

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16151

研究課題名(和文)自己免疫疾患にかかわる胸腺樹状細胞の成熟機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of thymic dendritic cell maturation involved in autoimmune diseases

研究代表者

関 崇生 (Seki, Takao)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：00832205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺の髄質領域には抗原提示細胞が局在し、自己応答性T細胞へ自己抗原を提示することで自己応答性T細胞は細胞死が誘導される。このように胸腺では大部分の自己応答性T細胞が除去されることで、自己免疫疾患の発症が未然に防がれている。胸腺髄質には髄質上皮細胞、B細胞、樹状細胞が局在し、抗原提示には成熟することが必須である。本研究では、TNFレセプターファミリーRANKとCD40が、胸腺樹状細胞の成熟に必要であることを明らかにした。RANKとCD40はTRAF6を介して古典的NF- κ B経路を活性化し、胸腺樹状細胞を成熟させる。すなわち、本課題により胸腺樹状細胞の成熟機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病、関節リウマチ等、自己免疫疾患の患者数は年々増加しているが、有効な治療法は限られており、新たな治療法の確立が喫緊の課題である。本研究では、リンパ組織である胸腺による自己免疫疾患発症抑制に着目した。T細胞は胸腺で分化するが、その過程で自己組織に反応する自己応答性T細胞は除かれる。自己応答性T細胞の除去には胸腺髄質に局在する抗原提示細胞が重要である。抗原提示細胞の一種である胸腺樹状細胞は自己応答性T細胞の除去に関わると言われている。本研究により、自己抗原を提示するために必要な“成熟”機構が明らかになった。今後、この知見を利用して自己免疫疾患の発症機構の理解が進展すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Antigen-presenting cells (APC) are localized in the thymic medulla and present self-antigens to auto-reactive T cells, which induce cell death. Thus, most of auto-reactive T cells are eliminated in the thymus, thereby preventing the onset of autoimmune diseases. Medullary thymic epithelial cells, B cells, and dendritic cells (DC) are APCs, which undergo homeostatic maturation for antigen presentation. In this study, we found that TNF receptor family members receptor activator of NF- κ B (RANK) and CD40 signaling cooperatively promote development of mature DCs. RANK and CD40 activate classical NF- κ B pathway via TRAF6 to mature thymic DCs. In other words, this study revealed a part of the homeostatic maturation mechanism in thymic DCs.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫 胸腺 樹状細胞 成熟 TNFレセプターファミリー

1. 研究開始当初の背景

免疫は体内に侵入した細菌、ウイルスなどの異物を排除するための自己防御機構である。通常、免疫系は「自己」と「非自己」を正しく認識することで正常に機能している。しかし、稀に「自己」を「非自己」と誤認してしまふことがあり、自己組織を誤認して生じる病気を総じて自己免疫疾患と呼ぶ。自己免疫疾患は全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、潰瘍性大腸炎などが知られ、その多くが難病に指定されている。さらに、難病情報センターによるといずれの疾患も近年増加している。自己免疫疾患は発症原因が明確でないため、根治が極めて困難であり、患者のQOLに与える影響が大きい。そのため、医学・薬学における臨床研究のみならず基礎研究による新規成果に基づく原因解明と治療法の改善が待たれている。

胸腺はT細胞の分化と成熟を担う免疫器官である。胸腺は皮質と髄質の2つの領域で構成される。T細胞は分化するに従って皮質から髄質へ移動する。髄質領域には、自己抗原を提示する細胞(抗原提示細胞)が局在し、提示された自己抗原に強い親和性を持つT細胞は、自己応答性T細胞と見なされ、細胞死が誘導される(または制御性T細胞へ分化誘導される)。したがって、自己免疫疾患の発症を未然に防ぐ上で、髄質領域の抗原提示細胞が重要な役割を持つ(図1)。

