

課題番号 : 24指112
研究課題名 : 胸腺微小環境の分子理解に基づく獲得免疫システムの制御
主任研究者名 : 新田 剛
分担研究者名 : 鈴木 春巳

キーワード : 免疫、T細胞、胸腺、胸腺上皮細胞、マウス
研究成果 :

T細胞は獲得免疫システムの司令塔であり、外来病原体や腫瘍組織を特異的に攻撃することで、生体防御と生体維持において重要な役割を担う。T細胞は主として胸腺にて分化し、その分化プロセスは胸腺微小環境を形づくる胸腺上皮細胞によって制御されている。本研究では、胸腺上皮細胞の分化を制御する分子機構の解明と、胸腺上皮細胞による獲得免疫システム制御の分子基盤を理解することを目的とし、独自に樹立したT細胞分化異常を示す自然変異マウス *TN (T-lymphopenia of naïve population)* を対象として、その表現型と原因遺伝子の解析を行った。

昨年度の解析により、*TN* マウスの胸腺で $\gamma\delta$ T細胞の分化が変容していることが明らかになった。そこで $\gamma\delta$ T細胞について詳細な解析を進めたところ、*TN* マウスでは新生仔期に産生される $Vg6^+ \gamma\delta$ T細胞が増加し、出生後に産生される $Vg4^+ \gamma\delta$ T細胞が減少していた。 $Vg6^+ \gamma\delta$ T細胞と $Vg4^+ \gamma\delta$ T細胞は、*IL-17*産生能を有し、炎症応答に関与することが報告されている。*TN* マウスでは、 $Vg4^+ \gamma\delta$ T細胞依存的な皮膚炎の低下と $Vg6^+ \gamma\delta$ T細胞依存的な肺の炎症の亢進がみられ、*IL-17*産生 $\gamma\delta$ T細胞の分化異常によって末梢組織の炎症応答が変容していることが明らかになった。以上の結果より、胸腺皮質微小環境は *IL-17*産生 $\gamma\delta$ T細胞のレパトリア形成と末梢での炎症応答の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

昨年度に発見した *TN* マウスの原因候補遺伝子 *Psmb11* 遺伝子についてさらに解析を行った。*TN* マウスでは *Psmb11* 遺伝子コーディング領域内にアミノ酸置換 (G220R) を引き起こす一塩基置換が存在する。*TN* 変異型 *Psmb11* を皮質上皮細胞に発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、*TN* マウスと同様の胸腺低形成がみられた。よって、当該変異が *TN* マウスの疾患責任遺伝子であることが明らかになった。*Psmb11* は皮質上皮細胞に特異的に発現されるプロテアソームの触媒サブユニットをコードしている。*Psmb11* 欠損マウスの表現型との比較から、*TN* 変異型 *Psmb11* はドミナントネガティブ体として皮質上皮細胞を障害する可能性が示唆された。そこで *Psmb11* を培養細胞に発現させたところ、野生型 *Psmb11* はプロテアソームに組み込まれるのに対し、*TN* 変異型 *Psmb11* はプロテアソーム形成を阻害し、顕著な細胞死を誘導することが明らかになった。同様の現象は *TN* マウスの皮質上皮細胞においてもみられたことから、*Psmb11* の変異が皮質上皮細胞の細胞死を引き起こすことが強く示唆された。さらに、*PSMB11* の変異がヒトの疾患と関連する可能性を検討した。培養細胞を用いた実験から、ヒト *PSMB11* SNP のうち、G49S 変異体が *TN* 変異型とよく似たプロテアソーム形成異常を示すことがわかった。このヒト *PSMB11* 変異が胸腺皮質上皮細胞およびT細胞の分化に影響するかどうか調べるため、変異マウスの作製を進めている。

Subject No. : 2 4 指 1 1 2

Title : Molecular studies of thymic microenvironments that control T cell development

Researchers : Takeshi Nitta, Harumi Suzuki

Key word : Immunity, Thymus, T cells, thymic epithelial cell

Abstract :

The thymus is a primary lymphoid organ specialized to support development of T-lymphocytes (T cells). The thymic microenvironment, which mainly consists of cortical thymic epithelial cells (cTECs) and medullary thymic epithelial cells (mTECs), supports stepwise development and repertoire selection of T cells. To better understand the molecular mechanisms how thymic epithelial cells control T cell development, here we characterized a novel spontaneous mutant mouse strain, designated '*T-lymphopenia of naïve population (TN)*', which exhibits impaired T cell development due to defect of thymic microenvironment.

