

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390071

研究課題名(和文)自己免疫を抑制するリンパ組織微小環境成立の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying formation of lymphatic tissue microenvironment required for preventing autoimmunity

研究代表者

秋山 泰身(AKIYAMA, TAISHIN)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50327665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系が自己由来の抗原に対して応答し、持続すると自己免疫疾患を発症する。通常、自己免疫疾患の発症は複数の機構で抑制されており、その一つが制御性T細胞による免疫抑制機構である。制御性T細胞の多くは、リンパ組織である胸腺で産生する。本研究では、制御性T細胞の産生に必要な胸腺内環境の形成を制御する分子機構を同定するとともに自己組織や癌に対する免疫応答制御における重要性を示した。これらの知見は、将来的に制御性T細胞を医療へ応用する上で重要な知見になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune diseases are provoked when acquired immune response to self-tissue-derived antigens initiate and continue. Normally, several different mechanisms prevent onsets of autoimmune diseases. Regulatory T cells suppress or attenuate immune responses and thereby play a critical role in preventing autoimmune disease onsets. A large part of regulatory T cells are generated in lymphoid organ thymus. This study identified a molecular mechanisms regulating formation of microenvironment required for generation of regulatory T cells in the thymus. Moreover, involvements of such mechanism in regulation of immune responses to self-tissues and tumors were addressed. This information would provide important insights in medical application of regulator T cells in future.

研究分野：分子免疫学

キーワード：自己免疫 胸腺 制御性T細胞 抗原提示細胞 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫応答を抑制する Foxp3 陽性制御性 T 細胞 (以下制御性 T 細胞) は、自己免疫疾患の治療などへ応用が期待されている。制御性 T 細胞の胸腺内の分化機構について、国内外で多くの研究がなされてきた。その結果として、制御性 T 細胞への分化運命決定に T 細胞抗原受容体シグナルが重要なこと、加えてインターロイキン (IL) -2 や IL-15 などのシグナルがマスター転写因子である Foxp3 の発現に必要なことが明らかとなってきた。

これらの知見のほとんどは、制御性 T 細胞への分化決定の際に T 細胞側で作動するシグナルや因子に関するものである。一方で、制御性 T 細胞の産生には、胸腺の様々な細胞が形成する細胞外環境が必要である。しかしながら、制御性 T 細胞が分化する際に必要な細胞外環境形成の分子基盤について不明な点が多く、その解明は制御性 T 細胞を人為的に分化誘導する方法を開発する上で不可欠な課題といえる。

2. 研究の目的

本研究課題は、TNF レセプターファミリーの RANK と CD40 のシグナルにより形成される胸腺微小環境の機能と形成に必要な分子基盤を、特に樹状細胞に着目して解析し、制御性 T 細胞の分化における役割を中心として自己免疫の抑制における意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) RANK と CD40 シグナルによる制御性 T 細胞の分化誘導機構

RANK や CD40 欠損および 2 重欠損マウス胸腺に存在する制御性 T 細胞、樹状細胞をフローサイトメーターや免疫組織染色などにより解析する。

RANK や CD40 欠損および 2 重欠損マウス胸腺より胎仔肝臓細胞を調製し、致死量 X 線照射したマウスに移入したキメラマウスを作成する。キメラマウスの胸腺をフローサイトメーターや免疫組織染色法などにより解析する。

RANK や CD40 欠損および 2 重欠損マウスより調製した胎仔胸腺ストローマをヌードマウスに移植する。移植した胸腺をフローサイトメーターなどで解析する。

2) RANK シグナルの抑制による制御性 T 細胞分化の微調整

OPG 欠損マウス胸腺に存在する制御性 T 細胞をフローサイトメーターや免疫組織染色により解析する。

OPG あるいはコントロールマウスより調製した胎仔胸腺ストローマをヌードマウスに移植したキメラマウスを準備し、発癌剤投与

や癌細胞の移入を行う。癌の増大を測定するとともに血清中の抗体を免疫組織染色やウエスタンブロット法により解析する

4. 研究成果

1) RANK と CD40 シグナルによる制御性 T 細胞の分化誘導機構

制御性 T 細胞の前駆細胞分化における役割

胸腺における制御性 T 細胞への分化は、最初に T 細胞抗原受容体と共刺激因子シグナルにより CD4 陽性 T 細胞から CD25 陽性 Foxp3 陰性前駆細胞に変換され、次に IL-2 などにより制御性 T 相細胞に分化する、という 2 段階の機構で進行するとの説が有力である。

