

## 財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 秋山 泰身   
所属機関名：東京大学 医科学研究所  
所属部署名： 分子発癌分野 職名：准教授  
所 在 地： 東京都港区白金台 4-6-1  
電 話： 03-5449-5276 内線：75276

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

### 自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境と T 細胞の分化制御

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秋山 泰身	職名： 准教授
所属機関名： 東京大学 医科学研究所	部署名：分子発癌分野
中国側研究者氏名： Yu Zhang	職名： 教授
所属機関名： 北京大学	部署名：

4. 当該研究における発表論文等

なし

---

---

---

---

## 自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境と T 細胞の分化制御

研究者氏名 秋山泰身  
日本研究機関 東京大学医科学研究所  
中国側共同研究者 Yu Zhang  
中国研究機関 北京大学

### 要 旨

胸腺髄質上皮細胞は自己免疫疾患の抑制に必須と考えられている。これまで胸腺髄質上皮細胞は、自己臓器反応性 T 細胞が発生途中にアポトーシスにより除去することで自己免疫疾患の抑制を行っていると考えられてきた。ところが最近、胸腺髄質上皮細胞が、胸腺内の T 細胞の最終分化段階にも関与することが明らかとなってきた。そのメカニズムを解明するために、胸腺髄質上皮細胞の成熟に必須なシグナル伝達因子である TRAF6 を欠損するマウスにおいて、胸腺内の T 細胞の分化を検討したところ、髄質で起きる分化段階の中で、最終段階が抑制されていることが明らかとなった。ついで TRAF6 に依存して分化する胸腺髄質上皮細胞がどのような機構で T 細胞分化を制御するのか調べるために、TRAF6 の上流のサイトカインシグナルである RANKL が、*in vitro* で胸腺髄質上皮細胞を分化誘導する際に、発現が上昇誘導する遺伝子をマイクロアレイ法により同定した。その結果、RANKL 刺激依存的な胸腺髄質上皮細胞の分化誘導に伴い、I 型インターフェロンの 1 つ IFN $\beta$  および I 型インターフェロン誘導遺伝子群が誘導されるとの実験結果を得た。今後、I 型インターフェロンと T 細胞の胸腺内分化の関連、および胸腺髄質上皮細胞による自己免疫疾患の抑制における I 型インターフェロンおよびその誘導遺伝子の役割について検討することで、自己免疫疾患制御や T 細胞分化における新たな知見が得られると考えられる。

### 緒 言

個体の防御システムの 1 つである免疫系は、自己と非自己を巧妙に識別する。この識別機構は自己組織に対する免疫応答を抑制し、さらには食物などの無害な非自己に対しても免疫応答を抑制する。その一方で、外来病原体など有害な非自己のみならず癌のような有害な自己に対しても免疫応答は惹起する。これら識別機構の異常は、自己免疫疾患、アレルギー、癌などの難知性疾患発症の原因となり得る。

免疫系の識別機構がどのようにして成立するのか、未だに謎な部分が多く、その解明は基礎医学や免疫学における重要課題の 1 つである。また免疫系の識別機構を人為的に制御できれば、自己免疫疾患やアレルギーあるいは癌などの治療応用へと展開が期待できる。

獲得免疫応答に重要な T 細胞は、ほとんどが胸腺で分化成熟する。その際、自己に反応し得る T 細胞は胸腺で除去される。さらに、免疫反応を抑制する制御性 T 細胞も、そのほとんどが胸腺で分化する。これらの機構は、個体の自己-非自己識別機構に重要であり、その異常はヒトに自己免疫疾患を引き起こす(参考文献 1)。すなわち胸腺は T 細胞を産生するだけでなく、免疫系の自己-非自己識別能も制御していると考えられる。

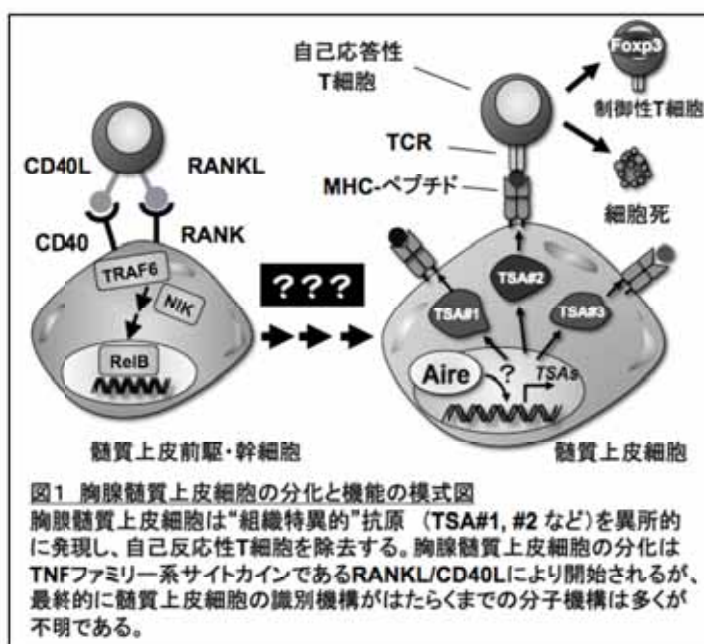


図1 胸腺髄質上皮細胞の分化と機能の模式図

胸腺髄質上皮細胞は“組織特異的”抗原 (TSA#1, #2 など) を異所的に発現し、自己反応性 T 細胞を除去する。胸腺髄質上皮細胞の分化は TNFファミリー系サイトカインである RANKL/CD40L により開始されるが、最終的に髄質上皮細胞の識別機構がはたらくまでの分子機構は多くが不明である。

胸腺が T 細胞の“識別能”を決定する上で重要なのが、T 細胞表面の抗原受容体(TCR)と抗原提示細胞の主要組織適合抗原 (MHC) ペプチド複合体との相互作用である。その際に抗原提示細胞として機能する細胞の一群が、胸腺の髄質領域に局在する「髄質上皮細胞」であり、他の細胞には見られないユニークな性質を持つ。すなわち、髄質上皮細胞は、(インシュリンのように) 特定組織に固有に発現するタンパク質を、微量であるが多種類にわたり「異所的に」発現する (図 1; 参考文献 2)。これまでに、髄質上皮細胞はこれら“組織特異的”抗原を、胸腺内で T 細胞へ“異所的”に提示することで、自己組織に応答する T 細胞を除去する、あるいは転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T 細胞の分化を誘導する、との仮説が提唱され (図 1)、この機構は個体の自己-非自己識別に必須と考えられている (参考文献 2)。実際、ヒト自己免疫疾患の原因遺伝子である Autoimmune regulator (AIRE) は髄質上皮細胞において、一部の組織特異的抗原の発現を制御することで自己免疫疾患を抑制する、と判明した (参考文献 3)。一方で、本研究課題の中国側の共同研究者である Yu Zhang 博士は、Aire 欠損マウスで T 細胞の最終分化が異常となることを発見している (参考文献 4)。この結果は、これまでに考えられていた機構以外に胸腺髄質上皮細胞による自己免疫疾患の抑制機構が存在することを示唆している。そこで本研究課題は、胸腺髄質上皮細胞の分化研究を行ってきた報告者と、胸腺髄質での T 細胞の最終分化を研究してきた中国側研究者とが情報交換しながら共同研究を行うことで、自己免疫に必要な胸腺髄質上皮細胞と T 細胞の分化機構の関連を明らかにすることを目的とした。

## 研究対象と方法

### <マウス>

TRAF6 欠損マウスは以前に報告したものをを用いた (参考文献 5)。胸腺器官培養に用いた胎仔マウスは、日本クレアより購入した妊娠マウスより調製した。

### <抗体、試薬類>

APC-Cy5 ラベル抗 CD4 抗体、PE-Cy5 ラベル抗 CD8 抗体、FITC ラベル抗 CD69 抗体、PE ラベル抗 Qa2 抗体はファージンより購入した。組み換え RANKL は和光純薬より購入した。

