

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05202

研究課題名(和文) 免疫微小環境によるT細胞多様性創出の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for T cell repertoire formation in thymic microenvironment

研究代表者

新田 剛 (Nitta, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：30373343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの体を感染症やがんから守るT細胞は、胸腺にてつくられる。本研究では、胸腺でのT細胞の生成を制御する胸腺上皮細胞に注目し、その分化のしくみと機能を明らかにすることをめざした。様々な遺伝子改変マウスを用いた解析の結果、未熟T細胞に発現する膜型RANKLが髄質上皮細胞の分化に必須であることが明らかになった。また、日本人に高頻度に存在するPSMB11遺伝子多型によって皮質上皮細胞の機能が損なわれ、T細胞の抗原認識が変化することが明らかになった。さらに、特殊なT細胞集団である T細胞にも着目し、 T細胞の分化を制御する胸腺環境因子およびシグナル伝達分子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は私たちの免疫系の司令塔であり、その抗原認識能力がつくられるしくみを理解することは、感染防御やがん免疫治療の観点から重要な課題である。本研究では、T細胞の抗原認識を決定づける胸腺微小環境のはたらきについて研究し、胸腺上皮細胞の生成のしくみと機能の一端を明らかにした。特に、日本人に高頻度に見られる遺伝子変異がT細胞の抗原認識と自己免疫疾患リスクに影響を与えることを見出したことは、大きな成果といえる。

研究成果の概要(英文)：T cells develop in the thymus, where various stromal cells including thymic epithelial cells regulate development and repertoire selection of immature T cells. Here, using a series of genetically modified mice, we studied the developmental mechanism and function of thymic epithelial cells. Our results showed that membrane-bound RANKL expressed in immature T cells is required for the development of medullary thymic epithelial cells. We also found that a PSMB11 gene polymorphism that is frequently found in the Japanese population impairs the function of cortical thymic epithelial cells and alters T cell repertoire in mice. In addition, we identified stromal factors and signaling proteins that determine the fate of distinct subsets of gamma/delta T cells in the thymus.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 細胞・組織 胸腺 T細胞 自己免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞の抗原認識の多様性と自己寛容（自己に反応しない性質）は胸腺での分化過程において形成される。胸腺は、様々なストロマ細胞が三次元ネットワーク構造をとった微小環境をもつ。胸腺内の空間は大まかに皮質と髄質に分けられ、それぞれの微小環境は主として、胸腺上皮細胞（皮質上皮細胞（cTEC）と髄質上皮細胞（mTEC））によって形成されている。これらの胸腺上皮細胞は骨髄由来の未熟T細胞に分化シグナルを提供し、正の選択と負の選択によって、多様性と自己寛容性をもつT細胞レパトアをつくりだす。しかしながら、胸腺微小環境によるT細胞免疫システムの制御の全容は未だ理解されていない。例えば、cTECとmTECの分化のもととなる共通前駆細胞の性質や、cTECへの分化を制御する細胞間シグナル分子は明らかになっていない。mTECの分化についても、髄質内に存在するリンパ球や他のストロマ細胞との相互作用の実体を明らかにする必要がある。また、 $\gamma\delta$ T細胞は $\alpha\beta$ T細胞とは全く異なる機構によって分化制御されるが、その抗原認識レパトアと機能分化を決定づける原理はわかっていない。このような免疫システムのなりたちを制御する基礎的な分子機序や動作原理の理解は、胸腺の再構築による免疫不全症や自己免疫疾患の治療といった未来の再生医療の実現に不可欠であり、基盤的な研究課題として重要である。

2. 研究の目的

本研究では、胸腺微小環境を構成するストロマ細胞群がT細胞免疫システムの多様性をつくりだすしくみの全体像を理解することを目的とした。マウスをモデル動物として、胸腺上皮細胞の分化系譜と機能の解明、T細胞レパトア形成の分子基盤についての研究を行った。