RANK と CD40 欠損マウスを用いた解析により、RANK と CD40 シグナルは冗長に機能することで、制御性 T 細胞の前駆細胞の産生を誘導することが判明した。さらに胸腺ストローマ移植実験および胎仔肝臓細胞の移植実験により、胸腺ストローマ細胞と造血系細胞の両方で RANK と CD40 シグナルが機能するとの結果を得た。

制御性 T 細胞の産生に必要な胸腺環境の制御

胸腺において、制御性 T 細胞の前駆細胞の分化には、MHC クラス II と自己抗原の刺激および CD80/86 などの共刺激が必要である。RANK と CD40 欠損マウスの解析から、RANK と CD40 シグナルは、胸腺髄質における MHC クラス II の発現や CD80 と CD86 の発現に必要であることが判明した。これは、胸腺環境を形成する髄質上皮細胞の分化誘導を介する機構だけでなく、樹状細胞の分化あるいは維持を誘導によるものであるとの結果を得た。

以上の結果から、RANK と CD40 シグナルは、髄質上皮細胞の分化だけでなく、樹状細胞の分化や維持の誘導を介して、髄質の MHC クラス II および CD80/86 の発現を誘導維持し、結果として制御性 T 細胞の分化を誘導するとの作業仮説が提唱できる。

これまでに胸腺における制御性 T 細胞の分化機構について、分化する T 細胞側での分子機構は、非常に多く明らかになっている。ところが、制御性 T 細胞分化に必要な環境を維持する細胞の分化機構については、国内外を含めてあまり多くの知見が蓄積していないのが現状であった。本研究により RANK と CD40 シグナルは冗長に機能することで、制御性 T 細胞を分化誘導する細胞外環境の誘導や維持を行っているとの新たな知見が得られた。制御性 T 細胞を人工的に分化誘導する上で、重要な基盤情報になると予想できる。

2) RANK シグナルの抑制による制御性 T 細胞分化の微調整

OPG による制御性 T 細胞の分化抑制

RANK シグナルは、そのリガンドである RANK リガンド (RANKL) の結合により開始する。RANKL は、RANK 以外に osteoprotegerin (OPG) にも結合することが知られている。OPG は細胞質部分を持たない分泌型のタンパク質であり、RANKL のデコイレセプターとして、RANK シグナルを抑制する。

OPG 欠損マウスの解析から、OPG が制御性 T 細胞の分化を抑制していることが明らかとなった (図 1)。この抑制は、前駆細胞の産生

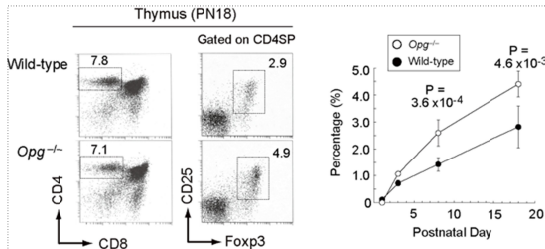


図 1. OPG は制御性 T 細胞の分化を抑制する

の過程で行われており、研究成果 (1) で得られた結果に一致する。すなわち RANK シグナルが制御性 T 細胞の前駆細胞の誘導に重要な寄与をしているとの考えが更に補強された。

OPG による制御性 T 細胞の抑制は生後の早い時期から開始されていた。最近、国外の他グループは、新生仔期マウスの胸腺で産生する制御性 T 細胞は、成体の胸腺で産生する制御性 T 細胞と性質が異なっており、成体後の長期にわたって自己免疫疾患の発症抑制に重要であることを報告した。従って、OPG による新生仔期マウスの制御性 T 細胞分化の微調整は、成体期の自己免疫制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

OPG の発現制御機構

胸腺における OPG の発現を調べると、成熟した髄質上皮細胞に高く発現していた。また OPG の発現は、胸腺ストローマを RANKL 刺激することで上昇した。すなわち RANK シグナルは、胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導するとともに、自らを抑制する OPG を発現する。

一方で RANK シグナルにより髄質上皮細胞で発現誘導される転写因子として ETS 転写因子ファミリーの Spi-B を同定した。Spi-B は CD80 や一部の組織特異的遺伝子の発現に加えて OPG の発現を誘導することがわかった (図 2)。すなわち RANK シグナルは、Spi-B の発現を上昇させることで OPG の発現を促進し、発現した OPG は RANKL と RANK の相互作用

