

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860138

研究課題名(和文) 胸腺上皮細胞異常による自己免疫病の免疫組織学的解析

研究課題名(英文) Immunohistological analysis of autoimmune disease caused by dysfunction of thymic epithelial cells

研究代表者

沢登 祥史 (Sawanobori, Yasushi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40525052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺上皮細胞は、これまでマウスを主な研究対象とし、ケラチンの発現パターンやレクチンとの結合を用いて同定されてきた。我々は他の動物種の胸腺上皮細胞もマウスと同様の手法にて同定可能か検討するため、既存の手法に加え新規抗体であるED18、ED19、ED21を用いてマウスとラットの胸腺を免疫染色した。その結果、マウス、ラットに共通し、髄質胸腺上皮細胞は2つの画分を含むことが明らかとなり、我々はこれらをmTEC1およびmTEC2と命名した。レクチンの結合および機能分子の発現はmTEC1に主に見出された。またシクロスポリンA投与ラットでは特にmTEC1が優先的に減少することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Thymic epithelial cells had been mainly investigated in mice, and identified with keratin expression pattern and binding to lectin. Studying whether these patterns are common between species or not, we immunohistochemically stained thymus of mice and rats with already-known methods and newly produced antibody ED18, ED19, and ED21. As a result, medullary thymic epithelial cells were revealed to consist of two subsets, as we named mTEC1 and mTEC2. Binding to lectin and functional molecules were dominant in mTEC1. We also revealed that mTEC1 diminishes mainly in cyclosporine A administered rats.

研究分野：解剖学

キーワード：胸腺上皮細胞 免疫寛容 T細胞分化 胸腺 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

胸腺上皮細胞(thymic epithelial cell: TEC)は胸腺内にてT細胞の分化を誘導し選別を行う細胞群であり、その機能と発生は精力的に研究されてきているが、これまでは主に実験動物としてマウスを利用して抗ケラチン5、8、7抗体やシダのレクチンである UEA-1 との結合で胸腺上皮細胞を同定していた。他の生物での胸腺上皮細胞の報告は少なく、同様の手法で胸腺上皮細胞を同定できるのかも不明であった。

また、マウス胸腺上皮細胞の研究においても、抗ケラチン抗体は免疫組織化学染色において皮質及び髄質胸腺上皮細胞を大雑把に同定する目的で使用されており、細胞内分子であるためフローサイトメーターでの詳細な解析時には UEA-1 や皮質胸腺上皮細胞特異的抗体である Ly51 が使用されており、発現するケラチンの種類と機能や詳細なサブセットとの関係は不明なままであった。

一方、臨床的にも広く使用されているシクロスポリン A は、ラットにおいては特定の投与量と期間により、通常は起こりえない同系統ラット間骨髄移植において移植片対宿主病を引き起こすことが知られている。胸腺のT細胞選別能が攪乱されていることが予測されるが、詳細な機序は不明であった。

2. 研究の目的

免疫組織化学染色を用い、ラットにおける胸腺上皮細胞の同定を当初目的としたが、研究の過程でラット・マウスに共通して髄質胸腺上皮細胞は2つの画分に分かれることがわかり、これらの画分の機能分子発現パターンを調査することによりそれぞれの役割を探索することを新たな目的とした。

また、これら画分の存在比を、T細胞選別能が低下していると思われるシクロスポリン投与ラットに於いて測定した。

3. 研究の方法

8週齢の Lewis ラットを用い、安楽死後胸腺を摘出し、凍結保存し、免疫組織化学染色のために薄切して使用した。

染色は既知の報告で使用されてきた抗ケラチン5抗体、抗ケラチン8抗体、及びレクチン UEA-1 に加え、新規抗体である ED18、ED19、ED21 を用い、酵素発色と蛍光物質による検出の双方を使用した。

フローサイトメトリーのために、胸腺はリベラーゼ TH により溶解され、得られた細胞を PBS-15 % optiprep (Sigma-Aldrich) に懸濁し PBS-11% optiprep の重層遠心を行うことにより界面に現れる TEC を含む低比重細胞群を濃縮した。染色時には必要に応じて Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience) を用いた細胞内染色を行った。

シクロスポリン A 投与ラットを観察するため、8週齢のラットにオリーブオイルに溶解したシクロスポリンを 4mg/kg となるように 4-16 日間毎日皮下注射し、安楽死後胸腺を新鮮凍結保存した。得られた組織は蛍光発色法にて免疫組織化学染色を行った。これらの組織は BZ-9000 型顕微鏡 (Keyence) にて撮影後、同社の解析ソフトウェアにて画像解析した。

4. 研究成果

1) 抗ケラチン抗体、新規抗体、UEA-1 によるマウスおよびラット胸腺染色の比較

まず今回使用する抗体群のラット及びマウス胸腺での大まかな染色性を確認するため、ラット及びマウス胸腺を、酵素法による免疫組織化学染色により網羅的に染色し比較した(表1)。既存の染色法であるケラチン5及び8による染色では、皮質でのケラチン5やUEA-1の染色性に違いが見られたものの、概ね近い結果が得られた。一方、新規抗体である ED18、ED19、ED21 に関しては、ED18 は、ラット、マウスに共通して皮質と髄質の双方を染めたが、ED19 はラットの皮質しか染色しなかった。ED21 はラット皮質を薄く染めたものの、髄質ではラット、マウスの双方に染色を確認した。

表 1

	Rat		Mouse	
	cortex	medulla	cortex	medulla
Keratin5	+	+	few	+
Keratin8	+	+	+	+
UEA-1	dull	+	-	+
MHCII	+	+	+	+
CD205	+	+	+	+
ED18	+	+	+	+
ED19	+	-	-	-
ED21	dull	+	-	+

