

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008 年度～2010 年度  
 課題番号：20591669  
 研究課題名（和文） 胸腺腫内微小環境が与えるシグナルの解析に基づく胸腺腫の免疫学的機能の評価  
 研究課題名（英文） Immunological function of thymoma in terms of interaction between T cells and neoplastic epithelial cells  
 研究代表者  
 門田 嘉久（KADOTA YOSIHISA）  
 大阪大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号：50464243

## 研究成果の概要（和文）：

胸腺腫内では腫瘍という正常と異なる環境下で T 細胞が産生されおり、自己免疫疾患発症との関連が予想される。本研究では胸腺腫内 T 細胞の lineage commitment と体循環の移行について評価した。lineage commitment の master regulator である Th-POK, Runx3 が胸腺腫内の CD4, CD8 系列分化にも関与していること示した。また胸腺腫内 T 細胞の体循環系への移行を示唆する知見が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

Thymoma is known to associate with autoimmune diseases. Thymoma derived T cells were thought plausible to investigate the pathogenesis of thymoma associated autoimmunity. In this study we investigate the development of thymoma T cell in terms of its lineage-commitment and its exportation to the peripheral blood. Our results suggested that Th-POK and Runx3 expression of T cell in thymoma could have key roles in the lineage commitment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
2009 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
2010 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
年度			
年度			
総計	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：胸腺腫、重症筋無力症、胸腺微小環境、TH-POK、AIRE

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺腫は前縦隔に好発する比較的稀な、胸腺上皮細胞に由来する腫瘍である。組織学的には、腫瘍上皮細胞とリンパ球で構成される多彩な形態をとっている。また、種々の自己免疫疾患（重症筋無力症：約 30%、赤芽球癆：5%など）や自己抗体の産生（抗 IFN $\alpha$  抗体：50%、抗 IL-12 抗体：30%、抗 titine 抗体、抗 rianodin 抗体など）を高頻度に伴う。胸腺腫摘除により合併する自己免疫疾患の寛解や、自己抗体の低下が認められることから、胸腺

腫の外科治療は、縦隔腫瘍の根治術としてのみならず、自己免疫疾患に対する治療という側面を併せ持つものといえる。

従って、胸腺腫の外科治療では、自己免疫疾患との関連も念頭においた治療を行う必要がある。しかし、病因における胸腺腫の関連はまだ明らかでなく、その治療法としての胸腺摘出術の理論的根拠も乏しいのが現状である。自己免疫疾患に関わる胸腺腫の生物学的特徴を明らかにすることは、胸腺腫の外科治療を、より適切なものとしていく上で重

要な研究テーマであると考えられる。

正常胸腺に類して、胸腺腫内ではT細胞が産生されている(胸腺腫が含有する T 細胞に腫瘍化所見はない)。正常と異なる腫瘍という環境下で、免疫反応の主要な担い手である T細胞が産生されるという現象は、自己免疫疾患発症との関連を考えていく上で非常に興味深い。胸腺腫内でどのような過程をへて T細胞が産生され、血液中に供給されるのが重要な検討課題となる。

近年、胸腺上皮細胞が主体として構築する胸腺微小環境が、T細胞の選択と分化、移動などを制御する種々のシグナルが提供し、T細胞の産生を支持することが、T細胞レパトア形成に極めて重要な役割をもつことが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

胸腺腫内でもT細胞が産生されることから、何らかの形で正常胸腺に見られるような微小環境が保持されているものと推察される。しかしながら、胸腺腫内で提供されるT細胞の選択と分化、移動などに関するシグナルについての詳細は未だ明らかでない。

そこで、本研究では胸腺腫内で提供されるT細胞の選択と分化、移動などに関するシグナルについて検討し、胸腺腫の保持する機能を免疫学的側面からの評価を目的とする。さらに自己免疫疾患を合併する胸腺腫の特徴の解析を行い、治療の発展を模索する。

胸腺内でのT細胞レパトア形成にいたる過程は下記の(1)-(3)に大別されるものと考えられており、各の過程について評価を試みる。

(1) 胸腺皮質における T 細胞選択、及び helper-T 細胞系[CD4SP (single positive) ] または killer-T 細胞系列(CD8SP 細胞)への分化。

