

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K19125

研究課題名（和文）機能的な胸腺の維持および退縮機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the mechanisms of the maintenance and involution of thymus

研究代表者

瀬海 美穂（Sekai, Miho）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：50737533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：胸腺はT細胞産生に必須のリンパ組織であり、その髄質上皮細胞は自己寛容の成立を担う。本研究では、マウスの胸腺において髄質上皮細胞の幹細胞を同定した。髄質上皮幹細胞はマウスの個体においてほぼ生涯にわたり機能的な髄質上皮細胞を供給しつづけ、その移植により、胸腺の髄質の機能不全に起因する自己免疫疾患の発症を抑制しつづることが示された。また、幹細胞の活性が生後直後から急激に低下する一方で、T細胞分化に異常のあるRag2欠損マウスではこの活性は維持されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胸腺の機能的な髄質上皮細胞の産生、および、T細胞の中樞性の自己寛容を生涯にわたり維持しうる胸腺の髄質上皮幹細胞の存在をはじめて証明した。また、髄質上皮幹細胞の移植により、髄質の機能不全をとともなう臓器特異的な自己免疫疾患の発症を抑制しうること、および、髄質上皮幹細胞の活性の制御機構の一端を明らかにすることができた。以上の結果は、胸腺および免疫系の維持や制御についての理解に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The thymus is a central lymphoid organ essential for T-cell production. Within the thymus, medullary thymic epithelial cells (mTECs) play a crucial role in central T-cell tolerance. In this study, we have identified the stem cells for mTECs that restore functional medulla formation and prevent the development of autoimmune diseases throughout life-long upon transplantation. Furthermore, we demonstrate that the stem cell activity rapidly decreases soon after birth, while the activity is maintained in adult Rag2-deficient mice with impaired T-cell development.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 上皮細胞 幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胸腺は T 細胞産生を担う中枢免疫組織であり、発生段階の T 細胞 (胸腺細胞) と微小環境を構築する胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cell, TEC) から構成される。その構造は組織学的に皮質と髄質に区別され、それぞれ皮質 TEC (cTEC) と髄質 TEC (mTEC) が存在し、胸腺細胞の増殖・発生・分化に異なる働きを担う。特に、mTEC は自己寛容の成立に必須の役割を果たす。これまで、胸腺細胞の分化過程に関してはその分子メカニズムが詳細に解析されてきた。一方で、胸腺細胞の分化をサポートする TEC の発生・分化に関しては不明な点が多かった。近年、ヒト自己免疫疾患である自己免疫性多内分泌腺症候群 I 型 (APECED) の原因遺伝子として *Aire* が同定され、*Aire* が一部の成熟 mTEC に発現すること、*Aire* を欠くマウスはヒト APECED と同様の自己免疫疾患を発症することが明らかとなった。さらに、mTEC の分化には胸腺細胞からの腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーメンバーを介したシグナルが必須であることが示された。例えば、NF- $\kappa$ B-inducing kinase に変異のある *aly/aly* マウスでは、mTEC の分化が障害され、*Aire* を発現する成熟 mTEC (*Aire*<sup>+</sup> mTEC) がほとんど認められず、自己反応性 T 細胞が除去されない結果、自己免疫疾患を発症する。

TEC は第三鰓弓由来の内胚葉上皮細胞から分化し、胎生期においては cTEC・mTEC の両者を生み出す共通前駆細胞、および各々を生み出す cTEC 前駆細胞と mTEC 前駆細胞が存在することが示されている。しかし、これら前駆細胞が成体において TEC の維持および胸腺組織の機能維持に寄与しているかどうか、また他の組織で同定されているような組織幹細胞が TEC にも存在するかどうか不明であった。

申請者らはこれまでに、胎生期にクローニン 3,4 を高く発現する (Cld3,4<sup>high</sup>) 細胞分画に *Aire*<sup>+</sup> mTEC を生み出す細胞が含まれることを明らかにしている。しかしながら、Cld3,4<sup>high</sup> 細胞が胸腺細胞の自己寛容を誘導する機能的な髄質を構築することができるのか、さらにはどのくらいの期間にわたり Cld3,4<sup>high</sup> 細胞が成熟 mTEC を生み出すことができるかについては明らかとはなっていなかった。

### 2. 研究の目的

これまでに同定した胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞が機能的な髄質を構築し、それを長期間維持できるか検討する。Cld3,4<sup>high</sup> 細胞が長期間にわたり機能的な髄質を維持することができた場合、Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画に幹細胞が存在する可能性について検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画の長期的・機能的な髄質構築能の検討

胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画の長期的および機能的な髄質構築能を生体において検証するため、mTEC の分化が障害され自己免疫疾患を発症する *aly/aly* マウスの胸腺に、GFP ラベルした野生型由来の胎生期 Cld3,4<sup>high</sup> 細胞を加えた再構築胸腺をヌードマウスの腎被膜下へ移植し、*Aire*<sup>+</sup> mTEC を含む正常な髄質構造が形成されるのか、またどのくらいの期間にわたり胸腺において維持されるのか検討した。さらに、mTEC の分化障害により発症する *aly/aly* マウスの自己免疫疾患を回避できるのか検討した。

#### (2) TEC 幹細胞の存在の検討

上記(1)の結果、胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画が生体内において個体の生涯にわたり機能的な mTEC を維持することができたことから、その分画には幹細胞を含む可能性が考えられた。そこで、幹細胞の定義である自己複製能と分化能を検討した。まずは、自己複製能の指標となるコロニー形成能を評価する培養系を確立し、1細胞由来のコロニーを継代することで、その自己複製能を評価した。その後、自己複製能を示す細胞の分化能を生体内で検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画の長期的・機能的な髄質構築能の検討

*Aire*<sup>+</sup> mTEC を欠き、髄質の機能不全および自己免疫疾患を呈する *aly/aly* マウスの胸腺に、GFP ラベルした野生型マウスの胎生期 Cld3,4<sup>high</sup> 細胞を混合移植したところ、Cld3,4<sup>high</sup> 細胞はマウスのほぼ生涯にわたり *Aire*<sup>+</sup> mTEC を含む正常な mTEC を供給し続けることが明らかとなった。また、*aly/aly* マウスで認められた自己免疫応答も、Cld3,4<sup>high</sup> 細胞を加えた胸腺を移植したマウスにおいては抑制されていた。この結果から、胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画には中枢性の自己寛容を誘導しうる機能的な mTEC を生涯にわたり維持することのできる細胞を含むことが示された。

フローサイトメトリーを用いて、胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画の細胞表面分子を詳細に解析したところ、その一部が SSEA-1 を発現すること、SSEA-1 を発現する (SSEA-1<sup>+</sup>) 分画には成熟 mTEC のマーカーの発現がほとんど認められず、SSEA-1 を発現しない (SSEA-1<sup>-</sup>) 分画と比べて未熟な細胞集団だと考えられた。実際、移植による胸腺再構築実験系によって、SSEA-1<sup>+</sup> 分画が長期間の mTEC 産生に寄与していることが明らかとなった。

#### (2) TEC 幹細胞の存在の検討

組織を構成する細胞は各々の組織により、幹細胞・前駆細胞によって維持されていると考えられている。mTEC のターンオーバーは 2~3 週間と比較的速いことから、長期間にわたり mTEC を供給し続けることのできる胎生期の Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画の中でも、SSEA-1<sup>+</sup>分画に mTEC の幹細胞が存在する可能性があると考えた。そこで、幹細胞の定義のひとつである自己複製能を評価するため、新たにマウス TEC を用いたコロニー培養系を確立した。SSEA-1<sup>+</sup>分画は SSEA-1<sup>-</sup>分画と比較してコロニー形成能が顕著に高く、継代効率も高かったことから、SSEA-1<sup>+</sup>分画に自己複製能を有する細胞が濃縮していることが示された。さらに、幹細胞のもうひとつの定義である分化能を生体内への移植により検討したところ、1 細胞由来のコロニー形成細胞の一部が Aire<sup>+</sup> mTEC を含む成熟 mTEC へ分化することがわかった。これらの結果から、胎生期の SSEA-1<sup>+</sup>Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画に mTEC の幹細胞が存在すると考えられた。また、SSEA-1<sup>+</sup>Cld3,4<sup>high</sup> 細胞分画による成熟 mTEC 産生能は胎生期に比べ、新生仔期、成体期と週齢が進むにつれて低下することから、mTEC 幹細胞の活性は加齢に伴い低下することが示唆された。

mTEC 幹細胞の活性が加齢で低下することに加え、1 胸腺あたりの TEC のコロニー形成能も生後直後から急激に低下していた。一方で、T 細胞の分化が分化段階の早期に停止する Rag2 ノックアウトマウスではコロニー形成能の低下はほとんど認められず、またダブルポジティブで停止する TCR ノックアウトマウスでは緩やかであったことから、TEC のコロニー形成能は T 細胞の産生に影響される可能性が考えられた。これらのノックアウトマウスに野生型の骨髄細胞を移植し、T 細胞が正常に分化すると TEC のコロニー形成能も野生型マウスと同様に低下したことから、TEC のコロニー形成能の低下は T 細胞産生によるものであることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wang Jianwei, Sekai Miho, Matsui Takeshi, Fujii Yosuke, Matsumoto Mitsuru, Takeuchi Osamu, Minato Nagahiro, Hamazaki Yoko	4. 巻 31
2. 論文標題 Hassall's corpuscles with cellular-senescence features maintain IFN production through neutrophils and pDC activation in the thymus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sekai Miho, Wang Jianwei, Minato Nagahiro, Hamazaki Yoko	4. 巻 467
2. 論文標題 An improved clonogenic culture method for thymic epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 29 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohigashi Izumi, Ohte Yuki, Setoh Kazuya, Nakase Hiroshi, Maekawa Akiko, Kiyonari Hiroshi, Hamazaki Yoko, Sekai Miho, Sudo Tetsuo, Tabara Yasuharu, Sawai Hiromi, Omae Yosuke, Yuliwulandari Rika, Tanaka Yasuhito, Mizokami Masashi, Inoue Hiroshi, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 A human PSMB11 variant affects thymoproteasome processing and CD8+ T cell production	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.93664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Kyosuke, Kato Aiko, Sekai Miho, Hamazaki Yoko, Minato Nagahiro	4. 巻 199
2. 論文標題 Physiologic Thymic Involution Underlies Age-Dependent Accumulation of Senescence-Associated CD4+T Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 138 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1602005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoko Hamazaki, Miho Sekai, Nagahiro Minato	4. 巻 271
2. 論文標題 Medullary thymic epithelial stem cells: role in thymic epithelial cell maintenance and thymic involution.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 38-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.12412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kohsuke Shirakawa, Xiaoxiang Yan, Ken Shinmura, Jin Endo, Masaharu Kataoka, Yoshinori Katsumata, Tsunehisa Yamamoto, Atsushi Anzai, Sarasa Isobe, Naohiro Yoshida, Hiroshi Itoh, Ichiro Manabe, Miho Sekai, Yoko Hamazaki, Keiichi Fukuda, Nagahiro Minato, and Motoaki Sano	4. 巻 126
2. 論文標題 Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4626-4639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI88606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Baik S, Sekai M, Hamazaki Y, Jenkinson WE, Anderson G.	4. 巻 -
2. 論文標題 Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK+ medullary epithelial progenitors.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Eur J Immunol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201546253.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekai M, Wang J, Hamazaki Y.	4. 巻 2048
2. 論文標題 Clonogenic culture of mouse thymic epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 143-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9728-2_15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----