

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24111004

研究課題名(和文)胸腺微小環境の機能解明と構築

研究課題名(英文)Development and function of thymic microenvironments

研究代表者

高濱 洋介(TAKAHAMA, Yousuke)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：20183858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胸腺微小環境を特徴づける胸腺上皮細胞亜集団の分化と機能に關与する分子の同定と機能解析を行った。その結果、まず、胸腺皮質上皮細胞と胸腺髄質上皮細胞の共通前駆細胞を同定し、それが転写因子Foxn1の直接制御にて、5tを発現する皮質上皮様前駆細胞であることを明らかにした。また、成体期の髄質上皮細胞の維持には成体期でなく新生仔期の5t発現前駆細胞が寄与することを見出した。更に、皮質上皮細胞依存性「正の選択」がTリンパ球の抗原応答性を調整する分化制御過程であること、ケモカイン分子種CCL21Serを産生する髄質上皮細胞亜集団がTリンパ球の自己寛容確立に不可欠であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study revealed a novel aspect of positive selection, in which T cell antigen-receptor affinity for positively selecting peptides produced by cortical thymic epithelial cells (cTECs) determines the subsequent antigen responsiveness of mature T cells in the periphery. It was also found that cTEC expression of beta5t, which governs positive selection of CD8+ cytotoxic T cells, is directly promoted by transcription factor Foxn1. Moreover, this study identified that postnatal medullary thymic epithelial cells (mTECs), which establish self-tolerance in T cells, are derived from perinatal bipotent progenitors that exhibit cTEC-like gene expression profiles. Essential role of CCL21 expressed by a subpopulation of mTECs in the establishment of central self-tolerance in T cells was also described.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 胸腺 胸腺上皮細胞 ストローマ細胞 Tリンパ球分化 レパトア選択

1. 研究開始当初の背景

胸腺は、獲得免疫システムの司令塔として自己と非自己の識別を担うTリンパ球を分化させるとともに、産生するTリンパ球の抗原認識特異性が自己生体に有用でしかも寛容であるように選択する免疫器官である。Tリンパ球の分化と選択を担う胸腺微小環境は主に皮質と髄質から構成されるが、それぞれを特徴づける皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の分化と機能、またそれらを裏打ちする分子機構は明確ではない。私たちは、皮質上皮細胞に特異的に発現され、CD8 陽性キラーT細胞の正の選択に必要な胸腺プロテアソームとその構成鎖 beta5t を同定するとともに、髄質上皮細胞に高く発現されT細胞の自己寛容確立に必須のケモカインCCL21とサイトカイン受容体RANKを見出し、胸腺微小環境の機能を担う分子機構の解析に先鞭をつけてきた。そこで本研究では、これらの分子群をてがかりに胸腺微小環境の機能を特徴づける分子の同定と機能の研究を推進することを目的とした。

2. 研究の目的

胸腺微小環境の機能解明と構築を目指した研究を進めるため、まず、皮質上皮細胞に特異的に発現される胸腺プロテアソームに依存する正の選択を担う分子機構解析を進め、負の選択に比較して十分に理解されていない「正の選択とは何か」に解を与えることを目的とした。また、すでに作製を進めている beta5t-Cre ノックインマウスや CCL21a-Tomato ノックインマウスなど新規のレポーター動物を用いることで従来まったく明らかにされていない皮質上皮細胞と髄質上皮細胞の系譜分岐機構の理解を進めることを目的とした。更に、髄質上皮細胞のもつ自己寛容誘導能に注目し、その機能を体内で構築する技術の開発をめざした。

3. 研究の方法

胸腺上皮細胞亜集団を含む胸腺ストローマ細胞集団を定量的かつ定性的に再現性高く分離精製する手法の確立を行った。また、それによって精製した胸腺上皮細胞亜集団を対象にした遺伝子発現解析を実施した。また、ノックアウトマウスやノックインマウスの作製と解析を進めることで、胸腺微小環境の機能解明と構築を目指した研究を実施した。

4. 研究成果

(1) 胸腺ナース細胞が beta5t 発現皮質上皮細胞の亜集団であり、幼若Tリンパ球の抗原受容体 alpha 鎖遺伝子の二次的再構成を支持することで、正の選択を至適化する細胞であることを明らかにした。(Proc Natl Acad Sci USA. 2012)

