

22. 自己免疫疾患発症を抑制する胸腺上皮細胞の機能制御

秋山 泰身

*理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫恒常性研究チーム

Key words : 自己免疫, 胸腺, 上皮細胞, T 細胞

緒 言

2009年に世界人口の約10%が自己免疫疾患に罹患していると報告された。自己免疫疾患のほとんどは原因不明であり、根本的治療が困難である。そのため、治療や予防法の開発には、自己免疫疾患の発症を抑制している機構を理解することが重要となる。本課題は、自己免疫疾患の発症を防止する“胸腺上皮細胞”に着目し、その機能を制御する分子機構の解明を目的とする。

免疫応答に重要なTリンパ球(T細胞)は、胸腺で分化する。その際、自己組織に応答するT細胞(自己応答性T細胞)が一定の頻度で生じる。これらの自己応答性T細胞が、自己組織に対する免疫応答を開始、持続すると自己免疫疾患を発症する。しかしながら、健常状態では、自己応答性T細胞の多くが胸腺内で除去される。

この機構に、胸腺の髄質領域に局在する上皮系細胞、髄質上皮細胞が必要である。髄質上皮細胞は、(インシュリンなど)特定の臓器・組織にだけ発現するタンパク質(組織特異的抗原)を、多種類にわたり異所的に発現する特殊な性質を持つ。そして髄質上皮細胞は、組織特異的抗原を提示し、それらを認識するT細胞にアポトーシスを誘導(あるいは制御性T細胞に変換)する。この機構により、自己組織を認識する様々な自己応答性T細胞が胸腺内で除去可能となり、結果として自己免疫疾患の発症が抑制される。

髄質上皮細胞は極めて多種類の組織特異的抗原を発現するが、その発現制御機構には不明な部分が残されている。一部の組織特異的抗原の遺伝子発現は、核内因子Aireにより制御される[1]。また最近、転写因子Fezf2の重要性も報告された[2]。これらの因子は組織特異的抗原の60~70%を制御すると考えられているが、残りの30~40%の発現はAireやFezf2を必要としない。すなわち、組織特異的抗原の発現を制御する第3の機構が存在する。

以上の背景を踏まえ、本研究課題は、以下を目的として研究を行なった。

- 1) 髄質上皮細胞において、組織特異的抗原の異所的な発現を制御する第3の機構を同定する
- 2) 上記で同定した機構の破綻が惹起する自己免疫病態を明らかにする

これまでに我々は、サイトカインRANKリガンドのシグナルが、組織特異的抗原を発現する髄質上皮細胞の分化を誘導することを報告してきた[3~7]。ついで、目的とする機構を同定するために、*in vitro*分化実験系と網羅的な遺伝子発現解析を行い、髄質上皮細胞の分化に伴い発現誘導される転写因子(未公表のため転写因子Transcription factor induced by RANKL:TFIRと略)を同定した。転写因子TFIR欠損マウスは胎生致死であるため、欠損マウスの胎仔胸腺を別マウスに移植し、発生したTFIR欠損胸腺を調べたところ、AireやFezf2により制御されない組織特異的遺伝子の発現(例:CRP)が大きく減少していた。従って、転写因子TFIRは、我々が同定を目指す第3の機構において、中心的な役割を持つと予想した。

上記を踏まえて本課題は、転写因子TFIRによる組織特異的抗原の発現制御機構の同定と、その機能破綻による自己免疫疾患の発症について検証を行うことを具体的な目的とした。

方法および結果

1. 転写因子 *TFIR* を胸腺上皮特異的に欠損するマウスの作製と胸腺構成細胞の解析

胸腺髄質上皮細胞の機能解析を成体で容易に行うために、Cre リコンビナーゼにより遺伝子 *TFIR* を欠損可能な Flox マウスを作製した。適切なターゲットベクターを作製し、組み換え法により ES 細胞、ついで常法により Flox マウスを得た。Flox マウスを、胸腺上皮細胞特異的に Cre を発現する Foxn1-Cre マウスと交配させ、胸腺上皮細胞特異的に転写因子 *TFIR* を欠損するマウス（以下、胸腺上皮特異的 *TFIR* 欠損マウス）を作製した。

作製したマウスは、少なくとも 20 週令までは、見かけの異常は見られなかった。胸腺の大きさや胸腺細胞の数、CD4 シングルポジティブ T 細胞、CD8 シングルポジティブ T 細胞、Foxp3 陽性制御性 T 細胞の発生には異常が見られなかった。一方、Foxp3 陰性 CD25 陽性の制御性 T 細胞前駆細胞が有意に減少した。

