

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 : 為広 紀正、(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。つまり、胸腺上皮細胞の分化制御メカニズムを理解することは、原発性免疫不全や自己免疫疾患の克服、新興感染症への対応、移植臓器拒絶の制御といった現在の高度医療が直面する諸課題の克服のみならず、iPS細胞を用いた免疫システムの再構築といった将来の基盤技術開発にとって、きわめて必要性の高い研究課題と位置づけられる。

そこで本研究では、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。当該変異マウスの表現型は過去に類例がなく、新規の遺伝子変異に起因すると考えられる。したがって、胸腺上皮細胞の分化と機能を制御する新規な分子メカニズムが存在する事が予測され、胸腺上皮細胞の個体レベルの免疫系の維持や感染防御における役割の解析により、ヒトにおける免疫システムの制御および免疫関連疾患の克服に向けた基盤技術の開発を目指す。つまり、胸腺上皮細胞の分化を制御する未知の分子メカニズムを明らかにする事で、獲得免疫システムの構築と機能の理解、およびそれらの人為的制御を視野に入れた基盤技術開発に資することを目的とした。

我々の飼育施設の野生型 B6 コロニー内に、T細胞分化異常をきたす自然変異マウスを発見し、この系統を *TN* と命名した。胸腺組織切片の解析から、*TN* マウスの胸腺には、胸腺皮質上皮細胞マーカーである CD205、Ly51、keratin 8 などの発現がほとんど検出されないことがわかった。このことは、フローサイトメーターによる定量的解析によっても裏付けられている。一方、胸腺髄質上皮細胞マーカーである UEA1 や keratin5、keratin 14 については、野生型マウスと同様の陽性細胞が検出された。胎仔期および新生仔期の胸腺についても調べたところ、野生型マウスでは胎齢 16 日目から皮質上皮細胞の分化がみられるのに対し、*TN* マウスでは全くみられなかった。従って、*TN* マウスの胸腺では皮質上皮細胞の分化が著しく障害されていることが明らかとなった。

さらに我々は、*TN* マウスでは胸腺の  $\alpha\beta$  T細胞分化に障害が認められる一方で、正常な胸腺にはほとんどみられない  $CD44^+CD25^{low}$   $\gamma\delta$  T細胞が増加している事を発見した。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* マウスでは野生型マウスに比べ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細胞が減少しており、 $\gamma\delta$  T細胞の TCR レパトアが大きく変化している事が分かった。 $Vg1^+$   $\gamma\delta$  T や  $Vg5^+$   $\gamma\delta$  T については頻度に大きな変化は認められなかった。更なる詳細な解析から、*TN* マウス胸腺における  $Vg6^+$   $\gamma\delta$  T細胞は  $CD27^-CD44^+CCR6^+$  細胞の機能的に成熟した細胞集団である事が示され、また、 $Vg4^+$   $\gamma\delta$  T細胞では  $Vg4^+$   $\gamma\delta$  T細胞分化の制御因子である Sox13 の発現が *TN* マウスで低下している事が確認された。これらの  $\gamma\delta$  T細胞レパトアの変化は、髄質上皮細胞の分化が欠損 (MHC 欠損) または亢進 (可溶性 RANKL トランスジェニック) したマウスでは認められず、皮質上皮細胞の欠損に特異的にみられる現象であった。 $Vg6^+$   $\gamma\delta$  T細胞と  $Vg4^+$   $\gamma\delta$  T細胞はいずれも、IL-17 産生能を有しており、炎症応答に関与することが報告されている。実際に、イミキモド (IMQ) で惹起した  $Vg4^+$   $\gamma\delta$  T細胞依存的な乾癬様の皮膚炎が *TN* マウスで減弱する事、結核菌の細胞壁糖脂質成分であるトレハロースジミコレート (TDM) で惹起した  $Vg6^+$   $\gamma\delta$  T細胞依存的な肺での炎症が *TN* マウスで亢進する事が認められ、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、胸腺皮質微小環境を構成する cTEC は

IL-17 産生  $\gamma$   $\delta$  T 細胞のレパト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。

胸腺低形成や T 細胞分化障害といった TN マウスの表現型はヘテロ個体でもみられ、家系解析によって単一遺伝子による常染色体優性遺伝であることが確認された。TN マウスの原因遺伝子を同定するため、連鎖解析によって特定された候補領域中の全塩基配列（14 番染色体上の約 11 Mb 領域）を対象とした次世代シーケンサーによるゲノム配列の解析を試みた。その結果、*Psmb11* 遺伝子のコーディング領域にアミノ酸置換（G220R）をもたらす一塩基置換を発見した。この単一変異によって TN マウスの表現型が引き起こされているか特定するため、CRISPR/cas9 システムによって TN ヘテロマウスの変異アレルを特異的に破壊したマウス、および変異アレルを野生型に置換したマウスを作製したところ、胸腺形成や皮質上皮細胞の分化が完全に回復した。従って、当該変異が TN マウスの疾患責任変異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  $\beta$ 5t をコードしている。*Psmb11* 欠損マウスのプロテアソームには  $\beta$ 5t の代わりに  $\beta$ 5i が組み込まれることから TN マウスと同様の表現型は認められない。TN マウスではヘテロ個体でも顕著な T 細胞分化異常が観察されたことから、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の分化を障害する可能性が示唆された。そこで培養細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入により *Psmb11* を過剰発現させたところ、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* は正常な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認められたことから、TN マウスにおける皮質上皮細胞の欠損は、*Psmb11* 変異による皮質上皮細胞特異的な細胞死によるものであると結論づけられた。

