

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16689

研究課題名（和文）加齢に伴う胸腺退縮のメカニズムの解明および免疫系への影響

研究課題名（英文）Understanding for the mechanism of thymic involution during aging

研究代表者

瀬海 美穂（Sekai, Miho）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50737533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞を産生する臓器である胸腺が加齢に伴って退縮することはよく知られていることであるにも関わらず、これまでそのメカニズムは明らかになっていなかった。これまでに我々は、T細胞の発生をサポートする胸腺上皮細胞の幹細胞を同定し、加齢に伴って幹細胞活性が低下することを明らかにしてきた。本研究では、胸腺上皮幹細胞の活性を制御するT細胞集団を同定し、幹細胞活性の制御メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胸腺上皮細胞の幹細胞の活性を評価できるコロニー培養系を確立し、それをを用いて生理的な胸腺退縮メカニズムの一端を明らかにした。本コロニー培養系は、胸腺上皮幹細胞活性を制御するメカニズムの解明を可能にし、今後さらなる研究の推進に貢献できると期待される。また、特定のT細胞集団が胸腺上皮幹細胞を制御する分子メカニズムを明らかにすることで、胸腺退縮を制御できる可能性がある。これらの研究は、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. Although it is well known that the thymus involutes with age, the mechanism of the thymic involution remain unclear. We have previously identified thymic epithelial stem cells that support T cell development and demonstrated that the stem cell activity decline with age. In this study, we identified a T cell population that affects the activity of thymic epithelial stem cells and revealed the mechanism to regulate stem cell activity.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺

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 細胞と微小環境を構築する胸腺上皮細胞から構成される。胸腺内の T 細胞は、細胞表面分子である CD4 と CD8 の発現で発生段階が分類され、CD4 も CD8 も発現していない最も未熟なダブルネガティブ (DN) から、CD4 と CD8 の両分子を発現するダブルポジティブ (DP) へ進み、その後 CD4 もしくは CD8 のどちらか一方を発現するシングルポジティブ (SP) へ分化する。この T 細胞の発生・分化に必須の胸腺は、思春期以降に萎縮 (退縮) が始まり、加齢に伴い T 細胞産生能が低下する。T 細胞は免疫システムの中心的な役割を果たすため、加齢に伴う T 細胞の変化は免疫機能の変容を招き、易感染性・慢性炎症性疾患などに代表される加齢関連疾患を引き起こすと考えられている。このように胸腺退縮は、加齢に伴う免疫老化の主因の一つと考えられているが、そのメカニズムはよくわかっていない。

申請者らはこれまで、T 細胞の発生に不可欠な胸腺上皮細胞において、マウス個体の生涯にわたり機能的な T 細胞産生を維持することができる特定の細胞集団を明らかにしてきた。また、胸腺上皮細胞の幹細胞の活性を評価するコロニー培養系を確立し、胸腺上皮幹細胞を同定した。さらに、その幹細胞活性が胸腺退縮に先行して低下することを見出し、これが思春期以降に認められる生理的な胸腺退縮の主要な要因である可能性を示してきた (Sekai et al., 2014 Immunity)。一方で、本コロニー培養系では成体期マウス由来のコロニー細胞がほとんど検出されず、胸腺上皮幹細胞の活性を制御するメカニズムの解明が困難であった。

2. 研究の目的

成体期マウスにおいて胸腺上皮細胞の幹細胞活性を解析することで、その活性を制御する T 細胞集団を同定し、幹細胞活性の制御メカニズムを明らかにする。さらには、胸腺上皮細胞以外のストロマ細胞における加齢変化を探索する。

3. 研究の方法

(1) 胸腺上皮幹細胞能を評価するコロニー培養系の改良

幹細胞の活性を評価するために確立した従来のコロニー培養系では、成体期由来のコロニーがほとんど検出されないことから、培養系に添加する因子とそのタイミングを検討し、コロニー培養系の改良を試みた。具体的には、従来の培養系に含まれていた上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) の添加タイミングを評価対象である胸腺上皮細胞を播種する前後で比較検討した。また、分化抑制や接着などに関わる因子の影響を本培養系にて評価した。

