

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07332

研究課題名(和文)自己免疫寛容を誘導する胸腺上皮細胞の分化・維持機構の解明

研究課題名(英文) Differentiation and maintenance mechanisms of thymic epithelial cells that induce autoimmune tolerance

研究代表者

秋山 伸子 (Akiyama, Nobuko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60342739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の治療や予防には、その発症機構を理解することが重要である。胸腺の髄質に局在する上皮細胞(髄質上皮細胞；mTEC)は自己免疫疾患の発症抑制に必須である。申請者らはこれまでに、mTECの分化に必須なTNFレセプターファミリーRANKの発現を指標に、胎仔期においてmTECに特化して分化する前駆細胞を同定した(J Exp Med. 2016, 213:1441)。一方、成体におけるmTECの分化・維持機構については、実体は明らかでない。本研究課題は、成体におけるmTEC前駆細胞を同定し、その細胞の特性を解析することにより、mTECの分化・維持機構の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体マウスのAire陽性髄質上皮細胞は約2週間の寿命でターンオーバーするが、その維持に関わる分化機構については、一致した結論が得られていない。本課題は細胞分化マーカーに加えて分子機構の知見を基軸に研究を進めることで、関連分野におけるブレークスルーになると期待される。

また髄質上皮細胞は、制御性T細胞の分化を誘導する。さらに、がん免疫にも関与することも報告されている。本課題で、その前駆・幹細胞が明らかになった場合、それを利用して特定の抗原に対する制御性T細胞を創出する技術の開発など、新たな研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Understanding the pathogenesis of autoimmune diseases is important for their treatment and prevention. Epithelial cells localized in the medulla of the thymus (medullary epithelial cells; mTECs) are essential for the suppression of autoimmune diseases. The applicants have previously identified progenitor cells that specifically differentiate into mTECs during fetal life based on the expression of the TNF receptor family RANK, which is essential for mTEC differentiation (J Exp Med. 2016, 213:1441). On the other hand, the nature of the differentiation and maintenance mechanisms of mTECs in adults is not clear. The aim of this research project is to identify adult mTEC progenitors and to analyze their cellular characteristics in order to elucidate the differentiation and maintenance mechanisms of mTECs.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、自己免疫寛容機構の破綻により発症する疾患の総称である。患者数および罹患率は、最近 30 年の間に増加の一途にある。また、指定難病である自己免疫疾患の多くは発症原因が不明であり、新しい根本治療法の開発が急務となっている。そのため、健常時における自己免疫寛容機構を理解することは、疾患発症の原因理解のみならず、有効な根治療法の開発につながる。

T 細胞のほとんどは胸腺で分化するが、胸腺髄質に局在する上皮細胞(胸腺髄質上皮細胞:mTEC)は自己抗原に対する T 細胞の免疫寛容(以下、自己免疫寛容)誘導に重要である。mTEC は、様々な組織に特異的に発現するタンパク質(組織特異的抗原;インシュリンやカゼインなど)を、多種類にわたり異所的に発現し、抗原提示する。提示された抗原を高い親和性で認識する T 細胞は、アポトーシスで除去されるか、あるいは制御性 T 細胞へ変換され、結果として自己免疫寛容を誘導する。一部の組織特異的抗原の遺伝子発現は、mTEC で特異的に発現する核内因子 Aire に依存する。

自己免疫寛容誘導における mTEC の重要性が明らかになる一方で、mTEC の分化過程については未だ不明な部分が多く残されている。mTEC は分化過程で、その特殊な遺伝子発現機構を獲得すると考えられており、分化機構の解明は、自己免疫寛容の誘導と自己免疫疾患の発症機構を理解する上で、重要な課題となっている。

申請者らのグループ (*Science*. 2005, 308:248; *Immunity*. 2008, 29:423; *Immunity*. 2008, 29:438; *J Exp Med*. 2014, 211:242; *J Exp Med*. 2016, 213:1441)、そして国内外の他の研究の多くも (*Annu Rev Immunol*. 2017, 35:85) 遺伝子欠損マウスを利用し、胸腺の発生期における mTEC の分化機構に焦点を当ててきた。しかしながら、成体における mTEC の維持や分化を制御する細胞・分子機構は不明な部分が多い。