さらに、*PSMB11* 変異が疾患と関連する可能性を検討したところ、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明らかとなった。詳細には、ヒトおよびマウス培養細胞を用いた解析から G49S 変異体はプロテアソームに組み込まれるものの、野生型よりも高い触媒活性を示すことがわかった。本 SNP は公開されているヒト *PSMB11* 遺伝子の SNP のうち、日本人で特に頻度が高い（アレル頻度 3%）変異である。このヒト *PSMB11* 変異 G49S 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個体レベルで調べるため、CRISPR/Cas9 系を用いてノックインマウスを作製したところ、G49S 変異マウスは正常な胸腺形成を示したが、CD8 T 細胞の正の選択が著しく阻害され、TCR レパトアが大きく変化していることが明らかになった。以上の結果より、G49S 変異は *Psmb11* の機能を変化させ、CD8 T 細胞のレパトア形成を介して健康や疾患感受性に影響する可能性が示唆された。

胸腺は分化途上の T 細胞と、それらを取りまいて支持し T 細胞の分化と選択の制御を担う胸腺上皮細胞が作り出す胸腺微小環境によって構成されている。本研究では、T 細胞分化異常を示す新たな胸腺皮質上皮細胞欠損マウス（自然変異 TN マウス）の解析により、胸腺微小環境を構成する細胞の一つである胸腺上皮細胞の未知な役割について言及し、ヒトにおける免疫システムの構築や免疫関連疾患との相関を明らかにする事を目的に解析を進めてきた。胸腺皮質上皮細胞を欠損した TN マウスでは、 $\alpha$   $\beta$  T 細胞のレパトア形成への影響に加えて、iNKT 細胞の分化低下や  $\gamma$   $\delta$  T 細胞のレパトアが変容していた。特に、皮質上皮細胞による IL-17 産生  $\gamma$   $\delta$  T 細胞レパトアと炎症応答の制御は、これまでにない新しい知見であり、想定以上の大きな進展といえる。

さらに我々は TN マウスにおける皮質上皮細胞分化異常の疾患責任遺伝子として *Psmb11*<sup>G220R</sup> を同定した。本分化阻害におけるしくみは、*Psmb11* 遺伝子変異によって齎されるプロテアソーム形成異常が細胞死を誘導する事であると明らかになった。また、原因遺伝子を同定する過程で採用した CRISPR/Cas9 法は、当センターにおける遺伝子改変マウス作製の体制作りに不可欠な貢献を果たした。さらに本手法を用いて作製したヒト *PSMB11* 遺伝子の SNP のノックインマウスは表現型解析を完了し、CD8 T 細胞のレパトア形成への影響を明らかにした。従って、ヒト型 *PSMB11* 遺伝子変異による皮質上皮と T 細胞分化の関連についても進捗しており、概ね当初の計画通り解析が進行したといえる。その他のヒト *PSMB11* SNP と免疫疾患との関連については、現在も解析を継続中であり今後の成果が期待できる。

Subject No. : 2 4 指 1 1 2

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

Researchers : Norimasa Tamehiro, Harumi Suzuki, (Takeshi Nitta)

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

The thymic microenvironment is a three-dimensional cellular architecture composed of a set of stromal cells, including thymic epithelial cells (TECs), which guide the development and repertoire formation of T cells. In the thymus, there are two anatomically discrete environments, the cortex and medulla, that contain phenotypically and functionally different TEC subsets called cortical TECs (cTECs) and medullary TECs (mTECs), respectively. cTECs form a cortical meshwork densely filled with CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes undergoing repertoire selection. Positively selected CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes migrate into the medulla, where mTECs filter out self-reactive SP thymocytes by negative selection. This stepwise developmental process across the distinct microenvironments achieves the development of αβT cells with a diverse yet self-tolerant T-cell receptor (TCR) repertoire.

A series of studies has revealed the importance of mTECs in the establishment of T-cell tolerance, but the physiological significance of cTECs has been less addressed, partly because of a few reports on cTEC-deficient mice. Thus, whether and how cTECs contribute to the development and function of the immune system, other than in the context of positive selection of αβT cells, remains to be elucidated. In addition to the conventional and unconventional αβT-cell lineages, the thymus also supports the development of γδT cells. In fact, development of Vγ5<sup>+</sup> γδT cells was shown to be dependent on Skint1 expressed on mTECs. Recent studies have paid particular attention to a subpopulation of γδT cells as an important source of interleukin (IL)-17 in various infections or inflammatory disorders, although regulation of the development of IL-17-producing γδT cells in the thymus remains largely unclear.