### <胎仔胸腺器官培養の調製と組み換え RANKL タンパク質による刺激実験>

胎生 14 日目の野生型 および TRAF6 遺伝子欠損の胎仔マウス胸腺を採取し、2'-DG (2'-Deoxyguanosine), 10%FBS を含む R10 培地に浮かべたフィルター上で 4 日間培養した。ついで組み換え RANKL の存在下、様々な時間培養した。培養した胸腺ストローマから RNeasy micro Kit (QIAGEN) を用いて、RNA を調製した。RNA は Superscript III cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いて、cDNA を合成した。cDNA を鋳型とし、各々の遺伝子に特異的なプライマーと Fast Start Universal SYBR-Green Master MIX を用いた SYBR-Green 法により、ABI 7300 Real time PCR system を用いて定量的 RT-PCR を行った。定量した値は各々のサンプルの Gapdh の発現量で補正した。

### <胸腺細胞の調製とフローサイトメーターによる解析>

生後約 14 日の TRAF6 欠損マウスおよび野生型コントロールマウスから胸腺を採取した。ついで得られた胸腺を、スライドグラスによりすりつぶし、胸腺細胞とした。胸腺細胞を蛍光ラベルした表面抗原抗体により常法に従って染色した。染色後、フローサイトメーター (FACS Calibur II; BD バイオサイエンス) により解析した。死細胞は 7-amino-actinomycin D により除外して解析した。

### <倫理的な考慮>

本研究課題ではヒトを対象とする研究は行っていない。マウスの飼育及び実験は東京大学の定める規定に従って行った。

## 結果

### 1. 胸腺髄質上皮細胞の形成が不全になる遺伝子改変マウスにおける T 細胞の後期分化

胸腺細胞は、その前駆細胞が胸腺に移入した後、いくつかの分化段階を経て、最終的にリンパ節など他の組織で免疫応答を

行う成熟した T 細胞へと分化する。その際、分化する T 細胞と胸腺内に存在する上皮細胞などの相互作用が重要となる。胸腺は皮質と髄質に分かれるが、胸腺に移した前駆細胞はまず皮質に移行し、CD4 と CD8 の両方の表面抗原を持つ T 細胞へ分化した後、髄質へ移行する。ついで T 細胞は胸腺髄質上皮細胞と相互作用することで、自己反応性 T 細胞が除去される。同時に T 細胞は髄質で、SP1 (6C10+CD69+Qa-2-)、SP2 (6C10+CD69+Qa-2-)、SP3(6C10-CD69-Qa-2-)、SP4(6C10-CD69-Qa-2+)の過程を経て分化する (参考文献4)。

