

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380183

研究課題名（和文） 胸腺上皮幹細胞の維持・再生に関与する転写因子ネットワークの解明とその応用

研究課題名（英文） Transcription factor network involved in maintenance and regeneration of epithelial progenitor cells in the thymus

研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA RYO)

東京理科大学・生命科学研究所・教授

研究者番号：50301552

研究成果の概要（和文）：成体組織の恒常性維持には組織幹細胞が関与している。加齢やストレスに伴う胸腺の退縮や再生の制御に幹細胞・前駆細胞が関与している可能性について、ホメオドメイン転写因子である *Meis1* の発現ならびに機能の面から解析を行った。その結果、*Meis1* は未熟な静止期にある一部の胸腺上皮細胞に発現しており、上皮細胞特異的に *Meis1* を欠損させると胸腺が消失し、加齢に伴い *Meis1* 発現細胞が減少することから、成体胸腺には *Meis1* を高発現する幹細胞・前駆細胞が存在しており、これらの細胞が成体胸腺の恒常性維持に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Most epithelial tissues retain stem/progenitor cells to maintain homeostasis of the adult tissues; however, the existence of a thymic epithelial cell (TEC) progenitor capable of maintaining homeostasis of the postnatal thymus remains unclear. Here we show that a TEC population expressing high levels of *Meis1*, a homeodomain transcription factor, is enriched in non-dividing quiescent cells with an immature cellular phenotype. Postnatal inactivation of *Meis1* in TECs caused exhaustion of the immature *Meis1*<sup>high</sup> TECs and promoted their cell cycle entry, which ultimately lead to premature disappearance of the thymus. There was an age-associated reduction in the proportion of the *Meis1*<sup>high</sup> TEC population, which may also relate to thymic involution. These findings indicate that in the postnatal thymus the high level expression of *Meis1* marks a unique population of TECs with progenitor activity, in which *Meis1* functions to maintain the undifferentiated state that is required for homeostasis of the postnatal thymus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6300000	1890000	8190000
2010年度	5000000	1500000	6500000
2011年度	3600000	1080000	4680000
年度			
年度			
総計	14900000	4470000	19370000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学（基礎獣医学・基礎畜産学）

キーワード：免疫、再生、幹細胞、転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺は、T細胞の分化・選択に必須な中枢リンパ組織であり、胸腺内免疫微小環境（ニッ

チ）と骨髄由来 T 前駆細胞が相互作用することにより、正ならびに負の選択という過程を経て、成熟 T 細胞が分化する。加齢やストレ

スに伴う胸腺の退縮は、胸腺ニッチの変化からなるが、胸腺上皮幹細胞の維持・再生に関する転写因子やその転写制御ネットワークについての詳細は未解明のままである。

## 2. 研究の目的

加齢に伴う免疫老化による易感染症や発癌などの危険を克服するには、胸腺という特殊な免疫ニッチの維持・再生の分子メカニズムを解明し、それを応用して人為的に胸腺の維持・再生を制御する必要がある。本研究では、再生誘導時の成体胸腺上皮細胞に発現する転写因子に焦点をあて、その胸腺上皮細胞特異的欠損マウスを用いて、胸腺上皮細胞の維持・再生に関する転写因子ネットワークを解明し、これらの転写因子を用いて人工胸腺を作製する技術基盤の構築を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 胸腺の再生に関する上皮幹細胞の同定：Meis1 欠損マウスでは胸腺上皮構造の維持に異常があることから、Meis1 を発現する胸腺上皮細胞中に胸腺上皮幹細胞が存在することが予想される。そこで Meis1 発現胸腺上皮幹細胞の性状ならびに定常状態・再生時の胸腺における細胞分布を明らかにすることにより、幹細胞の含まれる細胞集団の特定を行う。

(2) 胸腺上皮再生時に発現誘導される転写因子ならびにその標的遺伝子の解明：副腎皮質ステロイド投与ならびに放射線照射によって誘導される胸腺萎縮からの回復・再生に関する転写因子群を、マイクロアレイ法を用いて胸腺再生に異常の認められる Meis1 欠損胸腺上皮細胞と遺伝子発現を比較することにより同定する。

(3) 胸腺上皮細胞の再生に関わる転写因子の相互作用の解明：Foxn1 や Meis1 を中心にして、胸腺上皮細胞の発生や再生に関する転写因子群のネットワークについて、胸腺上皮細胞株を用いた *in vitro* 発現系を用いて明らかにする。

## 4. 研究成果

成体胸腺上皮幹細胞の維持・再生の転写制御機構について、ホメオドメイン転写因子である Meis1 の発現・機能の面から解析を行い、以下の成果を得た。

(1) Meis1 の遺伝子発現をモニターするために、Meis1 遺伝子座に EGFP 遺伝子をノックインした BAC トランスジェニックマウスを用いて、胸腺における Meis1 の発現をより詳細に解析したところ、T 前駆細胞には発現は