In the thymus of adult *TN* mice, cTEC deficiency caused a massive loss of thymic cellularity, impaired positive selection, altered $\alpha\beta$ TCR repertoire, and impaired invariant natural killer T (iNKT) cell development. Unexpectedly, the TCR repertoire of $\gamma\delta$ T cells was also affected by the lack of cTECs. Among interleukin (IL)-17-producing $\gamma\delta$ T cells, proportions of V γ 4 and V γ 6 were completely reversed, resulting in the perturbation of $\gamma\delta$ T-mediated inflammatory responses in peripheral tissues. These findings indicated that the thymic cortical microenvironment contributes to the shaping of the TCR repertoire not only of 'conventional' $\alpha\beta$ T cells but also of inflammatory 'innate' $\gamma\delta$ T cells.

Genome-wide linkage analysis and sequencing of candidate genes in the critical region revealed *TN* mouse strain harboring a spontaneous point mutation in the gene encoding β 5t, a cTEC-specific proteasome subunit. The mutant β 5t^{*TN*} inhibited normal proteasome assembly, resulting in substantial and specific loss of β 5t-expressing mature cTECs. Furthermore, we identified a SNP in human *PSMB11* gene that showed a proteasome assembly defect similar to that of β 5t^{*TN*}. Ongoing work is aimed at elucidating whether this SNP of human *PSMB11* impairs development of cTECs and T cells and causes any diseases.

