課題である。

自己免疫寛容に関する重要な知見は今から50年以上前に遡る。1960年代、Yasutomi Izukaraが、新生仔マウスの胸腺を摘出し、その後の成獣マウスを解析するという実験を行った。出生直後に胸腺摘出を行うと、免疫不全状態となり、通常の飼育条件では感染症を起こして死亡し、胸腺がT細胞分化の場であることを証明し、生後3日(Postnatal day 3; PD3)で胸腺摘出を受けたマウスは、免疫系がほぼ正常に発達し、通常の飼育条件でも対照マウスとほぼ同じ寿命を全うする。この結果は、マウスの場合、その一生(約2年間)に出会う可能性がある環境中の微生物抗原ほぼ全てに対応可能なT細胞受容体レパトアが、生後3日までに胸腺で形成され末梢組織に用意されることを示唆する。ところが、生後3日での胸腺摘出を受けたマウスでは、その後卵巣にリンパ球浸潤が起こり、エストロゲン産生細胞が破壊されて子宮が萎縮する(Nishizuka, Y. *et al.*, *Science*, 1969)。この卵巣破壊の原因を解明する過程で、生後3日での胸腺摘出を受けたマウスに生後14日までに同系マウスから胸腺移植を行えば卵巣破壊が防げること、生後7日以降の同系マウスからリンパ組織のT細胞を移入することも発症防止効果があること、マウスの系統によっては、同じ方法(生後3日での胸腺摘出)でリンパ球浸潤を伴う甲状腺炎や胃炎などの自己免疫疾患が発生することなどが明らかとなった。

Nishizukaらの発見を元に、Shimon Sakaguchiらは、胸腺で成熟した生後3日以降で成熟するCD25陽性Foxp3陽性T細胞は、制御性T細胞と命名され、末梢での自己免疫の抑制に重要な細胞集団として報告された(Sakaguchi, *et al.*, *J. Immun.*, 1995)。近年、胎児期に胸腺で胸腺ストローマ細胞(Medullary thymic epithelial cell; mTEC)を介してつくられる制御性T細胞は、一生に亘る自己免疫寛容の成立に重要であることが示された(Yang *et al.*, 2015, *Science*)。

免疫寛容を司る制御性T細胞は胸腺の髄質で最終選別されている。この時、からだ中の自己成分(自己抗原)をmTECで異所的に発現させることで、一部の自己応答性T細胞は制御性T細胞へと分化している。しかし、mTECが、どのようにT細胞の選別を行っているのか、その分子メカニズムはよく解っていない。また生後早期に出来上がる制御性T細胞が、どのような自己抗原を認識し、免疫寛容の成立に重要なのかについては全く分かっていない。申請者が独自に同定した転写因子Fezf2は、mTECに選択的に発現しており自己抗原の発現を誘導し、T細胞の選別と自己免疫寛容の成立に必須の遺伝子である(Takaba *et al.*, 2015, *Cell*)。Fezf2は転写制御因子Aireと独立してmTECで遺伝子発現を制御されている可能性がある。

mTECの自己抗原発現機構とT細胞の選別機構、とくに制御性T細胞の分化機構を解明することは、自己免疫寛容成立機構の基本原理の理解と将来的な自己免疫疾患やアレルギー疾患・癌免疫の制御に重要である。

2. 研究の目的

おもに胸腺で出来上がる制御性 T 細胞は、われわれの生涯にわたる免疫寛容機構の成立に最も大切な細胞集団である。出生直後に産生される制御性 T 細胞への分化は胸腺のストローマ細胞の一つである髄質胸腺上皮細胞 (mTECs) によって誘導される。近年、マウスモデルを用いた実験から、胎児期に胸腺で出来上がる制御性 T 細胞は、一生に亘る自己免疫寛容の成立に重要であることが報告された。しかしながら、どのようなメカニズムで制御性 T 細胞が創出されるか不明な点が多い。また、mTEC の数や自己抗原遺伝子の発現量の変化は、制御性 T 細胞の数や機能が変化し、自己免疫病やアレルギー疾患、腫瘍免疫等に影響を与える可能性が報告されている。このように、免疫寛容に関わる制御性 T 細胞は胎児期から胸腺で分化して出来上がるが、どのような自己抗原を認識し、免疫寛容を成立させているのか全く分かっていない。以前我々は自己応答性 T 細胞を除去する際に関わる重要な転写因子 *Fezf2* を同定した。本研究は、この分子の機能解析を掘り進めるべく、*Fezf2* に対する転写制御システムと *Fezf2* を介した T 細胞の選別システムに注目して研究を展開させた。また、*Fezf2* とは独立して遺伝子の発現制御をしている転写制御因子 *Aire* に関しても機能解析を行うことで、どのように mTEC が自己抗原遺伝子を発現しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