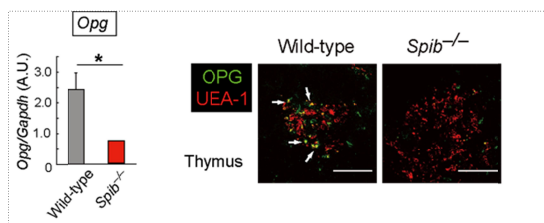


図 2 転写因子 Spi-B は OPG の発現を制御する

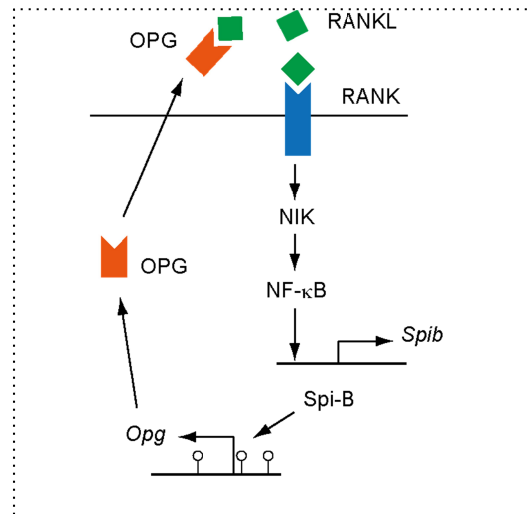


図 3 RANK シグナルのネガティブフィードバック制御

用を抑制することで、RANK シグナルを抑制するネガティブフィードバック機構の存在が明らかとなった (図 3)。

RANK シグナルが髄質上皮細胞分化を開始することは、代表者も含めて国内外の研究者により報告されたが、そのシグナルの下流に存在する分子機構は、これまでほとんど明らかでなかった。今回の研究により、その一端が明らかになるとともに RANK シグナルを抑制する新たな分子機構が明らかとなった。研究成果の (1) から考察すると、髄質上皮細胞で発現する RANK シグナルは OPG を介して樹状細胞の分化や維持を制御することになる。すなわち OPG を介した新たな細胞間相互作用が存在し、制御性 T 細胞の分化を微調整していることになる。今後、この作業仮説を検証する必要がある。

OPG による癌免疫応答の促進

自己応答性 T 細胞の除去と制御性 T 細胞の産生は胸腺髄質で行われる。最近、国外の研究グループから、胸腺髄質では癌や腫瘍に应答する T 細胞の除去や癌免疫を抑制する制御性 T 細胞の産生も行うことが報告されてきた。上記の研究成果から RANK と CD40 シグナルは、自己応答性 T 細胞や癌応答性 T 細胞の除去あるいは制御性 T 細胞の誘導を制御していると思える。一方で OPG は RANKL シグナルを抑制することで、自己・癌応答性 T 細胞の残存や制御性 T 細胞への変換を促進すると予想でき、この仮説を検証した。

胸腺髄質上皮細胞も含め胸腺ストローマで OPG を欠損する移植マウスに、発癌剤の投与を行ったところ、OPG 欠損移植マウスでは、癌の発生率が有意に増加した。またマウス癌細胞を移植したところ、癌の増殖は有意に早いことがわかった。

さらに癌細胞を移入したマウスの血清中には、移入した癌に存在するタンパク質に対する抗体が上昇するが、OPG 欠損移植マウスでは、抗体価が有意に低かった。

以上の結果は、OPG 欠損移植マウスでは、癌に対する免疫応答が低下し、その結果とし

て癌の増殖が亢進することを強く示唆している。

これまで RANK シグナルは髄質上皮細胞の分化を誘導することで自己免疫を抑制することが知られていた。本研究で Spi-B と OPG を介した RANK シグナルのネガティブフィードバック制御機構の存在が明らかとなった。この機構は、制御性 T 細胞の分化を抑制するのみならず、癌に対する免疫応答を亢進している。すなわち胸腺において自己免疫抑制機構の微調整を行うことで癌に対する免疫応答を亢進するとの新規概念の提唱に至った。

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 8 件)