(2) 胸腺髄質における組織特異的抗原の提示による更なる T 細胞選択

(3) T 細胞の胸腺皮質から髄質への移行等を介した移動、体循環への移行

## 3. 研究の方法

(1) 胸腺皮質における T 細胞選択及び CD4SP への分化誘導。

胸腺内での T 細胞の産生は、発達途上の T 細胞が主要組織適合抗原 (MHC) より与えられたシグナル (MHC 分子と T 細胞レパトアが結合することにより伝達される) により、選択 (正の選択) あるいは除去される (自己反応性を有した場合) ことにより行われる。さらに胸腺内での正の選択を受けた T 細胞は、CD4 又は CD8 分子の一方のみを発現し、より成熟した CD4SP T 細胞及び CD8SP T 細胞へと誘導されていく。

① 胸腺上皮細胞上の MHC class II 分子 (MHC-2) の発現が低下すると、産生される CD4T 細胞系列の割合が低下することが動物モデルにおいて示されている。

② 我々は、胸腺腫内では腫瘍上皮細胞 (t-TEC) の発現する MHC-2 の発現が正常胸腺に比べて低下しており、これに相

関して CD4T 細胞の産生が低下することを明らかにした (CD8 系 T 細胞は異常所見なし)。[胸腺腫内で正常胸腺とは異なる環境下 (MHC を介した抗原提示が低下した) で T 細胞が産生され、正常胸腺とは異なる T レパトアが形成されている可能性を示してきた]

③ MHC-2 分子を介して T 細胞に与えられるシグナルは、T 細胞は選択・除去するだけではなく、CD4 (helper-T 細胞) CD8 (killer-T 細胞) のいずれの T 細胞系列へ分化するかを決定することが示唆されてきた。この過程がいかにか調節されているか不明であったが、近年 CD4 系列へ分化をコントロールする master-regulator として、転写因子である Th-POK (T-helper-inducing POZ / Kruppel like factor) が存在することが明らかになった。詳細が未だ明らかにされていない点もあるが、現在のところ、MHC 分子より T 細胞レパトアに与えられたシグナルにより、Lck 分子の活性化を介して、Th-POK の発現を誘導し、CD4 系列への分化が生じる、というモデルが想定されている。

胸腺腫では胸腺腫上皮細胞の MHC-2 の発現低下に起因すると考えられる CD4T 細胞系列の産生低下が観察されており、このメカニズムの key factor として Th-POK が関わっている可能性が高いのと推察される。そこで、これまでに得た胸腺腫腫瘍上皮細胞に関する知見に加えて、胸腺腫内 CD4 系列 T 細胞産生における、Th-POK の発現及び MHC-2 分子を介して T 細胞に与えられるシグナルについての解析を行う。(Th-POK の発現に関しては既に解析を開始している)。

Th-POK はその zinc-finger 部に点変異有する動物モデルにおいてのみ解析が行われている。ノックアウトマウスの作成は未だ困難とされており、また現在のところ Human における解析の報告はない。

胸腺腫をモデルとした Th-POK の検討は胸腺腫研究のみにとどまらず、Human における Th-POK の役割を明らかにすることにつながるものであり、その成果が期待される。

(2) 胸腺髄質における髄質上皮細胞による組織特異的抗原の提示と選択

胸腺髄質上皮細胞には、組織特異的自己抗原が発現されている。髄質上皮細胞による種々の組織特異的抗原の発現は髄質上皮細胞に発現する核内因子 AIRE (autoimmune regulator) によって制御されており、欠損により多様な自己免疫疾患を合併することが報告されている。