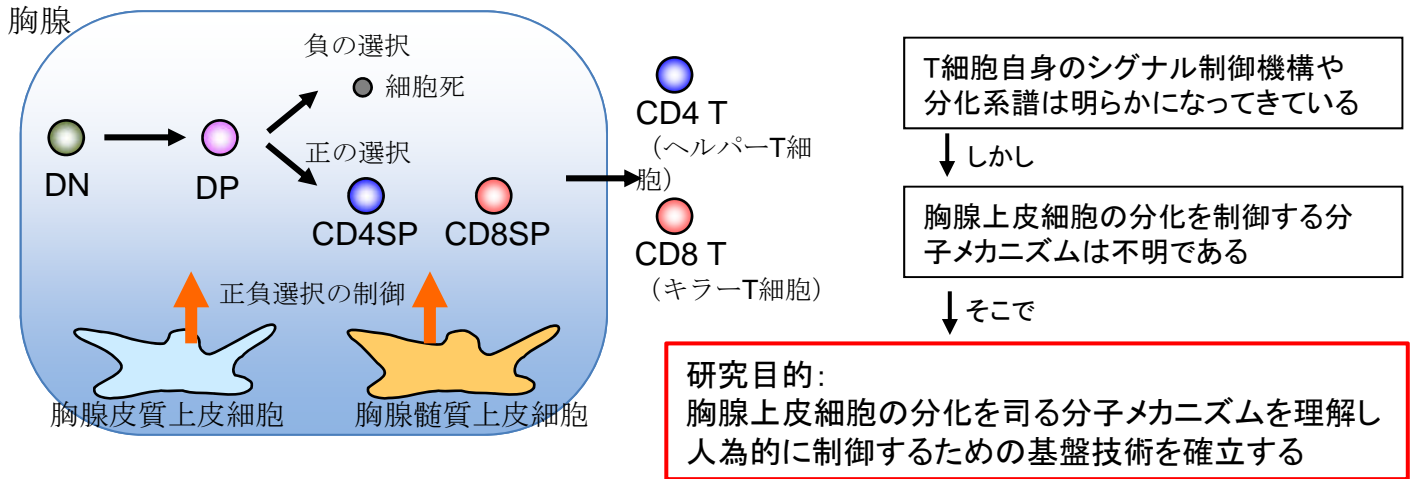
平成25年度 中間報告

課題番号: 24指112

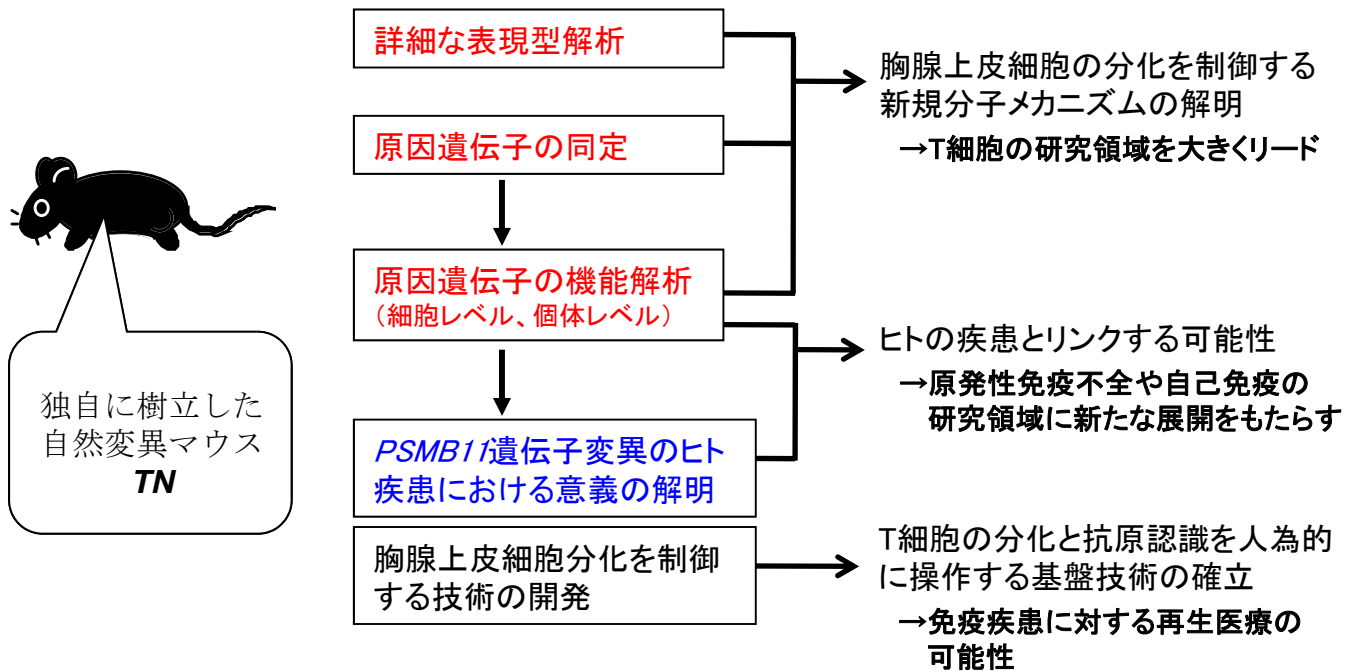
研究課題名: 胸腺微小環境の分子理解に基づく獲得免疫システムの制御

主任研究者: 新田 剛

研究の背景: 胸腺におけるT細胞の分化・選択



研究の方法と期待される成果



赤字は現在までに成果が得られた研究内容。

青字は現在着手している研究内容。

研究成果

原因遺伝子の同定

- *TN*マウスの原因遺伝子は、*Psmb11*遺伝子のミスセンス変異であった。
- *Psmb11*は皮質上皮細胞に特異的に発現するプロテアソームの触媒サブユニットをコードしている。

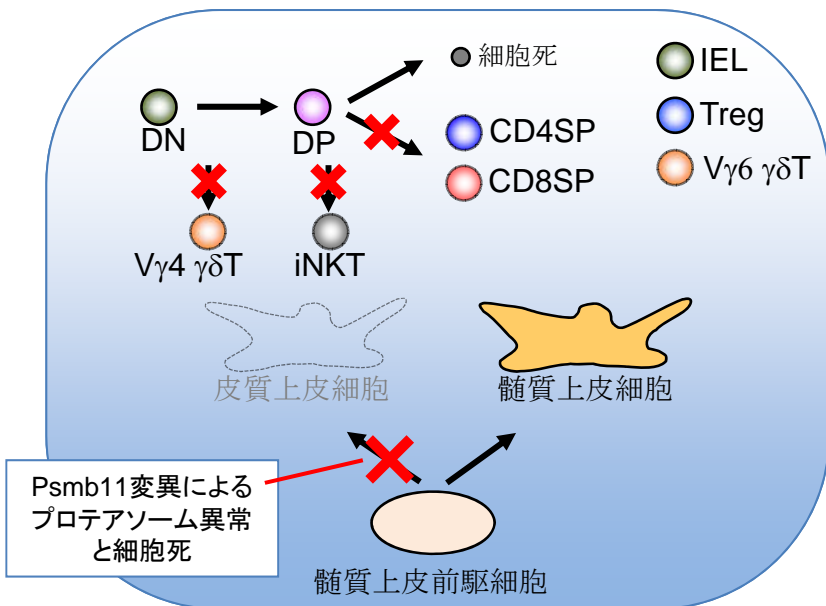
原因遺伝子の機能解析

- 培養細胞株において、*TN*変異型*Psmb11*はプロテアソーム形成を阻害し、細胞死を引き起こした。
- *TN*マウス胎仔胸腺では、プロテアソーム形成阻害と細胞死の増加がみられた。