また胸腺の上皮細胞をフローサイトメーターで解析した。胸腺をコラゲナーゼにより分散し、血球系マーカー (CD45、TER119)、上皮細胞マーカー (EpCAM)、髄質上皮細胞マーカー (UEA-1)、皮質上皮細胞マーカー (Ly51)、成熟細胞マーカー (CD80) で分離した。その結果、CD80 の発現が低い (CD80lo) 髄質上皮細胞 (EpCAM 陽性 UEA-1 陽性) の画分の割合が約 50% に減少した。

一方、CD80lo の髄質上皮細胞と CD80 の発現が高い (CD80hi) 髄質上皮細胞をセルソートして、転写因子 *TFIR* の発現を定量的 PCR 法で検討したところ、両方の細胞画分で発現するものの、CD80lo 髄質上皮細胞において比較的高い発現が見られた。皮質上皮細胞では、ほとんど発現が観察されなかった。

2. 転写因子 *TFIR* 依存的に髄質上皮細胞で発現する組織特異的遺伝子の同定

上記の結果 1 より、転写因子 *TFIR* の機能が CD80lo 髄質上皮細胞と CD80hi 髄質上皮細胞で異なると予想し、各々の画分を分取して、組織特異的抗原の発現を検討した。胸腺特異的な *TFIR* 欠損マウスの胸腺をコラゲナーゼで単細胞にし、CD80hi 髄質上皮細胞、CD80lo 髄質上皮細胞、皮質上皮細胞をセルソーターで分取した。分取した細胞より、cDNA ライブラリーを作製、シークエンスを行なった。得られたシークエンスデータを解析し、野生型および *TFIR* 欠損マウスで発現する遺伝子を定量した。変動する遺伝子を検討したところ、*TFIR* の発現量から予想されるとおり、CD80lo 髄質上皮細胞においてより大きく変動した。さらに CD80hi 髄質上皮細胞も含めると、約 13% の組織特異的遺伝子が、転写因子 *TFIR* により制御されることが判明した。

さらに *Aire* や *Fezf2* に依存して発現する組織特異的遺伝子と比較するために、各々のマウス胸腺から、同様に胸腺上皮細胞を採取し、シークエンス解析により遺伝子発現を決定した。その結果、*Aire* 欠損マウスでは約 23%、*Fezf2* 欠損マウスでは約 9% の組織特異的遺伝子の発現が変動していた。また転写因子 *TFIR* に依存する組織特異的遺伝子の中で、転写因子 *TFIR* と *Aire* の両方で制御される遺伝子は約 33% であり、転写因子 *TFIR* と *Fezf2* の両方により制御される遺伝子は約 16% であった。

3. 転写因子 *TFIR* の欠損による自己免疫疾患発症の検討

生後 20 週の胸腺上皮特異的 *TFIR* 欠損マウス (およびコントロールマウス) から、肝臓、脾臓、腎臓、顎下腺などを採取した。これらの組織をパラフィンで包埋し、組織切片を作製した。組織切片は、ヘマトキシリン・エオシン法により染色し、細胞浸潤の有無を確認した。その結果、*TFIR* 欠損マウスでは肝臓、肺、腎臓、脾臓、顎下腺において、細胞浸潤が観察された。

さらに、*TFIR* 欠損マウスの血清中で自己抗体価が上昇するのかが検証した。20 週令の欠損マウスより血清を採取、血清を 1 次抗体として、RAG2 欠損マウスの様々な組織切片を蛍光免疫染色した。その結果、肝臓、肺、腎臓、脾臓、顎下腺、胃、皮膚などの組織の抗原に対する自己抗体価の上昇が観察された。