胸腺腫における組織特異的抗原の発現の詳細は未だ不明であり、AIRE の発現を解析し、胸腺腫合併自己免疫疾患と AIRE の関連を検討する。

(3) T 細胞の胸腺内での trafficking : 皮質から髄質への移動及び体循環への移行

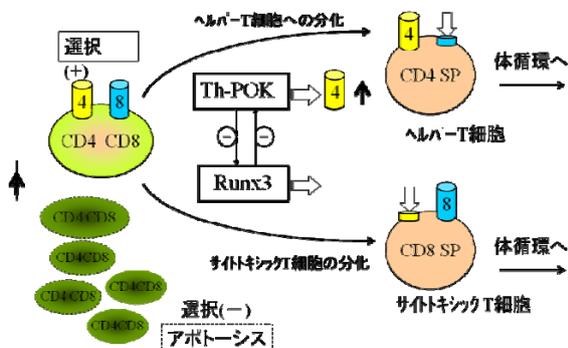
- ① T 細胞は分化の過程でケイリン受容体の発現を変化 (CCR9→CCR4→CCR7) させる。正の選択を受けた T 細胞は胸腺髄質より Sphingosine-1-Phosphate receptor1 (S1P1) 及び CD62L を発現し、高濃度の sphingosine-1-phosphate が存在する体循環中へと移行してゆく。

胸腺腫由来の T 細胞が自己免疫疾患の原因となりうるのが想定されるが、胸腺腫の T 細胞産生に伴う trafficking についての詳細は不明である。胸腺腫内において trafficking が如何に行われているかを評価する。 i) T 細胞上のケイリン受容体の発現、及び上皮細胞ケイリンの発現の解析。 ii) 胸腺腫由来 T 細胞の体循環への移行とその効率を評価する目的で、腫瘍内 T 細胞上の S1P1 発現の解析を形態学的評価 (胸腺腫内の脈管形成等) とあわせて加えて行う。 iii) さらに、新規の免疫抑制剤として期待されている FTY20 は、S1P1 のアンタゴニストであり、動物モデルでは胸腺髄質からのリンパ球の移出を極めて効率的に抑制することが示されている。FTY20 の胸腺腫 T 細胞に対する遊走抑制効果を in-vitro で評価する。S1P1 の解析は胸腺腫に伴う難治性の自己免疫疾患に対する新たな治療戦略につながる可能性がある。

#### 4. 研究成果

- (1) 胸腺腫における T 細胞選択及び CD4SP/CD8SP への分化誘導：  
CD4SP/CD8SP への分化誘導の master

#### 胸腺(胸腺腫)におけるT細胞の分化とTh-POKの役割



regulator である Th-POK を中心に解析した。

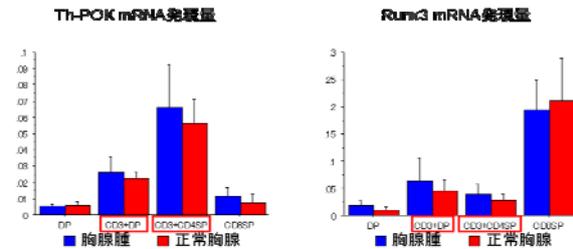
術前に治療歴のない胸腺腫 10 例を対象とした。正岡分類では、I 期：7 例、II 期：1 例、III 期：1 例、IVa 期：1 例であり、WHO 病理分類では、Type AB：3 例、Type B1：4 例、Type B2：1 例、Type B3：2 例であった。小児正常胸腺 10 例をインフォームドコンセントの下、正常対照として用いた。

ヒト正常胸腺および胸腺腫内のリンパ球を抗 CD3/4/8 抗体を用いた 3 color flowcytometry にて解析した。また、それらのリンパ球を磁気ビーズにて、DP, CD4SP, CD8SP 細胞に分離した。各リンパ球分画の Th-POK および Runx3 の mRNA を定量 RT-PCR 法

にて評価し、胸腺腫内の T 細胞分化と比較した。さらに、より詳細なリンパ球分画の CD3<sup>+</sup>DP, CD3<sup>+</sup>CD4SP 細胞について、Th-POK および Runx3 の mRNA を定量 RT-PCR 法にて評価した。

〔結果〕① CD4, CD8SP 細胞における成熟細胞の比率 (%CD3/CD4SP, %CD3/CD8SP)：CD8SP 細胞においては、正常胸腺、胸腺腫ともにほとんど成熟細胞が占めていた。一方、CD4SP 細胞においては、胸腺腫では、成熟細胞の比率は正常胸腺に比べて有意に低下し