*PSMB11*遺伝子変異のヒト疾患における意義の解明

- *PSMB11* G49S変異体は、培養細胞株において、*TN*変異型と似たプロテアソーム形成阻害および細胞死を引き起こした。
- G49Sノックインマウスを作製中である。

TNマウス胸腺



*Psmb11*変異による皮質上皮細胞の分化障害のメカニズムが明らかになった。

ヒト*PSMB11* G49S変異が*TN*変異と似たプロテアソーム形成障害と細胞死を示した。

↓ 今後の課題

ヒト*PSMB11*の変異が免疫疾患の原因となる可能性を検証する必要がある。

2013年6月以降の研究発表

学会発表(国際学会)

1. **Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki**, "A missense mutation in *Psmb11* impairs thymoproteasome assembly and T cell development", **The 35th Naito Conference "The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles"**, 札幌, 2013年7月9-12日. 優秀ポスター賞(内藤記念特定研究助成金)受賞
2. **Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki**, "Novel mutant mice lacking cortical thymic epithelial cells", **The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013**, 京都, 2013年6月3-7日.

課題番号 : 24指112
研究課題名 : T細胞分化障害を示す新規変異マウスのリンパ球の解析
(主任研究者名 : 新田 剛)
分担研究者名 : 鈴木 春巳

キーワード : 免疫、T細胞、胸腺、胸腺上皮細胞、マウス

研究成果 :

T細胞は獲得免疫システムの司令塔であり、外来病原体や腫瘍組織を特異的に攻撃することで、生体防御と生体維持において重要な役割を担う。T細胞は主として胸腺にて分化し、その分化プロセスは胸腺微小環境を形づくる胸腺上皮細胞によって制御されている。本分担研究では、胸腺上皮細胞による獲得免疫システム制御の分子基盤を理解することを目的とし、独自に樹立した胸腺皮質上皮細胞の分化異常を示す自然変異マウス *TN (T-lymphopenia of naïve population)* を対象として、そのリンパ球分化における表現型解析を行った。

*TN*マウスの胸腺では、胎仔期から成体期まで一貫して皮質上皮細胞の数が著しく減少していた。一方、髄質上皮細胞の分化と機能成熟は正常であった。同様の表現型は胎仔胸腺器官培養においても観察されたことから、*TN*マウスでは皮質上皮細胞に特異的かつ固有の異常が生じていることが明らかになった。*TN*マウスでは、abT細胞 (CD4 T細胞およびCD8 T細胞) の正の選択が障害され、TCRレパトアが大きく変容していた。一方で、abT細胞の負の選択、制御性T細胞および腸管上皮間リンパ球 (IEL) の産生は正常に起こっていた。また、*TN*マウスでは、iNKT細胞の胸腺内分化が低下し、末梢iNKT細胞が激減していた。

