

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

山梨大学 大学院総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室

特任助教・久富 理

1 研究テーマ

一次繊毛を介した胸腺器官形成と T 細胞分化メカニズムの解明

2 研究の目的

T 細胞は、胸腺にてヘルパー T 細胞 (CD4 陽性) や、細胞傷害性 T 細胞 (CD8 陽性) など様々なタイプに分化し、細菌、ウイルス、がん細胞などを攻撃して、生体を防御する細胞性免疫の核として機能する。T 細胞は胸腺以外では分化しないことから、正常な胸腺の器官形成は T 細胞の分化に必須である。しかし、これまでに胸腺の器官形成に関わる遺伝子がいくつか同定されているものの、その組織形成メカニズムは未だ不明な点が多い。

からだの器官の形成には、「一次繊毛」と呼ばれる毛状の細胞小器官が重要であることが明らかになっている。一次繊毛はほぼ全ての細胞に存在し、多様な細胞間情報を受容するアンテナの役割を果たすことが知られている。最近、この形成/機能不全は、多発性嚢胞腎、内臓逆位、水頭症、多指症、精子の形成不全による不妊症など、器官の形成不全に関わる多彩な異常（「ヒト繊毛病」と総称）を発症する原因となることが明らかになっており、医学的に大きな注目が集まっている。しかし、このような背景の中で、一次繊毛と胸腺の器官形成ならびに T 細胞の分化との関係を示した研究はほとんど行われていない。

そこで本研究は、胸腺の支持組織の主成分である胸腺上皮細胞に存在する一次繊毛を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを用いて、胸腺の組織構築、T 細胞分化の解析を通して、胸腺の器官形成ならびに T 細胞の分化のメカニズムにおいて一次繊毛が担う役割を解明することを目的とした。

3 研究の方法

① 胸腺上皮細胞の一次繊毛の欠損マウスの作製：

胸腺上皮細胞の一次繊毛の形成を特異的に欠損させるため、一次繊毛の形成に必須な遺伝子 *Ift88* に flox を挿入した遺伝子改変マウス (*Ift88-flox*) と、胸腺の器官形成に重要な転写因子 *Foxn1* プロモーターで組換え酵素 Cre を駆

動するトランスジェニックマウス (Foxn1-Cre) を用いて、Ift88 コンディショナルノックアウトマウス (以下 Ift88-cKO マウス) を作製した (図 1A)。作製後、胸腺ライセートにおける Ift88 の発現をウェスタンブロッティングで確認し、胸腺組織における一次繊毛の免疫染色を行い、一次繊毛の存在の有無を確認した。

Ift88-flox マウスは The Jackson Laboratory (メイン州、米国) にて購入し、Foxn1-Cre マウスは、作製元の Georg Hollander 博士 (バーゼル大学、スイス) と MTA を交わし、本マウスを所有する穂積勝人博士 (東海大学) より受領した。

② T 細胞分化の定量解析 :

新生児マウス、生後 3 週齢マウスの胸腺より採取した T 細胞数を計測した。これらを CD4、CD8 などの抗原分子マーカーに対する抗体を用いて、各 T 細胞の分化のステージの割合を、フローサイトメトリーで定量解析した。

③ 胸腺組織における免疫染色 :

摘出した胸腺を、4%PFA を含む PBS で浸漬固定を行った。固定後、PBS で洗浄し、シヨ糖濃度が 10%、15%、20%を含む PBS で段階的に置換した組織を OCT コンパウンドで包埋し、急速凍結により標本を作製した。

作製した標本をクリオスタットで 5 μ m 厚の切片を作製し、この切片を用いて目的の分子の抗体を用いた免疫染色を行った。染色像の観察には、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

4 研究の成果

① Ift88-cKO マウスにおける胸腺上皮細胞の一次繊毛の欠損の確認 :

上記の研究方法に従って作製した Ift88-cKO マウス) において、胸腺上皮細胞の一次繊毛が欠損しているか否かを確認した。胸腺ライセートにおける Ift88 の発現をウェスタンブロッティングで調べたところ、Ift88-cKO マウスでは Ift88 の発現がほとんど認められなかった (図 1B)。新生児マウスにおける胸腺組織における免疫染色では、Ift88-cKO マウスでは一次繊毛が存在する頻度が有意に減少していた (図 1C)。これより、Ift88-cKO マウスにおいて胸腺上皮細胞の一次繊毛の欠損を確認できた。