1. Blackburn J, Kawasaki K, Porntaveetus T, Kawasaki M, Otsuka-Tanaka Y, Miake Y, Ota MS, Watanabe M, Hishinuma M, Nomoto T, Oommen S, Ghafoor S, Harada F, Nozawa-Inoue K, Maeda T, Peterková R, Lesot H, Inoue J, Akiyama T, Schmidt-Ullrich R, Liu B, Hu Y, Page A, Ramirez A, Sharpe PT and Ohazama A, Excess NF- κ B induces ectopic odontogenesis in embryonic incisor epithelium *J. Dent. Res.*, 94,121-128 (2015). (査読あり) doi: 10.1177/0022034514556707.
2. Akiyama N., Shinzawa M., Miyauchi M., Yanai H., Tateishi R., Shimo Y., Ohshima D., Matsuo K., Sasaki I., Hoshino K., Wu G., Yagi S. Inoue J., Kaisho T., and Akiyama T*. Limitation of immune tolerance-inducing thymic epithelial cell development by Spi-B-mediated negative feedback regulation *J. Exp. Med.*, 211, 2425-2438 (2014) (査読あり) Doi: 10.1084/jem.20141207
3. Akiyama T*, Shiraiishi T., Qin J., Konno H., Akiyama N., Shinzawa M., Miyauchi M., Takizawa N., Yanai H., Ohashi H., Miyamaoto-Sato E., Yanagawa H., Yong W., Shou W., and Inoue J. Mitochondria-nucleus shuttling FK506-binding protein 51 interacts with TRAF proteins and facilitates the RIG-I-like receptor-mediated expression of type I IFN *PLoS One.* 9, e95992 (2014) (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0095992
4. Akiyama T*, Qin J, Ohshima D, and Inoue J Identification of transcription factors activated in thymic epithelial cells during embryonic thymus development. *Methods Mol Biol.* 1164:163-70 (2014) (査読あり) doi: 10.1007/978-1-4939-0805-9_13.
5. Akiyama T*, Shinzawa M, Qin J and Akiyama N. Regulation of gene expressions in medullary thymic epithelial cells essential for preventing the onset of autoimmune disease

Front. Immunol. 4:249 (2013) (査読あり) doi: 10.3389/fimmu.2013.00249.

6. Akiyama T*, Shinzawa M and Akiyama N RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems *World J. Orthop.* 3:142-150 (2012) (査読あり) doi: 10.5312/wjo.v3.i9.142.
7. Akiyama T*, Shinzawa M and Akiyama N TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. *Front. Immunol.* 3:278 (2012) (査読あり) doi: 10.3389/fimmu.2012.00278
8. Wu G., Hirabayashi K, Sato S., Akiyama N., Akiyama T., Shiota K., and Yagi S. DNA methylation profile of Aire-deficient mouse medullary thymic epithelial cells *BMC Immunol.* 13, 58 (2012). (査読あり) doi: 10.1186/1471-2172-13-58.

[学会発表](計 9 件)

1. Mitochondria-nucleus shuttling FK506-binding protein 51 interacts with TRAF proteins and facilitates the RIG-I-like receptor-mediated expression of type I IFN AKIYAMA Taishin (口頭発表), SHINZAWA Miho, AKIYAMA Nobuko and INOUE Jun-ichiro
第 43 回 日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日 (京都国際会議場、京都市)
2. T cell-specific CNOT3 depletion alters thymic T cell development and provokes autoimmunity ITOH-KUREHA Taku (口頭発表) and AKIYAMA Taishin
第 43 回 日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10 日 (京都国際会議場、京都市)
3. 非古典的 NF- κ B 経路の振動による転写制御メカニズムの解析
関崇生(ポスター発表) 大島大輔、田口祐、秋山泰身、市川一寿、井上純一郎
第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 (神戸国際会議場、神戸市)
4. T 細胞特異的 CNOT3 欠損マウスにおける T 細胞分化・機能異常と自己免疫疾患発症
呉羽拓(ポスター発表) 秋山泰身、森田斉弘、山本雅
第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日 (神戸国際会議場、神戸市)
5. ETS ファミリー転写因子 Spi-B は髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する
秋山伸子、新澤美穂、宮内真紀、井上純一郎、秋山泰身(口頭発表)
第 24 回京都 T 細胞会議 2014 年 5 月 16 日 (芝蘭会館、京都市)
6. 胸腺髄質上皮細胞の分化と機能を制御する分子機構
秋山泰身 第 33 回日本胸腺研究会 2014 年 2 月 8 日 (東京大学、東京都)
7. Requirement of RANKL signaling for maintenance of mature mTECs in adult thymus

Nobuko Akiyama, Miho Shinzawa, Nobukazu Takizawa, Maki Miyauchi, Junwen Qin, Jun-ichiro Inoue and Taishin Akiyama (口頭発表)

6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013年6月3日 (芝蘭会館、京都市)

8. Sequential regulation of the development of medullary thymic epithelial cells by NF-kB family
Taishin Akiyama (口頭発表), Nobuko Akiyama, Miho Shinzawa, and Jun-ichiro Inoue
第41回日本免疫学会学術集会 2012年11月5日 (神戸国際会議場、神戸市)
9. 胸腺髄質上皮細胞の分化における非古典的NF-kappaB活性化シグナルの役割
新澤未穂、滝沢信和、秋山伸子、井上純一郎、秋山泰身 (口頭発表)
第22回京都T細胞会議 2012年7月6日 (芝蘭会館、京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等：無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 泰身 (AKIYAMA, Taishin)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：50327665

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

井上純一郎 (INOUE, Jun-ichiro)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：70176428