(2) 変異マウスを用いた胸腺上皮幹細胞活性の評価

野生型のマウスでは胸腺上皮幹細胞の活性が生後直後に急激に低下することから、胸腺内で発生する T 細胞が幹細胞の活性に影響を与えていると考えられる。そこで、T 細胞のうち、幹細胞活性に影響を与え得る T 細胞集団を同定するため、T 細胞の発生が様々な段階で停止する変異マウスを用いて胸腺上皮細胞のコロニー形成能を評価した。T 細胞の発生段階の非常に早期であるダブルネガティブ 3 (DN3) で停止する Rag2 ノックアウトマウス、それより分化の進んだ段階であるダブルポジティブ (DP) で停止する TCR ノックアウトマウス、CD4 シングルポジティブ (SP) または CD8 SP が発生しない変異マウスのコロニー形成能を評価した。また、野生型マウスの骨髓細胞を上記変異マウスへ移植し、同一胸腺微小環境下における T 細胞集団の差異が胸腺上皮幹細胞活性にどのように影響を与えるか検討した。

(3) 胎生期と成体期由来の胸腺上皮細胞から形成されるコロニー細胞の比較

胎生期あるいは成体期の野生型マウスから胸腺上皮細胞を単離し、上記 1 で確立したコロニー培養系を用い、コロニーを形成させる。形成されたコロニー細胞の遺伝子発現を quantitative PCR で、タンパク質発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、胎生期と成体期の自己複製能を比較するため、自己複製能の指標である 1 細胞由来のコロニー形成能を継代により評価した。

(4) 脂肪滴含有細胞の加齢に伴う変化

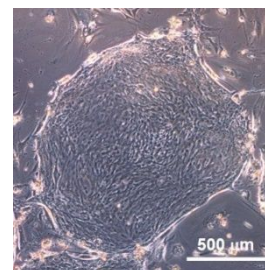
胎生期から 1 年齢を過ぎた様々な月齢の野生型マウス胸腺において、脂肪滴を免疫組織染色にて検出し、脂肪滴含有細胞の割合を検討した。

4. 研究成果

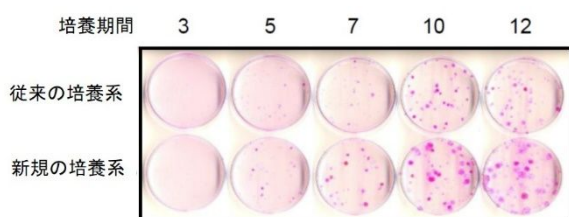
(1) 胸腺上皮幹細胞能を評価するコロニー培養系の改良

胸腺上皮細胞のコロニー形成能は、生後直後に急激に低下し、さらに加齢に伴い低下することをこれまでに示してきた。しかし、従来の培養系では成体期マウス由来のコロニー細胞を検出す

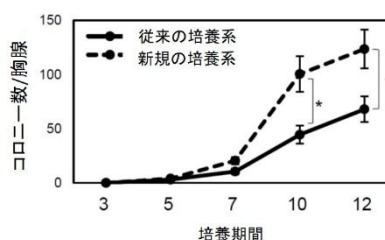
ることは困難であった。そこで、まずはコロニー培養系の改良を試みた。我々が確立した培養系は、評価対象である胸腺上皮細胞の播種と同時に、増殖因子や分化抑制因子などを添加している (Sekai et al., 2019 Methods Mol Biol)。各々の因子の濃度および添加タイミングがコロニー形成能に与える影響を検討したところ、胸腺上皮細胞を播種する3日後に EGF を添加することでコロニーのサイズが増大することがわかった。また、ヒト ES 細胞の生存率を向上させることが知られている Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤の添加により、コロニー形成数が増加することがわかった。このように添加する因子とそのタイミングを調整することで、従来と比べコロニー形成能が顕著に増加する培養系を確立した (図 1, 2, 3)。その結果、従来では検出が困難であった成体マウスにおいてもコロニー形成能を評価することが可能となった。この改良したコロニー培養系を用いて野生型マウス由来の胸腺上皮細胞のコロニー形成能を検討したところ、従来の培養系と同様、加齢に伴いコロニー形成能が低下することがわかった (Sekai et al., 2019 J Immunol Methods)。