② Ift88-cKO マウスにおける胸腺の外観と T 細胞分化の異常の解析：

新生児マウス、生後 3 週齢のマウスの胸腺の外観を観察したところ、Ift88-cKO マウスでは特に異常は見られなかった (図 2A)。また、胸腺内の T 細胞の分化において、CD4・CD8 の両方を発現しない「ダブルネガティブ (以下 DN)」、両方発現する「ダブルポジティブ (以下 DP)」、CD4 あるいは CD8 の片方を発現する「シングルポジティブ (以下、CD4-SP/CD8-SP)」の 4 つのステージの分化の割合、頻度を解析したところ、各分化のステージの割合、細胞数において、いずれも有意な増加・減少は見られなかった (図 2B-D)。

③ Ift88-cKO マウスにおける胸腺上皮細胞と T 細胞との接触面の構造解析：

これまでに末梢の免疫細胞は、抗原提示細胞などと接触して免疫応答を示す際、免疫シナプスと呼ばれる特徴的なリング構造を示す。研究代表者らは、胸腺上皮細胞と T 細胞との間で、これと類似する構造をすでに発見しており、これを「胸腺シナプス」と命名した (図 3)。胸腺上皮細胞-T 細胞間の胸腺シナプスの構造を詳細に調べるため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3D 再構築を行った。その結果、胸腺シナプスは、(1)胸腺上皮細胞で発現する細胞接着因子 ICAM1 が、CD3 をほぼ全周に渡って局在する、(2)半周に渡って局在する、(3)断片的に局在する、これら 3 つのパターンで分類された。Ift88-cKO マウスの場合、control で見られた各パターンの頻度が異なっており、(3)が増加していることがわかった (図 4)。

さらに、免疫シナプスの構成成分には中心体が含まれており、中心体は免疫シナプスが形成される方向に移動することが知られている。胸腺シナプスでも中心体の局在が見られた。Ift88-cKO マウスでは、胸腺シナプスへの中心体の局在が有意に減少した (図 5)。

5 まとめと今後の展望

現在のところ、Ift88-cKO マウスでは、胸腺の組織構築や胸腺内の T 細胞の分化 (DN から SP まで) において明らかな異常は見られなかった。その一方で、胸腺シナプスの形態形成において、Ift88-cKO マウスの場合で異常が見られたことを示した。胸腺シナプスの構成成分である ICAM1 は、主に髄質の胸腺上皮細胞において発現されることから、胸腺シナプスは髄質で形成されるイベントと考えられる。

また、胸腺の髄質は、自己を攻撃せず異物を攻撃することができる「自己寛容」を獲得する場としてはたらくことが知られている。したがって、本研究の成果から、胸腺上皮細胞の一次繊毛は胸腺シナプスの形成を介して、T細胞の自己寛容の獲得の制御に関与する可能性が示された。これらの点について更に理解を深めるため、以下の2点に着目して、免疫機能における一次繊毛の役割について追求していく。

- ① 胸腺髄質における T 細胞の分化過程に、一次繊毛が関与するか否かを検証する。具体的には胸腺髄質における CD4-SP (ヘルパーT細胞) から末梢において免疫応答の主力となるエフェクターT細胞や、免疫応答を抑制する働きを担う制御性 T 細胞への分化と一次繊毛の関係を解析する。lft88-cKO マウスと control マウスとの免疫機能比較を行い、分化異常の有無に着目する。
- ② 免疫自己寛容が破綻すると、末梢の各器官にリンパ球が浸潤し、自己免疫性疾患を引き起こすことが知られている。そこで lft88-cKO マウスにおいて、肺や関節、腺組織、粘膜、皮膚などにおいて、リンパ球の浸潤が見られるか否かを、まずは組織学的手法を用いて調べる。

