

令和元年6月23日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19937

研究課題名（和文）老化に伴う免疫病態の分子基盤解明と治療戦略

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism underlying immune disorder during aging

研究代表者

松田 達志（MATSUDA, Satoshi）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：個体の老化に伴う最も顕著な免疫系の変化は、胸腺環境を構築する細胞群の減少に伴う胸腺の退縮であり、鳥類や両生類を含むすべての高等動物にプログラムされた現象である。本研究では、各種遺伝子改変マウスを用いた人為的胸腺退縮系を用いることで、胸腺髄質上皮細胞におけるmTORC1シグナルが胸腺環境の維持、ひいては胸腺細胞数の維持に必須の役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺退縮の生理的意義やその分子機構に関しては、適切な老化モデルが少なく、未解明な点が多く残されているのが現状である。本研究により、胸腺上皮細胞のmTORC1シグナルを欠失させることで、人為的に胸腺退縮を引き起こせることが明らかとなった。この系を用いることで、これまで謎に包まれてきた、胸腺退縮の生理的意義解明に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：One of the most drastic changes in the immune system during aging is “thymic involution”, which associates with decrease in numbers of thymic T cells as well as thymic epithelial cells. This thymic involution is evolutionally conserved phenomenon in all vertebrates. We have revealed, by using newly developed “artificial” thymic involution system, that mTORC1 signal in the medullary thymic epithelial cells (mTEC) plays an essential role to maintain environment in the thymus. We have already found that loss of mTORC1 signal in mTEC leads to marked decrease in numbers of thymic T cells.

研究分野：免疫学、細胞生物学

キーワード：胸腺退縮 mTORC1 胸腺上皮細胞

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

1. 研究開始当初の背景

免疫系の司令塔である T 細胞は、胸腺において「自己」と「非自己」を選別するための能力を獲得する。それを支えるのは、胸腺上皮細胞や樹状細胞等から構成される 3 次元の精緻なネットワークであり、これら胸腺環境の異常は自己免疫疾患や T 細胞機能不全などの免疫病を引き起こす。

個体の老化に伴う最も顕著な免疫系の変化は、胸腺環境を構築する細胞群の減少に伴う胸腺の退縮であり、鳥類や両生類を含む全ての高等動物にプログラムされた現象である。しかし、胸腺退縮の生理的な意義やその分子機構に関しては、適切な老化モデルが少なく、未解明な点が多く残されているのが現状である。例えば、老化に伴う自己免疫応答の亢進や抗腫瘍免疫能の低下といった変化が、T 細胞の側の細胞老化に起因するのか、胸腺の退縮による T 細胞応答の質的な変化に起因するのか、もしくはその両者の相乗効果の結果なのか、未だに議論が続いている。

2. 研究の目的

研究代表者は、ごく最近、金沢大学がん研究所・平尾教授との共同研究で、PI3K の下流で機能する mTORC1 シグナルを全身で欠失させたところ、胸腺退縮が引き起こされることを見出した (Hoshii *et al.*, PNAS.111, 3805 (2014))。その後の骨髄キメラマウスを用いた解析から、骨髄由来の血球系細胞ではなく、胸腺を形作る上皮側の細胞において mTORC1 シグナルを消失させるだけで、胸腺の速やかな萎縮が誘導されることが明らかとなった (図 1)。以上の事実は、胸腺上皮細胞における mTORC1 シグナルが、胸腺環境維持に必須の役割を担っていることを強く示唆して



いる。以上の知見に基づき、mTORC1 シグナルを切り口に胸腺退縮の生理的意義とその分子基盤の解明を目指すべく、本研究を着想するに至った。

胸腺環境を構成する胸腺上皮細胞は、胸腺皮質細胞 (cTEC) と胸腺髄質細胞 (mTEC) に大別され、それぞれ T 細胞の「正の選択」と「自己寛容の確立」に重要な役割を果たしている。そこで第一に、mTORC1 シグナルの欠失が cTEC・mTEC の細胞数や分化状態に影響を及ぼすか否かを検証すると共にその背景となる分子機構の解明に取り組む (課題 1: 胸腺退縮の分子機構の解明)。並行して、胸腺上皮細胞における mTORC1 シグナルの欠失が T 細胞分化に与える影響を個体レベルで評価する (課題 2: 胸腺退縮が免疫応答に及ぼす影響の評価)。さらに、老化に伴う胸腺退縮を人為的な mTORC1 シグナルの活性化によって回復可能かの検証を行う (課題 3: mTORC1 シグナルを標的とした免疫老化回復の試み)。

3. 研究の方法

(1) 胸腺退縮の分子機構の解明

cTEC と mTEC は、共に転写因子である Foxn1 依存性に、共通の胸腺上皮前駆細胞から分化することが知られている。cTEC と mTEC の分岐を調節する分子機構は未だ解明されていないが、RANKL-TRAF6 経路が mTEC の分化・成熟に特異的に関与するなど、両者が異なる分子機構で制御

されているのは間違いない。そこで、mTORC1 シグナルの欠失がこれら上皮細胞の分化・増殖・生存等に影響を及ぼすか否か、FACS を用いた細胞生物学的な解析を行う。

(2) 胸腺退縮が免疫応答に及ぼす影響の評価

Raptor-ERT2 マウスにタモキシフェンを投与すると、腸の上皮細胞の増殖不全が原因となり、2週間程度で全例が死亡する。したがって、そのままではT細胞分化に与える影響を長期にわたって評価することが困難である。そこで、Raptor-ERT2 マウスの胎児胸腺を、内在性の胸腺を欠損した nude マウス (C57BL/6-nude) の腎皮膜下へ移植する。この操作により、胎児胸腺が生着後にタモキシフェン処理を行うことで、移植胸腺のみで mTORC1 シグナルの欠失を誘導することが可能となる。タモキシフェン処理に伴う移植胸腺退縮により T細胞の分化に異常が見られるか否か、FACS により解析を行う。

(3) mTORC1 シグナルを標的とした免疫老化回復の試み

mTORC1 シグナルの負の制御因子である Tsc1 を欠失させることで、mTORC1 シグナルを恒常的に活性化させることが可能である。この系を用い、mTORC1 シグナルの人為的増強によって老化に伴う胸腺退縮が抑制できるか否か検証を行う。なお、Raptor と同じく、Tsc1 も全身で消失させた場合には全例が死亡してしまう (未発表)。そこで、徳島大学・高濱教授が開発した、ドキシサイクリン誘導性に胸腺上皮細胞特異的に Cre を発現するマウス (□5t-iCre) と Tsc1 のコンディショナルノックアウトマウスを交配することで、ドキシサイクリン誘導性に胸腺上皮細胞のみで Tsc1 欠失可能なマウス (Tsc1-Dox) を作出する。老齢化した Tsc1-Dox マウスをドキシサイクリンで処理することで退縮した胸腺のサイズが回復するか否かを評価する。胸腺サイズの回復が認められた場合は、さらに各種免疫を行い、獲得免疫能が正常に保たれているか否かを評価する。

4. 研究成果

(1) 胸腺退縮の分子機構の解明

胸腺上皮細胞の mTORC1 シグナルのみを特異的に欠失させるために、致死量のガンマ線を照射した Raptor-ERT2 マウスに野生型マウスの骨髄を移植し、胸腺細胞が全て野生型由来となるキメラマウスを作出した。得られたキメラマウス群にタモキシフェンを投与して2週間後に cTEC/mTEC の細胞数や性状を調べたところ、

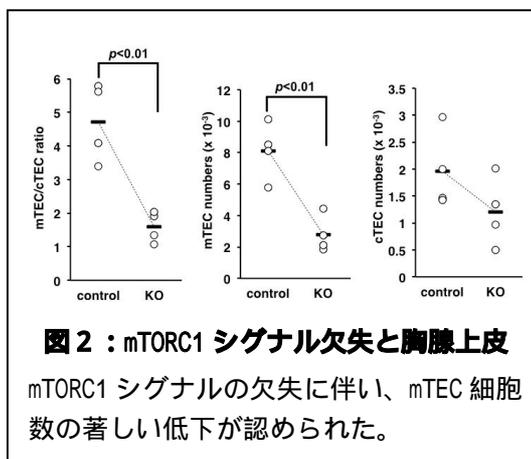


図2：mTORC1 シグナル欠失と胸腺上皮
mTORC1 シグナルの欠失に伴い、mTEC 細胞数の著しい低下が認められた。

胸腺上皮を構成する mTEC と cTEC の比率が著しく低下していることが明らかとなった (図2)。各々の細胞数を調べたところ、タモキシフェン処理に伴い、mTEC の細胞数の顕著な減少が認められ、このことが mTEC:cTEC の比率の原因と考えられた。さらにその分子基盤を調べるべき各種の解析を行ったところ、タモキシフェン処理群から回収された mTEC で、細胞増殖の指標となる Ki67 陽性細胞の割合の著しい低下が観察された (図3)。すなわち、mTORC1 シグナルの低下により mTEC の増殖能が抑制されることが、急速な胸腺退縮の原因であるものと考えられた。興味深いことに、老齢マウスの胸腺においても同様な mTEC:cTEC 比率の低下が報告されており、mTORC1 シグナルの低下が生理的な胸腺退縮をもたらしている可能性が強く示唆される。

(2) 胸腺退縮がT細胞分化に及ぼす影響の評価

当初の計画に従い、C57BL/6-nude マウスの腎皮膜下へ胎児胸腺を移植することで、mTORC1 シグナルの欠失がT細胞分化に与える影響の評価を試みたが、技術的な問題のため解析に必要となる個体数を確保することが難しく、計画の変更を余儀なくされた。そこで、課題3で用いる予定であったβ5t-iCre マウスと Raptor-flox マウスを交配し、胸腺退縮の有無ならびに個体レベルの免疫応答が影響を受けるか否か、検証を行った。その結果、ドキシサイクリン処理に伴い、胸腺細胞数の低下が誘導されたものの、その程度はコントロールの 1/3 程度と、CreERT2 依存性に胸腺上皮細胞で Raptor を欠失させた場合に比べて影響は軽微であった。さらに、mTEC:cTEC の比率の低下や mTEC における Ki67 陽性細胞の割合の変化なども観察されず、いわゆる老化形質が誘導されているとは状況とは言い難い表現型を示すに止まった(データ未掲載)。両者の違いを調べたところ、前者では mTEC・cTEC で共に Raptor が欠失していたのに対し、後者では cTEC の一部で Raptor の欠失が認められたのみで、mTEC において発現量の有意な変化は認められなかった。実際、近年の高濱教授の研究グループの解析から、β5t は胎生期の胸腺上皮前駆細胞に発現するものの、成体においては cTEC に発現が限局されることが明らかとなっている。以上の結果は、胸腺退縮の背景に存在するのは mTEC における mTORC1 シグナルの低下であり、cTEC における mTORC1 シグナル低下ではないことを強く示唆している。

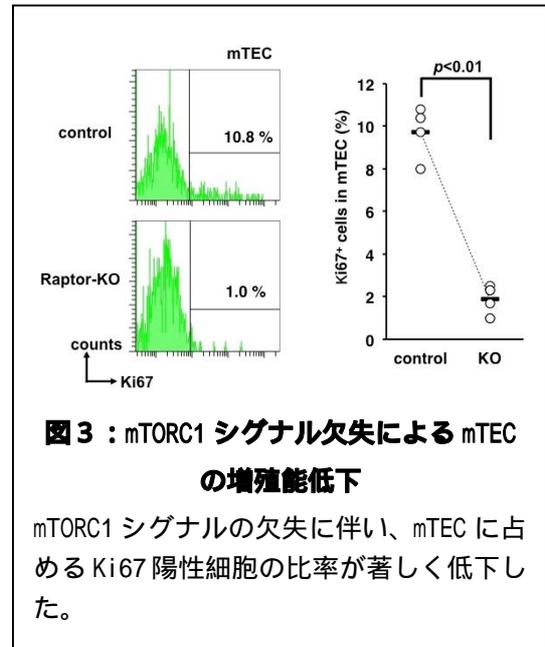


図3 : mTORC1 シグナル欠失による mTEC の増殖能低下

mTORC1 シグナルの欠失に伴い、mTEC に占める Ki67 陽性細胞の比率が著しく低下した。

(3) mTORC1 シグナルを標的とした免疫老化回復の試み

上述したように、成体のβ5t-iCre マウスをドキシサイクリン処理した場合には、cTEC においてのみ Cre の発現が誘導される。実際、β5t-iCre マウスと Tsc1-flox マウスを交配した高齢マウスをドキシサイクリンで処理すると、Raptor-flox マウスの場合と同様、cTEC における Tsc1 の欠失が誘導される一方、mTEC において Tsc1 の欠失は認められなかった。また、その際に胸腺サイズの回復も認められなかった。mTEC における mTORC1 シグナルの人為的な回復が胸腺退縮からの回復を引き起こすか否かについては、mTEC 特異的に誘導的に Cre を発現可能なマウスを樹立した上で、Tsc1-flox マウスとの交配を行う必要があるものと推察される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Takayuki Imanishi, Midori Unno, Wakana Kobayashi, Natsumi Yoneda, Satoshi Matsuda, Kazutaka Ikeda, Takayuki Hoshii, Atsushi Hirao, Kensuke Miyake, Glen N Barber, Makoto Arita, Ken J Ishii, Shizuo Akira, and Takashi Saito. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. Life Sci Alliance. 査読有(2019) 2(1). pii: e201800282. (doi: 10.26508/lsa.201800282.)

Nadya NA, Tezuka H, Ohteki T, Matsuda S., Azuma M, and Nagai S. PI3K-Akt pathway enhances the differentiation of interleukin-27-induced type 1 regulatory T cells.

〔学会発表〕(計 5件)

松田達志、江口稚佳子、住吉麻実、生田優希、小河穂波、丹賀直美、早川夏姫、渡邊利雄、Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, Yasunori Kanaho, and Satoshi Matsuda. Arf pathway regulates the pathogenicity of Th17 dependent autoimmune disease. 第47回日本免疫学会 2018年12月12日 福岡国際会議場(福岡)

小谷唯、住吉麻実、江口稚佳子、金保安則、渡邊利雄、松田達志 B細胞における低分子量Gタンパク質Arf経路の機能解明 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月30日 パシフィコ横浜(横浜)

住吉麻実、渡邊利雄、松田達志 T細胞特異的Arf欠損マウスの解析 第28回Kyoto T cell Conference 2018年6月15日 京大芝蘭会館(京都)

小谷唯、住吉麻実、伊藤量基、神田晃、平尾敦、渡邊利雄、松田達志 制御性T細胞の分化誘導に関わるシグナル伝達経路の解明 第40回日本分子生物学会年会 2017年12月8日 神戸国際会議場(神戸)

住吉麻実、江口稚佳子、小河穂波、小谷唯、伊藤量基、神田晃、金保安則、渡邊利雄、松田達志 T細胞における低分子量Gタンパク質Arfファミリーの機能解析 第40回日本分子生物学会年会 2017年12月6日 神戸国際会議場(神戸)

〔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〕

ホームページ等
<http://www3.kmu.ac.jp/bioinfo/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：住吉 麻実
ローマ字氏名：(SUMIYOSHI, Mami)

研究協力者氏名：小谷 唯
ローマ字氏名：(KOTANI, Yui)

研究協力者氏名：渡邊 利雄
ローマ字氏名：(WATANABE, Toshio)

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。