成体の mTEC は、MHC クラス II や補助因子 CD80 を高発現し、転写因子 Aire および組織特異的抗原を多く発現する成熟 mTEC(mTEC^{hi})とそれ以外の mTEC(mTEC^{lo})に分類される。mTEC^{hi} は約 2 週間の寿命であり (*J. Exp. Med.*, 2007, 204:2521) その前駆細胞から供給されることになる。これまでの研究から、mTEC^{lo} に、前駆細胞が含まれると考えられており、いくつかの候補細胞が提唱された (*Immunity*, 2014, 41:753; *Cell Rep.*, 2014, 8:1198 など)。しかしながら、申請者の研究グループは独自に、ドロップレット方式のシングルセル遺伝子発現解析で約 10,000 個の胸腺上皮細胞を調べたが、該当する細胞サブセットは同定できず、mTEC 前駆細胞の実体は、未だに不明と言える。

2. 研究の目的

本研究は成体における mTEC 前駆・幹細胞を同定することを目指す。

これまでに、TNF レセプターファミリー RANK と CD40 シグナルが、胸腺発生期の mTEC の分化を制御することが判明している。申請者は、成体における mTEC の分化にも RANK と CD40 のシグナルが重要であり、両者のシグナルを遮断すると成体 mTEC 前駆細胞の候補が得られると予想した。そこで CD40 欠損マウスに RANK リガンド 中和抗体を投与し、胸腺上皮細胞を解析したところ、成熟 mTEC (mTEC^{hi}) は完全に消失し、mTEC マーカーを発現するが成熟マーカー CD80 を発現しない細胞群を同定した。その細胞群の中から mTEC 前駆・幹細胞候補を絞り検討する。

3. 研究の方法

- (1) CD40 欠損マウスに RANK リガンド 中和抗体を投与し、胸腺上皮細胞をフローサイトメーターを用いて解析する。新規細胞群を成体 mTEC 前駆細胞候補とし、採取して RNAseq 解析を行う。
- (2) この新規細胞群を 成体 mTEC 前駆細胞候補とし、採取してシングルセル発現解析を行う。ドロップレット方式およびフローサイトメーターを用いた一細胞分取方式の両方を行う。

- (3) 成体 mTEC 前駆細胞を採取する目的で、RANK・CD40 シグナル遮断時に増える新規クラスターを成体 mTEC 前駆細胞候補とし、そのクラスター特異的に発現の高い細胞表面タンパク質を探索する。
- (4) 成体 mTEC 前駆細胞の細胞表面マーカー候補について、レポーターマウスを用いて FACS 解析を行う。また、細胞表面マーカー候補を発現する胸腺上皮の細胞集団について、分離・採取し、遺伝子発現解析を行う。
- (5) 成体 mTEC 前駆細胞候補の局在を調べる目的で、細胞表面マーカーレポーターマウスの免疫組織化学染色を行う。

4. 研究成果

- (1) CD40 欠損マウスに RANK リガンド中和抗体を投与し、胸腺上皮細胞を解析したところ、成熟 mTEC (mTEC^{hi}) は完全に消失し、mTEC マーカーを発現するが成熟マーカー CD80 を発現しない細胞群を同定した (図 1)。この新規細胞群を成体 mTEC 前駆細胞候補とし、採取して RNAseq 解析を行った。その結果、この細胞群では Psmb11 や Prss16 といった皮質上皮細胞のマーカーを高く発現していることが明らかとなった。

