

研究題目 胸腺細胞の動態制御と選択機構

研究組織

研究代表者：木梨達雄（関西医科大学附属生命医学研究所分子遺伝学部門）

共同研究者：松本 満（徳島大学疾患酵素学研究センター）

研究分担者：植田祥啓（関西医科大学附属生命医学研究所分子遺伝学部門）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ヒトにおける胸腺の分化の詳細な過程は未だ不明である。ヒト化マウスの胸腺細胞の分化、胸腺の組織構造を明らかにするためヒト胸腺細胞と抗原提示細胞との相互作用を胸腺 explant を用いた二光子ライブイメージングにより明らかにする。また、マウス・ヒトにおける CD4SP 細胞との相互作用と胸腺髄質上皮細胞の活性化、分化の関係をライブイメージングにより明らかにする。

[1-2]研究の方法・経過

我々は、ヒト臍帯血から CD133 陽性細胞を分取して、NSG マウスに移植してヒト化マウスを作製し、胸腺細胞の分化や局在をフローサイトメトリー及び免疫組織染色により解析した。

胸腺上皮細胞を可視化するために胸腺スライスを作製し皮質胸腺上皮細胞のマーカーである BP-1 および髄質胸腺上皮細胞のマーカーであるポドプラニンに対する蛍光標識抗体で染色し、胸腺細胞を導入して胸腺細胞との接触を観察した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

我々は、ヒト臍帯血から CD133 陽性細胞を分取して、NSG マウスに移植してヒト化マウスを作製し、免疫系の発達を免疫組織化学的に解析すると末梢に CD4、CD8 が観察され、数ミリ長の胸腺に DP 細胞および CD4SP、CD8SP 細胞を確認された。

しかしながらこの胸腺においては UEA+ の髄質上皮細胞 (mTEC) の集積がなく髄質が発達せず、被膜側に成熟 T 細胞の集積が島状に散在していた。一方免疫刺激によってヒト由来樹状細胞の集積

が起こり髄質様の構造が認められ、胸腺細胞の分化または細胞数が促進された。

申請者らは胸腺細胞を活性化マーカー CD69 とリンパ節のホーミングレセプター CD62L で染色し、CD4SP における染色パターンを検討した。その結果 SP 細胞は CD69^{high}CD62L^{lo}, CD69⁺CD62L^{intermediate}, CD69^{lo}CD62L^{high} の三つの分画に分かれることが明らかとなった。免疫刺激によりヒト由来樹状細胞の集積が起こることが明らかとなっていたが、前年度のフローサイトメトリーや免疫組織染色により、この樹状細胞は SIRP α と DEC205 を発現する移住性樹状細胞であることが明らかとなった。UEA-1 陽性マウス由来上皮細胞は MHC classII の発現が低いことから、免疫後に拡大する髄質様の構造においてこの樹状細胞が主要な抗原提示細胞であることが示唆された。

申請者らはヒト CD133 陽性造血前駆細胞にレンチウイルス法により蛍光タンパク質 Venus を導入して NSG マウスに移植したところ最大 90% 以上の胸腺細胞に Venus 陽性であった。これらのマウスから胸腺を摘出し、explant 法により 2 光子励起レーザー顕微鏡で胸腺細胞の動態を観察した。その結果、胸腺細胞の平均速度の遅い区画と平均速度の速い区画が見出された。マウス胸腺細胞動態との類似性からそれぞれ皮質および髄質におけるヒト胸腺細胞の移動特性を示していると考えられた。免疫後の胸腺を摘出して explant 法にてライブイメージングをおこなうと、髄質に樹状細胞が集積しその周囲を胸腺細胞が周回しながら接触する様子が観察された。そこでインテグリン接着に重要な Rap1 の活性化を可視化するため Rap affinity probe を導入したところ、胸腺細胞と樹状細胞の接触面に Rap1 活性化が明瞭に観察された。この結果から末梢 T 細胞と抗原提示細胞との抗原依存的接着との類似性が指摘された。胸腺上皮細胞との接着とのを詳細に解析するた

めに髄質胸腺上皮細胞のマーカであるポドプラニンに対する蛍光標識抗体で染色し、蛍光染色した胸腺細胞を導入して胸腺細胞との接触を観察した。ポドプラニン染色により、髄質上皮細胞および髄質・皮質のジャンクションにおける上皮細胞 (jTEC) が可視化され、胸腺細胞と接触する様子が観察された。一方 BP-1 染色による皮質胸腺上皮細胞は、検出可能レベルであったが、解析するために検討が必要であった。今後上の実験系を用いて胸腺細胞と上皮細胞との接触を時空間的に観察していく予定である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

ex vivo でヒトにおける胸腺細胞の選択機構を詳細に解析する実験系は開発されておらず、ヒト化マウスにより不明であった胸腺の選択の過程・制御機構が明らかになることが期待される。また、胸腺細胞と胸腺上皮細胞との相互作用を直接的に観察する実験系を介して、胸腺細胞の分化の過程を胸腺環境の構築の観点から選択過程を詳細に解析することにより、胸腺細胞の分化、選択異常による自己免疫病の分子標的薬の開発に発展する可能性がある。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M, Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen, *J. immunol.*, 2017 199(12):3959-3971
2. Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol.* 196(7):3019-31.2016