(図 1) マウスの胸腺上皮細胞由来コロニーの形態



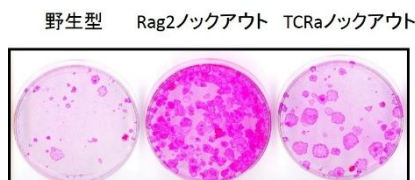
(図 2) 新旧培養系におけるコロニー形成能の比較



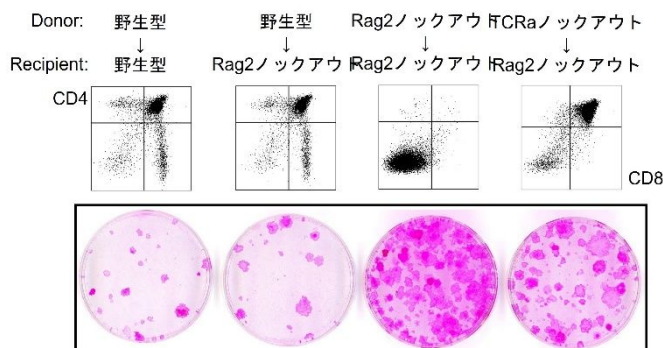
(図 3) 新旧培養系におけるコロニー数の比較

(2) 変異マウスを用いた胸腺上皮幹細胞活性の評価

これまでの研究で、野生型のマウスでは胸腺上皮幹細胞の活性が加齢に伴い低下することから、胸腺内で発生する T 細胞が胸腺上皮幹細胞の活性に影響を与えていることが示唆された。そこで T 細胞の発生が様々な段階で停止する各変異マウスを用いて、それらの胸腺上皮細胞のコロニー形成能を検討した。検討した変異マウスのうち最も未熟な段階である DN3 で T 細胞発生が停止する 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なかったことから、それ以降の発生段階の T 細胞が幹細胞活性に影響を与えられたと考えられた (Sekai et al., 2019 J Immunol Methods)。一方で、DP で停止し、CD4SP および CD8SP の両細胞が発生しない TCR ノックアウトマウスではコロニー形成能の低下は緩やかであった (図 4)。また、CD4SP もしくは CD8SP を欠く変異マウスでは野生型マウスと比べるとコロニー形成能は微増するが、Rag2 ノックアウトマウスおよび TCR ノックアウトマウスと比べるとその増加は部分的であった。そのため、胸腺上皮細胞のコロニー形成能を制御している主な胸腺内 T 細胞集団は DP 細胞であると考えられる。次に、上記の結果が変異マウスにおける胸腺微小環境と T 細胞のどちらに起因するものか検証するため、Rag2 ノックアウトマウスへ野生型マウスあるいは Rag2 ノックアウトマウス由来の骨髓細胞を各々移植した。その結果、胸腺微小環境はどちらも Rag2 ノックアウトマウスであるにも関わらず、野生型マウスの骨髓細胞を移植した胸腺においては、そのコロニー形成能が野生型マウスと同程度までに低下していた (図 5)。