2) 蛍光発色法による多重免疫組織化学染色でのサブセット解析と mTEC1、mTEC2 の発見。

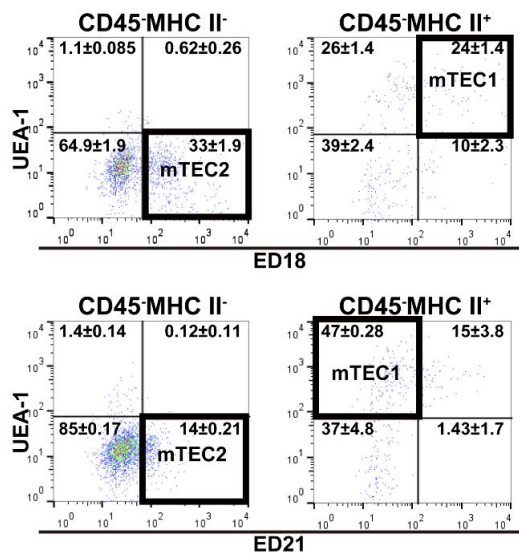
続いて、今回使用した抗体やレクチンが同一の細胞を染めているのか否かを、多重免疫組織化学染色により検討した。複数の抗体の組み合わせで染色を行い、結果を統合したところ、皮質胸腺上皮細胞(cTEC)は比較的均一な集団であったが、髄質胸腺上皮細胞(mTEC)は Keratin5⁺Keratin8⁺ED18⁺ED21⁺ 及び Keratin5⁺Keratin8^{dull}ED18⁺ED21⁺ の2つの集団に分かれることが観察され、我々はこれを mTEC1 および mTEC2 と命名した(表2)。さらに、T細胞への抗原提示を行う MHC II 分子や、mTEC からの抗原発現を制御する AIRE、成熟

mTEC やその前駆細胞に発現する Claudin3 及び 4 は mTEC1 に主に発現しており、mTEC1 は機能性の高いサブセットであると思われた。
表 2

	Rat			Mouse		
	cTEC	mTEC1	mTEC2	cTEC	mTEC1	mTEC2
Keratin5	+	-	+	few	-	+
Keratin8	+	+	dull	+	+	dull
UEA-1	dull?	+	-	-	+	-
MHCII	+	many	few	+	many	few
CD205	+	-	-	+	NT [#]	NT
ED18	+	+	+	+	+	+
ED19	+/-	-	-	-	-	-
ED21	dull?	-	+	-	-	+
Claudin3/4	-	many	few	-	many	few
AIRE	-	many	few	-	many	few

さらに、ED18, ED21 は permeabilization を行うことによりフローサイトメトリーでも使用可能であり、図 1 に示すようにフローサイトメトリー上で mTEC1、mTEC2 を同定することも可能であった(図 1)。

図 1



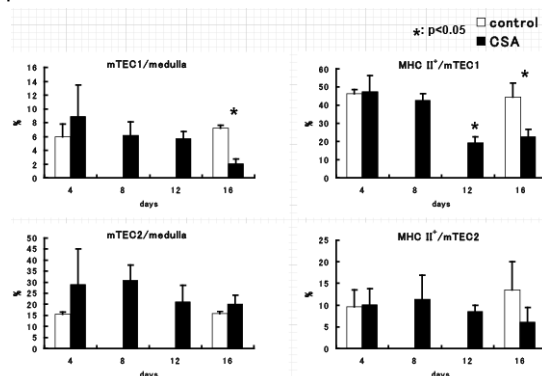
以上の結果は Plos One に投稿、掲載された (PLoS One. 2014; 9(10): e109995)。

3) シクロスポリン投与ラットにおける mTEC1 の優先的な減少。

シクロスポリン A ラットにおける自己応答性の T 細胞の出現は胸腺での T 細胞選別能が低下していることが原因と考えられるが、我々はシクロスポリン A 投与ラットの胸腺を ED18、ED21 および抗 MHC II 抗体を用いて染色し、写真撮影、画像解析を経て mTEC1 と

mTEC2 の数と MHCII 発現を解析した。その結果、mTEC2 が髄質内に占める割合、および mTEC2 の MHC II 発現は実験期間を通じて有意な変化を認めなかったが、mTEC1 は投与 16 日目の髄質内での割合、および投与 12 日目と 16 日目の MHC II 発現が有意に低下し、シクロスポリン A に対して特に感受性が高い細胞群であることを示唆し、シクロスポリン A による自己応答性 T 細胞の誘導が mTEC1 の減少を原因としている可能性を示唆した(図 2)。

図 2



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 1 件)

Three Distinct Subsets of Thymic Epithelial Cells in Rats and Mice Defined by Novel Antibodies.

Yasushi Sawanobori, Hiashi Ueta, Christine D. Dijkstra, Chae Gyu Park, Motoyasu Satou, Yusuke Kitazawa, and Kenjiro Matsuno. PLoS One. 2014; 9(10): e109995.

Published online 2014 Oct 21. doi: 10.1371/journal.pone.0109995

〔学会発表〕(計 2 件)

Yasushi Sawanobori, Cyclosporin A affects differentially on two distinctive subpopulations of rat medullary thymic epithelial cells, 2014 年 12 月 10-12 日、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都市

Yasushi Sawanobori, Novel antibodies revealed three distinct thymic epithelial cell subsets in rats and mice, 2013 年 12 月 11-13 日、第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢登祥史 (Yasushi Sawanobori)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：

40525052

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：