

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790540

研究課題名（和文） 胸腺T細胞レパトア形成を制御する細胞間相互作用

研究課題名（英文） Lympho-epithelial interactions in the thymus for T-cell repertoire formation

研究代表者

新田 剛 (NITTA TAKESHI)

国際医療研究センター・研究所・室長

研究者番号：30373343

研究成果の概要（和文）：胸腺皮質上皮細胞は、胸腺T細胞の分化とレパトア選択を支持する。私達は、皮質上皮細胞の大部分が多数の胸腺細胞と会合した多細胞複合体を形成していることを見出した。多細胞複合体の一部は、皮質上皮細胞が胸腺細胞を包み込む構造をとっており、これらは過去に「胸腺ナース細胞（TNC）」として記載された構造体と同一であった。TNC複合体はマウスの新生仔期以降に生成され、T細胞の正の選択によって減少した。また、TNC複合体の内部には、長期生存しTCR $\alpha$ 鎖の遺伝子再構成を経たCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>胸腺細胞が多く含まれていた。以上の結果より、皮質上皮細胞と胸腺細胞の複合体はTCR再構成とT細胞の選択を促進する微小環境を形成することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Distinct subsets of thymic epithelial cells support development of repertoire selection of T cells. We found that cortical thymic epithelial cells form multicellular complexes that closely associate with many viable thymocytes. The complexes that completely enclose thymocytes were found to be identical to previously described “thymic nurse cells (TNCs)”. Our results showed that the formation of TNC complexes requires pre-selected CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes in postnatal thymus. Cells within TNC complexes were enriched for long-lived CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes that have undergone secondary TCR $\alpha$  rearrangement. These results indicate that cortical thymic epithelial cells interact with pre-selected CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes to form TNC complexes that provide a microenvironment supporting secondary TCR $\alpha$  rearrangement and T-cell selection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：獲得免疫、胸腺

## 1. 研究開始当初の背景

T細胞は獲得免疫システムの司令塔であり、外来病原体や自己の腫瘍組織を特異的に攻撃することで、生体防御と生体維持において重要な役割を担う。T細胞の抗原受容体レパトアは、主として胸腺皮質における正の選択と、それに続く胸腺髄質における負の選択に

よって形成される。皮質と髄質にはそれぞれ機能の異なる胸腺上皮細胞（皮質上皮細胞と髄質上皮細胞）が存在し、自己ペプチドとMHCの複合体を幼若T細胞（胸腺細胞）に提示することで正負選択を制御する重要な役割を担う。

私達は、皮質上皮細胞に特異的に発現され

るプロテアーゼ複合体「胸腺プロテアソーム」が、MHC 結合性自己ペプチドの生成を介して非自己反応性 CD8 T 細胞レパトアの正の選択を制御することを報告し、皮質上皮細胞が特殊なタンパク質分解系を備えることで生体防御に重要な役割を担うとの概念提唱に寄与してきた。このような経緯から、皮質上皮細胞と胸腺細胞の相互作用実体を理解することは、T 細胞レパトア形成のしくみを理解し制御するうえで重要であると考えられた。そこで、胸腺プロテアソームを発現する皮質上皮細胞を単離し観察したところ、その多くが内部に多数の生きた胸腺細胞を包み込んだ、ユニークな多細胞複合体構造を示すことがわかった。この多細胞複合体は、胸腺プロテアソームを発現する皮質上皮細胞に特異的に検出されること、胸腺細胞を囲む細胞内空腔に MHC の発現がみられること、および内部の胸腺細胞のほとんどは CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>であり、胸腺器官培養にて成熟 T 細胞への分化能を有することから、胸腺微小環境において正の選択を誘導する特異的な「場」として機能する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景および予備実験結果より、皮質上皮細胞の一部が胸腺細胞とのユニークな多細胞複合体形成によって T 細胞レパトア選択を制御する可能性が示唆された。本研究ではこの可能性を検証することを目標として、皮質上皮細胞と胸腺細胞の複合体を定量定期的に解析する技術を確立し、多細胞複合体の形成機構と T 細胞レパトア選択における役割を明らかにする。また、三次元組織解析や生体内イメージング技術を用いて多細胞複合体を解析し、胸腺皮質微小環境の実像に迫ることをめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) 多細胞複合体の定量的解析

