

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860361

研究課題名(和文) 胸腺皮質上皮細胞特異的 5tの発現を指標にした胸腺上皮細胞分化機構の研究

研究課題名(英文) Development and developmental potential of beta5t-expressing thymic epithelial cells

研究代表者

大東 いずみ(OHIGASHI, Izumi)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：00596588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺髄質上皮細胞は皮質上皮細胞分子 5tを一過性に発現する皮質髄質共通前駆細胞に由来する。私たちは、特定時期の 5t発現前駆細胞が、髄質上皮細胞の維持・再生にどのように寄与しているのか検討した。その結果、髄質上皮幹細胞を含む髄質上皮細胞は、胎生期から生後1週齢までの 5t発現前駆細胞由来の細胞によって維持されており、生後1週齢以降の 5t発現前駆細胞の寄与は、正常時だけでなく胸腺退縮後の再生時もわずかであった。これらの結果から、成体期の髄質上皮細胞は 5t発現前駆細胞から新たに作り続けられているのではなく、新生仔期までに産生された髄質系列の細胞によって維持・再生されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Medullary thymic epithelial cells (mTECs) are derived from cortico-medullary common thymic epithelial progenitors (pTECs) that transiently transcribe cortical thymic epithelial cells (cTECs)-specific molecule 5t. By in vivo fate-mapping analysis of cells that transcribe 5t during a given period in mice, we examined how 5t+ pTECs contribute the maintenance and regeneration of adult mTECs. In adult mice, most mTECs were derived from cells that transcribed 5t during embryogenesis and neonatal period up to one week of age. The contribution of adult 5t+ pTECs was minor even during injury-triggered thymic regeneration. Our results further demonstrate that adult mTEC-restricted stem cells were also derived from perinatal 5t+ progenitors. These results indicate that the adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by mTEC-lineage cells that pass beyond the bipotent stage during early ontogeny.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 獲得免疫 胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

胸腺上皮細胞 (TEC: thymic epithelial cell) は、皮質上皮細胞 (cTEC: cortical TEC) と髄質上皮細胞 (mTEC: medullary TEC) に分類され、胸腺微小環境を形成し T 細胞の抗原認識特異性レパトアの形成を担う。これらの上皮細胞は共通の上皮前駆細胞から分化するが、そのメカニズムは不明な点が多い。

私たちの研究室ではこれまでに、T 細胞の抗原特異性レパトア形成機構を解明するとともに、免疫不全症などの重篤な免疫疾患の治療法開発に近づくために、T 細胞のレパトア形成を担う胸腺微小環境の分子機構の解明を目指した研究をおこなってきた。その中でも、cTEC 特異的に発現する胸腺プロテアソーム構成鎖 5t を同定し、有用な T 細胞レパトアの形成に必須であることを明らかにした (Science 2007, Immunity 2010)。cTEC での 5t の発現は細胞特異性が非常に高く、mTEC などの微小環境を構築する他の細胞や、胸腺以外の臓器では発現されていない。また

5t の cTEC での発現は、TEC 分化の早期から検出され、前駆細胞から cTEC への分化開始直後である胎生 12.5 日齢から成獣マウスにいたるまで発現が維持される。私たちは、

5t 発現の細胞特異性、および cTEC 分化早期における発現に着目し、5t の発現を指標に、TEC 分化機構を解析することができるとの着想に至った。

2. 研究の目的

先行研究において、5t を現在または過去に発現した細胞を EGFP 発現にてトレースすることができるレポーターマウスを解析し、TEC における EGFP の発現は、cTEC のみならず、5t の現在発現が検出されない mTEC でも検出された。このことから、mTEC は TEC 前駆細胞からの分化途上で cTEC 特異的な分子である 5t を一時的に発現することが明らかになった。そこで、この先行研究結果をもとに、5t 発現細胞の分化運命トレースにより分化能のさらなる解析を進めるとともに、