3. 研究の方法

(1) cTECとmTECの分化系譜の解明

胸腺の皮質上皮細胞（cTEC）と髄質上皮細胞（mTEC）は、共通の胸腺上皮前駆細胞（pTEC）から分化する。mTECへの分化はシグナル受容体RANKによって制御されるが、内在性RANKを発現するTECの検出と単離は困難であった。そこで、RANKプロモーターにCre-IRES-EGFPを連結したBACトランスジェニックマウス（RANK-CIG）を作製し、胎仔期および成体期の胸腺におけるGFP発現を解析した。また、RANK-CIGマウスとloxP-stop-loxP-tdTomatoマウスを交配してfate-mappingマウスを作製し、成体期マウス胸腺を解析した。

また、mTECの分化を制御するサイトカインRANKLには膜結合型と分泌型が存在し、どちらもmTEC制御に重要か不明であった。そこで、CRISPR/Cas9ゲノム編集法を用いて、プロテアーゼ標的的部位を欠失させることで分泌型RANKLを欠損させたマウス（RANKL- Δ S）を作製した。また、膜貫通領域をG-CSFシグナルペプチドに置換することで膜型RANKLを欠損させたマウス（RANKL- Δ M）を作製した。さらに、RANKL発現細胞を特定するため、RANKL-floxマウスと複数のCre系統（Lck-Cre、CD4-Cre、Rorc-Cre、Twist2-Cre）を交配し、特定の細胞でのみRANKLを欠損するマウスを作製した。これらのマウスを用いてmTECの分化および胸腺T細胞分化への影響を調べた。

(2) cTECの分化と機能成熟の分子機構

cTECの分化および機能に重要な遺伝子を探索するため、野生型マウスからcTECとmTECを単離し、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、cTECに高発現する転写因子Klf15を見出した。Klf15は脂肪細胞の機能調節に関わる転写因子として知ら

れているが、胸腺における機能は不明である。CRISPR/Cas9 編集法を用いて、Klf15 の第 1 イントロンと第 2 イントロンに loxP 配列を挿入した Klf15-flox マウスを作製した。これを FoxN1-Cre マウスと交配し、TEC 特異的に Klf15 を欠損する Klf15-conditional KO (CKO) マウスを作製し、表現型解析を行った。

(3) $\alpha\beta$ T 細胞レパトア形成の分子基盤

胸腺における $\alpha\beta$ T 細胞レパトアの制御を高精度に理解するため、特定の TCR β 鎖を T 前駆細胞に発現するレトロジェニックマウスを作製し、T 細胞に発現する TCR α 鎖を非バイアス遺伝子増幅と次世代シーケンシングによって定量的、網羅的に解析した。TCR $\alpha^{+/-}$ マウスに 5-fluorouracil (150 mg/kg) を投与し、3 日後に骨髓細胞を採取し、Sca1⁺細胞を単離して SCF、IL-6、IL-3 存在下で TCR β を発現させるレトロウイルスに感染させ、X 線照射したホストマウスに移植した。移植後 35 日後に胸腺細胞を回収し、EGFP⁺ V β 5⁺ CD4SP または CD8SP 細胞をソーティングし、RNA 抽出液 (ISOGEN) に溶解した。RNA 精製、cDNA 増幅、次世代シーケンス解析は、Repertoire Genesis 社に依頼した。興味深い変動を示した TCR 配列については、TCR α -P2A-TCR β を発現するレトロジェニックマウスを作製して胸腺細胞分化を解析した。

(4) $\gamma\delta$ T 細胞レパトア形成の分子基盤

$\gamma\delta$ T 細胞レパトア形成を制御する候補因子である Btn/Skint ファミリー遺伝子群のうち、11 個の遺伝子を含む Skint ファミリーに着目した。Skint ファミリーの 11 遺伝子は全て 4 番染色体に存在し、そのうち Skint1 は V γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必要であることが報告されている。Skint ファミリーの生理的意義を調べるため、CRISPR/Cas9 法を用いて 11 個の遺伝子を含む 2.3Mb 領域を欠失したマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) cTEC と mTEC の分化系譜の解明

RANK-CIG マウスを用いて解析を行った。成体マウス胸腺での GFP 発現は mTEC において高く、cTEC には検出されなかった。胎仔期には、未分化の胸腺上皮前駆細胞 (pTEC) が全て GFP を低レベルで発現していた。また、ヌードマウス胎仔胸腺の解析から、pTEC における低レベルの RANK 発現は FoxN1 依存的であることが示された。さらに fate-map 解析により、成体期の全ての mTEC と cTEC に RANK の発現履歴が検出された。これらの結果は、過去に報告された cTEC 特異的遺伝子 β 5t の fate-map 解析の結果 (Ohigashi et al, *PNAS* 2013) とよく似ていた。従って、pTEC は、cTEC と mTEC に特有の遺伝子群を一旦発現し、その後どちらかの細胞系譜に特殊化して分化することがわかった。また、RANK-CIG マウスは RANK 発現細胞の検出・単離および細胞分化系譜研究に有用であることが示された。

mTEC の分化を制御するサイトカイン RANKL の作用機序を明らかにするため、RANKL- Δ S および RANKL- Δ M マウスの胸腺を解析した。mTEC の分化は、RANKL- Δ S マウスでは正常であったが、RANKL- Δ M マウスでは著しく阻害されていた。また、CD4-Cre/RANKL-flox マウスの胸腺を解析したところ、mTEC の分化は RANKL-KO マウスと同程度に障害されていた。以上の結果から、SP 胸腺細胞に発現する膜型 RANKL が mTEC 分化に必須であることが明らかになった (論文投稿中)。

また、本研究で作製した RANKL- Δ S マウスを、他の免疫組織微小環境の研究に活用し、腸管上皮 M 細胞の分化を制御する新規のストロマ細胞を同定することができた (論文 11)。

(2) cTEC の分化と機能成熟の分子機構

cTEC 特異的に Klf15 を欠損させた FoxN1-Cre / Klf15-flox (Klf15-CKO) マウスを作成し、表現型解析を行った。Klf15-CKO マウスの胸腺サイズおよび胸腺細胞数は野生型マウスと同程度であり、DN、DP、CD4SP および CD8SP 胸腺細胞の数に影響はみられなかった。また、胸腺の皮質・髄質の形成に異常はみられず、cTEC と mTEC の数も正常であった。qRT-PCR により機能遺伝子の発現を解析したところ、cTEC における $\beta 5t$ 、Prss16、CtsL、MHC class II の発現、および mTEC における Aire、CD80、MHC class II、Ins2 の発現は野生型マウスと同程度であった。以上の結果から、TEC における Klf15 の機能を見出すことはできなかった。

(3) $\alpha\beta$ T 細胞レパトア形成の分子基盤

胸腺微小環境による $\alpha\beta$ T 細胞レパトア制御を理解するための TCR シークエンス解析法を確立し、ヒトに高頻度に見られる $\beta 5t$ 遺伝子多様性 (genetic variation) が T 細胞レパトアに与える影響を調べた。 $\beta 5t$ G49S 変異マウスを宿主として TCR β レトロジェニックマウスを作製し、胸腺 CD8 T 細胞を単離して TCR α 鎖を解析したところ、 $\beta 5t$ G49S 変異マウスでは野生型マウスに比べて、CD8 T 細胞の TCR レパトアの一部が失われ、新たに生成された TCR レパトアは認められなかった。従って、 $\beta 5t$ G49S 変異によって CD8 T 細胞の正の選択が低下し TCR レパトアが縮小することが示唆された。さらに、 $\beta 5t$ G49S 変異によって影響を受けない TCR クローン (TCR-1) と、正の選択が低下した TCR クローン (TCR-5) について、TCR α/β 鎖ペアを発現させるレトロジェニックマウスを作製した。G49S マウスにおいて TCR-1 は CD8 T 細胞分化がほとんど変化せず、TCR-5 は CD8 T 細胞分化が著しく低下したため、レパトア解析結果が正しいことが確認された。これらの結果より、 $\beta 5t$ の genetic variation が TCR レパトアを変化させることを実験的に検証することができた (論文 9)。