胸腺プロテアソームの構成因子β5tを発現する皮質上皮細胞を、フローサイトメーターによって定量的に検出する方法を確立した。マウス胸腺をコラゲナーゼ処理し、全胸腺構成細胞を含むと考えられる細胞懸濁液を調製した。これを各種マーカー分子に対する抗体によって細胞表面染色または細胞内染色し、フローサイトメーターを用いて解析した。また、胸腺上皮細胞と胸腺細胞との会合様態の違いを定性的かつ定量的に解析するため、細胞内外に会合した CD45<sup>+</sup>細胞を染め分ける手法を確立した。コラゲナーゼ処理によって得た全胸腺細胞画分を対象として、PE-Cy5 標識された抗 CD45 抗体を用いて細胞外 CD45 (extracellular CD45, eCD45) を染色し、固定・透過処理の後、FITC 標識抗 CD45 抗体を用いて細胞内 CD45 (intracellular CD45,

iCD45) を染色した。これをフローサイトメーターで解析し、必要に応じて細胞集団のソーティングを行った。

### (2) 胸腺組織における多細胞複合体の検出

マウス胸腺をパラホルムアルデヒド固定のち凍結し、60μm 厚の切片を作製した。蛍光標識抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。また、生体内の胸腺微小環境を解析するため、β5t<sup>Venus/+</sup>新生仔マウスから採取した胸腺を野生型マウスの腎被膜下に移植した。4週間後、移植された胸腺を麻酔下で二光子レーザー顕微鏡を用いて解析した。

### (3) 多細胞複合体と T 細胞分化との関わり

上記の手法を用い、様々な発生段階の野生型マウスおよび遺伝子改変マウスを対象として、多細胞複合体の生成を解析した。遺伝子改変マウスとしては、hCD3ε-Tg マウス、Rag2 欠損マウス、Zap70 欠損マウス、TCRα 欠損マウス、β2m 欠損マウス、RORγt 欠損マウス、Bcl-2-Tg マウス、HY-TCR-Tg マウス、P14-TCR-Tg マウス、F5-TCR-Tg マウス、3A9-TCR-Tg マウス、AND-TCR-Tg マウス、OT-I-TCR-Tg マウスを用いた。

### (4) T 細胞レパトア形成における多細胞複合体の意義

皮質上皮細胞と胸腺細胞の複合体 (EpCAM<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup>) を蛍光セルソーターによって単離し、物理的に破砕することで複合体の内部に包まれた胸腺細胞を回収した。RNA を精製し、定量的 RT-PCR 法によって TCRα鎖の遺伝子再構成を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 多細胞複合体の定量的解析

β5t を発現する胸腺上皮細胞を、フローサイトメーターによって定量的に検出した。β5t の発現は EpCAM<sup>+</sup>胸腺上皮細胞に検出された。また、β5t<sup>+</sup>細胞は、胸腺上皮細胞に高発現される I-A (MHC class II)、および皮質上皮細胞マーカーの CD205 と Ly51 を発現し、髄質上皮細胞マーカー UEA1 陰性であったことから、既知の皮質上皮細胞のカテゴリーに分類されうる細胞集団であった。

Forward Scatter (FSC) 値と Side Scatter (SSC) 値の解析、および PI による核染色解析より、EpCAM<sup>+</sup> β5t<sup>+</sup>細胞はサイズがきわめて大きく、胸腺細胞の数十倍の DNA 量を有する多核細胞であることが示された。共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、EpCAM<sup>+</sup> β5t<sup>+</sup>細胞の大部分は多くの核を有し、そのほとんどは表面に CD45 を発現する胸腺細胞の核であることがわかった (図 1)。すなわち、EpCAM<sup>+</sup> β5t<sup>+</sup>細胞は、多くの胸腺細胞と会合

した多細胞複合体を形成することが定量的な解析により確認された。PI による核染色解析から、多細胞複合体は1個の皮質上皮細胞と、平均15個程度の胸腺細胞からなることが明らかとなった。

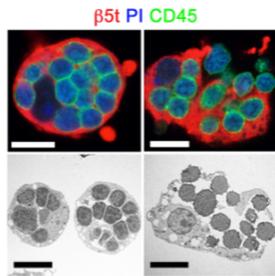


図1 皮質上皮細胞と胸腺細胞による多細胞複合体

多細胞複合体のうち、一部の複合体は、多数の CD45<sup>+</sup>細胞がβ5t<sup>+</sup>細胞内の小胞に包み込まれた構造をとっていた。これらは過去に「胸腺ナース細胞 (thymic nurse cell, TNC)」として報告された機能未知の胸腺ストロマ細胞に酷似していた。また、会合する CD45<sup>+</sup>細胞が外側に露出した複合体も検出された。細胞内外に会合した CD45<sup>+</sup>細胞を染め分ける手法により、皮質上皮細胞と胸腺細胞との会合様態の違いを解析した (図2A)。EpCAM<sup>+</sup> β5t<sup>+</sup>細胞は、eCD45 陽性の集団 (Population 1, P1)、eCD45 弱陽性かつ iCD45 陽性の集団 (P2)、および eCD45 陰性かつ iCD45 陰性の集団 (P3) に分けられた。各集団を蛍光セルソーターによって単離し、顕微鏡で観察したところ、P1は CD45<sup>+</sup>細胞がβ5t<sup>+</sup>細胞の外側に会合した複合体であった (図2B)。P2は TNC と類似の、多くの CD45<sup>+</sup>細胞がβ5t<sup>+</sup>細胞内に包み込まれた複合体であった。P3は複合体を形成しないβ5t<sup>+</sup>細胞、あるいは少数の CD45<sup>+</sup>細胞が包み込まれた複合体であった。

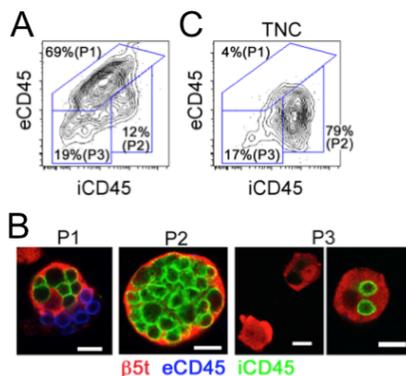


図2 多細胞複合体の検出と単離

P2集団にみられる複合体がTNCと同一かどうかを調べるため、胸腺組織のトリプシン消化および1-g sedimentation法によって調製したTNCを解析したところ、そのほとんどはP2集団であることがわかった (図2C)。従っ

て、私達が見出した皮質上皮細胞と胸腺細胞による複合体の一部は、過去に報告されたTNCと同一であることが証明された。以上の結果より、胸腺細胞との相互作用にもとづいて多細胞複合体の構造の多様性を定性的かつ定量的に検出することが可能となり、複合体の一部はTNCであることが確認された。

### (2) 胸腺組織における多細胞複合体の検出

胸腺組織中の皮質上皮細胞を効率よく可視化するため、β5t 遺伝子コーディング領域に蛍光タンパク質 Venus をノックインした β5t<sup>Venus/+</sup>マウスを用いた。胸腺組織切片の共焦点レーザー顕微鏡解析により、Venus を発現する皮質上皮細胞は胸腺皮質全体に分布し、数十個の胸腺細胞を包み込むカゴ状の球形構造をとることがわかった (図3)。

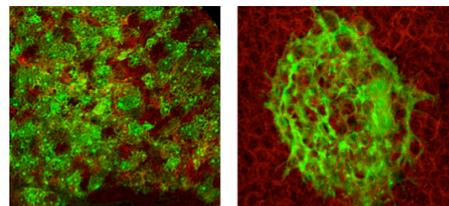


図3 生体胸腺における多細胞複合体の検出

また、マウスの腎被膜下に移植した胸腺を、二光子レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス解析したところ、Venus 発現細胞による球形構造の周囲を胸腺細胞が動き回る様子が観察された。

