

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249025

研究課題名(和文)獲得免疫システムを特徴づける胸腺微小環境の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis for the thymic microenvironments that characterize the immune system

研究代表者

高濱 洋介(TAKAHAMA, Yousuke)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：20183858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円

研究成果の概要(和文)：Tリンパ球のレパトア形成を担う胸腺微小環境の分子本態解明とそれに基づく免疫疾患の根本的治療法の開発を目指して、胸腺上皮細胞に発現されTリンパ球の生成に必須の自己ペプチドモチーフを同定し、胸腺髄質上皮細胞亜集団としてCCL21発現細胞と胸腺皮質上皮細胞亜集団として胸腺ナース細胞を同定した。また、マウス胸腺上皮細胞の解析成果の応用によって、新生児期の心臓血管手術に際しての胸腺摘出の際には後年の免疫機能保持のために全摘出ではなく部分摘出のほうがよいことを示すとともに、胸腺の過形成を伴う重症筋無力症患者の胸腺ではハッサル小体の増加やCCL21の発現上昇など髄質上皮細胞の性状に特徴があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Towards understanding of molecular mechanisms that govern repertoire formation of T lymphocytes in the thymic microenvironments, this study identified and characterized (1) amino acid motifs for MHC-I-associated self-peptides that induce positive selection of CD8 T cells and (2) CCL21+ subpopulation of medullary thymic epithelial cells and beta5t+ thymic nurse cells. This study also indicated that (3) complete thymectomy in early human infancy reduces the number of circulating T cells and T-cell-mediated immune responses, suggesting that the thymus should be at least partially preserved during surgery in early infancy to maintain protective immunity. Furthermore, we found that (4) the number of Hassall's corpuscles and CCL21 expression in the thymic medulla was significantly elevated in the thymuses of myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia, suggesting that the altered mTEC differentiation is associated with thymic hyperplasia and the onset of myasthenia gravis.

研究分野：免疫学

キーワード：獲得免疫 Tリンパ球 胸腺 レパトア形成 胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

生体の自己を認識することで個体を防御する免疫システムは、すべての生物の生存維持に不可欠である。なかでも自己と非自己の識別を担当するTリンパ球の抗原認識特異性レパトア（レパートリー）確立は、ヒトを含む脊椎動物の生存と健康に必須であり、その不全は自己免疫疾患または免疫不全症につながる。私たちは、Tリンパ球レパトア形成機構の解明に基づく免疫疾患の根本的治療法の開発に近づくことを目指して、Tリンパ球のレパトア形成を担う胸腺微小環境の分子本態解明を目的とした研究を進めてきた。しかし、Tリンパ球のレパトア選択を支持し制御する胸腺環境の形成と機能を担う分子機構は未だ不明であり、2つの異なる胸腺内微小環境を構築する皮質上皮細胞と髄質胸腺細胞が共通の前駆細胞に由来することが最近示されたものの、共通前駆細胞がどのように2種類の胸腺上皮細胞亜集団へと分岐し、Tリンパ球の自己識別レパトアを段階的に形成する皮質と髄質それぞれの機能的微小環境を構築するかを含め、胸腺微小環境に関する分子レベルでの理解は未開拓である。

2. 研究の目的

本研究は、Tリンパ球のレパトア形成を担う胸腺微小環境の分子本態解明に向けて、(1)皮質と髄質それぞれの胸腺上皮細胞に発現される自己ペプチドの同定、(2)皮質上皮細胞と髄質上皮細胞それぞれの亜集団の同定と分化系譜分岐機構の解析、(3)マウス胸腺上皮細胞の解析成果の応用によるヒト胸腺上皮細胞解析技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1)胸腺上皮細胞に発現される自己ペプチドの同定：細胞周期促進活性をもつ cyclin D1 を keratin5 プロモーターによって胸腺上皮細胞に強制発現させることで、著しい胸腺の過形成をおこすことが知られているトランスジェニックマウス（K5D1tg マウス）を利用して、胸腺皮質上皮細胞を大量調製し、胸腺上皮細胞に発現される自己ペプチドの質量分析計による解析を行った。

