

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21790472

研究課題名 (和文) 胸腺での T 細胞再教育

研究課題名 (英文) Re-education of T cells in the thymus

研究代表者 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

研究成果の概要 (和文)：

胸腺は免疫系の司令塔である T 細胞の分化と教育の場であり、特に胸腺髄質は自己反応性の未熟 T 細胞を除去することで自己免疫の防止に重要な役割を担う。本研究では、胸腺髄質を人為的に拡大させたマウスを用いて、末梢循環血中の T 細胞が胸腺髄質内に効率よく再移入することを見出した。胸腺に再移入した T 細胞は、活性化 T 細胞および制御性 T 細胞を含み、胸腺髄質内で「再教育」を受ける可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The thymus is an organ that supports development and education of T cells, which play a central role in the immune system. The thymic medulla is essential for the deletion of auto-reactive immature T cells, preventing autoimmunity. Here we show that, with mice in that thymic medulla is genetically enlarged, peripheral T cells efficiently re-enter the thymic medulla. These re-entered T cells contained activated T cells and regulatory T cells, suggesting the possibility that peripheral T cells are “re-educated” in the thymic medulla.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：胸腺、T細胞、髄質、免疫寛容、自己免疫

1. 研究開始当初の背景

胸腺微小環境を構成する胸腺ストロマ細胞群は、未熟 T 細胞 (胸腺細胞) の分化選択を支持することで T 細胞レパトア選択を制御する。近年、胸腺ストロマ細胞、とりわけ胸腺髄質上皮細胞の機能と免疫系における役割が注目されている。髄質上皮細胞は、通常

は末梢組織にのみ存在する組織特異的タンパク質を発現し、抗原として提示することで、分化途上の自己反応性胸腺細胞を負の選択によって除去し、中枢性自己寛容の確立に必須の役割を果たす。組織特異的抗原の発現は核内因子 Aire によって制御され、Aire の欠損は自己免疫疾患をもたらす。また、髄質上

皮細胞と髄質内に局在する樹状細胞は、末梢で自己反応性T細胞のはたらきを抑える制御性T細胞の産生に寄与する。胸腺髄質の機能を支える分子メカニズムを理解し、そのはたらきを人為的に制御する試みは、自己免疫疾患の理解と克服に向けて重要である。

申請者は、胸腺髄質上皮細胞の分化と増殖を誘導するシグナル分子 RANKL を同定するなど、胸腺微小環境の形成と機能の研究において成果をあげてきた。その研究の過程で、RANKL を過剰発現させたマウス胸腺に、末梢 T 細胞が効率よく移入することを見出した。末梢 T 細胞が循環血流を介して胸腺髄質に再移入する現象は以前から報告されていたが、そのメカニズムと生理的意義についてはほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 胸腺髄質微小環境の形成機構、および胸腺髄質における細胞間の相互作用の全体像の理解をめざす。特に、①胸腺細胞の髄質移動のメカニズムとその意義、②樹状細胞の髄質移動のメカニズムとその意義、③髄質上皮細胞の分化を制御する細胞間シグナルの解明を目的とする。

(2) 胸腺髄質微小環境の形成に関わる機能分子を遺伝子導入等の手法によって制御することで、末梢 T 細胞の胸腺再移入解析に適した、胸腺髄質の機能を亢進させたモデル動物を確立する。具体的には、Aire 発現髄質上皮細胞の分化と増殖を誘導する作用が知られている RANKL に着目し、RANKL を過剰発現するマウスを用いて、T 細胞の胸腺再移入の生理的意義と胸腺微小環境の未知の機能の解明をめざす。とりわけ、胸腺での選択を免れて末梢に至った自己反応性 T 細胞が胸腺髄質に再移入することで、負の選択による除去あるいは制御性 T 細胞への分化といった「再教育」を受ける可能性を想定し、研究を進める。

3. 研究の方法

(1) 胸腺髄質の微小環境を形成する細胞間シグナルの全容解明

①胸腺細胞の髄質移動を制御する分子機構とその意義を明らかにするため、以前から関与が指摘されてきたケモカイン受容体 CCR7 に着目し、CCR7 欠損マウスおよび CCR7 リガンド欠損マウスの胸腺内細胞局在を解析した。モデル抗原を髄質上皮細胞に発現するマウス (RIP-mHEL または RIP-mOVA) およびそれらの抗原に反応性をもつ TCR-Tg マウス (3A9 または OT-I) を用いて、胸腺細胞の髄質移動が自己反応性胸腺細胞の負の選択に与える影響を検討した。

