

平成22年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790373  
 研究課題名（和文） Aire 陽性胸腺髄質上皮細胞におけるクローデインの発現とその機能  
 研究課題名（英文） Expression and function of claudins in Aire expressing medullary thymic epithelial cells  
 研究代表者  
 濱崎 洋子 (HAMAZAKI YOKO)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：10362477

## 研究成果の概要（和文）：

胸腺は正常な免疫応答に必須の役割を果たすT細胞の産生を担うリンパ組織である。胸腺では将来T細胞になる細胞が分化増殖すると共に自己に反応するT細胞をあらかじめ消去する仕組みがある。Aire 蛋白質はその仕組みを担う分子の一つで、胸腺内で様々な組織の自己成分を発現することにより自己成分に反応性を持つT細胞の胸腺内消去を保証している。我々は以前の研究でこの Aire を発現する細胞がクローデインという接着分子を特異的に発現することを見出している。本研究では、Aire 発現細胞の発生あるいはT細胞の分化・選択におけるクローデインの役割を明らかにするために、クローデインを持たないマウスを作製した。

## 研究成果の概要（英文）：

The thymus is a central lymphoid organ crucial for developing T cells. Aire is involved in expressing promiscuous gene expression of various tissue specific antigens in thymic stromal cells, which enables self-reactive T cells to be deleted in the thymus. In the previous study, we demonstrated that cell-adhesion molecules, claudins, are specifically expressed in Aire+ stromal cells. In this study, we produced claudin-KO mice to analyze the function of claudins on inducing self tolerance or development of Aire+ stromal cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：T細胞分化 胸腺 上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺は正常な免疫応答に必須の役割を果たすT細胞の産生に必須のリンパ組織であり、またリンパ組織の中では唯一上皮性の組織である。胸腺上皮細胞は通常の上皮細胞と異なり体内外を区画化するバリアとして機能するのではなく、T細胞の分化支持に特化したユニークな細胞である。にもかかわらず、上皮間のバリアとして機能するタイトジャンクションという接着構造を形成するクローデイン蛋白質が Aire という胸腺内自己寛容に必須の分子を発現する一部の胸腺上皮細胞にも発現することが明らかになっている。本研究では、クローデインが Aire 陽性一部の胸腺上皮細胞に選択的に発現する意義について検討を行うため、クローデインを欠失するマウスを作製した。

## 2. 研究の目的

胸腺組織はリンパ臓器の中で唯一上皮細胞により形成されるが、何故T細胞のみが上皮組織で分化する必要があるのか、あるいは、T細胞の分化支持に機能的に特化したようになった胸腺上皮細胞は、体内の典型的な上皮細胞と何が異なり、それはどのようなしくみによるのかについてはよくわかっていない。以前の研究で、私たちは体内の通常の上皮細胞が果たすバリア機能に必須のクローデインという分子が、胸腺内で末梢自己抗原を提示する特殊な胸腺髄質上皮細胞に選択的に発現することを見出している。本研究では、もはや典型的な上皮のように生体内外のバリアとして機能しない胸腺上皮の一部に発現するクローデインの機能を解明することで、T細胞のみが上皮組織で発生・分化することの意義、胸腺上皮細胞の特殊性を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず、胸腺上皮細胞に発現するクローデインを欠損するマウスを作製する。マウスが作製できたら、以下の解析を行う。胸腺上皮細胞に特異的なプロモーター下に