We have found that a spontaneous mutant mouse line that exhibited a T lymphopenia in our in-house breeding colony of C57BL/6 mice. These mice showed a significant reduction of CD3<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup> naïve T cells in peripheral blood, with no apparent defects in growth or reproduction. We named this mouse strain “*T lymphopenia of naïve population (TN)*”. After several generations of in- and outbreeding, we found that the T lymphopenia was inherited as an autosomal dominant trait. Compared with wild-type, *TN* mice had strikingly smaller thymi and markedly reduced numbers of total thymocytes. The frequency of CD4SP and CD8SP mature thymocytes was significantly reduced in *TN* mice, whereas the frequency of DP thymocytes was unchanged. Bone marrow cells from *tn/tn* mice readily reconstituted thymocyte development in irradiated wild-type mice, whereas *+/tn* and *tn/tn* host mice did not support thymocyte development of wild-type bone marrow cells, indicating that non-hematopoietic stromal cells, likely thymic stromal cells, are responsible for the impaired T-cell development in *TN* mice. In the thymus from *tn/tn* mice, the contrast and boundary between cortex (wherein DP thymocytes localize) and medulla (wherein CD4SP and CD8SP thymocytes localize) were clearly detectable as seen in wild-type thymus. However, CD205<sup>hi</sup>UEA1<sup>-</sup> cTECs were nearly complete loss in *tn/tn* thymus, whereas CD205<sup>lo</sup>UEA1<sup>+</sup> mTECs were detectable. Development of cTECs also failed in *in vitro* organ culture of E14.5 fetal thymus, indicating that this defect was thymus-intrinsic. The most prominent population of TECs from *tn/tn* mice was CD205<sup>lo</sup>UEA1<sup>-</sup> cells that showed low surface expression of MHC class II. As the expression of MHC class II gradually increases along the maturation process of TECs, our results indicate that

Researchers には、分担研究者を記載する。

CD205<sup>lo</sup>UEA1<sup>-</sup> cells in *tn/tn* mice are immature progenitors and that *tn/tn* mice are defective in the generation of mature cTECs from immature TEC progenitors.

By linkage analysis followed by deep sequencing of the entire 11 -Mb candidate region on chromosome 14, we identified a homozygous missense mutation in *tn/tn* mice in the *Psmb11* gene, the gene that encodes the cTEC -specific proteasome subunit  $\beta 5t$ . This mutation is a G to A nucleotide substitution, which causes a codon change (G220R). To confirm that the *Psmb11*<sup>G220R</sup> mutation was primarily responsible for the *TN* phenotypes, we performed CRISPR/Cas9 -mediated genome editing in mice. A single nucleotide reversion from *Psmb11*<sup>G220R</sup> to *Psmb11*<sup>WT</sup> in *+/tn* mice completely restored thymocyte cellularity and development of mature cTECs up to wild -type levels. These results clearly indicate that the *Psmb11*<sup>G220R</sup> is the causative mutation responsible for the *TN* phenotype.  $\beta 5t$  is a proteasome subunit exclusively expressed in cTECs that forms an atypical type of proteasome, termed the “thymoproteasome”. It was quite unexpected that the single amino acid substitution of  $\beta 5t$  could account for such severe defects, because mice lacking  $\beta 5t$  showed normal cTEC development by the redundant complementation with another subunit  $\beta 5i$ . Along with the fact that heterozygous *+/tn* mice also exhibited the *TN* phenotype, it is evident that the G220R mutation of  $\beta 5t$  has a dominant -negative effect, instead of a loss -of -function effect. To examine the effect of the G220R mutant on thymoproteasomes, we utilized retroviral expression of  $\beta 5t$  in  $\beta 5i$  -deficient mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. The mutant  $\beta 5t$ <sup>G220R</sup> protein was not proteolytically processed to its mature form, nor was it assembled with other subunits. Its expression resulted in the accumulation of proteasome assembly intermediates. These results indicate that the  $\beta 5t$ <sup>G220R</sup> mutant protein disturbs normal proteasome assembly in cTECs. In fact, impaired thymoproteasome assembly was observed *in vivo* in fetal thymus from *tn/tn* mice. Consistent with an absolute requirement of proteasome activity for cell survival, exogenous expression of  $\beta 5t$ <sup>G220R</sup> induced cell death in different cell types in a dose -dependent manner. Indeed, in *tn/tn* neonatal thymus, mature  $\beta 5t$ <sup>hi</sup> cTECs were specifically absent, while immature  $\beta 5t$ <sup>med/lo</sup> TEC populations remained. Finally, residual cTECs in fetal thymus from *tn/tn* mice exhibited higher accumulation of polyubiquitinated proteins and a higher occurrence of cell death than those from wild -type mice. Collectively, we concluded that  $\beta 5t$ <sup>G220R</sup> mutant protein inhibits normal proteasome assembly and thus induces cell death in mature cTECs that highly express  $\beta 5t$ . Thus, *TN* mice represent a  $\beta 5t$  -driven, novel mouse model of cTEC deficiency.