5t の転写制御機構を明らかにする。これらの実験を推進することにより、TEC の分岐および分化を制御する分子細胞機構の解明にせまる。

3. 研究の方法

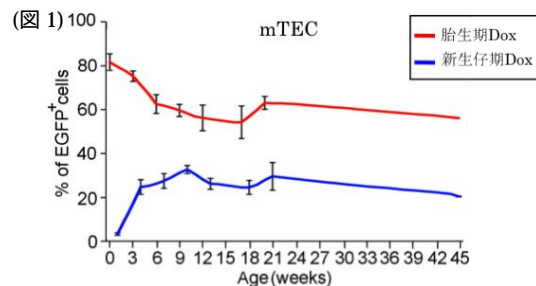
(1) 5t 発現細胞の分化運命トレースによる分化能解析: 5t 遺伝子座にドキシサイクリン依存性転写制御因子 rtTA をノックインしたマウスを用い、任意時間のドキシサイクリン (Dox) の投与により、特定の時期に 5t を発現した細胞を EGFP 発現にてトレースできるマウスを作製する。このマウスの、胎生期、

新生仔期、成体期における 5t 発現前駆細胞の分化能をトレースすることで、5t 発現前駆細胞から mTEC への分化能が、個体発生、成長、老化に応じてどのように変化するか解析するとともに、mTEC の入れ替わり速度および半減期を測定する。さらに、X 線照射による胸腺退縮や回復時における TEC 分化について検討し、胸腺の再生における TEC の分化について明らかにする。

(2) 5t の転写制御機構解析: 私たちはこれまでに、TEC 分化に必須な転写因子である Foxn1 を欠損するマウスの胸腺原基で、5t の発現が見られないことを明らかにしている。そこで、さまざまな塩基長の 5t ゲノム DNA に緑色タンパク質 EGFP をつないだレポータープラスミドを作製し、Foxn1 を共発現させた細胞培養系において、Foxn1 の発現により EGFP 発現が制御されるのかを検討する。また、cTEC と mTEC での遺伝子発現を比較したマイクロアレイ解析結果に基づき、発現差分がみられ、かつ、5t 遺伝子座に結合配列が存在する転写因子を抽出し、レポーターアッセイにより、これらの候補転写因子による 5t の発現制御について検討する。

4. 研究成果

(1) 5t 発現細胞の分化運命トレースによる分化能解析: 胎生期、新生仔期、成体期それぞれに Dox を投与し、Dox 投与期間に 5t を発現した細胞を EGFP 発現にてトレースした。その結果、成体マウスの mTEC の大部分は、胎生期および新生仔期に 5t を発現した前駆細胞から分化した細胞によって維持されており、成体期に存在する 5t 発現前駆細胞からの細胞供給はわずかであった。また、45 週齢の比較的高齢期に近いマウスにおいても、大部分の mTEC は胎生期、および新生仔期に 5t を発現した前駆細胞由来であった (図 1)。



さらに、X 線照射や poly I:C 投与による胸腺退縮からの器官再生時においても、大部分の mTEC は、胎生期および新生仔期の 5t 発現前駆細胞から分化した細胞によって供給されており、成体期に存在する 5t 発現前駆細胞からの細胞供給はわずかであった。また、mTEC の中では最も幼若な mTEC 幹細胞についても同様に検討したところ、成体マウスの mTEC 幹細胞は、胎生期および新生仔期の 5t 発現前駆細胞由来であった。これらの結果から、5t を発現する皮質髄質共通前駆細胞は、生後まもなくまでに mTEC 幹細胞を含む mTEC 系列の

細胞を産生すること、成体期の mTEC は共通前駆細胞から新たに作り続けられているのではなく、新生仔期までに産生された mTEC 系列の細胞によって維持・再生されることが明らかになった。

(2) 5t の転写制御機構解析: 5t ゲノム DNA 上の Foxn1 結合配列を検索したところ、翻訳開始点の近傍と、翻訳開始点から 2kb 上流に Foxn1 が結合しうる配列が存在した。また、*in vitro* レポーターアッセイにおいて、Foxn1 による 5t の発現制御について検討したところ、Foxn1 を発現した細胞株では、5t の発現が増加した。そこで、5t ゲノム上の Foxn1 結合配列に 1 塩基変異を挿入したレポータープラスミドを作製し、Foxn1 発現プラスミドと共発現したところ、5t 翻訳開始点近傍の Foxn1 結合配列に変異を入れた場合、5t の発現増加は検出されなかったが、2kb 上流の Foxn1 結合配列の変異では、5t の発現は増加した。これらの結果から、5t の発現は、翻訳開始点近傍の配列を介し、Foxn1 によって正に制御されることが示唆された。

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 7 件)