検出されず、胸腺上皮細胞に高い発現が認められ、Meis1 の発現レベルの異なる3つの上皮細胞集団が存在することが明らかになった。

(2) Meis1 の発現レベルの異なる3つの細胞集団における遺伝子発現をマイクロアレイ解析した結果、Meis1 を高発現する細胞群は、Hoxa3, Pbx1, Pax1, Pax9 などの胎仔期の胸腺発生に必須の転写因子を高発現する胎仔期上皮に類似した未熟な細胞集団であり、一方、Meis1 を低発現する細胞群は Aire を高発現する成熟した髄質胸腺上皮であることが明らかになった。

(3) ヌードマウス腎臓被膜下への移植実験で、Meis1 を高発現した上皮細胞から Meis1 を発現しない上皮細胞が分化することが明らかになった。

(4) Keratin14(K14)-CreER<sup>T2</sup>マウスと Meis1 の第8エクソンを flox した Meis1<sup>lox</sup>マウスを交配することで、K14-CreER<sup>T2</sup>-Meis1<sup>lox</sup>マウスを作製し、タモキシフェン投与により成体マウスにおいて Meis1 の欠失を誘導したところ、処理後2週で、皮質・髄質境界領域の上皮細胞の消失ならびに胸腺細胞数の減少、4週では皮質・髄質領域の著しい萎縮ならびに皮質領域における K5・K8 二重陽性上皮細胞の出現を認め、処理後12週で胸腺の完全な消失が認められることが明らかになった。

(5) タモキシフェン投与により成体マウスにおいて Meis1 の欠失を誘導した場合、欠失初期には胸腺上皮細胞の分化マーカー陰性の胸腺上皮前駆細胞と考えられる細胞集団が選択的に消失した。また、マイクロアレイ解析により Hoxa3, Pbx1, Pax1, Pax9 などの遺伝子発現の顕著な低下が観察されることから、Meis1 欠失に最も感受性を示す細胞群は、Meis1 を高発現する胸腺上皮前駆細胞であることが示唆された。

(6) Meis1 の発現レベルの異なる胸腺上皮細胞集団の細胞周期について解析した結果、Meis1 を高発現或する細胞群は細胞増殖しておらず静止期にあり、一方、Meis1 を発現していない細胞群は増殖する細胞集団を含んでいた。Meis1 欠損の細胞周期に与える影響について解析した結果、Meis1 欠損の誘導により、Meis1 を高発現する細胞群に対応する未熟な上皮細胞の細胞周期が進行し、増殖が誘導されていることが明らかになった。

(7) グルココルチコイド処理後の胸腺再生過程において、Meis1 を高レベルに発現した上皮細胞集団が増加し、一方、加齢に伴い、こ

れら Meis1 を高発現した上皮細胞数は低下することが明らかになった。

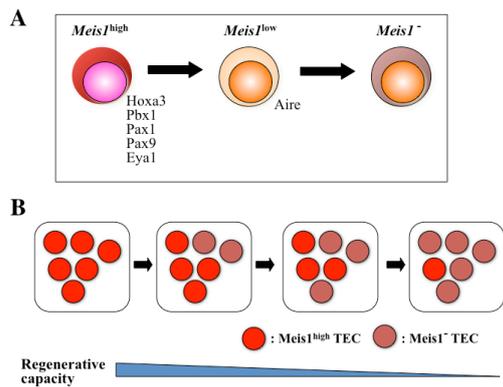


図1: 成体胸腺上皮細胞における Meis1 の発現と恒常性維持の関連 (A)Meis1 の発現と胸腺器官形成に関与する転写制御因子の発現様式。 (B)加齢に伴う胸腺上皮細胞における Meis1 の発現変化と再生能との関連

以上の結果を総合すると、Meis1 を高発現する細胞群は成体胸腺上皮前駆細胞に相当する細胞集団であり、Meis1 欠損により胸腺上皮前駆細胞の枯渇がおこり、それによって成体胸腺の恒常性維持の破綻が起こることが示唆された(図1)。今後、加齢に伴う胸腺退縮における上皮前駆細胞の量的・質的变化など、胸腺の器官形成に関与する転写因子の発現や機能の面から包括的にアプローチすることで、胸腺をはじめとする免疫器官の再生を基盤とした新たな免疫療法の開発に繋がるものと考えられる

## 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 10 件)

- ① Hidano S., Kitamura, D., Kumar, L., Geha, R. S., and Goitsuka, R.: SLP-76 is required for high affinity IgE receptor- and IL-3 receptor-mediated activation of basophils. *Int. Immunol.* 2012 (in press)
- ② Fujii, Y., Hirayama, T., Ohtake, T., Ono, N., Inoue, T., Sakurai, T., Takayama, T., Matsumoto, K., Tsukahara, N., Hidano, S., Harima, N., Nakazawa, K., Igarashi, Y., and Goitsuka, R.: Amelioration of collagen-induced arthritis by a novel S1P<sub>1</sub> antagonist with immunomodulatory activities. *J. Immunol.* 2012, 188(1):206-215.
- ③ Iida, H., Suzuki, M., Goitsuka, R., and Ueno, H.: Hypoxia induces CD133 expression in human small cell lung cancer cells by

up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *Int. J. Oncol.*, 2012, 40(1):71-79.

