

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790488

研究課題名(和文) 制御性T細胞を分化成熟させる胸腺内 Treg ニッチの実証とそのクロストーク分子機構

研究課題名(英文) Identification of the "thymic Treg niche" which maintains regulatory T cell maturation and analysis of its molecular mechanisms

研究代表者

深澤 太郎 (FUKAZAWA, Taro)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・特別研究員

研究者番号：10565774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)は、主な分化の場を胸腺とするが、ここにおけるTreg成熟過程・胸腺からの流出過程において作用する因子等は不明な点が多い。我々はこの問題に対し、Tregを分化成熟させるための特別な微小環境(Tregニッチ)が存在するという作業仮説よりアプローチを試みている。本研究期間中では、新たな胸腺Treg成熟マーカーの同定がなされ、また、胸腺Tregの流出に際し、胸腺ストロマ細胞中において、胸腺上皮以外に重要な役割を持つ細胞種の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) development occurs predominantly within the thymus, but the factors or signalings which are associated to Treg development and its egress from thymus remains unclear. To approach this matter, we utilize a "Treg niche" hypothesis; there are some micro environments for Treg differentiation and maturation in the thymus. In this study, we identified a new Treg maturation marker. And more, we suggest that there are some thymic stromal cells except thymic epithelial cells which play pivotal roles for mature Treg egress from the thymus.

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：制御性T細胞 胸腺

1. 研究開始当初の背景

免疫応答の際に中心的な役割をもつ細胞内シグナリングの一つに、転写因子 Nuclear Factor - B(NF- B)を介した経路がある。NF- B のサブユニットの一つである RelA を欠損したマウスは胎児期に胎児肝において多数のアポトーシスを起こしている細胞を認め、胎生 14 日までに致死となる。この致死性は、Tumor Necrosis Factor- (TNF-) を欠損させることで回避され、TNF-/RelA ダブルノックアウト(TA-KO)マウスは出生するようになる。この TA-KO マウスは同腹子と比べ発育が悪く、様々な組織で炎症性細胞浸潤といった自己免疫様病態を呈し、生後3週までに致死となる。

自己の組織に対する免疫寛容を成立させるシステムの一つに、制御性T細胞(Treg)による自己免疫抑制がある。Treg は、胸腺を主たる分化の場とし、分化成熟ののち末梢へと流出していく。

ここで、TA-KO マウス各組織中の Treg の頻度を解析してみると、脾臓・末梢血中での Treg 頻度は非常に低かった(図2下)一方で、胸腺においては対照マウス(野生型・TNF-KO)と同頻度の Treg を認めた。

そこで、TA-KO 胸腺内 Treg が胸腺から流出しないのか、流出後に末梢において失われているのかを検討するため、TA-KO マウス胸腺 Treg を別個体の TA-KO マウスへ移植した。この移植は、TNF KO Treg を移植した場合と同程度の延命効果を認めたことから、TA-KO 胸腺の Treg は機能的であり、(人為的に)末梢へ移行できさえすれば抑制能を示すことがわかった。これより、TA-KO 胸腺 Treg が末梢へ流出後に失われているという可能性は否定され、TA-KO マウスの自己免疫様病態は、胸腺 Treg が胸腺から流出しないことに因ると考えられた。加えて、TA-KO 胎児肝を放射線照射した別個体(B6/Ly5.1+)へ移植し血球系キメラマウスを作成したところ、このマウスにおいては胸腺 Treg 流出不全はおこらず、TA-KO マウスでの流出不全は Treg 側ではなく胸腺環境側で RelA を欠損するためであると考えられた。

TA-KO マウス胸腺より Treg が流出しない際、Treg の分化のどの段階で止まっているのかが問題となる。そこで、胸腺内 Treg 分画の成熟の程度を、ゲノム *foxp3* 領域の脱メチル化を指標に解析してみたところ、野生型・TNF KO マウスの Treg 分画は成熟 Treg・未成熟 Treg が混在していたが、TA-KO マウスの Treg 分画は成熟 Treg で占められていた。このことから申請者は、成熟 Treg が流出しないと新たな(未成熟)Treg の分化が起こらないと考え、胸腺が同時にメンテナンスできる Treg の数に上限があるのではないかとこの着想に至った。この、Treg 分化成熟のための微小環境(Treg niche)があるのではないかとこの作業仮説をもとに、成熟 Treg の流出機構の解析を行った。