これらの結果から、生体胸腺において、β5t を発現する皮質上皮細胞がカゴ状の構造をつくり、胸腺細胞と相互作用することが示唆された。単離された皮質上皮細胞にみられた多細胞複合体は、生体内ではこのような構造をとっていると考えられる。

### (3) 多細胞複合体と T 細胞分化との関わり

マウスの発生段階に沿って、多細胞複合体の生成を調べた。β5t<sup>+</sup>皮質上皮細胞は胎齢12日目以降の胸腺に検出されるが、胎齢14日目までは胸腺細胞との複合体は検出されなかった。胎齢17日目になると P1 複合体が形成され始め、その頻度は新生仔期にさらに増加した。P2 (TNC) 複合体は生後3日目までほとんど検出されず、生後7日目より顕著に増加した。一方、胸腺 T 細胞の分化については、胎齢17日目に CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>

(CD4/CD8 double-positive, DP) 胸腺細胞がみられ、生後3日目には CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD4 single positive, CD4SP) および CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 細胞 (CD8SP) の分化がみられた。以上の結果より、P1 複合体の生成は DP 胸腺細胞の分化とほぼ同時にみられるが、TNC 複合体は T 細胞の分化が開始されてから後に形成されることが明らかとなった。

さらに、胸腺 T 細胞分化に関する種々の遺

伝子改変マウスについて、多細胞複合体の生成を調べた。胸腺細胞の分化が CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>期で停止する hCD3ε-Tg マウスや Rag2 欠損マウスでは、TNC 複合体はほとんど検出されなかった。一方、DP 期で分化が停止する TCRα 欠損マウスや Zap70 欠損マウスでは、野生型マウスと同程度の TNC 複合体が検出された。また、正の選択が強く誘導される TCR-Tg マウス (HY、P14、F5、3A9、AND、OT-I) では、TNC 複合体は顕著に減少していた。これらの結果より、TNC 複合体の生成には DP 胸腺細胞の分化が必要であり、正の選択によって TNC 複合体は減少することが明らかとなった。

TNC 複合体の生成は、DP 胸腺細胞の生存能が向上する Bcl-2-Tg マウスでは増加し、DP 胸腺細胞の生存能が低下する RORγt 欠損マウスでは減少していた。従って、TNC 複合体は、DP 胸腺細胞が正の選択を受けず長期間生存した場合に生成されることが示唆された。

#### (4) T 細胞レパトア形成における多細胞複合体の意義

DP 胸腺細胞の生存能は、TCR レパトア形成と関わることが報告されている。正の選択を受けられなかった DP 胸腺細胞は、より外側 (5'側の Vα と 3'側の Jα) のセグメントを使って TCRα 遺伝子再構成を繰り返し、再度選択を受ける機会を得ると考えられる。TNC 複合体に含まれる DP 胸腺細胞は、トータル DP 胸腺細胞と比較して、より外側の Vα と Jα セグメントの使用頻度が高いことがわかった。すなわち、TNC 複合体中の DP 胸腺細胞は、複数回の TCRα 遺伝子再構成を経た長期生存細胞であることが示された。

以上の結果から、皮質上皮細胞と胸腺細胞の多細胞複合体の形成機構と生理的意義は次のように考察される。皮質上皮細胞は DP 胸腺細胞との緊密な相互作用によって多細胞複合体を形成する。正の選択を受けた胸腺細胞は CD4SP または CD8SP 細胞へと分化し、複合体から離脱する。正の選択を受けられなかった DP 胸腺細胞は皮質上皮細胞との相互作用を維持し、TNC 複合体が形成される。TNC 複合体は DP 胸腺細胞における TCRα 遺伝子再構成を促進することで、より効率的な TCR レパトア形成に寄与すると考えられる。

本研究の成果により、皮質上皮細胞と胸腺細胞による多細胞複合体の構造、形成機構、生理的意義が明らかとなった。また、本研究にて確立された皮質上皮細胞や多細胞複合体の定量的解析、胸腺組織の生体内イメージング解析といった解析技術は、胸腺微小環境の研究領域の発展に欠かせない基盤技術となった。今後、多細胞複合体の形成を担う細胞間シグナル分子や接着因子の同定や、TNC