Cre を発現するトランスジェニック (Tg) マウス (ケラチン5-Cre Tg, FoxN1-Cre Tg) と掛け合わせることにより、胸腺髄質上皮細胞に発現する TJ 分子の機能について個体レベルで検討を行う。Cld, Occ は最も初期の重層上皮様の形態を示す胸腺原基の段階から発現を認めるため、その表現型は全胸腺上皮細胞に認められる可能性もある。したがって、まず HE 染色により胸腺全体の構築および髄質・皮質の形態異常の有無を検討する。また、様々な上皮細胞マーカーを用いた免疫蛍光染色により各上皮細胞サブセットの分化、特に Cld を発現する Aire 陽性細胞の分化と Aire の発現についても解析を行う。さらに、胸腺上皮細胞を用いた FACS 解析により、MHC class II や補助刺激分子などの機能分子の発現量についても解析する。また、T細胞発生分化について検討を行うために、CD4/8 の分化パターン、末梢におけるT細胞の数と CD4/8 比、末梢T細胞数を検討する。胸腺組織が正常に構築されている場合は、こうした分化マーカーには大きな影響が出ない可能性が高いと予想される。一方、最近 Aire 陽性髄質上皮細胞が制御性T細胞の発生に重要であることが示されている (Nat. Imm. 2007 Apr;8(4):351-8.)。そこで、制御性T細胞の発生異常の有無やその機能についても着目し、マウス全身の病理学的解析も行う。FoxN1、ケラチン5は共に皮膚にも発現しているため、最終的にはデオキシグアノシン処理を施し胸腺ストローマのみにした胸腺を nude マウスに移植し、同じ表現型が認められることを確認することで、皮膚の Cld, Occ が欠失したことによる二次的な影響でないことの証明を行う

## 4. 研究成果

まず、胸腺上皮細胞に発現するクローデイン分子の KO マウス作製に成功した。現在、全身で発現が欠損しているマウスの表現型解析を行っている。今後、胸腺上皮細胞に特異的なプロモーター下に Cre を発現するトランスジェニック (Tg) マウス (ケラチン5-Cre Tg, FoxN1-Cre Tg) と掛け合わせることに

より、全身KOマウスで認められた表現型が胸腺上皮細胞に発現するクローデインの欠失に起因するものであることを確認する。本研究は、胸腺の組織発生と機能を上皮細胞の細胞生物学的視点から解析する極めてユニークなものであり、この成果は、免疫応答の司令塔であるT細胞を正常に発生させる分子機構の一端を明らかにし、様々な免疫関連病態の理解にも役立つものである。

#### 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3件)

1. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N.

PD-1<sup>+</sup> memory phenotype CD4<sup>+</sup> T cells expressing C/EBP $\alpha$  underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia

Proc Natl Acad Sci USA 2009 106:15807-15812

(査読有り)

2. Katayama Y, Sekai M, Hattori M, Miyoshi I, Hamazaki Y, Minato N.

Rap signaling is crucial for the competence of IL-7 response and the development of B-lineage cells.

Blood. 2009 Aug 27;114(9):1768-75

(査読有り)

3. Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S.

Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins.

Mol Cell Biol. 2009 May;29(9):2372-89.

(査読有り)

[学会発表] (計4件)

1. 2010年3月20日

An International workshop on T lymphocytes (ThymOZ workshop)

Heron Island, Australia

Claudin-4 expression in thymocytes and its role in T-cell development

Yoko Hamazaki, Harumi Fujita, Yohei Kawai and Nagahiro Minato

2. 2009年12月2日

日本免疫学会 大阪

Claudin expression in Thymocytes: Implication in T cell Development

Yohei Kawai, Yoko Hamazaki, Harumi Fujita and Nagahiro Minato

3. 2009 June 1-4

The International Workshop on Kyoto T cell Conference

Shiran-Kaikan, Kyoto University

Claudin expression in thymocytes; Implication in T cell development

Yoko Hamazaki, Yohei Kawai, Harumi Fujita, Miho Sekai, and Nagahiro Minato

4. 2008 Nov 12

International Conference on Lymphopoiesis, T cell Differentiation, and Immune Recognition (ThymUS)

San Juan, Puerto Rico, USA

Claudin expression in thymocytes: Implication in T cell development

Yoko Hamazaki, Harumi Fujita, Yohei Kawai and Nagahiro Minato

[図書] (計4件)

1. 免疫細胞生物学 監修 笹月健彦  
南江堂 2010年4月15日発行 379-420

2. 濱崎 洋子、湊 長博 胸腺の発生  
(皮質・髄質上皮細胞の起源と分化)  
メディカルバイオ, 5(1), 24-31 (2008)

3. 濱崎 洋子、湊 長博 胸腺上皮細胞に発現するクロードイン感染・炎症、免疫, 38(1), 32-40 (2008)
4. 濱崎 洋子、湊 長博 胸腺上皮細胞の分化とクロードイン医学のあゆみ, 224(10), 797-798 (2008)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad\\_school/introduction/1205/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1205/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱崎 洋子 (HAMAZAKI YOKO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 10362477