The findings described above prompted us to utilize *TN* mice to study the significance of cTECs in T -cell development and the immune system *in vivo*. First, we observed that thymic cellularity was associated with the expansion of mature cTECs during ontogeny. In E14.5 fetal thymus, there were no differences in thymic cellularity or epithelial architecture between wild -type and *tn/tn* mice. After E16.5, *tn/tn* mice exhibited reduced thymic cellularity, which coincided with the impaired maturation of cTECs. These results indicate the requirement of mature cTECs for maximizing the size of the thymus. We next examined  $\alpha\beta$ T -cell development. In mice expressing either polyclonal or monoclonal TCRs (OT -I and OT -II), TCR $\beta$ <sup>hi</sup>CD69<sup>+</sup> post -selected DP thymocytes and CD4SP or CD8SP thymocytes were markedly reduced, indicating that positive selection of  $\alpha\beta$ T cells was impaired in *tn/tn* mice. The  $\alpha\beta$ T cells that developed in *tn/tn* mice carried an altered TCR repertoire, as the distribution of TCR -V $\alpha$  and TCR -V $\beta$  in splenic T cells and SP thymocytes was significantly different between wild -type and *tn/tn* mice. By contrast, negative selection mediated by mammary tumor virus (*mtv*) -encoded superantigen was not affected in *tn/tn* mice. These results indicate that mature cTECs are required for positive selection and repertoire formation, but dispensable for negative selection, of  $\alpha\beta$ T cells,

Researchers には、分担研究者を記載する。

which is consistent with previous findings. We also found a significant reduction of iNKT cells in the thymus, liver, and spleen from *tn/tn* mice. The ratio of thymic iNKT to DP cells was markedly reduced in *tn/tn* mice, indicating that development of iNKT cells from DP thymocytes is impaired in the absence of mature cTECs. The frequency of Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in CD4SP thymocytes and their distribution in the thymic medulla were similar between wild-type and *tn/tn* mice. We also found no significant reduction in the frequencies of TCRβ<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> thymic CD8αα<sup>+</sup> IEL precursors or IEL subpopulations, including CD8αα<sup>+</sup>TCRαβ IELs, isolated from small intestine. These results indicate that the thymic development of Tregs and IELs does not require mature cTECs.

Lastly, we addressed γδT-cell development in *tn/tn* mice. Although the proportion of Vγ5<sup>+</sup> and Vγ1<sup>+</sup> cells among thymic γδT cells was largely unchanged between wild-type and *tn/tn* mice throughout ontogeny, development of Vγ6<sup>+</sup> and Vγ4<sup>+</sup> cells was dramatically altered in postnatal thymus from *tn/tn* mice. Vγ6<sup>+</sup> cells continued to expand after birth and their numbers exceeded those from wild-type thymus at 5 weeks old. In contrast, Vγ4<sup>+</sup> cells in *tn/tn* thymus did not show the robust postnatal increase that was apparent in wild-type thymus. Vγ6<sup>+</sup> and Vγ4<sup>+</sup> cells include an IL-17-producing subset, termed γδT17, whose development is restricted to the thymus during late embryonic and neonatal stages; they also contribute to the pathogenesis of inflammation in the periphery. In adult *tn/tn* mice, the proportion of IL-17-producing cells among γδT cells was greatly increased. Among these γδT17 cells, the Vγ6<sup>+</sup> subset vigorously increased, whereas the Vγ4<sup>+</sup> subset substantially decreased, resulting in the marked skewing from Vγ4 to Vγ6 in TCR repertoire of γδT17 cells from *tn/tn* mice. The altered repertoire of γδT cells in *tn/tn* mice was due to neither β5t deficiency nor reduced mTEC development, as the proportion of Vγ4<sup>+</sup> and Vγ6<sup>+</sup> cells was unaffected in β5t-deficient mice and mTEC-reduced, MHC-deficient mice, and the altered γδT-cell repertoire in *tn/tn* mice was not restored by sRANKL-mediated enhancement of mTEC differentiation. To explore the significance of the alteration in thymic γδT cells, we examined the distribution and function of peripheral γδT cells. In adult *tn/tn* mice, Vγ6<sup>+</sup> cells in lung were robustly increased, whereas Vγ4<sup>+</sup> cells were markedly reduced in lung, skin, spleen, and lymph nodes. Lung Vγ6<sup>+</sup> γδT17 cells have been reported to trigger the inflammation induced by trehalose 6,6'-dimycolate, a cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. Indeed, in response to TDM administration, *tn/tn* mice exhibited enhanced acute inflammatory responses in lung, including the production of IL-17 mRNA, organ swelling, and granuloma formation. To the contrary, in the skin, psoriasis-like dermatitis induced by imiquimod (IMQ), in which Vγ4<sup>+</sup> γδT17 cells that expand in lymph node and home to inflamed skin play a crucial role, was significantly attenuated in *tn/tn* mice. These results indicate that the γδT cells generated in the absence of mature cTECs express an altered TCR repertoire that fails to properly mount inflammatory responses.

In this study, we established a novel mouse model, designated **TN** mice, which intrinsically lacks mature cTECs. We identified the G220R mutation of β5t as being primarily responsible for cTEC deficiency in **TN** mice. Thus, **TN** is a β5t-driven, mature cTEC-deficient mouse strain, which will be useful to investigate the physiological significance of cTECs, leading to unveil developmental rules for γδT cells that can be applied to γδT-cell-based immunotherapies.