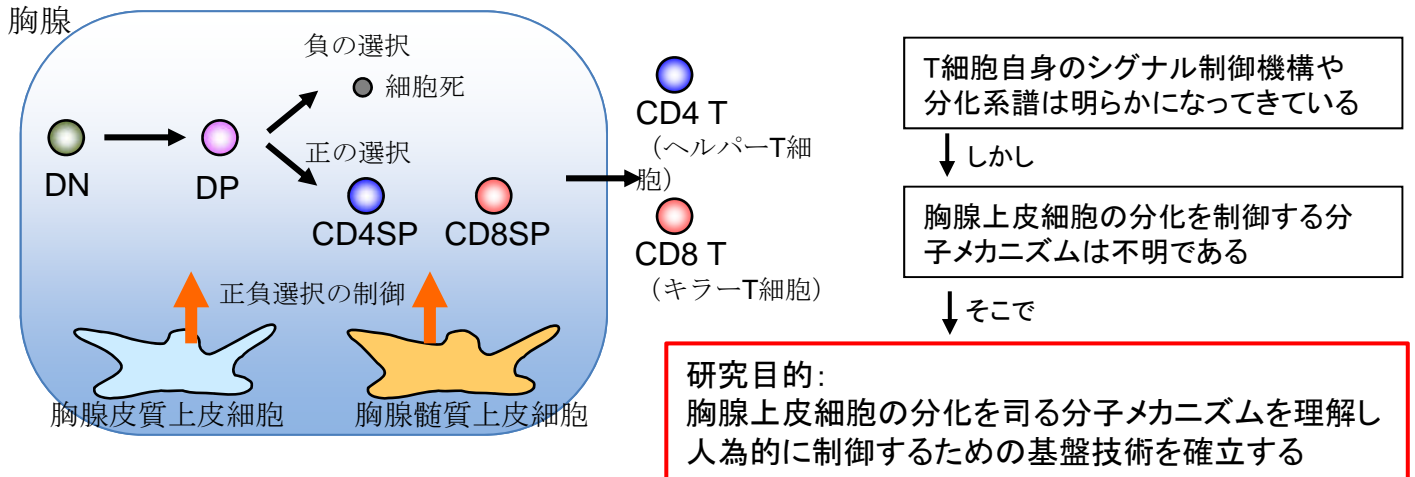
平成25年度 中間報告

課題番号: 24指112

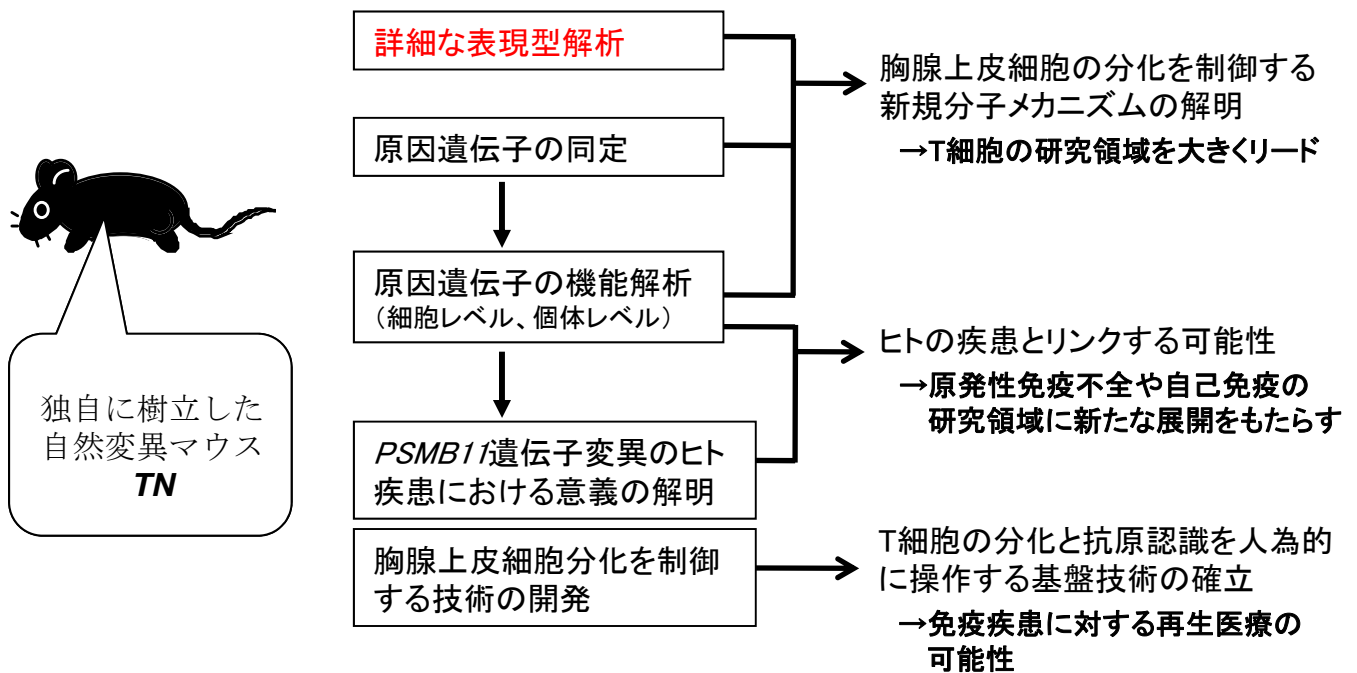
研究課題名: 胸腺微小環境の分子理解に基づく獲得免疫システムの制御

主任研究者: 鈴木 春巳

研究の背景: 胸腺におけるT細胞の分化・選択



研究の方法と期待される成果

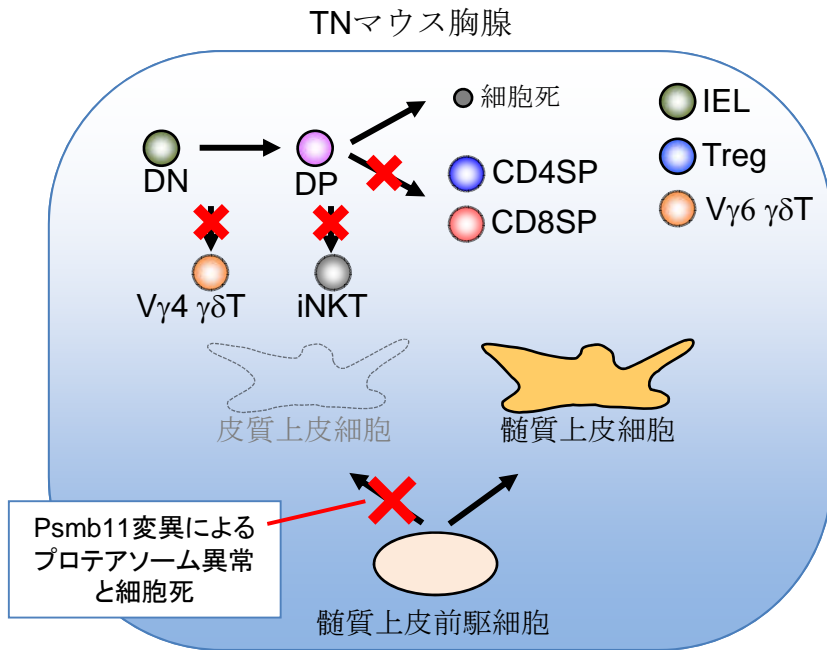


赤字が分担部分

研究成果

詳細な表現型解析

- TNマウス胸腺では、皮質上皮細胞の分化が特異的に障害されていた。
- TNマウス胸腺では、 $\alpha\beta$ T細胞およびiNKT細胞の分化が低下していた。またIL17産生 $\gamma\delta$ T細胞のTCRレパトアが変化していた。
- $\gamma\delta$ T細胞依存的な炎症応答が変化(低下または亢進)していた。



皮質上皮細胞が $\alpha\beta$ T細胞、iNKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞の分化を制御することが明らかになった。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指112

研究課題名： 胸腺微小環境の分子理解に基づく獲得免疫システムの制御

主任研究者名： 新田 剛

論文発表

| 論文タイトル | 著者 | 掲載誌 | 掲載号 | 年 |
|--|---|----------------|--------|------|
| Differential function of Themis CABIT domains during T cell development. | #Okada, T., #Nitta, T., Kaji, K., Takashima, A., Oda, H., Tamehiro, N., Goto, M., Okamura, T., Patrick, M.S., *Suzuki, H. | PLoS One | e89115 | 2014 |
| Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. | Yano, K., Carter, C., Yoshida, N., Abe, T., Yamada, A., Nitta, T., Ishimaru, N., Takada, K., Butcher, G.W., *Takahama, Y. | Eur J Immunol, | 44 | 2014 |