複合体による DP 胸腺細胞の生存維持機構の解明を進める必要がある。

#### 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 5 件)

- (1) Nitta, T., Ohigashi, I., Takahama, Y. The development of T lymphocytes in fetal thymus organ culture. **Methods Mol Biol**, 946,85-102,2013.  
DOI:10.1007/978-1-62703-128-8\_6 (査読有)
- (2) \*Nakagawa, Y. \*Ohigashi, I., \*Nitta, T., \*Sakata, M., Tanaka, K., Murata, S., Kanagawa, O., Takahama, Y. Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary TCRα rearrangement in cortical thymocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 109, 20572-20577,2012.  
DOI:10.1073/pnas.1213069109 (\*, equal contribution) (査読有)
- (3) Zuklys, S., Mayer, C.E., Zhanybekova, S., Stefanski, H.E., Nusspaumer, G., Gill, J., Barthlott, T., Chappaz, S., Nitta, T., Dooley, J., Nogales-Cadenas, R., Takahama, Y., Finke, D., Liston, A., Blazar, B.R., Pascual-Montano, A., Holländer, G.A. MicroRNAs Control the Maintenance of Thymic Epithelia and Their Competence for T Lineage Commitment and Thymocyte Selection. **J Immunol**, 189,3894-3904,2012.  
DOI:10.4049/jimmunol.1200783 (査読有)
- (4) Roberts, N.A., White, A.J., Jenkinson, W.E., Turchinovich, G., Nakamura, K., Withers, D.R., McConnell, F.M., Desanti, G.E., Benezech, C., Parnell, S.M., Cunningham, A.F., Paolino, M., Penninger, J.M., Simon, A.K., Nitta, T., Ohigashi, I., Takahama, Y., Caamano, J.H., Hayday, A.C., Lane, P.J., Jenkinson, E.J., Anderson, G. Rank Signaling Links the Development of Invariant γδ T Cell Progenitors and Aire<sup>+</sup> Medullary Epithelium. **Immunity**, 36, 427-437,2012.  
DOI:10.1016/j.immuni.2012.01.016 (査読有)
- (5) Ishimaru, N., Yamada, A., Nitta, T., Arakaki, R., Lipp, M., Takahama, Y., Hayashi Y. CCR7 with S1P<sub>1</sub> signaling through AP-1 for migration of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. **Am J Pathol**, 180:199-208,2012.

DOI:10.1016/j.ajpath.2011.09.027 (査読有)

[学会発表] (計6件)

- (1) 新田 剛 「胸腺皮質微小環境の形成と機能」第10回 Osteoimmunology Forum 2013年3月30日 東京 (招待講演)
- (2) 新田 剛、岡田季之、加地健太郎、小田浩代、高島明子、Michael S. Patrick、鈴木春巳「T細胞分化における Themis 分子内ドメインの役割」第35回日本分子生物学会年会 2012年12月12日 福岡
- (3) Takeshi Nitta, Toshiyuki Okada, Hiroyo Oda, Akiko Takashima, Michael S. Patrick, Harumi Suzuki 「Distinct protein motifs in Themis regulate positive selection of T cells」第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月6日 神戸
- (4) 新田 剛、岡田季之、加地健太郎、小田浩代、高島明子、Michael S. Patrick、鈴木春巳「Themis 分子内ドメインの機能解析」第22回 Kyoto T Cell Conference 2012年7月6日 京都
- (5) Takeshi Nitta, Izumi Ohigashi, Yasushi Nakagawa, Yousuke Takahama, “Lympho-epithelial complexes in the thymic cortex”, 第40回日本免疫学会総会・学術集会, Chiba, Japan, Nov 28, 2011. 千葉 (国際シンポジウム演者・座長)
- (6) 新田 剛、新田幸子、中川靖士、高浜洋介「胸腺皮質上皮細胞と胸腺細胞の多細胞複合体」第21回 Kyoto T Cell Conference 2011年6月10日 京都

[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

新田 剛 ( NITTA TAKESHI )  
国際医療研究センター・研究所・室長  
研究者番号：30373343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし