

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790458

研究課題名（和文） AIRE 陽性胸腺髄質上皮細胞におけるクローディンの機能解析

研究課題名（英文） Function of claudins in Aire-expressing medullary thymic epithelial cells

研究代表者

濱崎 洋子 (HAMAZAKI YOKO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10362477

研究成果の概要（和文）：

胸腺内自己寛容の成立に寄与する胸腺上皮細胞に特異的に発現するクローディン(Cld)-3,4の機能を明らかにするために、まず Cld3 と Cld4 各々の単独ノックアウト (KO) マウスを作製した。両マウスに異常を認めなかったためダブルKOマウスの作製に着手した。両遺伝子はゲノム上で40Kbpしか離れていないため、Cld4KOのES細胞にCld3KOベクターを導入する手法にて行ったところ、ダブルKOマウスを得ることが出来た。現在解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the function of claudin (Cld)-3, 4 in thymic epithelial cells, we first made single KO mice for each gene. There was no obvious defect in each single KO mice; thus we next tried to make double KO mice. Since the distance of each gene on genome is only 40Kbp, we made a strategy in which Cld3 Tg vector was introduced into Cld4KO ES cells. We have succeeded in making double KO mice and now are analyzing the phenotypes on thymic organogenesis and T cell development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：T細胞分化、胸腺、自己免疫疾患、胸腺上皮細胞、クローディン、Aire

1. 研究開始当初の背景

胸腺は発生学的には重層上皮細胞様の原基に由来し、突起を伸ばした胸腺上皮が形成する三次元網工により構築される上

皮性組織である。この点において胸腺は、線維芽細胞および膠原線維の網工が主体の他のリンパ造血系組織と大きく異なっている。これまでT細胞の分化機構に関し

て、様々な免疫関連分子やシグナル伝達分子、液性因子の機能を中心に盛んに研究が行われてきた。しかしながら、これらの重要なシグナルを胸腺内で時空間的制御の下にもたらす上皮細胞がどのようなメカニズムで分化し、また機能の異なる各々の上皮細胞が胸腺内の必要な場所にいかにして配置されるのかなど、T細胞の分化選択の異常による免疫不全や自己免疫疾患の病因・病態の全貌を理解する上での根本的な課題は未解決のままである。

一方、成熟胸腺上皮細胞は典型的な上皮細胞とその形態学的・機能的特徴を全く異にしている。すなわち、上下の極性を有しシートを形成して体内外の液体成分を区画化するという上皮本来の性質と役割を持たない。この事実は、胸腺上皮細胞の特殊性を考える上で注目に値すべきことである。この上皮細胞本来の機能の中心的役割を果たすのが、上皮細胞特有の接着構造タイトジャンクション (TJ) であり、近年クローディン (Cld) 、オクルディン (Occ) をはじめとしたその構成膜蛋白質が同定され、急速に分子レベルでの解析が進んできている。Cldは極めて特異的に上皮細胞に発現すること、また極性形成に関与する細胞内蛋白質を結合することによる細胞極性への関与も示唆されていることから、その発現と局在は上皮細胞の機能と形態を特徴付ける最もよい指標の一つであるといえる。

申請者はこれまでに、胸腺原基及び胸腺上皮細胞に発現する TJ 構成膜タンパク質に着目し、胸腺髄質内に散在する一部の上皮細胞が TJ 構成膜タンパク質である Cld3, 4 および Occ を強く発現すること、またこれらの分子を発現する髄質上皮細胞が末梢自己抗原に対する免疫寛容に重要な役割を果たす *Autoimmune regulator (Aire)*

遺伝子を発現する特殊に機能分化した細胞であることを明らかにした。さらに、Cld3, 4, Occ は重層上皮様の構造をとる最も初期の胸腺原基の頂端部に即した上皮細胞にのみ高発現し、この頂端側由来の Cld3, 4 陽性上皮細胞を中心に髄質領域が形成されること、またこの発生初期の Cld3, 4 陽性細胞分画に Aire 陽性上皮細胞を含む髄質上皮細胞の前駆細胞が含まれることを見出した (Nat Immunol. 2007 Mar; 8(3):304-311.)。しかしながら、Aire 陽性の特殊な髄質上皮細胞のみが通常の上皮細胞と同様に上皮特異的接着分子である Cld を発現する生理的意義については明らかでなかった。