2. 研究の目的

胸腺からの成熟 Treg 流出に関わる因子の探索。

3. 研究の方法

(1) T細胞の胸腺からの流出に必要なであることが既知である因子(Sphingosine-1-phosphate receptor 1; S1PR1)についての発現解析。

(2) TA-KO・TNF-KO マウス胸腺より Treg 分画を単離し、発現遺伝子の違いを DNA マイクロアレイにより探索した。

(3) Treg 流出において RelA は T細胞側ではなく胸腺環境側の細胞が必要であることが分かっていたが、この胸腺環境側のどの細胞種で RelA を必要とするかの絞込みを、まずは *foxn1-cre/rela floxed* (胸腺上皮特異的 RelA 欠損)マウスの作出、次にデオキシゲアノシン処理 TA-KO 胎児胸腺の腎皮膜下への移植により行った。

(4) 胸腺ストロマ細胞を胸腺上皮とそれ以外の血球系(CD45 陽性)細胞とに分け、DNA マイクロアレイによりそれぞれに発現遺伝子プロファイルを作成した。なお、この実験に用いる細胞のプールには時間がかかることが予想されたため、(3)の実験の結果を待たず先行して(4)の実験を開始した。

4. 研究成果

(1) S1PR1 について胸腺 Treg 分画を単離し定量的 RT-PCR を行ったところ、TNF-KO 胸腺 Treg 分画と同程度の発現量を検出した。また、抗 S1PR1 抗体を用いた発現解析においても、TA-KO 胸腺 Treg 分画中では TNF-KO と同頻度の S1PR1 陽性 Treg を認めた(図1)。この結果は、TA-KO マウスの Treg の流出不全が Treg 側ではなく胸腺環境側で RelA を欠損することに因るという結果とよく整合する。

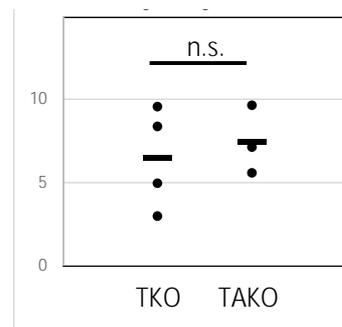


図1 胸腺 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>分画中の S1PR1<sup>+</sup>細胞の頻度 (%)

(2) TA-KO と TNF KO 胸腺 Treg 分画で発現の異なる遺伝子の候補を 68 種類得た(図2)。この中で、TA-KO 胸腺 Treg 分画において発現増強している因子として IL-7R が同定され、これについてフローサイトメトリーにより TA-KO 胸腺 Treg 分画で IL-7R 陽

性 Treg の頻度が高くなっていることを確認した(図3)。

これより、IL-7R が成熟 Treg マーカーとして有用である可能性が浮上した。そこで、野生型マウスを用い Treg 分画を IL-7R 陽性と陰性とに分け、ゲノム *foxp3* 領域メチル化程度よりそれぞれの分画の成熟度を解析したところ、IL-7R 陽性 Treg 分画の方がより成熟した集団であった。これより、IL-7R は Treg の成熟マーカーとなることを示した。

この成果により、胸腺 Treg 分画内において、IL-7R 陽性成熟 Treg 分画という新たな分画を定義することが可能となった。これを用いて、TA-KO と TNF KO 胸腺より IL-7R 陽性成熟 Treg 分画を単離し、再度 DNA マイクロアレイを行った。これにより、前述の

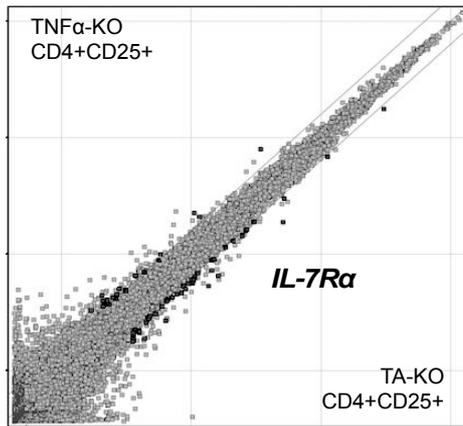


図2 TNF $\alpha$ -KO・TA-KO 胸腺 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 分画における遺伝子発現プロファイルの比較。このとき同時に、図には示していないが TNF $\alpha$ -KO・TA-KO 胸腺 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$  CD24 $^{-}$  成熟 conventional T 細胞間でも比較を行い、Treg 分画間では差がみられたが conventional T 細胞分画間では差の見られなかった遺伝子 (TA-KO の Treg 分画でのみ発現変動の見られた遺伝子; 68 種類) を濃いドットで示す。