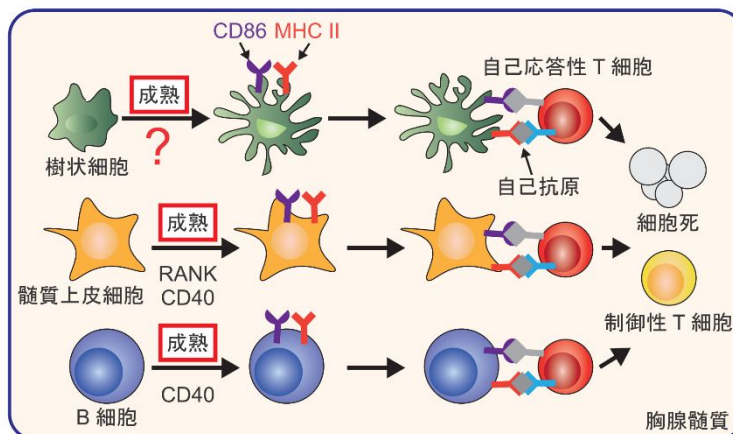


図1. 胸腺髄質内の抗原提示細胞は樹状細胞、髄質上皮細胞そしてB細胞である。これらの抗原提示細胞は胸腺内で“成熟”し、自己応答性T細胞に自己抗原を提示する。自己応答性T細胞は細胞死、または制御性T細胞へ誘導される。これまでに樹状細胞の成熟に必要なシグナルは同定されていない。

胸腺髄質の自己応答性T細胞除去にかかわる抗原提示細胞は、髄質上皮細胞、B細胞、樹状細胞の3種類である(図1)。胸腺髄質の抗原提示細胞が、自己抗原を効率的に提示するためには、抗原提示に必要なMHCや共刺激因子CD86などを高発現(以降、“成熟”と定義)する必要がある。これまでの研究で、TNFレセプターファミリー-RANKとCD40シグナルが髄質上皮細胞の成熟を誘導することが明らかとなっている(Akiyama T et al., *Immunity* 29:423-437, 2008)。また胸腺B細胞の成熟はCD40シグナルで制御され、自己応答性T細胞を除去することが明らかとなっている(Yamano T et al., *Immunity* 42:1048-1061, 2015)。一方、胸腺樹状細胞が自己応答性T細胞を除去することは明らかであるが、成熟を胸腺内で誘導する機構は未だに明らかでなく、関連分野において解決すべき課題となっている(Inglesfield S et al., *Trends In Immunol.* 1549:1-13, 2019)。

2. 研究の目的

本研究課題は、樹状細胞の成熟を誘導するシグナル因子の同定を行い、自己免疫抑制における重要性を明らかにし、得られた知見から自己免疫疾患の新たな治療標的となることを目指す。具体的には以下の3項目を目的とした。

- (1) 胸腺樹状細胞の成熟を誘導するシグナル因子を同定する
未成熟の樹状細胞で発現し、成熟を誘導する細胞表面レセプターを同定する。
- (2) 胸腺樹状細胞の成熟を誘導するシグナルから成熟に至る分子メカニズムを同定する
成熟を誘導するレセプターが活性化する細胞内シグナルを決定し、その標的因子を同定する。
- (3) 胸腺樹状細胞の成熟が自己免疫抑制に必要性であることを検証する
樹状細胞が未成熟であると自己免疫抑制ができず、樹状細胞の成熟過程が必要であることを検証する。

3. 研究の方法

(1) 胸腺構成細胞のフローサイトメーター解析

欠損マウス由来の胸腺を、定法に従い、コラゲナーゼ処理によって分散し、単細胞とした。胸腺細胞にPE標識抗CD11c抗体と抗PEマイクロビーズを反応させ、MACS (Miltenyi)で樹状細胞の濃縮を行った。胸腺樹状細胞画分(cDC1、cDC2、pDC)については、蛍光標識したCD11c、CD45RA、SIRPα、CD86、MHCクラスII抗体を指標にフローサイトメーターで解析した。胸腺T細胞(未熟なT細胞、制御性T細胞等)については、蛍光標識したCD4、CD8α、CD25、Foxp3、GITR抗体を指標にフローサイトメーターで解析した。

(2) 胸腺樹状細胞のシングルセル遺伝子発現解析

欠損マウス由来の胸腺を、定法に従い、コラゲナーゼ処理によって分散し、単細胞とした。胸腺細胞に PE 標識抗 CD11c 抗体と抗 PE マイクロビーズを反応させ、MACS (Miltenyi) で樹状細胞の濃縮を行った。さらに、CD11b 陽性細胞、CD45RA 陽性 pDC を除いた CD11c 発現細胞をセルソーターで分取した。分取した細胞から 10xGenomics Chromium システムを用いて、1 細胞ごとに異なるバーコード配列を付与した cDNA ライブラリーを作製して次世代シーケンサーにより得られたリード数を解析することで発現量を決定した。さらに、R のパッケージである Seurat を利用して遺伝子発現プロファイルに基づき細胞集団を分類した。

4. 研究成果

(1) 胸腺樹状細胞の成熟過程における RANK の機能

樹状細胞特異的に Cre を発現する CD11c-Cre マウスを RANK^{fl/fl} CD40 欠損マウス (CD40 KO マウス) と交配させ、cRANK/CD40 DKO マウスの解析を行った。胸腺樹状細胞 (cDC) は、cDC1 と cDC2 のサブセットが存在する。

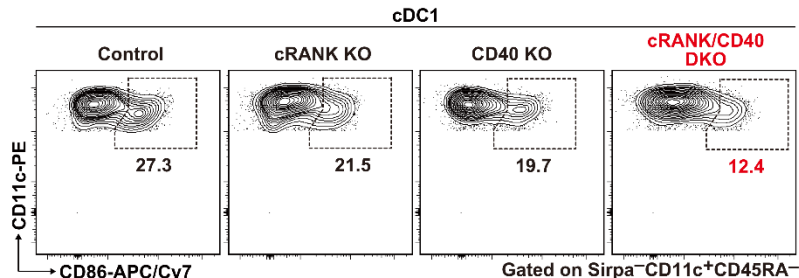


図 2. cRANK/CD40 DKO マウスでは、成熟した cDC1 が大幅に減少しており、樹状細胞で RANK が働くことが示唆された。

樹状細胞は細菌等の抗原を取り込むことで成熟するため、離乳前 (生後 2 週齢) のマウスを解析し、食事など成長に伴う環境変化の影響を排除した。cDC1 と cDC2 の成熟画分 (CD86^{high}) の割合と細胞数をフローサイトメーターで解析した。コントロールマウス、RANK 欠損 (cRANK KO)、CD40 欠損 (CD40 KO) マウスと比較して、cRANK/CD40 DKO マウスのみ成熟画分の割合が大きく減少したが、細胞数は CD40 KO 背景を持つマウス (CD40 KO、cRANK/CD40 DKO) で樹状細胞数が増加し、かつ cDC1 の割合が増加するため有意な差は見られなかった。一方で、cDC2 は CD40 KO、cRANK/CD40 DKO マウスで成熟画分が減少し、細胞数も減少した。cDC1、2 の Ki67 (細胞増殖マーカー) 発現、前駆細胞である pre-cDC の割合についても比較したが、有意な差はなかった。また、抹消リンパ組織である脾臓の成熟 cDC1、成熟 cDC2 についても解析したが、有意な差はなかった。

さらに詳細に解析するため、コントロールマウスと cRANK/CD40 DKO マウスの CD11c 陽性細胞から、CD11b 陽性細胞、CD45RA 陽性 pDC をセルソーターで除き、シングルセル遺伝子発現解析した。成熟 cDC1 と cDC2 の細胞比率が大きく減少していることを確認した (図 3)。さらに、RNA velocity 解析 (RNA-seq の結果に含まれるイントロンの割合から細胞の分化過程を算出する解析) で成熟 cDC1 には、分化過程の異なる *Il12b^{hi}* cDC1 (クラスター 2、3) と *Ccl17^{hi}* cDC1 (クラスター 1、13、15) が存在することが示唆された (図 3)。

以上の結果から、RANK は胸腺樹状細胞で働き、CD40 と協調して *Il12b^{hi}* cDC1 と *Ccl17^{hi}* cDC1 両者の成熟を誘導すると結論した。

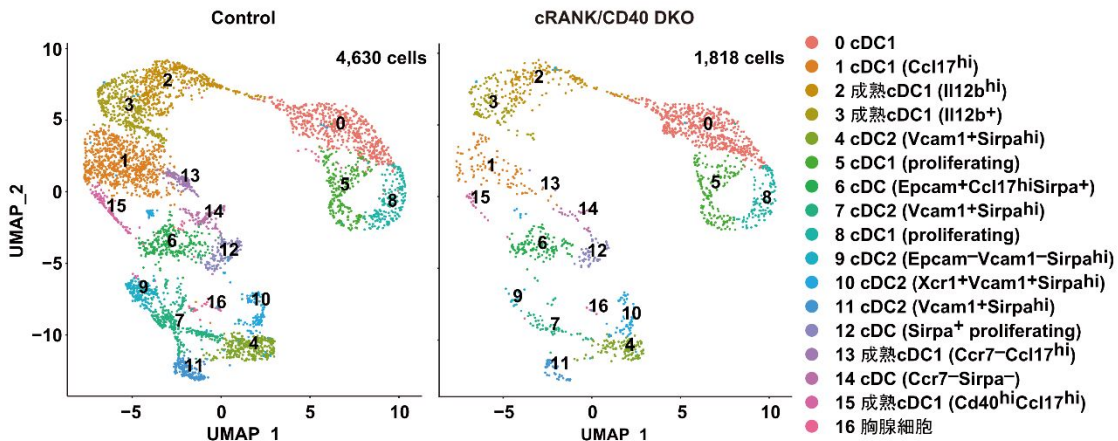


図 3. cRANK/CD40 DKO マウスでは、成熟した cDC1 と cDC2 が大幅に減少しており、樹状細胞で RANK が働くことが示唆された。さらに、成熟 cDC1 には *Il12b^{hi}* と *Ccl17^{hi}* の画分が存在することが明らかとなった。

(2) 胸腺樹状細胞の成熟を誘導する RANK/CD40 下流のシグナル伝達経路

TRAF6 は RANK と CD40 の下流で古典的 NF- κ B 活性化経路を制御する分子である。そこで TRAF6 欠損マウス (TRAF6 KO) の成熟 cDC1 の割合と細胞数をフローサイトメーターで解析した。野生型マウスと比較して TRAF6 KO マウスの成熟 cDC1 は細胞比率、細胞数共に大きく減少した。この結果は、RANK/CD40 は TRAF6 を介して古典的 NF- κ B 経路を活性化し、cDC1 の成熟を誘導することを示唆している。

(3) 成熟胸腺樹状細胞の制御性 T 細胞分化への影響

cDC1 は制御性 T 細胞を誘導すると考えられている。そこで、コントロールマウスと cRANK/CD40 DKO マウスの胸腺制御性 T 細胞の割合と細胞数をフローサイトメーターで解析した。コントロールマウスと比較したところ、cRANK/CD40 DKO マウスの制御性 T 細胞の割合はわずかに減少したが、細胞数に大きな変化は見られなかった。また、CD25⁺GITR⁺CD4⁺CD8⁻ の制御性 T 細胞前駆細胞の割合、細胞数に変化はなかった。これらの結果から、RANK/CD40 は cDC1 の成熟を誘導するが、制御性 T 細胞の誘導には大きく影響しないと結論した。

以上の結果を踏まえ、RANK と CD40 は、協調して cDC1 で働き、TRAF6 を介して古典的 NF- κ B 経路を活性化し、*I12 β ^{hi}* cDC1 と *Ccl17^{hi}* cDC1 両者の成熟を誘導すると考えられる。今後は、成熟 cDC1 の自己免疫疾患への影響、さらにシングルセル RNA 遺伝子発現解析で明らかとなった *I12 β ^{hi}* cDC1 と *Ccl17^{hi}* cDC1 の機能について検討する必要がある。得られた成果は、胸腺の自己免疫疾患抑制機構解明、自己免疫疾患の治療法への開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 小林謙太 , 土屋勇一 , 関崇生 , 駒澤幸子 , 西山千春 , 三上哲夫 , 今村亨 , 田中稔 , 中野裕康
2. 発表標題 FGF18はNASH における肝線維化に関与する
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋勇一 , 小林謙太 , 関崇生 , 駒澤幸子 , 西山千春 , 三上哲夫 , 今村亨 , 田中稔 , 中野裕康
2. 発表標題 肝細胞特異的cFLIP欠損はチオアセトアミド投与による慢性肝障害と肝線維化を亢進させる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋山泰身 , 堀江健太 , 石川龍也 , 関崇生 , 秋山伸子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 シングルセルRNA-seqによる細胞ヘテロジェナイティの探索	

〔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
---------	---------