1. Ohigashi I, Takahama Y. CCRL1 marks heterogeneity in cortical and medullary thymic epithelial cells. *European Journal of Immunology*, 査読有, 2014, 44: 2827-2875.
DOI: 10.1002/eji.201445091.
2. Matsui N, Ohigashi I, Tanaka K, Sakata M, Furukawa T, Nakagawa Y, Kondo K, Kitagawa T, Yamashita S, Nomura Y, Takahama Y, Kaji R. Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia. *Journal of Neuroimmunology*, 査読有, 2014, 269:56-61.
DOI:10.1016/j.jneuroim.2014.01.011
3. Williams JA, Zhang J, Jeon H, Nitta T, Ohigashi I, Klug D, Kruhlak MJ, Choudhury B, Sharrow SO, Granger L, Adams A, Eckhaus MA, Jenkinson SR, Richie ER, Gress RE, Takahama Y, Hodes RJ. Thymic medullary epithelium and thymocyte self-tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways. *Journal of Immunology*, 査読有, 2014, 192: 630-640.

DOI: 10.4049/jimmunol.1302550

4. Jenkinson SR, Williams JA, Jeon H, Zhang J, Nitta T, Ohigashi I, Kruhlak M, Zuklys S, Sharrow S, Adams A, Granger L, Choi Y, Siebenlist U, Bishop GA, Hollander GA, Takahama Y, Hodes RJ. TRAF3 enforces the requirement for T cell cross-talk in thymic medullary epithelial development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 査読有, 2014, 110: 21107-21112.
DOI: 10.1073/pnas.1314859111
5. Alves NL, Takahama Y, Ohigashi I, Ribeiro AR, Baik S, Anderson G, Jenkinson WE. Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironment. *European Journal of Immunology*, 査読有, 2014, 44: 16-22.
DOI: 10.1002/eji.201344110
6. Takada K, Ohigashi I, Kasai M, Nakase H, Takahama Y. Development and function of cortical thymic epithelial cells. *Current Topics Microbiology and Immunology*, 査読有, 2014, 373: 1-17.
DOI: 10.1007/82_2013_322
7. Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Zhanybekova S, Murata S, Tanaka K, Holländer G, Takahama Y. Aire expressing thymic medullary epithelial cells originate from 5t-expressing progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 査読有, 2013, 110: 9885-9890.
DOI: 10.1073/pnas.1301799110.

[学会発表](計 8 件)

1. Ohigashi I, Takahama Y. Adult thymus medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage restricted cells rather than bipotent progenitors. 第 4 回眉山国際免疫シンポジウム, 2015 年 1 月 29 日, 徳島大学藤井節郎記念ホール(徳島県徳島市)
2. Ohigashi I, Takahama Y. 5t+ progenitors contribute to the maintenance and regeneration of medullary thymic epithelial cells. 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(京都府京都市)

3. 大東いずみ, 高浜洋介. 髄質上皮細胞の維持と再生における 5t 陽性前駆細胞の寄与. 第 24 回 Kyoto T Cell Conference, 2014 年 5 月 16 日, 京都平安ホテル(京都府京都市)
4. Ohigashi I, Takahama Y. Developmental potential of 5t-expressing thymic epithelial progenitor cells. 第 3 回眉山国際免疫シンポジウム, 2014 年 2 月 14 日, 徳島大学藤井節郎記念ホール (徳島県徳島市)
5. Ohigashi I, Sakata M, Takahama Y. Development and developmental potential of 5t-expressing thymic epithelial cells. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 11 日, 幕張メッセ (千葉県千葉市)
6. Takahama Y, Ohigashi I. Sereal development of cortical and medullary thymic epithelia. 4th Synsetic Immunology Workshop. 2013 年 11 月 15 日, 京都大学学友会館 (京都府京都市)
7. 大東いずみ, 高浜洋介. 胸腺上皮細胞特異的 5t および髄質上皮細胞に発現する CCL21a の発現とレーザー実験による胸腺上皮細胞分化機構の解析. 第 37 回日本リンパ学会総会, 2013 年 6 月 15 日, アクロス福岡 (福岡県博多市)
8. Takahama Y, Ohigashi I. Development and developmental potential of 5t-expressing thymic epithelial cells. KTCC 2013 Internatinal Workshop on T Lymphocytes, 2013 年 6 月 4 日, 京都大学芝蘭会館 (京都府京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大東 いずみ (OHIGASHI, Izumi)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教
研究者番号: 00596588