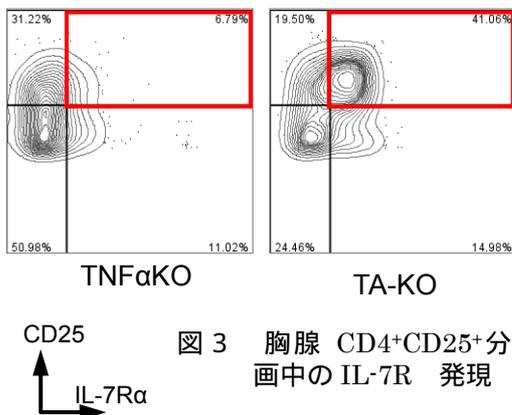


図3 胸腺 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ 分画中の IL-7R 発現

68 候補遺伝子は 49 候補遺伝子まで絞り込まれた。

(3) まず *foxn1-cre/rela* floxed マウスを作出したところ、このマウスにおいて胸腺 Treg 流出不全の表現型は再現されなかった。しかしながら、このマウスの胸腺上皮において組み換え効率が悪かった。そこで次に、デオキシグアノシン処理 TA-KO 胎児胸腺の、ヌードマウス腎皮膜下への移植を行ったところ、このマウスでは、Treg の流出不全は再現されなかった(図4)。このことから、Treg の流出に際して RelA を必要とするのは、胸腺ストロマ細胞のうち胸腺上皮以外の細胞種であることがわかった。この結果は、胸腺 Treg の流出に際し、胸腺上皮以外の細胞の関与があることを意味する。

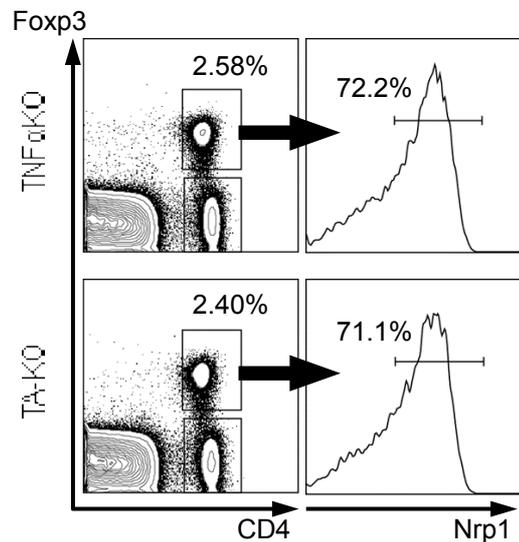


図4 TNF $\alpha$ -KO・TA-KO dGuo 処理胎児胸腺のヌードマウスへの腎皮膜下移植後の脾細胞中の胸腺由来 Treg (Nrp1 $^{+}$ Treg) 頻度

(4) 胸腺上皮細胞と、CD45 陽性胸腺ストロマ細胞より発現遺伝子プロファイルを作成した。この実験は(3)に先行して行ったが、(3)の結果を受け今後の研究は CD45 陽性胸腺ストロマ細胞より作成したプロファイルを用い進める。

## 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)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 深澤太郎、三瀬節子、小幡裕一、土井貴裕

Analysis of RelA-dependency of thymic Treg efflux

第 42 回日本免疫学会学術集会

2013 年 12 月 13 日

幕張メッセ(千葉)

2. 深澤太郎、三瀬節子、小幡裕一、土井貴裕

Thymic regulatory T cell efflux requires RelA in thymic environment

第 41 回日本免疫学会学術集会

2012 年 12 月 6 日

神戸ポートピアホテル(神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 太郎 (FUKAZAWA TARO)

理化学研究所バイオリソースセンター

特別研究員

研究者番号: 10565774

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし