

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390144

研究課題名(和文) Tリンパ球依存性胸腺微小環境構築機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms that regulate the formation of the thymic microenvironments

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)

本研究では、分化途上のTリンパ球が胸腺微小環境の構築に必須であることに着眼した胸腺上皮細胞刺激因子の同定を行うとともに、胸腺上皮特異的機能分子の発現を指標にした皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の分岐機構の解析を開始した。その結果、まず、正の選択をうけた幼若Tリンパ球に発現されるRANKLが髄質上皮細胞の強力な増殖因子であることを明らかにした。また、胸腺髄質上皮細胞の産生するCCR7ケモカインによる幼若Tリンパ球の髄質移動が、組織特異的自己抗原に反応性を示すTリンパ球の負の選択に必要なであることを明らかにした。更に、胸腺髄質上皮細胞の産生するケモカイン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るとともに、自己免疫疾患原因分子のひとつAireによって制御されることを明らかにした。加えて、胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現される胸腺プロテアソームによるタンパク質分解が、CD8陽性T細胞の効率よい正の選択をひきおこすペプチドクラス1MHC複合体の産生に必要なであることを明らかにした。併せて、胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞の分岐機構の解明に挑むため、皮質上皮細胞特異的Cre発現マウスとCCL21発現髄質上皮細胞を蛍光検出するマウスの作製を進めた。

研究成果の概要(英文)

The medullary microenvironment of the thymus plays a crucial role in the establishment of self-tolerance through the deletion of self-reactive thymocytes and the generation of regulatory T cells. Crosstalk or bidirectional signal exchanges between developing thymocytes and medullary thymic epithelial cells (mTECs) contribute to the formation of the thymic medulla. We have identified the molecules that mediate thymic crosstalk. Tumor necrosis factor superfamily cytokines, including RANKL and lymphotoxin, produced by positively selected thymocytes promote the proliferation and differentiation of mTECs. In return, CCR7 ligand chemokines produced by mTECs facilitate the migration of positively selected thymocytes to the medulla. The cytokine crosstalk between developing thymocytes and mTECs nurtures the formation of the thymic medulla and thereby regulates the establishment of self-tolerance. Our results also demonstrate that the XCL1-mediated medullary accumulation of thymic dendritic cells contributes to regulatory T cell development and is regulated by Aire and that thymoproteasome-dependent self-peptide production is required for the development of an immunocompetent repertoire of CD8<sup>+</sup> T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、獲得免疫、胸腺分化、胸腺微小環境、胸腺上皮細胞、胸腺髄質上皮細胞、胸腺皮質上皮細胞、ケモカイン、胸腺プロテアソーム、 $\beta$ 5t、RANKL、Aire、CCR7、XCL1

### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムの自己・非自己識別を保證するTリンパ球の胸腺における成熟分化および自己寛容の成立がどのような分子機構によって実現されているかは、基礎生物学としても臨床医学としても重要な課題であり、多くの科学者がTリンパ球の分化と生死選択を担うシグナル伝達機構の解明に向けた研究を進めてきた。しかし、Tリンパ球の分化・選択を支持・制御する胸腺環境の形成を担う分子機構は殆ど不明であった。また、胸腺微小環境の構築には分化途上のTリンパ球との相互作用が必要であることは90年代より知られていたものの、このTリンパ球依存性制御を含め、胸腺微小環境構築の分子機構は解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、Tリンパ球の胸腺内分化選択機構の分子理解を目標にした独自の研究成果に基づいて、分化途上のTリンパ球が胸腺微小環境の構築に必須であることに着眼した胸腺上皮細胞刺激因子の同定を行い、更に胸腺上皮特異的機能分子の発現を指標にした皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の分岐機構の解析へと進むことで、Tリンパ球レパトア選択を担う胸腺微小環境の多段階構築機構を分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 正の選択をうけた幼若Tリンパ球を髄質へと誘導するCCR7ケモカインの産生と、全身の臓器に発現される多種多様な自己遺伝子を発現して自己分子への免疫寛容を誘導する核内因子AIREの産生を指標に、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。

(2) 胸腺プロテアソーム構成鎖 $\beta$ 5tの遺伝子座にCreを組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の作出を行うとともに、ケモカインCCL21の遺伝子座に蛍光タンパク質をコードする遺伝子を組換えることでCCL21を発現する髄質上皮細胞特異的に蛍光検出するマウスの作製を進めた。これら新たな材料を用いることで、胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞の分岐機構の解明に挑む。