(2) 髄質上皮細胞が Aire 発現と CCL21 発現を指標に少なくとも4つの異なる亜集団によって構成される多様性を有することを明らかにした。(J Immunol. 2013)

(3) beta5t 遺伝子座に Cre をノックインしたマウスを作製し EGFP レポーターマウスと交配して解析することにより、髄質上皮細胞は皮質上皮細胞の固有機能の特徴づける beta5t を発現する前駆細胞に由来することを明らかにした。(Proc Natl Acad Sci USA. 2013)

(4) 胸腺皮質上皮細胞に発現される beta5t 含有胸腺プロテアソームは、MHC 会合ペプチドの構造を特徴づけ、TCR と相互作用する親和性を規定することで正の選択を担うことを明らかにした。(Nature Commun. 2015)

(5) beta5t 欠損 RAG1 欠損 TCR トランスジ

ェニックマウスを作製しモノクローナルT細胞の分化と機能の解析を完遂することで、胸腺上皮細胞依存性の正の選択とは、T細胞の抗原特異性レパトアを選択するだけでなく、T細胞の機能を最適化させる「教育」プロセスでもあることを明らかにした。胸腺における「正の選択」とは何かに関する全く新しいコンセプトを提示した。(Nature Immunol. 2015)

(6) beta5t 遺伝子座に rtTA をノックインしたマウスを tet0-Cre 依存的 EGFP レポーターマウスと交配して時期限定 doxycycline 投与による EGFP 発現細胞を解析することで、成体期の髄質上皮細胞は形成・維持・再生のいずれの局面においても、胎生期から新生仔期までの beta5t 発現皮質髄質共通前駆細胞に由来すること、成体期の beta5t 発現皮質髄質共通前駆細胞は髄質上皮細胞の生成・維持・退縮からの回復に殆ど寄与しないことを明らかにした。退縮胸腺の回復技術の開発を図るうえで重要で有用な知見が得られた。(Cell Rep. 2015)

(7) beta5t の遺伝子発現制御機構に関して、beta5t 発現が転写因子 Foxn1 の欠損マウスで著明に減少することから、beta5t 遺伝子座近傍に存在する Foxn1 結合配列を同定した。そのうえで、当該配列を変異させたマウスを作製して形質解析を行うことで、当該配列への Foxn1 結合が実際に beta5t の最適発現に必須であることを見いだした。転写因子 Foxn1 による胸腺上皮細胞機能の直接的な制御機構が初めて明らかにされ、胸腺上皮細胞の機能分子 beta5t の転写制御機構の一端が初めて示された。(Nature Commun. 2017)

(8) CCR7 ケモカインの一分子種 CCL21Ser

を特異的に欠損するマウスを作製することで、CCL21Ser が胸腺上皮細胞による胸腺細胞の誘引と自己寛容確立に必要なケモカインであることを明らかにした。(J Exp Med. 2017)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計26件)

Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, *Takahama Y. [*corresponding author] Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. Journal of Experimental Medicine. 査読有 In press, 2017 DOI: 未定

*Takahama Y, Ohigashi I, Baik S, Anderson G. [*corresponding author] Generation of diversity in thymic epithelial cells. Nature Reviews Immunology. 査読有 17, 295-305, 2017 DOI: 10.1038/nri.2017.12

Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, Murata S, *Takahama Y. [*corresponding author] Foxn1-beta5t transcriptional axis controls CD8+ T cell production in the thymus. Nature Communications. 査読有 8, 14419, 2017 DOI: 10.1038/ncomms14419

Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, *Takahama Y. [*corresponding author] Adult thymic medullary epithelium is maintained and regenerated by lineage-restricted cells rather than bipotent progenitors. Cell Reports. 査読有 13, 1432-1443, 2015 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.012

Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, *Takahama Y. [*corresponding author] TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively

selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells.
Nature Immunology. 査読有
16, 1069-1076, 2015
DOI: 10.1038/ni.3237

Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, *Takahama Y, *Murata S. [*co-corresponding authors]
Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8+ T cells.
Nature Communications. 査読有
6, 7484, 2015
DOI: 10.1038/ncomms8484

Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Zhanybekova S, Murata S, Tanaka K, Hollander GA, *Takahama Y. [*corresponding author]
Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells.
Proceedings of National Academy of Sciences USA. 査読有
110, 9885-9890, 2013
DOI: 10.1073/pnas.1301799110

Lkhagvasuren E, Sakata M, Ohigashi I, *Takahama Y. [*corresponding author]
Lymphotoxin beta receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells.
Journal of Immunology. 査読有
190, 5110-5117, 2013
DOI: 10.4049/jimmunol.1203203

Nakagawa Y, Ohigashi I, Nitta T, Sakata M, Tanaka K, Murata S, Kanagawa O, *Takahama Y. [*corresponding author]
Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary TCR rearrangement in cortical thymocytes.
Proceedings of National Academy of Sciences USA. 査読有
109, 20572-20577, 2012
DOI: 10.1073/pnas.1213069109

[学会発表](計8件)

Takahama Y.
How the thymic medulla attracts thymocytes for the establishment of self-tolerance.
2016 NCI Thymus Symposium (国際学会)
2016年12月9日 National Institutes of Health (アメリカ) [招待講演]

Takahama Y.

T-cell development and selection.
13th FIMSA Advanced Immunology Course
(国際学会) 2016年3月18日 Chandigarh (インド) [招待講演]

Takahama Y.
Thymus-dependent positive selection of T cells.
NCI Symposium on Frontiers in Basic Immunology (国際学会) 2015年10月8日 National Institutes of Health (アメリカ) [招待講演]

Takahama Y.
Thymus epithelium conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells.
Venice Thymus Conference (国際学会)
2015年4月10日 San Servolo Island (イタリア) [招待講演]

Takahama Y.
mTECs derived from embryonic and postnatal beta5t+ progenitors.
ThymOz VII International Workshop on T Lymphocytes (国際学会) 2014年4月3日 Heron Island (オーストラリア) [招待講演]

Takahama Y.
The thymic microenvironments that shape T cell repertoire.
15th International Congress of Immunology (国際学会) 2013年8月24日 Milano(イタリア) [招待講演]

Takahama Y.
Attacking the endocrine system: what is AIRE doing?
Society for Endocrinology BES 2013 (国際学会) 2013年3月20日 Harrogate (イギリス) [招待講演]

Takahama Y.
Aire+ thymic medullary epithelial cells originate from beta 5t+ progenitor cells.
ThymUS International Conference 2012 (国際学会) 2012年11月4日 Florida(アメリカ) [招待講演]

[図書](計3件)

Watanabe T, Takahama Y.
Synthetic Immunology. 書籍編纂 200ページ Springer 2016
ISBN: 9784431560272

Ohigashi I, Takahama Y.
Thymocyte-mTEC cross talk for self-tolerance in T cells.

Encyclopedia of Immunobiology. 1st Edition. 章執筆5ページ Elsevir 2016 ISBN: 9780123742797

Kasai M, Nakagawa Y, Kondo K, Takahama Y.
Thymus.
Reference Module in Biomedical Sciences. 3rd Edition. 章執筆9ページ Elsevir 2014 ISBN: 9780128012383

[その他]

報道

- 徳島新聞「自己免疫疾患 治療法に光」2015年12月4日
- 毎日新聞「胸腺の酵素、免疫への関与と解明」2015年10月6日
- 徳島新聞「がん殺すキラーT細胞、胸腺の酵素で威力増大」2015年9月3日
- 毎日新聞「免疫機能に酵素が関与、謎解明に道」2015年8月29日
- NHK ニュース(徳島放送局)「免疫系細胞作られる仕組み一部解明」2015年8月26日
- 徳島新聞「99%の失敗も、難病解明の道」2014年7月20日
- 徳島新聞「病気予防の免疫システム解明へ」2012年7月26日

科学コミュニケーション活動

- 知の拠点セミナー「生体防御のかなめ「胸腺」の形成と機能」2016年9月17日(京都大学・東京オフィス)
- 免疫ふしぎ未来2014 2014年8月10日(日本科学未来館)
- BSフジ テレビ番組 ガリレオX「日本分子生物学会 2050年シンポジウム」2014年1月12日
- 免疫ふしぎ未来2013 2013年8月11日(日本科学未来館)
- 第35回日本分子生物学会年会フォーラム「いかに惹きつけ納得させるか? 研究領域スーパープレゼン」2012年12月12日(福岡国際会議場)

- 免疫ふしぎ未来2012 2012年8月19日(日本科学未来館)

ウェブサイト

- 「免疫四次元空間ダイナミクス」
<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/ion/index.html>
- 「徳島大学 高浜胸腺研究室」
<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高濱 洋介 (TAKAHAMA, Yousuke)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授
研究者番号: 20183858