(図 4) 変異マウス由来のコロニー形成能の比較



(図 5) 胸腺内 T 細胞の各分画がコロニー形成能に与える影響

上段: 骨髓移植マウス胸腺における T 細胞の CD4/CD8 発現パターン
下段: 骨髓移植マウス胸腺におけるコロニー形成能

(3) 胎生期と成体期由来の胸腺上皮細胞から形成されるコロニー細胞の比較

これまでの解析から胎生期と成体期とでは、胸腺上皮細胞のコロニー形成細胞の性質などが異なる可能性が示唆されている。そこで、胎生期および成体期に形成されるコロニー細胞において、遺伝子・タンパク質の発現解析と機能解析を行った。胎生期と成体期マウスでは、形成されるコロニーの数と大きさが異なるだけでなく、遺伝子およびタンパク質の発現パターンが異なり、性質の異なるコロニー細胞が形成されることがわかった。さらには、胎生期マウス由来のコロニー細胞は数世代の継代が可能であるが、成体期マウス由来のほとんどのコロニー細胞は継代が不可能であることから、加齢とともに胸腺上皮細胞の自己複製能が低下することが示唆された。これらの結果から、加齢に伴いコロニー細胞の性質が変化することが考えられる。

(4) 脂肪滴含有細胞の加齢に伴う変化

マウスの胸腺において、4週齢という若齢にも関わらず脂肪を有する細胞が存在し、1年齢を過ぎた高齢マウスではその割合が増加することが明らかとなった。

以上の結果より、胸腺内での正常なT細胞分化が胸腺上皮細胞の幹細胞活性を低下させること、さらには若齢から脂肪滴含有細胞が出現することが明らかになった。今後は、本研究をさらに発展させ、T細胞が胸腺上皮幹細胞活性を制御するメカニズムの解明および脂肪滴含有細胞の機能の解明を通し、胸腺退縮のメカニズムおよび意義を明らかにすることを旨とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kozawa Kei, Sekai Miho, et al.	4. 巻 31
2. 論文標題 The CD44/COL17A1 pathway promotes the formation of multilayered, transformed epithelia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3086 ~ 3097.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.04.078	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 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 Sekai Miho, Wang Jianwei, Hamazaki Yoko	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 -
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 2019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 Shirai Takanobu, Sekai Miho, Kozawa Kei, Sato Nanami, Tanimura Nobuyuki, Kon Shunsuke, Matsumoto Tomohiro, Murakami Takeru, Ito Shoko, Tilston Lunel Andrew, Varelas Xaralabos, Fujita Yasuyuki	4. 巻 113
2. 論文標題 Basal extrusion of single oncogenic mutant cells induces dome like structures with altered microenvironments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3710 ~ 3721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15483	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 Kuromiya Keisuke, Aoki Kana, Ishibashi Kojiro, Yotabun Moe, Sekai Miho, Tanimura Nobuyuki, Iijima Sayuri, Ishikawa Susumu, Kamasaki Tomoko, Akieda Yuki, Ishitani Tohru, Hayashi Takashi, Toda Satoshi, Yokoyama Koji, Lee Chol Gyu, Usami Ippei, Inoue Haruki, Takigawa Ichigaku, Gauquelin Estelle, Fujita Yasuyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Calcium sparks enhance the tissue fluidity within epithelial layers and promote apical extrusion of transformed cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111078 ~ 111078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111078	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

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 瀬海美穂、濱崎洋子、湊長博
2. 発表標題 髄質胸腺上皮幹細胞の同定とその制御機構の解明
3. 学会等名 第8回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬海美穂
2. 発表標題 超初期がん病変における変異細胞の認識機構および免疫系の関与
3. 学会等名 第6回六甲医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho Sekai, Yasuyuki Fujita
2. 発表標題 Detection and regulation for precancerous lesions
3. 学会等名 ムーンショット若手育成プログラムA「第1回 若手ワークショップ」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miho Sekai, Takanobu Shirai, Yasuyuki Fujita
2. 発表標題 Basal extrusion of single-oncogenic mutant cells induces dome-like structures with macrophage accumulation
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sekai Miho, Sako Hiroaki, Ito Shoko, Kozawa Kei, Fujita Yasuyuki
2. 発表標題 Phage antibody library screening for detecting precancerous tumors Cell Competition in Development and Disease Symposium
3. 学会等名 Cell Competition in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------