②樹状細胞の髄質移動を制御する分子の同定を目的とし、樹状細胞に発現されるケモカ

イン受容体、および髄質上皮細胞に発現されるケモカインを探索した。候補分子群の中から樹状細胞の遊走を誘導するものを選抜し、その欠損マウスを対象として胸腺内の樹状細胞の局在を解析した。

③髄質上皮細胞の分化を制御する新規分子の同定をめざした。これまでに髄質形成を制御する可能性が示唆されていた lymphotoxin (LT) シグナルについて、LT・欠損マウスおよび LT・受容体 (LT・R) 欠損マウスを用いて髄質上皮細胞の分化状態を解析した。

(2) RANKL を過剰発現するマウスを用いて、末梢 T 細胞の髄質移入を感度よく検出するモデル動物の作製をめざした。各種の細胞表面マーカーや転写因子を指標として、胸腺内に再移入した T 細胞の機能分化や系譜の特定を試みた。特に、末梢で抗原刺激を受けた自己反応性 T 細胞が髄質に再移入することで再選択をうけ除去される可能性や、制御性 T 細胞に分化する可能性を検証することをめざした。また、近年報告された、末梢リンパ組織において自己寛容誘導に関わる Aire 発現細胞を検証した。野生型マウスおよび RANKL 発現マウスの末梢リンパ組織を対象として遺伝子発現解析を行い、RANKL が末梢 Aire 発現細胞に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) ①胸腺細胞の髄質移動がケモカイン受容体 CCR7 を介するシグナルによって制御されることがわかった。TCR-Tg マウスおよびモデル抗原発現マウスを用いた解析から、CCR7 依存的な胸腺細胞の髄質移動が組織特異的抗原に対する負の選択を促進し、自己寛容の確立に寄与することが示された。

②髄質上皮細胞に発現されるケモカイン XCL1 が樹状細胞の遊走を惹起することがわかった。XCL1 受容体である XCR1 は胸腺内の樹状細胞に高発現され、XCL1 欠損マウスでは樹状細胞の髄質への集積が阻害されることが明らかになった。さらに、XCL1 欠損マウスでは胸腺における制御性 T 細胞の産生が著しく低下しており、XCL1 依存的な樹状細胞の髄質局在が制御性 T 細胞の産生に重要な役割を担うことが示唆された。

③LT・欠損マウスおよび LT・R 欠損マウスでは、髄質上皮細胞の最終分化段階にあたる Involucrin 発現細胞が減少することから、LT シグナルは髄質上皮細胞の最終分化を制御することが示された。Involucrin 発現細胞は、Aire 発現細胞と異なり、RANKL 過剰発現によって増加しなかった。従って、RANKL と LT はそれぞれ、髄質上皮細胞の分化の異なるステップを制御することが示唆された。

(2) 末梢 T 細胞の胸腺移入を評価するモデル動物として、全身性に可溶性 RANKL を過剰産生する sRANKL-Tg マウスを用いた。このマ

ウスでは Aire 発現髄質上皮細胞の増加と髄質領域の拡大が認められたが、リンパ節における Aire 発現に変化はみられなかった。また、胸腺髄質に局在する樹状細胞が増加していた。成熟 T 細胞が存在しない「空」の髄質をもつ sRANKL-Tg/TCR \cdot -KO マウスを作製したところ、正常マウスと比して高い頻度で末梢 T 細胞の胸腺への移入が観察された。胸腺に移入した末梢 T 細胞は、主に髄質領域内に局在していた。胸腺移入した T 細胞のほとんどは活性化マーカーである CD44 や CD69 を高発現し、その一部は Foxp3 を発現していた。従って、胸腺移入 T 細胞は、末梢自己抗原に反応した自己反応性 T 細胞か、あるいは体内の常在細菌叢等に反応した T 細胞と考えられた。

上記の実験の過程で、T 細胞と B 細胞を欠損する Rag2-KO マウスに正常マウス由来の末梢 T 細胞を移植すると、きわめて高い頻度(全胸腺細胞の数%)で胸腺移入がみられることを見出した。胸腺移入した T 細胞は、活性化マーカー CD44 と CD69 を発現しており、およそ 20%が Foxp3 を発現していた。この高頻度の T 細胞胸腺移入は、B 細胞を欠損する TCR-Tg/Rag2-KO マウスにおいてもみられたが、T 細胞のみを欠く TCR \cdot /TCR \cdot -KO マウスでは検出されないことから、B 細胞の分化と関連することが示唆された。B 細胞によって制御を受ける腸管内細菌叢との関連が考えられるため、抗生物質の投与により腸管内細菌を除去する実験を検討する必要がある。

(1) の結果より、胸腺細胞と樹状細胞の髄質移動を制御するケモカインシグナル、および髄質上皮細胞の分化を制御するサイトカインシグナルが同定され、髄質微小環境を形成する主要な細胞群の配置と分化を決定づける細胞間シグナルの全体像が明らかになった。また、胸腺細胞の髄質移動は組織特異的抗原に対する負の選択に必須であることがわかった。従って、髄質微小環境は髄質外から移入してきた T 細胞に対して負の選択を誘導し、自己寛容の確立に寄与しうることが示唆された。(2) の結果より、末梢から胸腺に移入した T 細胞は、活性化型の T 細胞であり、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞を含むことが示された。末梢で活性化された T 細胞や制御性 T 細胞が胸腺に移入しやすい性質をもつのか、あるいは末梢のナイーブ T 細胞が胸腺に移入した後に活性化や制御性 T 細胞への分化が誘導されるのか、さらなる検証が必要である。また、本研究で作製、使用されたモデルマウスは、末梢 T 細胞の胸腺髄質再移入の機序と生理的意義を検証する目的にとって、きわめて有用と考えられる。

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 8 件)

1. Ohigashi, I., Nitta, T., Lkhagvasuren E, Yasuda H, Takahama Y. Effects of RANKL on the thymic medulla. *Eur J Immunol*, in press. (査読有)
2. Nitta, T., Ohigashi, I., Takahama, Y. The development of T lymphocytes in fetal thymus organ culture. *Methods Mol Biol*, in press. (査読有)
3. Lei, Y., Mat Ripen, A., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L. T., Bösl, M. R., Holländer, G. A., 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)
4. Yamano, T., Watanabe, S., Hasegawa, H., Suzuki, T., Abe, R., Tahara, H., Nitta, T., Ishimaru, N., Sprent, J., Kishimoto, H. Ex-vivo expanded DC induce donor-specific central and peripheral tolerance and prolong the acceptance of donor skin allografts. *Blood*, 117, 2640-2648, 2011. (査読有)
5. Nitta, T., Ohigashi, I., Nakagawa, Y., Takahama, Y. Cytokine crosstalk for thymic medulla formation. *Curr Opin Immunol*, 23, 190-197, 2011. (査読有)
6. White, A. J., Nakamura, K., Jenkinson, W. E., Saini, M., Sinclair, C., Seddon, B., Narendran, P., Pfeiffer, K., Nitta, T., Takahama, Y., Caamano, J. H., Lane, P. J. L., Jenkinson, E. J., Anderson, G. Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells. *J Immunol*, 185, 4769-4776, 2010. (査読有)
7. Ishimaru, N., Nitta, T., Arakaki, R., Yamada, A., Lipp, M., Takahama, Y., Hayashi, Y. In situ Patrolling of Regulatory T cells is Essential for Protecting Autoimmune Exocrinopathy. *PLoS One* 5, e8588, 2010. (査読有)
8. Nitta, T., Nitta, S., Lei, Y., Lipp, M., Takahama, Y. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 17129-17133, 2009. (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. Takeshi Nitta, "Role of cortical thymic epithelial cells in positive selection of T cells", *JSI Young Investigator Awards Lecture in the Japanese Society for Immunology 2010 Symposium for "Cutting edge from immunology; innate immunity and immune regulation"*, Dec 3, 2010, Tokyo, Japan. (受賞講演)
2. 新田 剛、高浜洋介「胸腺クロストークによるT細胞レパトア形成の制御」第32回日本分子生物学会年会ワークショップ 2009年12月9日 横浜

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計2件)

1. 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：株式会社ニコン、国立大学法人徳島大学
種類・番号：特許公開 2010-19656
取得年月日：2010年1月28日
国内外の別：国内

2. : Evaluation device for fluorescent group, computer-executable evaluation program for fluorescent group, and evaluation system for fluorescent group.
発明者：Nakano Y, Takahama Y, Nitta T.
権利者：国立大学法人徳島大学、株式会社ニコン
種類・番号：特許公開 W02010/004691
取得年月日：2010年1月14日
国内外の別：国際

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：