Fezf2 抗体またはタグ標識 *Fezf2* ノックインマウスの樹立

Fezf2 の機能解析を行う際に、mTEC 特異的に *Fezf2* 遺伝子を欠損させた *Foxn1-Cre Fezf2*-floxed マウスを使用し、このコンディショナルノックアウトマウスを用いることで表現型を解析した。一方で、*Fezf2* 自体の機能を解析するために、胸腺内から *Fezf2* を取り出して機能解析することが必要であった。これまでに *Fezf2* タンパク質に対して検出感度の高い抗体が得られてないことから、抗 *Fezf2* 抗体を樹立することが急務であった。したがって、ラットに *Fezf2* のペプチド断片を抗原として免疫することで抗 *Fezf2* モノクローナル抗体を樹立することを試みた。一方で、*Fezf2* に対して目的の実験に使用出来るモノクローナル抗体が取得できない可能性があるため、*Fezf2* 遺伝子座に Flag ノックインマウスを作製することで、内在性の *Fezf2* タンパク質の挙動を *Fezf2*-flag タグマウスを樹立し、抗 Flag 抗体を用いることで胸腺内の *Fezf2* の機能解析をおこなうことを試みた。

次世代シーケンス解析

胸腺は、自己応答性 T 細胞を除去するために末梢組織で発現している遺伝子を異所的に、自己抗原 (組織末梢抗原: Tissue-restricted antigen: TRA) として発現させている。とくに、胸腺髄質上皮細胞 (Medullary thymic epithelial cell) が TRA を発現させているが、TRA はどのような遺伝子なのか、客観的な指標と具体的な遺伝子リストがなかった。今回我々は野生型の mTEC と *Fezf2* 欠損または *Aire* 欠損マウス胸腺から mTEC を分取してきて、次世代シーケンサーによる RNA-sequencing (RNA-seq) 解析や質量分析解析を行うことで TRA を同定し遺伝子リストの作成を試みる。また、これまでに報告されている mTEC の単一細胞 RNA-seq 解析データを用いて、*Fezf2* 依存的または、*Aire* 依存的遺伝子は、どのような特徴があるかを解析する。また、mTEC を用いた Assay for Transposase-Accessible

Chromatin Sequencing (ATAC-seq) の解析により、網羅的オープンクロマチン領域解析を同定する。開いたクロマチン領域は、活性化状態にあるシス転写調節領域に高頻度に観測されるため、mTEC のシス転写調節領域の状態把握や新たなシス転写調節領域の探索をする。

TCR トランスジェニックマウスと MHC テトラマーの作製

Fezf2 依存的な遺伝子の中で自己抗原の候補となりうるものを探索し、その抗原を認識する T 細胞を同定する。その同定した T 細胞から T 細胞抗原受容体 (T cell receptor; TCR) をクローニングして、T 細胞にモノクローナルに特定の TCR を発現するトランスジェニックマウスを樹立する。このマウスを用いて、Fezf2 依存的な抗原を認識する T 細胞が負の選択や制御性 T 細胞の分化誘導を受けるかどうかを検証する。さらに、Fezf2 依存的な抗原ペプチドを認識する T 細胞を野生型マウスから回収するために MHC テトラマーを作製し、とくていの抗原ペプチドを認識する T 細胞や Foxp3 レポーターマウスをもちいることで特定の抗原を認識する制御性 T 細胞を回収する。