(2)胸腺上皮細胞亜集団の同定と分化系譜分岐機構の解析：正常マウスから粗精製した皮質上皮細胞と髄質上皮細胞から RNA を調製してマイクロアレイ解析を行った。候補分子に

ついて様々な遺伝子変異マウス胸腺上皮細胞のフローサイトメトリ解析を行い、胸腺上皮細胞亜集団解析を行った。

(3)ヒト胸腺上皮細胞解析技術の開発：新生児期の心臓血管手術に際して視野確保の目的で摘出された胸腺や重症筋無力症患者から治療目的で摘出された胸腺を対象に分子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1)胸腺上皮細胞に発現される自己ペプチドの同定：著しい胸腺の過形成をおこす K5D1tg マウスを 5t 欠損マウスと交配し、5t 陽性の正常胸腺皮質上皮細胞と共に 5t 欠損の皮質上皮細胞を大量調製し、胸腺上皮細胞に発現される自己ペプチドを同定試行した。並行して、大量調製の容易な細胞株を出発材料にした MHC 会合ペプチドを同定した。その結果、β5t 依存性に産生されるクラス 1 MHC 会合ペプチドのアミノ酸配列モチーフが明らかになった。具体的には、中央アンカーペプチドの C 末端側隣のアミノ酸は、β5t 依存性にプロリンが多用されていることが明らかになった。TCR トランスジェニック T 細胞分化モデル系を用いることで、β5t 依存性のペプチドモチーフがしばしば、T 細胞の正の選択を誘導しうることを明らかにすることができた。これらの結果は、胸腺微小環境依存性に最適化される Tリンパ球の正の選択の分子機構に大きな進展をもたらした。

(2)胸腺上皮細胞亜集団の同定と分化系譜分岐機構の解析：正常マウスから粗精製した皮質上皮細胞と髄質上皮細胞から RNA を調製してマイクロアレイ解析を行い、皮質上皮細胞に選択的に発現の高い細胞表面分子 CD83, CD102, CD205, CD249, CD274、髄質上皮細胞に選択的に発現の高い細胞表面分子 CD55, CD80, CD86 を見いだした。これらの分子を指標に、胸腺上皮細胞亜集団の同定を進めた。また、自己抗原提示能の発現に関与する核内因子 Aire と、幼若 Tリンパ球の誘引に関与するケモカイン CCL21 をフローサイトメトリにて同時解析する技術を開発し、Aire 発現髄質上皮細胞と CCL21 発現髄質上皮細胞が異なる細胞集団であること、CCL21 発現髄質上皮細胞は Aire およびサイトカイン受容体 Lymphotoxin β receptor に依存することを明らかにした。更に、胸腺ナース細胞が皮質上皮細胞の亜集団であり、抗原受容体遺伝子の二

次組換えによるレパトア選択を至適化する機能を持つことを明らかにした。加えて、非古典的 NF κ B シグナル経路を阻害する TRAF3 は髄質上皮細胞の増殖と分化を制御するシグナル伝達に中心的な役割を果たすことを明らかにするとともに、髄質上皮細胞に発現される CD80/86 と胸腺細胞に発現される CD28 のあいだでの相互作用が髄質上皮細胞の増殖と分化の制御に重要であることを明らかにした。

(3) ヒト胸腺上皮細胞解析技術の開発：マウスを用いた胸腺上皮細胞の解析成果がヒトの免疫システム理解につながるのかは重要な課題である。そこで、上記の如く同定された CD 分子を使ってヒト胸腺上皮細胞とその亜集団の検出が可能か解析を開始し、CD86, CD205, CD326 はヒト胸腺上皮細胞とその亜集団の同定と精製に有用であることが示された。また、ヒト胸腺の機能について、新生児期の心臓血管手術に際して視野確保の目的で胸腺を摘出する際には後年の免疫機能保持のために全摘出ではなく部分摘出のほうがよいことを示すとともに、これまで開発を進めてきたヒト胸腺上皮細胞解析技術を用いることで、胸腺の過形成を伴う重症筋無力症患者の胸腺ではハッサル小体の増加や CCL21 の発現上昇など髄質上皮細胞の性状に特徴があることを見出し、重症筋無力症の一因に胸腺髄質上皮細胞の分化や維持が関与する可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 27 件)

Takada K, Takahama Y.