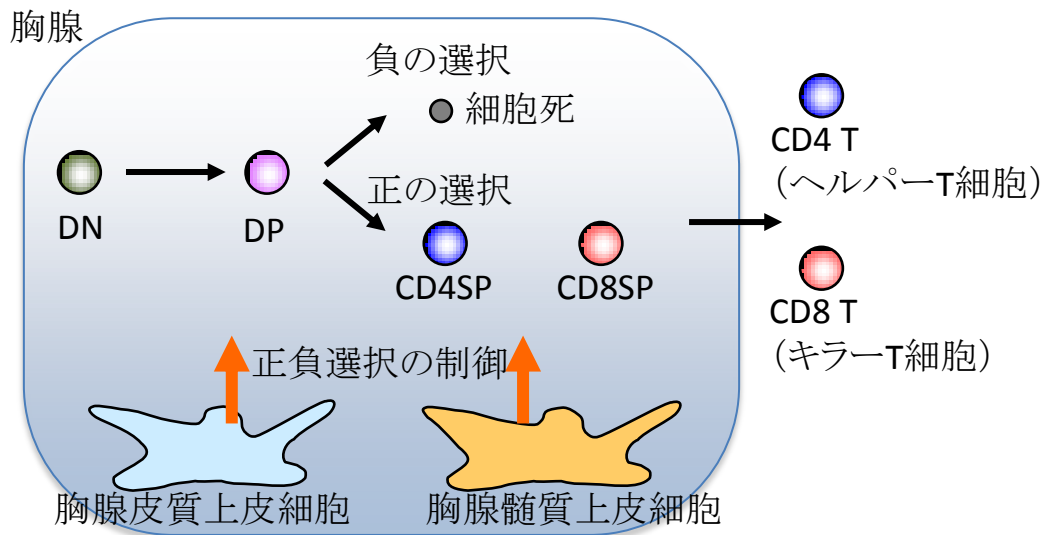
# 平成26年度 報告書(主任)

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: 為広紀正(平成26年)、新田剛(平成24、25年)

## 研究の背景: 胸腺におけるT細胞の分化・選択



T細胞自身のシグナル制御機構や分化系譜は明らかになってきている

↓しか  
し

胸腺上皮細胞の分化を制御する分子メカニズムは不明である

↓そこで

**研究目的:**  
胸腺上皮細胞の分化を司る分子メカニズムを理解し  
人為的に制御するための基盤技術を確立する

## 研究の方法と期待される成果



独自に樹立した  
自然変異マウス **TN**

① 詳細な表現型解析

② 原因遺伝子の同定

③ 原因遺伝子の機能解析  
(細胞レベル、個体レベル)

④ **PSMB11** 遺伝子変異のヒト  
疾患における意義の解明

胸腺上皮細胞分化を制御  
する技術の開発

胸腺上皮細胞の分化を制御する  
新規分子メカニズムの解明  
→ T細胞の研究領域を大きくリード

ヒトの疾患とリンクする可能性  
→ 原発性免疫不全や自己免疫の  
研究領域に新たな展開をもたらす

T細胞の分化と抗原認識を人為的に  
操作する基盤技術の確立  
→ 免疫疾患に対する再生医療の  
可能性

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。

## 研究成果詳細

### ① 詳細な表現型解析

- *TN*マウス胸腺では、皮質上皮細胞(cTEC)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TCRL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。

### ② 原因遺伝子の同定

- *TN*マウスの原因遺伝子は、*Psemb11*遺伝子のミスセンス変異であった。
- *Psemb11*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。

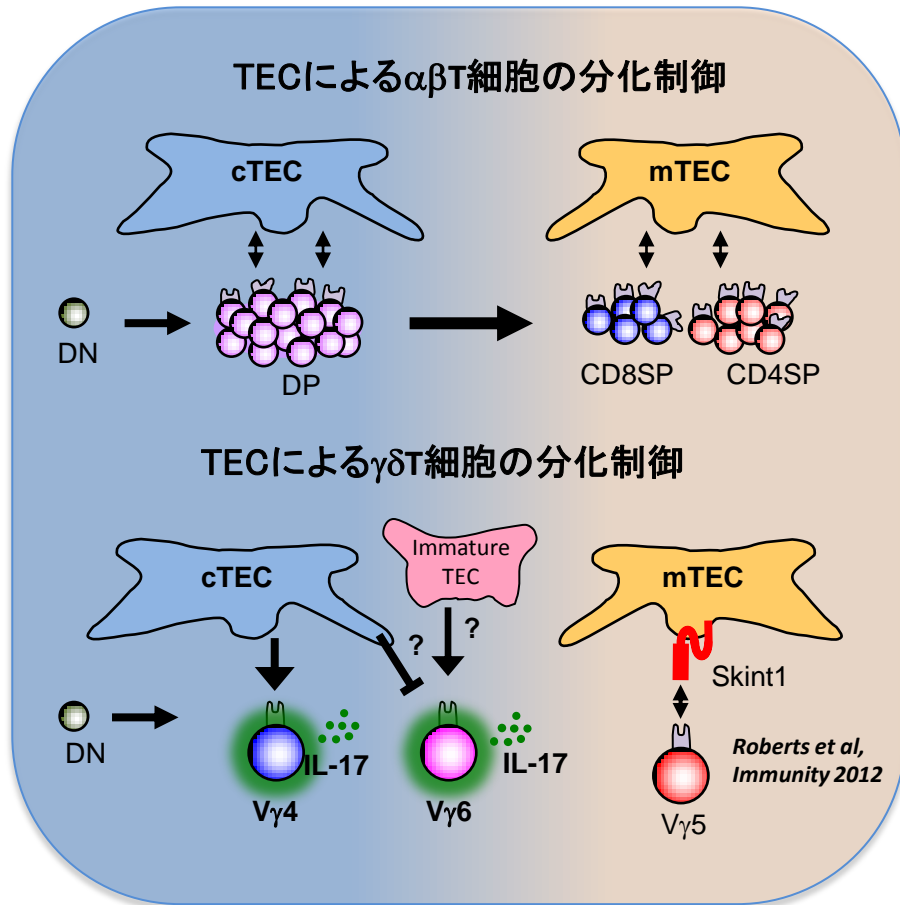
### ③ 原因遺伝子の機能解析

- 培養細胞株において、*TN*変異型*Psemb11*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。

### ④ *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、日本人において高頻度(アレル頻度3%)に検出される。
- G49S変異体は野生型よりも高いプロテアソーム活性を示した。
- CRISPR/Cas9法によりG49S変異を導入したノックインマウスを作製した。
- G49Sマウスは胸腺形成は正常であったが、CD8 T細胞の正の選択が阻害され、TCRLレパトアが変化していた。





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

皮質上皮細胞(cTEC)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。

ヒト*PSMB11* G49S変異がCD8 T細胞の分化とレパトア形成に影響することが示唆された。

↓ 今後の課題

G49Sを含むヒト*PSMB11*の変異が免疫疾患感受性に与える影響を解析する必要がある。

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 : 為広 紀正、(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* マウスでは顕著な胸腺低形成が認められ、また、胎仔期から成体期まで一貫して著しい皮質上皮細胞数の減少が認められた。一方、髄質上皮細胞の分化と機能成熟は正常であった。胎仔胸腺器官培養においても同様の表現型が観察されたことや、近親・異系交配により認められる本表現型の出現頻度により、*TN* マウスでは皮質上皮細胞に特異的かつ固有の常染色体上優勢遺伝的異常が生じていることが明らかになった。また、*TN* マウスの胸腺では、 $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞の分化はみられるものの、 $CD4^+CD8^-$ および $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞の頻度が有意に低下していた。これは OT-I および OT-II TCR トランスジェニックマウスとの交配により、*TN* マウスにおいて  $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞の正の選択が著しく低下している為であると確認された。また、末梢 T 細胞の TCR  $V\alpha$ 鎖および  $V\beta$ 鎖の頻度が顕著に変化していたことから、T細胞のレパトア選択が大きく影響を受けていることがわかった。さらに、*TN* マウス由来の骨髄細胞を野生型マウスに移植しても同様の表現型は認められず、野生型マウス由来骨髄細胞を移植した場合にのみ T細胞の分化異常が観察されたことから、*TN* マウスで起こる  $\alpha\beta$ T 細胞の分化障害は胸腺環境に由来する現象である事が示唆された。しかしながら、内在性スーパー抗原の実験系においては abT 細胞の負の選択は障害をうけておらず、制御性 T 細胞および腸管上皮間リンパ球 (IEL) の産生も正常に起こっていた。一方、invariant natural killer T (iNKT) 細胞の胸腺内分化は *TN* マウスで低下し、末梢 iNKT 細胞が激減していた。*TN* マウス胸腺内 iNKT の多くが  $CD44^+NK1.1^+$  (ステージ3) 細胞であり、 $CD44^+NK1.1^-$  (ステージ2) 細胞頻度は対照的に減少していた。このステージ2 iNKT 細胞の減少は、恐らく  $PLZF^+iNKT$  細胞が減少しているためだと予想される。さらに興味深いことに、*TN* マウス胸腺では、正常な胸腺にはほとんどみられない  $CD44^+CD25^{low}$   $\gamma\delta$ T 細胞が増加していた。 $\gamma\delta$ T 細胞は個体発生の成長段階に応じて分化運命が厳密に規定されている。そこでさらに  $\gamma\delta$ T 細胞について解析を進めたところ、*TN* マウス胸腺では出生後に分化する IL17 を産生するタイプの  $V\gamma4^+$   $\gamma\delta$ T 細胞が著しく減少しており、胎児期に分化し同じく IL17 を産生するタイプの  $V\gamma6^+$   $\gamma\delta$ T 細胞が出生後に増加してくることがわかった。以上の結果より、*TN* マウス胸腺では皮質上皮細胞の分化障害によって、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞 iNKT 細胞の分化が変容していることが明らかになった。また、*TN* マウスでは、肺、涙腺、唾液腺にリンパ球の浸潤がみられ、自己免疫病態が生じていることが示されており、さらに 70 週齢程度の老齢になると、体の特定の部位に腫瘍の自然発症がみられた。特に肝臓の腫瘍が多く、その詳細な病態とメカニズムについては現在解析を進めている。

以上の結果より、*TN* マウスでは胸腺皮質上皮細胞の分化または維持が特異的に障害されており、それによって $\alpha\beta$ T 細胞、iNKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化が変容していることが明らかになった。今後の課題として、胸腺微小環境がこれらの細胞の分化を制御する分子機構を明らかにする必要がある、肺や涙腺に浸潤するリンパ球を特定し自己免疫病態のメカニズムを明らかにしたい。