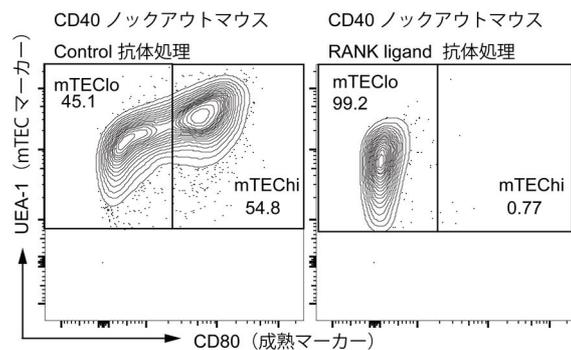


図 1. CD40 欠損マウスにおける RANK シグナル遮断時の TEC の FACS 解析。左: コントロール抗体処理群、右: RANK リガンド中和抗体処理群。

- (2) この新規細胞群を成体 mTEC 前駆細胞候補とし、採取してシングルセル発現解析を行った。その結果、この新規細胞群において cTEC および Unidentified TECs クラスターの割合が増加していた。申請者らはこれらのクラスターの中に成体 mTEC 前駆細胞の候補が含まれていると予想している。
- (3) 成体 mTEC 前駆細胞を採取する目的で、RANK・CD40 シグナル遮断時に増える新規クラスターを成体 mTEC 前駆細胞候補とし、そのクラスター特異的に発現の高い細胞表面タンパク質を探索した。その結果、この新規細胞群において特異的に発現の高い遺伝子の一つとして X を同定した。そこで X のレポーターマウスを導入し、FACS 解析を行なった。その結果、胸腺上皮細胞のうちおよそ 3 割の細胞が X を発現していた。予想通り、成熟 mTEC^{hi} にはほとんど発現しておらず、cTEC および未分化の集団 mTEC^{lo} で発現が高いことが分かった。この結果は、X が mTEC 前駆細胞で発現が高い可能性を示している。
- (4) X を発現する胸腺上皮の細胞集団について、他の細胞表面マーカー (EpCAM, UEA-1, Ly51, CD80) と共に分離・採取し、遺伝子発現解析を行なった。その結果、mTEC マーカー (UEA-1) および cTEC マーカー (Ly51) 両陰性の X 陽性画分では、幹細胞マーカー (Serpinf1, Tnfrsf19, Trp63) を高く発現していた。この結果は、X を発現する UEA-1⁻Ly51⁻ 胸腺上皮細胞が幹細胞性を持つことを示唆している。
- (5) X 陽性胸腺上皮細胞の局在を調べる目的で、X-GFP レポーターマウスの免疫組織化学染色を行った。その結果、皮質領域もしくは皮質と髄質の境界領域で GFP が検出された。また、皮質領域の中で Keratin 8 の発現が低い領域に X 陽性細胞が局在していた。この結果は、X 陽性細胞が cTEC と mTEC のどちらかに分化する前段階の細胞である可能性を示唆している。

本研究では、免疫寛容誘導に必要な成体期の mTEC を供給する幹・前駆細胞の同定を目指した。成体期の mTEC 分化に必要なシグナルである RANK・CD40 シグナルを遮断したところ、mTEC 幹・前駆細胞候補として UEA1⁻Ly51⁻TEC を得た。シングルセル発現解析の結果より、前駆細胞候補を分取するためのマーカーとして X を同定した。X の GFP レポーターマウスを用い、バルクRNA-seq 解析を行ったところ、X を発現する UEA-1⁻Ly51⁻ 細胞は幹細胞マーカーを発現していた。また、X-GFP レポーターマウスの免疫組織化学染色の結果、皮質・髄質境界領域で GFP が検出された。以上の結果から、X を発現する UEA-1⁻Ly51⁻ 細胞は cTEC と mTEC 両方に分化する幹・前駆細胞である可能性を示している。