6 研究の発信方法（予定を含む）

本研究の成果は以下の学会、研究会で発表を行った。また、論文発表に向けて現在投稿準備中である。

1. 久富 理、穂積 勝人、野中 茂紀、竹田 扇
「胸腺上皮細胞の一次繊毛と免疫機能」（口頭発表）
第10回繊毛研究会（東京農工大学），2019. 11. 25, 26.
2. 久富 理
「胸腺の機能における一次繊毛の役割」（ポスター発表）
第2回日本医学会連合 Rising Star リトリート（淡路夢舞台），2020. 3. 1, 2.
※開催延期（代替日未定）
3. 久富 理、穂積 勝人、野中 茂紀、竹田 扇
「胸腺上皮細胞の一次繊毛が担う免疫機能の役割」（ポスター発表）
第125回日本解剖学会（山口、宇部市），2020. 3. 25-27.
※開催中止（誌上開催）

7 謝辞

本研究の実施にあたって、ご支援を賜りました山梨県大村智人材育成基金事業に深く感謝を申し上げます。

8 図表

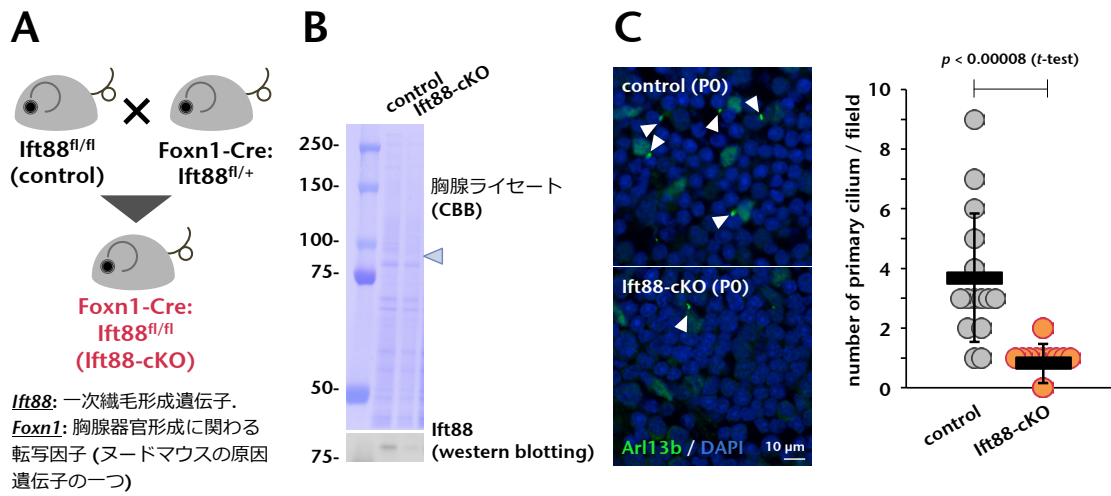


図 1: lft88-cKO マウス作製。(A) lft88-cKO マウス作製の概略。Foxn1-Cre が挿入され、かつ lft88 の両方の対立遺伝子に flox が挿入されるときに ($lft88^{fl/fl}$)、lft88 コンディショナルノックアウトが起こる。本研究の control には Foxn1-Cre が挿入されていない $lft88^{fl/fl}$ マウスを使用した。(B) ウェスタンブロッティングによる胸腺ライセートにおける lft88 の発現。lft88 は分子量およそ 88 kDa のタンパク質であり (青矢じりが示す位置に相当する)、lft88-cKO マウスの場合、lft88 の発現がほとんど検出されなかった。(C) 新生児マウスの胸腺組織における一次繊毛の局在解析。一次繊毛のマーカとして、低分子量Gタンパク質 Arl13b に対する抗体で免疫染色を行った。lft88-cKO では観察視野における一次繊毛 (白やじり) の頻度が有意に減少した。

