

研究題目 1 細胞マルチオミクス手法を用いた胸腺上皮細胞の多様性解析

研究組織

研究代表者：吉田 英行（国立研究開発法人 理化学研究所 生命医科学研究センター）

共同研究者：松本 満 教授（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

生体の恒常性が維持される上で、免疫システムが病原微生物などに応答し、その排除に働くことは必要不可欠といえる。免疫システムが多様な病原微生物にもれなく応答するためには、遺伝子のランダムな再構成により形成されるリンパ球の多様性は重要であり、免疫システムの大きな特徴となっている。しかしながら、この多様性は、自己成分に反応する可能性も生じさせ、自己免疫疾患と呼ばれる病態を生じさせる諸刃の剣ともなる。

T リンパ球が胸腺内で分化増殖する過程において、自己反応性 T 細胞が除去される仕組みは「負の選択」と呼ばれ、自己成分への反応が抑制される「自己免疫寛容」状態が成立する上で、重要なメカニズムと考えられている。負の選択には胸腺髄質内に存在する胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cells: mTEC) が関わり、mTEC 特異的な転写因子 AIRE が重要であることが、松本教授らを含む複数のグループにより解明されてきた。

mTEC は MHCII や CD80 の発現レベルにより 2 つの細胞集団に分けることができ、これらの発現が高い細胞集団 (mTEChi) では、AIRE とともに数千種類にも及ぶ自己抗原遺伝子 (Peripheral Tissue Antigens: PTAs) の発現が誘導されている。AIRE 遺伝子を欠損するマウスでは、mTEChi での PTA 遺伝子発現が顕著に減弱し、自己免疫の表現型が観察される。これらの結果に基づき、AIRE により PTA の発現が直接誘導され、これらに反応した自己反応性の T リンパ球がアポトーシスにより死滅する (負の選択) モデルが考えられてきている。一方、松本教授らの研究により、Aire による mTEC の分化制御が

PTA 発現に関わることが示されており、Aire による PTA 発現誘導は mTEC の分化誘導の結果とも考えることができる。したがって、AIRE による PTA 遺伝子発現誘導のメカニズムを解明するためには、mTEC の分化を含めた理解が必要となる。

1 細胞遺伝子発現解析 (Single cell RNA-sequencing: scRNA-seq) は細胞の差異を 1 細胞レベルで解析し、細胞集団に含まれるサブポピュレーションを明らかにする手法であり、細胞分化を理解する助けとなる。松本教授らとの共同研究による scRNA-seq 解析では、mTEC には多くのサブポピュレーションが含まれ、一部のサブポピュレーションは Aire に依存することを報告している (Nishijima, H., et al. J Immunol, 2022)。しかしながら、これらサブポピュレーションの違いを形成するメカニズムを理解するためには遺伝子発現 (RNA) の解析のみでは不十分であり、Aire による mTEC 分化制御メカニズムを解明するには至っていなかった。

ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin-seq) 法によるクロマチン解析は細胞の特性をゲノムの制御という視点から調べる手法であり、RNA 解析と組み合わせることで細胞の差異を形成するメカニズムにも迫ることが可能となる。本共同研究では、1 細胞レベルで RNA 解析と ATAC-seq 法によるクロマチン解析を同時に行う「1 細胞マルチオミクス解析」を行い、mTEC のサブポピュレーションを形成するメカニズムや、AIRE がこれらサブポピュレーションの形成に及ぼす影響を解明することを目的とする。

[1-2] 研究の方法・経過

松本教授らが樹立した遺伝子改変マウスを理化学研究所へ分与後、理化学研究所（横浜）にて胸腺上皮細胞の単離・調整並びに解析を行った。1細胞マルチオミクス解析は10xGENOMICS社のChromiumシングルセルマルチオームATAC+遺伝子発現解析キットを利用して行い、オンラインディスカッションを含む緊密な連携を取りつつ、その結果の解釈を行った。

1細胞解析技術は発展途上にあり、実施やデータの解析には専門の技能や経験が求められる。一方、解析結果の解釈にはこれまでに蓄積されてきた知見が重要となる。長年にわたりmTEC研究を牽引されてきた松本教授との共同研究は「1細胞マルチオミクス手法を用いた胸腺上皮細胞の多様性解析」の遂行に必須であったと考える。1細胞マルチオミクス解析についての論文を共同執筆中であり、近日中の投稿予定である。

また、主な発表論文等に記載の通り、共同研究中の連携は1細胞マルチオミクス解析のみにとどまらず、令和3年度の共同研究はきわめて有意義な機会であったと考える。

【2】 研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

mTECを構成する各サブポピュレーションのそれぞれに異なる遺伝子発現パターンの詳細を明らかにすることができ、マルチオーム解析を行ったことで、異なる遺伝子発現パターン形成にはたらく制御メカニズムを推定することができた。また、松本教授らが樹立していた*Aire*ノックアウトマウスを組み合わせた解析を行い、AIREにより誘導されるPTA遺伝子には、直接誘導されていると推定される遺伝子群と、mTECの分化を介する遺伝子群が混在することを明らかにすることができた。これらの遺伝子群は、発現するサブポピュレーションや、共発現のパターンが異なり、それぞれに異なるメカニズムが働いていることが推定され、AIREによるPTA遺伝子発現誘導は、従来考えられていたような単一のメカニズムではないことが明らかになってきている。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

リンパ球の負の選択は自己免疫寛容が成立す

る上で重要なプロセスであり、その異常は自己免疫疾患を惹起しうる。本共同研究の結果は負の選択の根本的メカニズムであるPTA遺伝子発現がmTECの分化と密接に関連していることを示しており、これらの成果は、自己免疫疾患の原因究明にも進展をもたらすものと期待される。

また、これらの結果は、負の選択を真に理解するためにはmTEC分化メカニズムを含めた包括的理解が必要であることを示している。本共同研究では、mTEC分化に関連する種々の因子を同定しており、今後のmTEC分化メカニズムの解明に役立つものと考えられる。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1. Aire suppresses CTLA-4 expression from the thymic stroma to control autoimmunity. Morimoto J, Matsumoto M, Miyazawa R, Yoshida H, Tsuneyama K, Matsumoto M. Cell Rep. 38:110384 (2022)

2. Aire Controls Heterogeneity of Medullary Thymic Epithelial Cells for the Expression of Self-Antigens. Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hosomichi K, Akiyama N, Akiyama T, Oya T, Tsuneyama K, Yoshida H, Matsumoto M. J Immunol. 208:303-20 (2022)

[3-2] 学会発表

第50回日本免疫学会学術集会

1. Aire suppresses CTLA-4 expression from medullary thymic epithelial cells to avoid autoimmunity. Morimoto J, Matsumoto M, Miyazawa R, Yoshida H, Matsumoto M.

2. Aire controls heterogeneity of medullary thymic epithelial cells for the expression of self-antigens. Matsumoto M, Nishijima H, Morimoto J, Akiyama N, Akiyama T, Tsuneyama K, Yoshida H, Matsumoto M.

[3-3] 成果資料等

【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同研究は、最新のプロファイリング技術と免疫学研究の連携の有用性を示すものであった。本共同研究で培われた連携を今後の研究へとつなげていくことが肝要と考える。