(4) $\gamma\delta$ T 細胞レパトア形成の分子基盤

$\gamma\delta$ T細胞レパトア形成を制御する候補因子である11個のSkint遺伝子を欠損するマウス (SKLD) を作製し表現型解析を行った。SKLDマウスではV γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞の胸腺内成熟と皮膚への局在が大きく障害されていた。しかし、それ以外の $\gamma\delta$ T細胞サブセットや $\alpha\beta$ T細胞、B細胞、骨髄系細胞の数には変化がみられなかった。従って、Skintファミリー遺伝子はV γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞の制御に特化した役割をもつことが示唆された (論文4)。また、IL17産生型 $\gamma\delta$ T細胞 ($\gamma\delta$ T17) の分化機構を明らかにするため、 $\gamma\delta$ T17前駆細胞に発現するTCRシグナル因子のKOマウスを作製し表現型解析を行った。 $\gamma\delta$ T17の分化にはTCR直下のチロシンキナーゼSykと、その下流で活性化するPI3K経路が必須であることが明らかになった。本研究により、 $\gamma\delta$ T17はSyk-PI3K経路に依存し、 $\alpha\beta$ T細胞よりもむしろB細胞に近い抗原受容体シグナルを備えるという新しい知見が示された (論文 1,7)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Muro R, Takayanagi H, Nitta T. T cell receptor signaling for $\gamma\delta$ T cell development. *Inflamm Regen*, 39,6, 2019. doi.org/10.1186/s41232-019-0095-z. **査読あり**
2. Tamehiro N, Nishida K, Sugita Y, Hayakawa K, Oda H, Nitta T, Nakano M, Nishioka A, Yanobu-Takanashi R, Goto M, Okamura T, Adachi R, Kondo K, Morita A, Suzuki H. Ras homolog gene family H (RhoH) deficiency induces psoriasis-like chronic dermatitis by promoting TH17 cell polarization. *J Allergy Clin Immunol*, doi: 10.1016/j.jaci.2018.09.032. **査読あり**

3. Inoue M, Okamoto K, Terashima A, Nitta T, Muro R, Negishi-Koga T, Kitamura T, Nakashima T, Takayanagi H. Arginine methylation controls the strength of γc family cytokine signaling in T cell maintenance. *Nat Immunol*, 19, 1265-1276, 2018. doi:10.1038/s41590-018-0222-z. 査読あり
4. Narita T, Nitta T, Nitta S, Okamura T, Takayanagi H. Mice lacking all of the *Skint* family genes. *Int Immunol*, 30, 301-309, 2018. doi:10.1093/intimm/dxy030 査読あり
5. Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, Iwakura Y, Nakashima T, Okamoto K, Takayanagi H. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*, 9, 701, 2018. doi:10.1038/s41467-018-03147-6 査読あり
6. Muro R, Nitta T, Kitajima M, Okada T, Suzuki H. Rasal3-mediated T cell survival is essential for inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 496, 25-30, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.159. 査読あり
7. Muro R, Nitta T, Nakano K, Okamura T, #Takayanagi H, #Suzuki H. $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk/PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program. *J Clin Invest*, 128, 415-426, 2018. doi: 10.1172/JCI95837. 査読あり
8. Nagashima K, Sawa S, Nitta T, Prados A, Koliaraki V, Kollias G, Nakashima T, Takayanagi H. Targeted deletion of RANKL in M cell inducer cells by the Col6a1-Cre driver. *Biochem Biophys Res Commun*, 493, 437-443, 2017. Doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.004. 査読あり
9. Nitta T, Kochi Y, Muro R, Tomofuji, Y, Okamura T, Murata S, Suzuki H, Sumida T, Yamamoto K, Takayanagi H. Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell selection. *Sci Immunol*, 2, eaan5165, 2017. Doi: 10.1126/sciimmunol.aan5165. 査読あり
10. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, Sawa S, Nitta T, Takayanagi H. Osteoimmunology: the conceptual framework for unifying the immune and skeletal systems. *Physiol Rev*, 97, 1295-1349, 2017. Doi: 10.1152/physrev.00036.2016. 査読あり
11. Nagashima K, Sawa S, Nitta T, Tsutsumi M, Okamura T, Penninger JM, Nakashima T, Takayanagi H. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol*, 18, 675-682, 2017. doi:10.1038/ni.3732. 査読あり
12. Tsukasaki M, Hamada K, Okamoto K, Nagashima K, Terashima A, Komatsu N, Win S, Okamura T, Nitta T, Yasuda H, Penninger JM, Takayanagi H. LOX Fails to Substitute for RANKL in Osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, 32, 434-439, 2017. doi: 10.1002/jbmr.2990. 査読あり
13. Nitta T, Suzuki H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1021-1037, 2016. DOI 10.1007/s00018-015-2107-8 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