#### CD3<sup>+</sup>DP, CD3<sup>+</sup>CD4SP の Th-POK, Runx3 mRNA 発現量



ていた。

- ② DP, CD4SP, CD8SP 細胞の Th-POK mRNA 発現量：

正常胸腺では、CD4SP 細胞において、DP, CD8SP 細胞に比べて高発現を認めた。胸腺腫では、CD4SP 細胞において、正常胸腺に比べて有意に低下していた (胸腺腫  $0.011 \pm 0.003$ , 正常胸腺  $0.064 \pm 0.021$ ,  $p=0.02$ )。

- ③ 胸腺腫内 CD4SP 細胞における Th-POK mRNA 発現量と %CD3/CD4SP の比較：

胸腺腫内 CD4SP 細胞の Th-POK mRNA 発現量は %CD3/CD4SP と有意な正の相関を認めた。

- ④ DP, CD4SP, CD8SP 細胞の Runx3 mRNA 発現量：

正常胸腺、胸腺腫ともに、CD8SP 細胞において、DP, CD4SP 細胞に比べて高発現を認めた。各リンパ球分画においては、正常胸腺と胸腺腫の間で有意差を認めなかった。

- ⑤ CD3<sup>+</sup>DP, CD3<sup>+</sup>CD4SP 細胞の Th-POK, Runx3 mRNA 発現量：

CD3<sup>+</sup>DP, CD3<sup>+</sup>CD4SP 細胞においては、Th-POK, Runx3 mRNA 発現量はともに、正常胸腺と胸腺腫の間で有意差を認めなかった。胸腺腫内においても、CD4, CD8 系列分化に従って、各々 Th-POK, Runx3 mRNA 発現量の漸増を認めた。

#### 〔結論〕

- ① 胸腺腫内 CD4SP 細胞の Th-POK mRNA 発現量は、正常胸腺に比べて低下していたが、成熟した CD4SP 細胞においては、胸腺腫と正常胸腺の間で有意差は認めなかった。

- ② 胸腺腫内の CD4, CD8 系列分化に各々 Th-POK, Runx3 が関与していた。

- (2) 胸腺髄質における髄質上皮細胞による組織特異的抗原の提示：

胸腺腫内 AIRE の発現評価については、複数の研究施設と競合するものであった。先行して発表された研究成果を下記に提示する。

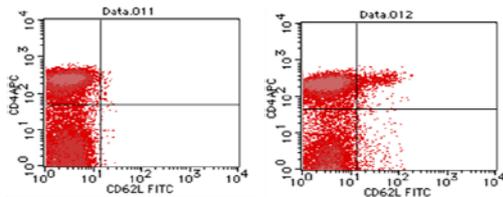
- ① Marx A, Willcox N, et al. Thymoma and

paraneoplastic myasthenia gravis.  
Autoimmunity. 2010  
Aug;43(5-6):413-27.

- ② Cheng MH, Fan U, et al. Acquired autoimmune polyglandular syndrome, thymoma, and an AIRE defect. N Engl J Med. 2010 25;362(8):764-6.

### CD62L expression

Control Thymoma [mature CD4T]



- (3) T細胞の胸腺腫内での trafficking  
T細胞の胸腺腫内から体循環への移行:

胸腺腫内において成熟したT細胞の最終分化型を考えられるCD62L陽性T細胞が存在することを発見した。本微小集団については、機能を評価を継続中である。  
また、免疫抑制剤FTY20を用いて、遊走能の抑制試験については評価途上であり研究成果の公表に至っていない。

### 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1件)

Tokunaga T, Hayashi A, Kadota Y, Shiono H, Inoue M, Sawabata N, Okumura M, Regulation of Th-POK and Runx3 in T cell development in human thymoma. , Autoimmunity , 42(8) , 2009, 653-660, 査読なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

門田嘉久 (KADOTA YOSIHISA)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50464243

#### (2) 研究分担者

奥村 明之進 (OKUMURA MEINOSIN)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40252647

井上 匡美 (INOUE MASAYOSI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：10379232

南 正人 (MINAMI MASATO)  
大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10240847

下記の者は、近畿中央胸部疾患センターに異動のため研究分担者をH22年度に辞退

内海 朝喜 (UTUMI TOMOKI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40423165

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：