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 8件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takakura Y, Machida M, Terada N, Katsumi Y, Kawamura S, Horie K, Miyauchi M, Ishikawa T, Akiyama N, Seki T, Miyao T, Hayama M, Endo R, Ishii H, Maruyama Y, Hagiwara N, Kobayashi TJ, Yamaguchi N, Takano H, Akiyama T, Yamaguchi N	4. 巻 15
2. 論文標題 Mitochondrial protein C15ORF48 is a stress-independent inducer of autophagy that regulates oxidative stress and autoimmunity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-45206-1	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 Horie Kenta, Namiki Kano, Kinoshita Kyouhei, Miyauchi Maki, Ishikawa Tatsuya, Hayama Mio, Maruyama Yuya, Hagiwara Naho, Miyao Takahisa, Murata Shigeo, Kobayashi Tetsuya J., Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 14
2. 論文標題 Acute irradiation causes a long-term disturbance in the heterogeneity and gene expression profile of medullary thymic epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1186154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1186154	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 Ishikawa Tatsuya, Horie Kenta, Takakura Yuki, Ohki Houko, Maruyama Yuya, Hayama Mio, Miyauchi Maki, Miyao Takahisa, Hagiwara Naho, Kobayashi Tetsuya J., Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 28
2. 論文標題 T cell receptor repertoire analysis of CD4 positive T cells from blood and an affected organ in an autoimmune mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 929 - 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13079	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 Ishikawa Tatsuya, Ishii Hiroto, Miyao Takahisa, Horie Kenta, Miyauchi Maki, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 13
2. 論文標題 Sample Preparation and Integrative Data Analysis of a Droplet-based Single-Cell ATAC-sequencing Using Murine Thymic Epithelial Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 4588-4598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4588	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 Miyao T, Miyauchi M, Kelly S T, Tommy W, Ishikawa T, Oh E, Hirai S, Horie K, Takakura Y, Ohki H, Hayama M, Maruyama Y, Seki T, Ishii H, Yabukami H, Yoshida M, Inoue A, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Muratani M, Minoda A, Akiyama N, Akiyama T	4. 巻 11
2. 論文標題 Integrative analysis of scRNA-seq and scATAC-seq revealed transit-amplifying thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 73998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.73998	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 Nishijima Hitoshi, Matsumoto Minoru, Morimoto Junko, Hosomichi Kazuyoshi, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin, Oya Takeshi, Tsuneyama Koichi, Yoshida Hideyuki, Matsumoto Mitsuru	4. 巻 208
2. 論文標題 Aire Controls Heterogeneity of Medullary Thymic Epithelial Cells for the Expression of Self-Antigens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100692	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 Ishikawa Tatsuya, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 12
2. 論文標題 In Pursuit of Adult Progenitors of Thymic Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.621824	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 Ito-Kureha Taku, Miyao Takahisa, Nishijima Saori, Suzuki Toru, Koizumi Shin-ichi, Villar-Briones Alejandro, Takahashi Akinori, Akiyama Nobuko, Morita Masahiro, Naguro Isao, Ishikawa Hiroki, Ichijo Hidenori, Akiyama Taishin, Yamamoto Tadashi	4. 巻 11
2. 論文標題 The CCR4-NOT deadenylase complex safeguards thymic positive selection by down-regulating aberrant pro-apoptotic gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19975-4	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋山伸子、並木佳乃、宮尾貴久、宮内真紀、師田瑞樹、中島淳、秋山泰身
2. 発表標題 B 型胸腺腫における転写制御因子 ASCL1 の発現低下は関連自己免疫疾患発症へ寄与する
3. 学会等名 第43回日本胸腺研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 秋山伸子、宮尾貴久、宮内真紀、師田瑞樹、中島淳、秋山泰身
2. 発表標題 胸腺腫の1細胞遺伝子発現解析
3. 学会等名 第41回日本胸腺研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

シン・胸腺上皮細胞ーシングルセル解析による胸腺上皮細胞の分化機構解明ー https://www.riken.jp/press/2022/20220517_2/index.html 理研HP Tリンパ球の救命装置 - mRNA分解により異常な細胞死を防ぐ - https://www.riken.jp/press/2020/20201202_3/index.html 免疫の不思議：免疫はなぜ、自己組織を攻撃しないのか - 自己免疫疾患を防ぐ胸腺オートファジーの誘導機構を解明 - https://www.riken.jp/press/2024/20240208_3/index.html

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
---------	---------