Positive selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells.

Adv Immunol. 125:87-110 (2015) 査読有

doi: 10.1016/bs.ai.2014.09.003

Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y.

Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse.

Eur J Immunol. 44:561-572 (2014) 査読有

doi: 10.1002/eji.201343750

Togoo K, Takahama Y, Takada K.

Alpha-smooth muscle actin expression identifies subpopulations of lymph node non-hematopoietic cells.

Biochem Biophys Res Commun. 449:241-247 (2014) 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.023

Williams JA, Zhang J, Jeon H, Nitta T, Ohigashi I, Klug D, Kruhlak MJ, Choudhury B, Sharrow SO, Granger L, Adams A, Eckhaus MA, Jenkinson SR, Richie ER, Gress RE, Takahama Y, Hodes RJ.

Thymic medullary epithelium and thymocyte self-tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways.

J Immunol. 192:630-640 (2014) 査読有

doi: 10.4049/jimmunol.1302550

Alves NL, Takahama Y, Ohigashi I, Ribeiro AR, Baik S, Anderson G, Jenkinson WE.

Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments.

Eur J Immunol. 44:16-22 (2014) 査読有

doi: 10.1002/eji.201344110

Matsui N, Ohigashi I, Tanaka K, Nakagawa Y, Kondo K, Kitagawa T, Yamashita S, Nomura Y, Takahama Y, Kaji R.

Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients carrying thymic hyperplasia.

J Neuroimmunol. 269:56-61 (2014) 査読有

doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.01.011

Takada K, Ohigashi I, Kasai M, Nakase H, Takahama Y.

Development and function of thymic cortical epithelial cells.

Curr Top Microbiol Immunol. 373:1-17 (2014) 査読有

doi: 10.1007/82_2013_322

Ohigashi I, Takahama Y.

CCRL1 marks heterogeneity in cortical and medullary thymic epithelial cells.

Eur J Immunol. 44:2872-2875 (2014) 査読有

doi: 10.1002/eji.201445091

Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Zhanybekova S, Murata S, Tanaka K, Hollander GA, Takahama Y.

Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells.

Proc Natl Acad Sci USA. 110:9885-9890 (2013)[read a commentary in Asian Scientist] 査読有

doi: 10.1073/pnas.1301799110

Lkhagvasuren E, Sakata M, Ohigashi I, Takahama Y.

Lymphotoxin beta receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells.

J Immunol. 190:5110-5117 (2013) 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1203203

Jenkinson SR, Williams JA, Jeon H, Zhang J, Nitta T, Ohigashi I, Kruhlak MJ, Zuklys S, Sharrow SO, Adams A, Granger L, Choi Y, Siebenlist U, Bishop GA, Hollander G, Takahama Y, Hodes RJ.

Traf3 enforces the requirement for T cell crosstalk in thymic medullary epithelial development.

Proc Natl Acad Sci USA. 110:21107-21112 (2013) 査読有
doi: 10.1073/pnas.1314859111

Kurobe H, Tominaga T, Sugano M, Hayabuchi Y, Egawa Y, Takahama Y, Kitagawa T.

Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune responses: Three-year-tracing study after pediatric cardiac surgery.

J Thorac Cardiovasc Surg. 145:656-662 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.12.015

Bryson JL, Griffith AV, Hughes B, Saito F, Takahama Y, Richie ER, Manley NR.

Cell-autonomous defects in thymic epithelial cells disrupt endothelial-perivascular cell interactions in the mouse thymus.