- ④ Fujii, Y., Ohtake, H., Ono, N., Hara, T., Sakurai, T., Takahashi, S., Takayama, T., Fukasawa, Y., Shiozawa, F., Tsukahara, N., Hirayama, T., Igarashi, Y., and Goitsuka, R.: Lymphopenia induced by a novel selective S1P<sub>1</sub> antagonist structurally unrelated to S1P. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012, 1821(4):600-606.
- ⑤ Fujii, Y., Ueda, Y., Ohtake, H., Ono, N., Takayama, T., Nakazawa, K., Igarashi, Y. and Goitsuka, R.: Blocking S1P interaction with S1P<sub>1</sub> receptor by a novel competitive S1P<sub>1</sub>-selective antagonist inhibits angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 419 (4):754-760.
- ⑥ 平山雄啓、後飯塚僚: 胸腺上皮細胞の分化と転写因子 臨床免疫・アレルギー科 第56巻 第3号 262-268頁, 2011 科学評論社
- ⑦ 後飯塚僚: 消滅する器官としての胸腺: 胸腺微小環境の形成・恒常性維持の転写制御機構、NIBS letter 第57巻第6号 78-85頁, 2011、(財)日本生物科学研究所
- ⑧ 飛彈野真也、後飯塚僚: SLP-76 と好塩基球の活性化 臨床免疫・アレルギー科 54巻第2号 155-159頁 2010 科学評論社
- ⑨ Nakato G., Fukuda S., Hase K., Goitsuka R., Cooper M. D., and Ohno H.: New approach for M-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res.* 16:227-235, 2009.
- ⑩ Nakayama, J., Yamamoto, M., Hayashi, K., Satoh, H., Bundo, K., Kubo, M., Goitsuka, R., Farrar, M. A., and Kitamura, D.: BLNK suppresses pre-B cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* 113:1483-1492, 2009.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Takehiro Hirayama, Narutochi Tsukahara, and Ryo Goitsuka: Subcellular localization of transcriptional coactivator Yap1, a target of the Hippo pathway, in thymic epithelial cells is regulated by interaction with thymocytes. 第40回日本免疫学会学術集会、千葉、2011年11月27-29日。
- ② 平山雄啓、後飯塚僚: 未知のリガンド・レセプターシステムを介した胸腺細胞・胸腺上皮細胞間のクロストーク機構 第21回 Kyoto T Cell Conference (KTCC)、京都、2011年、6月10-11日。
- ③ Takehiro Hirayama and Ryo Goitsuka: Transcription factor associated with stemness defines an epithelial progenitor cell

population in the postnatal thymus. Second Workshop of Synthetic Immunology 京都、2010年、12月17-18日.

- ④ 後飯塚僚：消滅する免疫系器官としての胸腺：その維持と再生の制御機構（財）日本生物科学研究所 第二研究会講演会、青梅 2010年11月17日
- ⑤ Takehiro Hirayama, Takuro Nakamura, and Ryo Goitsuka: Expression and function of homeodomain transcription factor Meis1 defines an epithelial progenitor cell population in the postnatal thymus. The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 神戸、2010年、8月22-27日.
- ⑥ Shizuka Fujii, Takehiro Hirayama, George Hollander and Ryo Goitsuka: Expression and function of the homeodomain transcription factor pKnox1 in thymic epithelial cells. The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 神戸、2010年、8月22-27日.
- ⑦ Takehiro Hirayama and Ryo Goitsuka: Meis1 is essential for the maintenance of postnatal thymic epithelial progenitor cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009年、12月2-4日.
- ⑧ Takehiro Hirayama, and Ryo Goitsuka: Meis1 deficiency impairs the postnatal thymic microenvironment to induce early thymic involution. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T cell Conference 2009、京都、2009年、6月1-4日.

〔図書〕(計1件)

後飯塚僚：アレルギー疾患イラストレイテッド 第2版(分担：Fcεレセプター)メディカルレビュー社、2010

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.noda.sut.ac.jp/~ribsjm/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後飯塚 僚 (GOITSUKA RYO)  
東京理科大学・生命科学研究所・教授  
研究者番号：50301552

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

河合 康洋 (KAWAI YASUHIRO)  
東京理科大学・生命科学研究所・助教  
研究者番号：00416281

中村 卓郎 (NAKAMURA TAKURO)  
癌研究所・発がん研究部・部長  
研究者番号：00180373