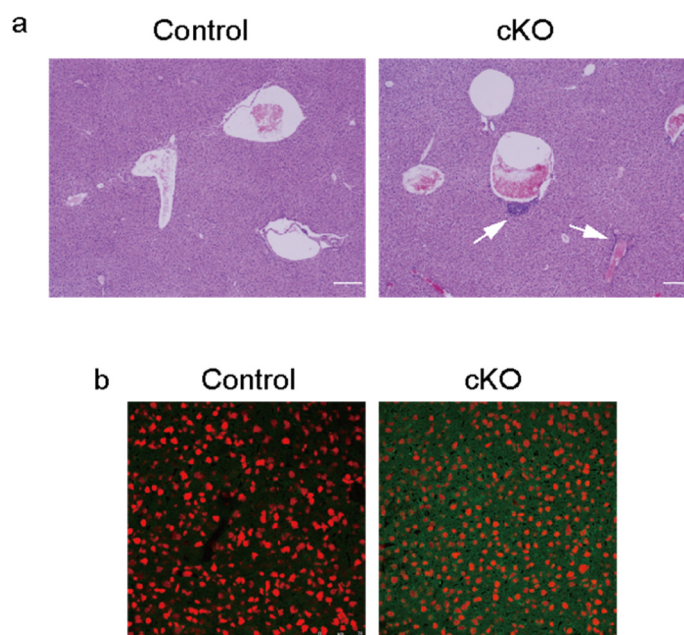


図 1. 胸腺上皮細胞特異的 *TFIR* 欠損マウスの自己免疫

- a) コントロールマウス (Control) と胸腺上皮細胞特異的 *TFIR* 欠損マウス (cKO) 由来の肝臓組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色図。白矢印が細胞浸潤。スケールバー: 100 μ m
- b) コントロールマウス (Control) と胸腺上皮細胞特異的 *TFIR* 欠損マウス (cKO) 由来の血清を 1 次抗体にし、*RAG2* 欠損マウス肝臓を染色した。緑蛍光は自己抗体の結合を示す。スケールバー: 75 μ m

考 察

本研究課題で、転写因子 *TFIR* は髄質上皮細胞の組織特異的遺伝子の発現を制御し、髄質上皮細胞に依存的な自己免疫抑制に重要な役割を持つことが明らかとなった。また転写因子 *TFIR* は *Aire* や *Fezf2* など既知の因子とは異なる種類の組織特異的遺伝子の発現を制御していた。すなわち、転写因子 *TFIR* は、*Aire* や *Fezf2* などの因子とは異なる機構で、組織特異的遺伝子の発現を制御している可能性が高い。今後、その分子機構を明らかにする必要がある。そしてその解明は、免疫系の自己-非自己識別の分子機構の解明に寄与するのみならず、自己免疫疾患の発症機構の理解に貢献することが期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所分子発癌分野の井上純一郎教授、筑波大学医学医療系ゲノム生物学の村谷匡史教授、理化学研究所生命医科学研究センターエピゲノム技術開発ユニットの蓑田亜希子博士である。

文 献

- 1) Anderson MS, Venzani ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 2002 Nov 15;298(5597):1395-401. Epub 2002 Oct 10. doi: 10.1126/science.1075958
- 2) Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, Kodama T, Takayanagi H. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):975-87. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.013.
- 3) Akiyama T, Maeda S, Yamane S, Ogino K, Kasai M, Kajiura F, Matsumoto M, Inoue J. Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science*. 2005 Apr 8;308(5719):248-51. Epub 2005 Feb 10. doi: 10.1126/science.1105677
- 4) Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J. The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):423-37. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.015.
- 5) Mouri Y, Yano M, Shinzawa M, Shimo Y, Hirota F, Nishikawa Y, Nii T, Kiyonari H, Abe T, Uehara H, Izumi K, Tamada K, Chen L, Penninger JM, Inoue J, Akiyama T, Matsumoto M. Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma. *J Immunol*. 2011 May 1;186(9):5047-57. doi: 10.4049/jimmunol.1003533. Epub 2011 Mar 25
- 6) Akiyama N, Shinzawa M, Miyauchi M, Yanai H, Tateishi R, Shimo Y, Ohshima D, Matsuo K, Sasaki I, Hoshino K, Wu G, Yagi S, Inoue J, Kaisho T, Akiyama T. Limitation of immune tolerance-inducing thymic epithelial cell development by Spi-B-mediated negative feedback regulation. *J Exp Med*. 2014 Nov 17;211(12):2425-38. doi: 10.1084/jem.20141207. Epub 2014 Nov 10. Ref
- 7) Akiyama N, Takizawa N, Miyauchi M, Yanai H, Tateishi R, Shinzawa M, Yoshinaga R, Kurihara M, Demizu Y, Yasuda H, Yagi S, Wu G, Matsumoto M, Sakamoto R, Yoshida N, Penninger JM, Kobayashi Y, Inoue J, Akiyama T. Identification of embryonic precursor cells that differentiate into thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1441-58. doi: 10.1084/jem.20151780. Epub 2016 Jul 11.