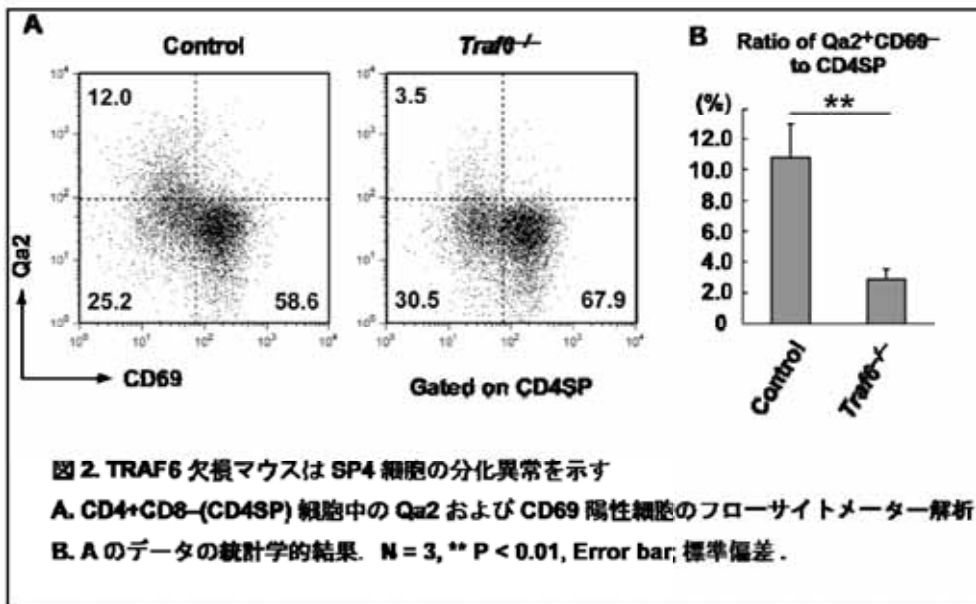


図2. TRAF6 欠損マウスは SP4 細胞の分化異常を示す

A. CD4+CD8-(CD4SP) 細胞中の Qa2 および CD69 陽性細胞のフローサイトメーター解析。  
B. A のデータの統計学的結果。N = 3, \*\* P < 0.01, Error bar; 標準偏差。

T 細胞の後期分化における胸腺髄質上皮細胞の役割を明らかにするために、成熟した胸腺髄質上皮細胞をほとんど持たない TRAF6 欠損マウス (参考文献5) について、CD4+CD8-画分内の CD69 と Qa-2 の発現をフローサイトメーターで検討した (図2)。野生型マウスでは、これまでの報告と一致して、SP1/SP2 画分、SP3 画分、SP4 画分に分離できた。一方、TRAF6 欠損マウスの胸腺では CD69-Qa-2+ の SP4 画分が有意に減少していた。

この結果は、TRAF6 依存的に分化した胸腺髄質上皮細胞は T 細胞の後期分化、特に SP3 から SP4 への移行に重要な役割を果たすことを強く示唆している。

## 2. RANK シグナル依存的に胸腺髄質上皮細胞で発現するサイトカインの同定

実験1の結果は、成熟した胸腺髄質上皮細胞は T 細胞の後期分化を制御していることを示しているが、その制御がどのような分子機構でなされているのか不明である。そこで TRAF6 依存的に胸腺髄質上皮細胞が分化するに伴い発現上昇するサイトカインを検討した。TRAF6 は

TNF レセプターファミリーからのシグナルを伝達し、NF- $\kappa$ B など転写因子を活性化するシグナル伝達因子である。胸腺髄質上皮細胞は TRAF6 の上流で機能する TNF レセプターファミリーメンバーの RANK のシグナルにより分化が誘導されることを以前に報告した (参考文献6)。これまでの報告者らの研究において、未熟な胸腺上皮細胞を含む胎仔胸腺ストローマ器官培養に TNF ファミリーに属する Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) を作用させ