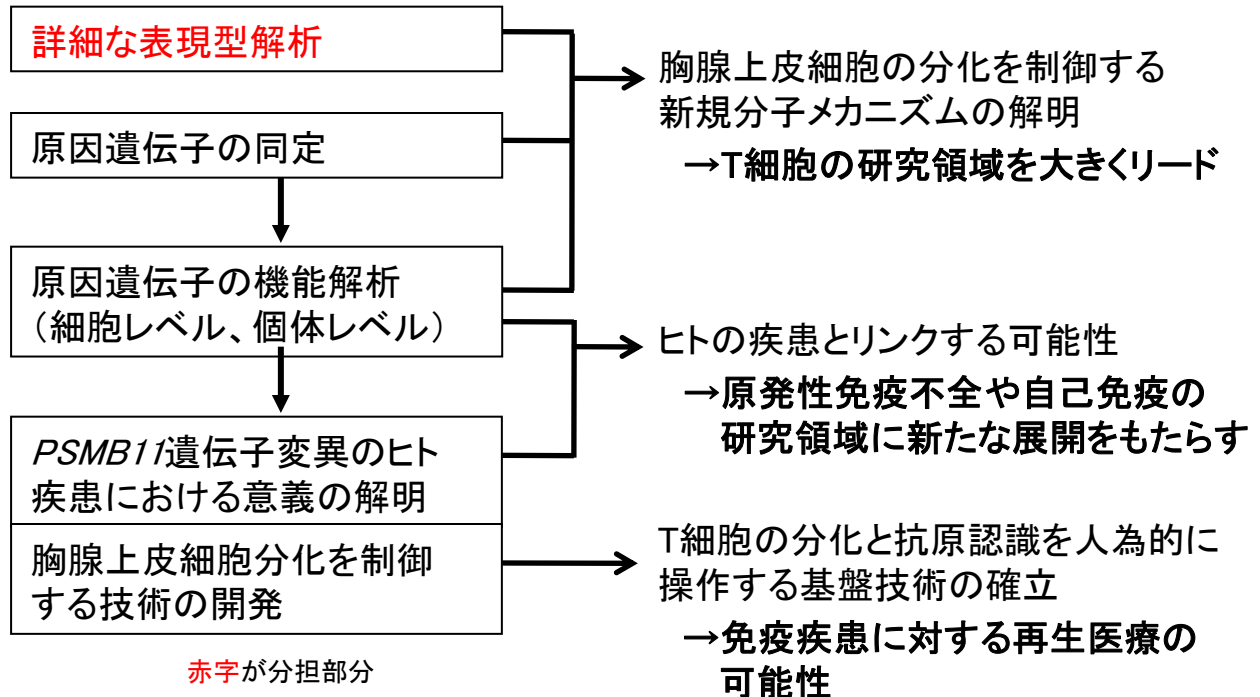
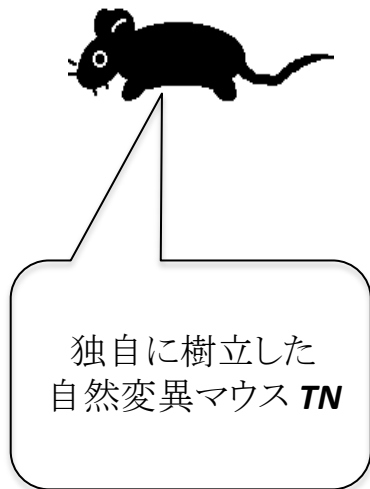
# 平成26年度 研究報告書(分担)

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

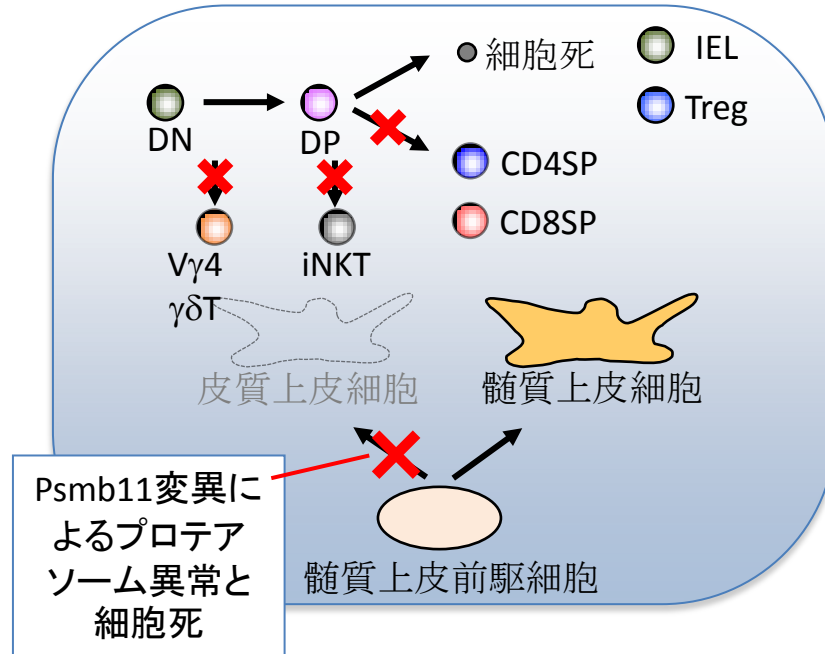
分担研究者: 鈴木 春巳

## 研究の方法と期待される成果



# 研究成果

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。

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

負の選択、制御性T細胞やIELの分化は正常であった。

↓ 今後の課題

胸腺微小環境がT細胞、iNKT細胞、γδT細胞の分化を制御する分子機構を明らかにする必要がある、また、ヒト *PSMB11* の変異が引き起こす肺や涙腺に浸潤するリンパ球を特定し自己免疫病態のメカニズムを明らかにする。

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： 為広 紀正 (新田 剛)

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naive T cells.	Muro R, <u>Nitta T</u> , Okada T, Ideta H, Tsubata T, <u>Suzuki H</u> .	PLoS One	e0119898	2015
The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells.	<u>Nitta, T</u> , Muro R, Shimizu Y, Nitta S, Oda H, Ohte Y, Goto M, Yanobu-Takanashi R, Narita T, Takayanagi H, Yasuda H, Okamura T, Murata S, <u>Suzuki H</u> .	EMBO Rep	16	2015
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	#Okada, T., # <u>Nitta, T.</u> , Kaji, K., Takashima, A., Oda, H., Tamehiro, N., Goto, M., Okamura, T., Patrick, M.S., * <u>Suzuki, H.</u>	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., <u>Nitta, T.</u> , 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., <u>Nitta, T.</u> , 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
The development of T lymphocytes in fetal thymus organ culture	<u>Nitta, T.</u> , Ohigashi, I., Takahama Y.	Methods Mol Biol	946	2013
Differential requirement for RhoH in development of TCRab CD8aa IELs and other types of T cells.	Oda H, <u>Tamehiro N</u> , Patrich MS, Hayakawa K and <u>Suzuki H</u> .	Immunol. Lett.		2013

研究発表及び特許取得報告について

Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary TCR $\alpha$ rearrangement in cortical thymocytes	Nakagawa, Y., Ohigashi, I., <u>Nitta, T.</u> , Sakata, M., Tanaka, K., Murata, S., Kanagawa, O., Takahama, Y	Proc Natl Acad Sci USA	109	2012
Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways.	Eshima K, Chiba S, <u>Suzuki H</u> , Kokubo K, Kobayashi H, Iizuka M, Iwabuchi K, Shinohara N	Immunol. Lett.	144	2012

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
免疫システムを形づくる胸腺微小環境	<u>新田 剛</u>	第5回関東甲越免疫不全症研究会	東京	2014年9月
胸腺微小環境の新機能	<u>新田 剛</u>	沖縄感染免疫シンポジウム2014	沖縄	2014年7月
Thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing gdT cells	<u>Takeshi Nitta</u> , Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki	ThymOz International Conference	オーストラリア	2014年4月
Cortical thymic epithelial cells control conventional and innate T cell development	<u>Takeshi Nitta</u> , Ryunosuke Muro, Hiroyo Oda, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	第42回日本免疫学会総会・学術集会	千葉	2013年12月
胸腺皮質上皮細胞による $\gamma$ $\delta$ T細胞の分化制御	<u>新田 剛</u> 、室龍之介、 <u>新田 幸子</u> 、 <u>小田 浩代</u> 、 <u>鈴木 春巳</u>	第24回 Kyoto T Cell Conference	京都	2014年5月
胸腺皮質上皮細胞による $\gamma$ $\delta$ T細胞のレパトア制御	<u>新田 剛</u>	第23回東京免疫フォーラム	東京	2013年2月
胸腺皮質微小環境の形成と機能	<u>新田 剛</u>	第10回 Osteoimmunology Forum	東京	2013年3月
Distinct protein motifs in Themis regulate positive selection of T cells	<u>Nitta T</u> , Okada T, Oda H, Takashima A, Patrick MS, Suzuki H	第41回日本免疫学会学術集会	神戸	2012年12月
The novel gene ISC22 is involved in TCR-mediated IL-2 production in mature T cells	早川国宏, <u>鈴木春巳</u>	第41回日本免疫学会学術集会	神戸	2012年12月
ESET(SETDB1) modulates H3K9 methylation of developing thymocytes and is indispensable for T cell development	Takikita S, Hayakawa K, <u>Suzuki H</u>	第41回日本免疫学会学術集会	神戸	2012年12月
Themis regulates cytokine production and differentiation of Th subsets	Okada T, Patrick MS, Kaji K, Suzuki H	第41回日本免疫学会学術集会	神戸	2012年12月
RhoH regulates TCR expression on thymocytes	小田浩代、 <u>為広紀正</u> 、 <u>鈴木春巳</u>	第41回日本免疫学会学術集会	神戸	2012年12月
TCR-dependent proteasomal degradation of RhoH in CD4CD8 double positive thymocytes	Tamehiro N, Oda H, and <u>Suzuki H</u>	第41回日本免疫学会学術集会	神戸	2012年12月

研究発表及び特許取得報告について

T細胞分化におけるThemis分子内ドメインの役割	新田 剛、岡田季之、加地健太郎、小田浩代、高島明子、Michael S. Patrick、鈴木春巳	第35回日本分子生物学会年会	福岡	2012年12月
Function of distinct domains in Themis in positive selection.	Nitta T, Okada T, Kaji K, Oda H, Takashima A, Patrick MS, Suzuki H	ThymUS	Miami USA.	2012年11月
Themis分子内ドメインの機能解析	新田 剛、岡田季之、加地健太郎、小田浩代、高島明子、Michael S. Patrick、鈴木春巳	第22回KTCC	京都	2012年7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。