| Thymic medullary epithelium and thymocyte self-tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways. | 3. Williams, J.A., Zhang, J., Jeon, H., Nitta, T., Ohigashi, I., Klug, D., Kruhlak, M.J., Choudhury, B., Sharrow, S.O., Granger, L., Adams, A., Eckhaus, M.A., Jenkinson, S.R., Richie, E.R., Gress, R.E., Takahama, Y., *Hodes, R.J. | J Immunol, | 192 | 2014 |

学会発表

| タイトル | 発表者 | 学会名 | 場所 | 年月 |
|--|------------------------------|------------------------------|----|---------|
| 胸腺皮質上皮細胞による γ δ T細胞の分化制御 | 新田 剛、室 龍之介、新田 幸子、小田 浩代、鈴木 春巳 | 第24回 Kyoto T Cell Conference | 京都 | 2014年5月 |
| 胸腺皮質上皮細胞による γ δ T細胞のレパトア制御 | 新田 剛 | 第23回東京免疫フォーラム | 東京 | 2013年2月 |

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

| タイトル | 発表者 | 発表先 | 場所 | 年月日 |
|------|-----|-----|----|-----|
| 該当なし | | | | |

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

| 発明名称 | 登録番号 | 特許権者(申請者) (共願は全記載) | 登録日(申請日) | 出願国 |
|------|------|-----------------------|----------|-----|
| 該当なし | | | | |

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。