1. **Takeshi Nitta, Tomoya Narita, Hiroshi Takayanagi**, “Mice lacking all eleven Skint family genes”, **Gamma/Delta T Cell Conference**, Bordeaux, France. Jun 7-10, 2018.
2. **Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi**, “ $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk-PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program”, **ThymOz International Conference on Thymus and T-cell Biology**, Heron Island, Queensland, Australia. Mar 21-26, 2018.
3. **Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi**, “Deciphering lineage-specific TCR signaling in IL-17-producing $\gamma\delta$ T cell development”, **The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society**, Kanazawa, Japan. Oct 30, 2017.
4. **Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi**, “Thymoproteasome mutations impact CD8 T cell development”, **International Kyoto T Cell Conference 2017**, Kyoto, Japan. Mar 13-17, 2017.
5. **Takeshi Nitta, Takehito Ono, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi**, “IL-17-producing V γ 6+ $\gamma\delta$ T cells enhance bone fracture healing”, **Gamma/Delta T Cell Conference**, London, UK. Jun 16-19, 2016.
6. **Takeshi Nitta, Masanori Tsutsumi, Shinichiro Sawa, Hiroshi Takayanagi**, “Deciphering RANKL-RANK signal in mTEC development”, **2016 ThymUS International Conference**, Hawaii, USA. Jun 6, 2016.

7. 新田 剛「胸腺における T 細胞レパトア選択と自己免疫」本郷免疫ネットワークカンファレンス 2019 年 3 月 6 日 (招待講演)
8. Takeshi Nitta「Thymus」第 47 回日本免疫学会学術集会 Overview Talk, 2018 年 12 月 10 日 (招待講演)
9. Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi「Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell repertoire」第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年 12 月 13 日
10. 新田 剛「プロテアソームの遺伝的多様性と T 細胞選択・自己免疫疾患」日本リウマチ学会 第 3 回ベーシックリサーチカンファレンス・次世代リーダーセッション 2017 年 10 月 13 日 (招待講演)
11. 新田 剛、高柳 広「プロテアソームの遺伝子多様性による CD8 T 細胞レパトアの変化」第 3 回日本骨免疫学会 2017 年 6 月 28 日
12. 新田 剛、高柳 広「胸腺線維芽細胞サブセットの同定と機能解析」第 36 回日本胸腺研究会 2017 年 2 月 4 日
13. Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Harumi Suzuki, Hiroshi Takayanagi「Thymoproteasome mutations impact CD8 T cell immunity」第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日
14. 新田 剛、室龍之介、高柳 広「プロテアソーム遺伝子変異による CD8 T 細胞のレパトア変容」日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 2016 年 10 月 14-15 日
15. 新田 剛、新田 幸子、堤 雅紀、澤 新一郎、高柳 広「胸腺髄質に存在する細網線維芽細胞の機能」第 25 回 Kyoto T cell conference 2016 年 5 月 20-21 日

[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: <http://osteimmunology.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 澤 新一郎

ローマ字氏名: SAWA, Shinichiro

研究協力者氏名: 室 龍之介

ローマ字氏名: MURO, Ryunosuke

研究協力者氏名: 岡村 匡史

ローマ字氏名: OKAMURA, Tadashi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。