2. 研究の目的

自己寛容に必須の胸腺上皮細胞に特異的に発現する Cld3, 4 の機能を明らかにすることで、胸腺上皮細胞が担う免疫寛容と自己形成の分子メカニズムの一端を理解する。

3. 研究の方法

Cld3 と Cld4 のノックアウトマウスを作製し、その表現型 (胸腺組織形成、Aire 陽性髄質上皮細胞の発生・分化、T細胞の分化選択、自己免疫疾患発症の有無等) を解析する。

4. 研究成果

まず Cld4 単独 KO マウスを作製し、その表現型を解析した。Cld4KO マウスは、胸腺組織構築、胸腺上皮細胞およびT細胞の分化に顕著な異常を認めず、正常に発育した。自己免疫疾患の発症率は加齢に伴い増加する可能性があるため、1年齢以上の個体についても解析を行ったが、抗核抗体・抗組織抗体検出率に軽度の上昇傾向があるものの統計学的に有意ではなかった。その一方でこれら老化 Cld4 KO マウスは1年齢以降、生存率の低下を認めた。衰弱しつつある1年齢以上のマウスを解析したところ、片側性に、時に両側性に水腎症を発症していた。また歳をとるにつれ両側性水腎症を呈する個体が増加することから、加齢に伴う死亡率の増加は両側性水

腎症による腎不全によるものと考えられた。水腎の発症には、尿量の増加あるいは尿の排出障害の可能性があるが、造影剤投与による ivp により水腎発症に先立ち尿の滞留が認められたことから尿路の閉塞によるものと考えられた。そこで尿路上皮の組織学的解析を詳細に行ったところ、加齢マウスの尿路上皮が過形成を起こしていることが分かった。したがって、C1d4KO マウスは加齢に伴い尿路移行上皮が過形成をおこし、それに起因する尿路の閉塞により水腎症を発症するものと考えられる。これらの表現型は C1d4 の全身 KO でのみ認められ、T細胞特異的 C1d4KO マウスで認められなかったことから、腎及び尿路上皮に発現する C1d4 遺伝子が欠失した結果、タイトジャンクションの機能が破綻したことにより生じたものと考えられる。

C1d3 と C1d4 はゲノム上で極めて近く (約 40Kbp)、本来の目的である C1d3/4 ダブル KO マウスを得るには通常の掛け合わせでは確率的にほぼ不可能であると考えられたため、上述した腎尿路系の解析と並行して C1d4KO マウス ES 細胞にさらに C1d3KO のターゲティングベクターをエレクトロポレーションするという手法を用いて、ダブル KO マウスを得ることが出来た。現在胸腺組織、および免疫系のフェノタイプについて解析を行っている。

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 4 件)

1. Fujita H, Hamazaki Y, Noda Y, Oshima M, and Minato N.
Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis
PLOS ONE, 2012;7(12):e52272. (査読有)
Doi: 10.1371/journal.pone.0052272.

2. Kawai Y*, Hamazaki Y*, Fujita H, Fujita A, Sato T, Furuse M, Fujimoto T, Jetten AM, Agata Y and Minato N.

*Both authors contributed equally to this work.

Claudin-4 induction by E protein activity in later stages of CD4/8 double-positive thymocytes to increase positive selection efficiency.

Proc Natl Acad Sci USA 2011 Mar 8; 108(10):4075-80 (査読有)

DOI: 10.1073/pnas.1014178108

- 3 Shimizu Y, Hamazaki Y, Hattori M, Doi K, Terada N, Kobayashi T, Toda Y, Yamasaki T, Inoue TA, Kajita Y, Maeno A, Kamba T, Mikami Y, Kamoto T, Yamada T, Kanno T, Yoshikawa K, Ogawa O, Minato N, Nakamura E.

SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer.

Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):828-36. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01876.x

4. Tanaka H, Tamura A, Sekai M, Hamazaki Y, Minato N.

Increased c-Myc activity and DNA damage in hematopoietic progenitors precede myeloproliferative disease in Spa-1-deficiency.

Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):784-91. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01850.x

[学会発表] (計 14 件)

1. 2012.12.11
Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis
藤田春美、濱崎洋子、野田裕美、大島正伸、湊長博

第35回日本分子生物学会総会 マリンメッセ福岡 (福岡県) ショートトーク・ポスター発表

2. 2012.12.5

Identification of thymic epithelial stem cells ensuring lifelong central T-cell tolerance

Miho Sekai, Yoko Hamazaki, Nagahiro Minato

第41回日本免疫学会総会 神戸国際会議場 (兵庫県) 口頭発表

3. 2012.12.5

Claudin-5 is a Crucial Component of Blood-thymus Barrier by Regulating Vascular Permeability

Takahiro Nagatake, Yan-Chun Zhao, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第41回日本免疫学会総会 神戸国際会議場 (兵庫県) 口頭発表

4. 2012.11.5

Claudin-5 plays a role in establishing specific thymic microenvironment by regulating vascular permeability.

Takahiro Nagatake, Yan-Chun Zhao, Nagahiro Minato and Yoko Hamazaki

ThymUS international conference 2012、Trump International Beach Resort、マイアミ (アメリカ)

5. 2011.11.29

A novel CD4+T cell population preferentially producing osteopontin steers altered immune function in senescence and malignancy

Kyosuke Sato, Suhail Tahir, Yuji Fukushima, Yasuhiro Nakashima, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第40回日本免疫学会総会 幕張メッセ (千

葉) 口頭発表

6. 2011.11.28

Fetal claudin-3,4 positive mTEC progenitors have the long-term reconstitution capacity of functional thymic medulla

Miho Sekai, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第40回日本免疫学会総会 幕張メッセ (千葉) 口頭発表

7. 2011.6.29

Claudin-4 induction by E-protein activity in thymic lymphocytes and its role in the TCR-mediated signaling.

Harumi Fujita, Yohei Kawai, Akikazu Fujita, Toyoshi Fujimoto, Mikio Furuse, Yasutoshi Agata, Nagahiro Minato and Yoko Hamazaki

第63回日本細胞生物学会大会 北海道大学 札幌 (北海道) 口頭発表

8. 2011.6.19

A novel CD4+T cell population preferentially producing osteopontin steers altered immune function in senescence and malignancy

Suhail Tahir, Kyosuke Sato, Yasuhiro Nakashima, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第10回オステオポンチン研究会 北海道大学 札幌 (北海道) 口頭発表

9. 2011.6.10

クローディン4はEタンパク質の活性によって後期DP細胞で発現誘導され、ポジティブセレクションの効率化に寄与する

河合洋平、濱崎洋子、藤田春美、縣保年、湊長博

第21回 Kyoto T cell conference 京都平安ホテル 口頭発表

10. 2010. 12. 6-10

The claudin-3,4 positive mTEC progenitors maintain the potential to generate Aire expressing mTECs over fetal stage

Miho Sekai, Yoko Hamazaki, Nagahiro Minato

European Congress of Immunology Liverpool, UK ポスター発表

11. 2010.5.18

Tight junction-independent expression of claudin-4 in thymic lymphocytes and its role in TCR-signaling

Yoko Hamazaki, Yohei Kawai, Harumi Fujita, Akikazu Fujita, Toyoshi Fujimoto and Nagahiro Minato

第62回日本細胞生物学会総会 大阪 口頭発表

*若手最優秀発表賞

12. 2010.3.20

Claudin-4 expression in thymocytes and its role in T-cell development

Yoko Hamazaki, Harumi Fujita, Yohei Kawai and Nagahiro Minato

An International workshop on T lymphocytes ThymOZ オーストラリア 口頭発表

13. 2009年12月2日

Claudin expression in Thymocytes: Implication in T cell Development

Yohei Kawai, Yoko Hamazaki, Harumi Fujita and Nagahiro Minato

日本免疫学会 大阪 口頭発表

14. 2009. 6. 1-4

Claudin expression in thymocytes; Implication in T cell development

Yoko Hamazaki, Yohei Kawai, Harumi Fujita, Miho Sekai, and Nagahiro Minato

The International Workshop on Kyoto T cell Conference 京都 ポスター発表

〔図書〕 (計2件)

1. エッセンシャル免疫学 (第2版)

監修 笹月健彦

メディカルサイエンス・インターナショナル 2010

1 免疫生物学 監修 笹月健彦

南江堂 2010

〔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0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：