4. 研究成果

mTEC において転写制御因子 Aire や Fezf2 が具体的にどの程度の遺伝子数を直接制御しているのか未知であるため、抗 Fezf2 モノクローナル抗体の樹立を試みた。Fezf2 タンパク質の C 末のペプチドを標的としてラットに免疫し、ELISA スクリーニングと 293 細胞に人工的に Fezf2 タンパク質を発現させてフローサイトメトリーで認識するハイブリドーマを Fezf2 抗体産生する候補株として、6 クローン樹立した。その上で、ウエスタンブロットや野生型マウスをもちいて組織抗体染色とフローサイトメトリー解析を行い評価した。また、クロマチン免疫沈降法-シーケンス (ChIP-seq) 解析を行うことで、発達時期を追うことで、実際に Aire や Fezf2 が mTEC において、どの程度の自己抗原遺伝子を発現制御しているかを、CRISPR/Cas9 システムを活用して Flag を Fezf2 の N 末に標識したマウスを樹立している (Flag-Fezf2 ノックインマウス)。Flag-Fezf2 ノックインマウスを用いた ChIP-seq 解析を行い、mTEC における Fezf2 がどの自己抗原遺伝子のどの領域に結合しているかを明らかにする。妊娠期に誘導されるエストロゲンなど性ホルモンによる影響で mTEC の Aire 遺伝子の発現量が変化し自己免疫発症に大きく寄与することが報告されている (Dragin et al., JCI, 2016, Zhu et al., Nat. Comm, 2016)。申請者らは、生後 3 日前後で Fezf2 遺伝子の発現が上昇することや、Fezf2 遺伝子の発現制御を支配する TNF 受容体 LT_R の存在を明らかにした (Takaba, et al., Cell, 2015)。しかし、LT_R 欠損マウスでは Fezf2 の発現は半分程度にしか低下せず、TNF 受容体の下流に位置するアダプター分子 Traf6 を欠損させた胸腺でのみ、Fezf2 の発現がまったく検出されなかった (Takaba et al., Cell, 2015)。以上の結果より、他の TNF 受容体に依る Fezf2 遺伝子の発現制御機構が存在すると考えられる。申請者はこれまでに *ex vivo* のシステムによる胎仔胸腺器官培養法 (fetal thymus organ culture; FTOC) を確立し、抗体等を用いて受容体を任意で刺激することが可能なシステムを構築した。FTOC の実験系を用いて、mTEC で誘導される Fezf2 遺伝子の詳細な発現制御メカニズムの解明に挑んだ。

申請者はこれまでに、Fezf2 欠損マウスを用いた遺伝子発現解析により、mTEC で Fezf2 によって制御されている自己抗原遺伝子を複数同定した (Takaba et al., Trends in Imm., 2017)。胸腺内で Fezf2 依存的な抗原としてカラーゲン遺伝子 (Col) に着目し、Col のペプチドを認識する T 細胞が、負の選択と制御性 T 細胞の分化を受けているのかを Col-MHC テトラマ

ーと TCR トランスジェニックマウスを用いた二つの方法で実証した。

近年、制御性 T 細胞は自己免疫の寛容に重要であるだけでなく、脳や皮膚、肺や腸などの末梢組織へ移動し、組織修復や免疫抑制作用、代謝の維持に関わることが報告されている。このような細胞集団は組織制御性 T 細胞（組織 Treg）として呼ばれているが、申請者はこれまでに、自己免疫関節炎マウスモデルで、コラーゲンを認識する制御性 T 細胞が関節滑膜局所に集積し、炎症の抑制に関与している可能性を見出した。この結果は、あらたな組織 Treg の同定したのみでなく、リウマチ患者の関節に集積している T 細胞がコラーゲンを認識するという報告と一致することから新たな制御性 T 細胞のマーカーを同定することが可能となる。今後なぜ関節局所へ Col 特異的な制御性 T 細胞が集積するかの原因を究明していくことは重要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiroyuki Takaba, and Hiroshi Takayanagi 「The Mechanisms of T cell selection in the Thymus」 *Trends in Immunology*, 38(11):805-816. doi: 10.1016/j.it.2017.07.010. (2017)
査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1、Self-Reflection by Tolerogenic Factors: Promiscuous Gene Expression in the Thymus
[招待有り]

高場 啓之

日本免疫学会 2018 年 12 月 10 日

2、Epigenetic regulation of thymic self-antigen expression for immune tolerance

Hiroyuki Takaba, Yoshihiko Tomofuji, Hiroshi Takayanagi

ゴードン会議 2018 年 6 月 16 日

3、免疫学のセントラルドグマ [招待有り]

高場 啓之

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高柳 広

ローマ字氏名：Takayanagi, hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。