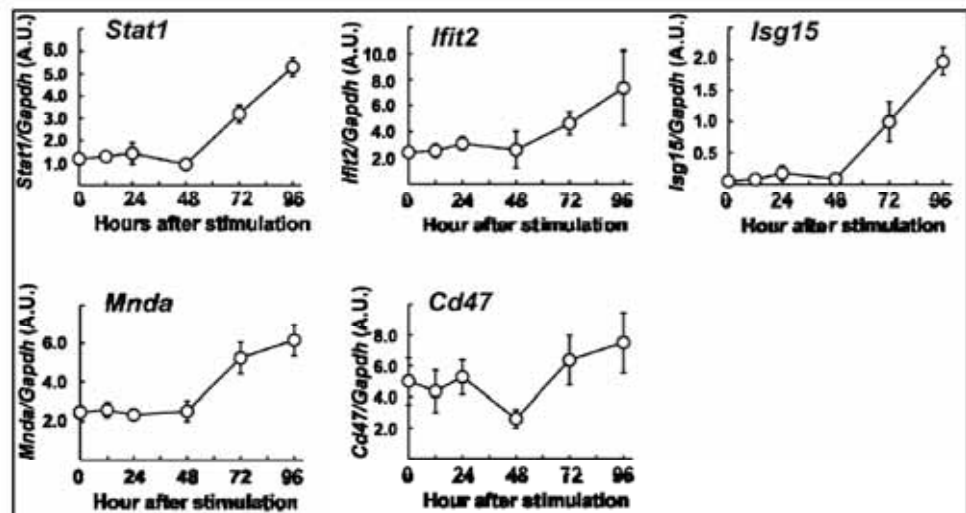


図3. 胸腺ストローマ器官培養における I 型インターフェロン誘導遺伝子の RANKL 依存的な発現変動

胎仔胸腺ストローマ (胎齢 14.5 日) に組み換え RANKL タンパク質 (1 $\mu$ g/ml) を作用させ、Stat1, Ifit2, Isg15, Mnda, CD47 の遺伝子発現を定量的な RT-PCR で検討した。

ることで成熟した胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導できることを見いだしている(参考文献6)。そこで、この実験系を利用して、髄質上皮細胞が分化するに伴い、変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定した。興味深いことに、それらの遺伝子群の中には、I型インターフェロンにより発現が誘導される遺伝子が多く含まれていた。まず、RANKL 依存的にこれらのI型インターフェロン誘導遺伝子が発現誘導することを確認するために、RANKL 刺激した胸腺ストローマ器官培養から得られるcDNA を定量的RT-PCR 法により解析した(図3)。その結果、複数のI型インターフェロン誘導遺伝子がRANKL 刺激依存的に誘導されることが証明した。

図3の結果は、I型インターフェロンが胸腺髄質上皮細胞でRANKL 依存的に発現誘導していることを示唆する。どこでI型インターフェロンの発現を定量的RT-PCR 法で解析したところ、胎仔胸腺ストローマでRANKL 依存的にIFN $\beta$ が発現誘導することが分かった(図4)。

### 考 察

本研究課題でTRAF6欠損胸腺の解析により、TRAF6シグナルに依存して分化した胸腺髄質上皮細胞がT細胞の後期分化を制御していることが明らかとなった。さらにTRAF6を活性化して胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導するRANKLシグナルは、胸腺上皮細胞より成る胸腺ストローマでI型インターフェロンであるIFN $\beta$ およびI型インターフェロン誘導遺伝子群が発現誘導されることが明らかとなった。I型インターフェロンは末梢組織でのT細胞の分化に関与することが知られているが、胸腺で機能については報告がなく、I型インターフェロンが胸腺内T細胞の分化や自己免疫応答性T細胞の除去にどのように関与するのか、引き続き検討を行っている。

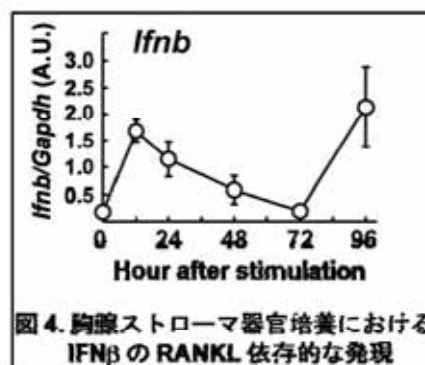


図4. 胸腺ストローマ器官培養におけるIFN $\beta$ のRANKL 依存的な発現

### 参 考 文 献

1. Kamradt T. et al., *N. Engl. J. Med.*, 344, 655-664 (2001)
2. Kyweski B & Klein L., *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 571-606 (2006)
3. Peterson P. et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 948-957 (2008)
4. Li J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 184, 18175-18180 (2007)
5. Akiyama T. et al. *Science* 308, 248-251 (2005)
6. Akiyama T\* *Immunity* 29, 423-437 (2008)