PLoS One. 8(6):e65196 (2013) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0065196

Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y.

The development of T lymphocytes in fetal thymus organ culture.

Methods Mol Biol. 946:85-102 (2013) 査読有
doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_6

Nakagawa Y, Ohigashi I, Nitta T, Sakata M, Tanaka K, Murata S, Kanagawa O, Takahama Y.

Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary TCR α rearrangement in cortical thymocytes.

Proc Natl Acad Sci USA. 109:20572-20577 (2012) 査読有
doi: 10.1073/pnas.1213069109

Roberts NM, White AJ, Jenkinson WE,

Turchinovich G, Nakamura K, Withers DR, McConnell FM, Desanti GE, Benezech C, Parnell SM, Cunningham AF, Paolino M, Penninger J, Simon K, Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y. Caamano JH, Hayday AC, Lane PJ, Jenkinson EJ, Anderson G.

Rank signaling links the development of invariant $\gamma\delta$ T cell progenitors and Aire+ medullary epithelium.

Immunity. 36:427-437 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.016

Zuklys S, Mayer CE, Zhanybekova S, Stefanski H, Nusspaumer G, Gill J, Barthlott T, Chappaz S, Nitta T, Dooley J, Nogales-Caballero R, Takahama Y, Finke D, Liston A, Blazar BR, Pascual-Montano A, Hollander GA.

miRNAs control the maintenance of thymic epithelia and their competence for T lineage commitment and thymocyte selection.

J Immunol. 189:3894-3904 (2012) 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1200783

Anderson G, Takahama Y.

Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection.

Trends Immunol. 33:256-263 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.it.2012.03.005

Takahama Y, Takada K, Murata S, Tanaka K.

Beta5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8+ T cells.

Curr Op Immunol. 24:92-98 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.coi.2012.01.006

Lei Y, Takahama Y.

XCL1 and XCR1 in the immune system.

Microbes and Infection. 14:262-267 (2012) 査読有

doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.003

21 Mat Ripen A, Nitta T, Murata S, Tanaka K, Takahama Y.

Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit beta5t.

Eur J Immunol. 41:1278-1287 (2011) 査読有
doi: 10.1002/eji.201041375

22 Ohigashi I, Nitta T, Lkhagvasuren E, Yasuda H, Takahama Y.

Effects of RANKL on the thymic medulla.

Eur J Immunol. 41:1822-1827 (2011) 査読有

doi: 10.1002/eji.201141480

²³Takahama Y.

Medullary interplay for central tolerance

Blood. 118:2380-2381 (2011)査読有

doi: 10.1182/blood-2011-05-351734

【学会発表】(計63件)

Takahama Y. Thymus microenvironment for the formation of CD8 T cell repertoire. 第43回日本免疫学会学術集会 京都国際会館(京都府・京都市)2014年12月10日(招待講演)

Takahama Y. The thymic microenvironments that shape T cell repertoire. International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013年8月24日(招待講演)

Takahama Y. Attacking the endocrine system, what is Aire doing? Annual Conference of The Society for Endocrinology. Harrogate, UK 2013年3月20日(招待講演)

Takahama Y. T lymphocyte repertoire formation of in thymic microenvironments. 5th Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia Oceania. New Delhi, India 2012年3月15日(招待講演)

Takahama Y. Thymic cortical epithelial cells for T cell repertoire formation. 99th Annual Meeting of the American Association of Immunologists. Boston, USA 2012年5月8日(招待講演)

【図書】(計1件)

Boehm T, Takahama Y. Thymic development and selection of T lymphocytes. Springer (Current Topics in Microbiology and Immunology. Volume 373) 132(1-132)(2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高濱 洋介(TAKAHAMA, Yousuke)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：20183858

(2)研究分担者

高田 健介(TAKADA, Kensuke)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター

一・講師

研究者番号：40570073

(3)連携研究者

大東 いずみ(OHIGASHI, Izumi)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター

一・特任助教

研究者番号：00596588