### 4. 研究成果

(1) 正の選択をうけた幼若Tリンパ球から

産生されるサイトカインと髄質上皮細胞に発現されるサイトカイン受容体について、マイクロアレイ解析データをもとに網羅的に組み合わせ解析を行い、更にノックアウトマウスを用いた機能解析を行うことで、正の選択をうけた幼若Tリンパ球に発現されるRANKLが髄質上皮細胞の強力な増殖因子であ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にも同様の作用があることを明らかにした。更に、 $\gamma\delta$ 型の胸腺Tリンパ球もRANKLを発現する細胞であることを明らかにした。

(2) 胸腺髄質上皮細胞の産生するCCR7ケモカインによる幼若Tリンパ球の髄質移動が、組織特異的自己抗原に反応性を示すTリンパ球の負の選択に必要なことを明らかにした。このとき併せて、胸腺内を動き回る樹状細胞が髄質上皮細胞に提示される組織特異的自己抗原を皮質に運んで提示することによって、自己抗原反応性Tリンパ球の排除を行うことも明らかになった。

(3) 胸腺髄質上皮細胞の産生するケモカイン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るとともに、自己免疫疾患原因分子のひとつAireによって制御されることが明らかになった。

(4) 胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現される胸腺プロテアソームによるタンパク質分解が、CD8T細胞の効率よい正の選択をひきおこすペプチドクラス1MHC複合体の産生に必要であり、その結果として有用Tリンパ球レパトアの形成と有効なウイルス感染防御に必要なことを明らかにした。

(5) 胸腺微小環境構築機構の解析を進め、胎生期胸腺の形成には神経冠由来間葉系細胞に発現される転写因子MafBをはじめ、KIAA1440, TRRAP, SKIV2L2といった分子が必要であることを明らかにした。

### 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36件)

① 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
- ② Nitta T, Ohigashi I, Nakagawa Y, Takahama Y. Cytokine crosstalk for thymic medulla formation. *Curr Op Immunol*. 23:190-197 (2011) 査読有
- 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
- ④ Takahama Y, Nitta T, Mat Ripen A, Nitta S, Murata S, Tanaka K. Role of thymic cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells. *Sem Immunol*. 22: 287-293 (2010) 査読有
- 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
- ⑥ Sultana DA, Tomita S, Hamada M, Iwanaga Y, Kitahama Y, Khang NV, Hirai S, Ohigashi I, Nitta S, Amagai T, Takahashi S, Takahama Y. Gene expression profile of third pharyngeal pouch reveals role of mesenchymal MafB in embryonic thymus development. *Blood*. 113: 2976-2987 (2009) 査読有
- ⑦ Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol*. 99: 59-94 (2008) 査読有
- ⑧ 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
- [学会発表] (計 79 件)
- ① Takahama Y. T-cell repertoire formation in the thymus. Cold Spring Harbor Asia Conferences -Frontiers of Immunology in Health and Diseases- 中国蘇州 2010 年 11 月 9 日発表
- ② Takahama Y. Thymic microenvironments that shape T cell repertoire. 14th International Congress of Immunology. 神戸国際会議場 2010 年 8 月 23 日発表
- ③ Takahama Y. XCL1 regulates medullary accumulation of thymic dendritic cells and thymic development of regulatory T cells. Gordon Research Conferences on Chemotactic cytokines. イタリア ルッカ 2010 年 6 月 1 日発表
- ④ Takahama Y. Aire regulates XCL1-mediated medullary accumulation of thymic dendritic cells and thymic development of regulatory T cells. ThymOz VI International Conference on T Cell Biology. オーストラリア グラッドストーン 2010 年 3 月 21 日発表
- ⑤ Takahama Y. Positive selection by thymoproteasome-expressing thymic epithelial cells shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells. 2nd European Congress of Immunology ドイツ ベルリン 2009 年 9 月 14 日発表
- ⑥ Takahama Y. Thymoproteasome governs positive selection of CD8 T cells. ThymUS International Conference. プエルトリコ サンホアン 2008 年 11 月 12 日発表
- [図書] (計 6 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 Tokyo. p71-82 (2009)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 3 件)  
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3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〕

ホームページ等

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

## 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

新田 剛 (NITTA TAKESHI)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・講師

研究者番号：30373343

上野 智雄 (UENO TOMOO)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・講師

研究者番号：30360506