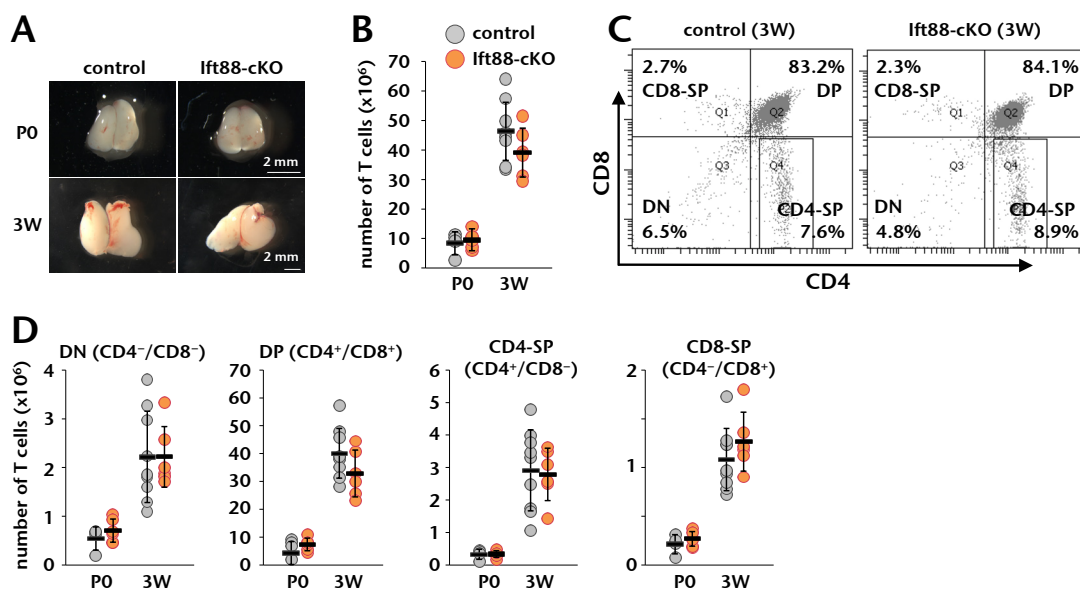


図 2: Ift88-cKO マウスの胸腺の外観および T 細胞の分化の解析。(A) 新生児マウス (P0)、生後 3 週齢マウス (3W) における胸腺の外観。(B) 胸腺内の T 細胞数。(C) フローサイトメトリーによる CD4、CD8 の発現のドットプロット。各区画の値は、それぞれの T 細胞分化のステージの存在割合を示す。(D) 各 T 細胞分化のステージの T 細胞数。各プロットは、B の胸腺内の T 細胞数から C の割合値を積算した値を示す。

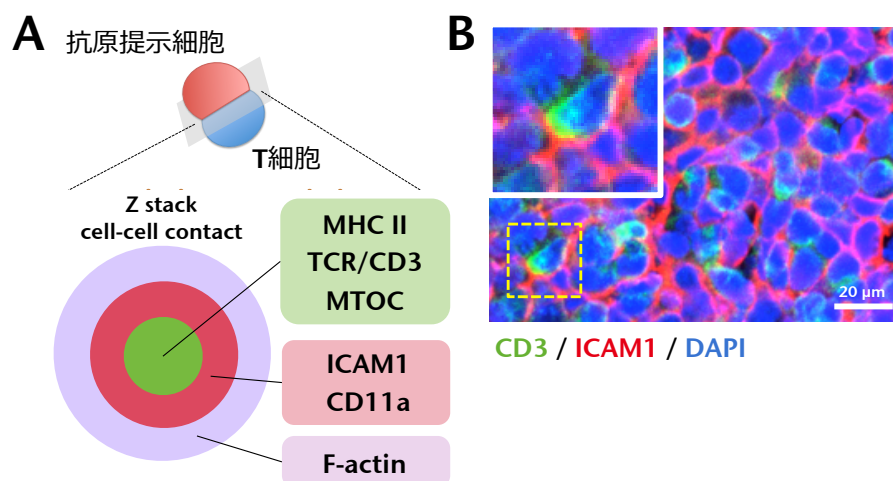


図 3: 胸腺シナプスの構成成分と局在関係。(A) 末梢の成熟 T 細胞と抗原提示細胞との接触により形成される免疫シナプスの構造。図は総説 Griffiths et al., *J. Cell Biol.* 2010 より一部改変。(B) 胸腺における CD3 (T 細胞由来) と ICAM1 (胸腺上皮細胞由来の細胞接着因子) の局在。黄色破線枠で示された細胞において、CD3 と ICAM1 が接する局在が見られ、胸腺シナプスが形成されていると判断した。

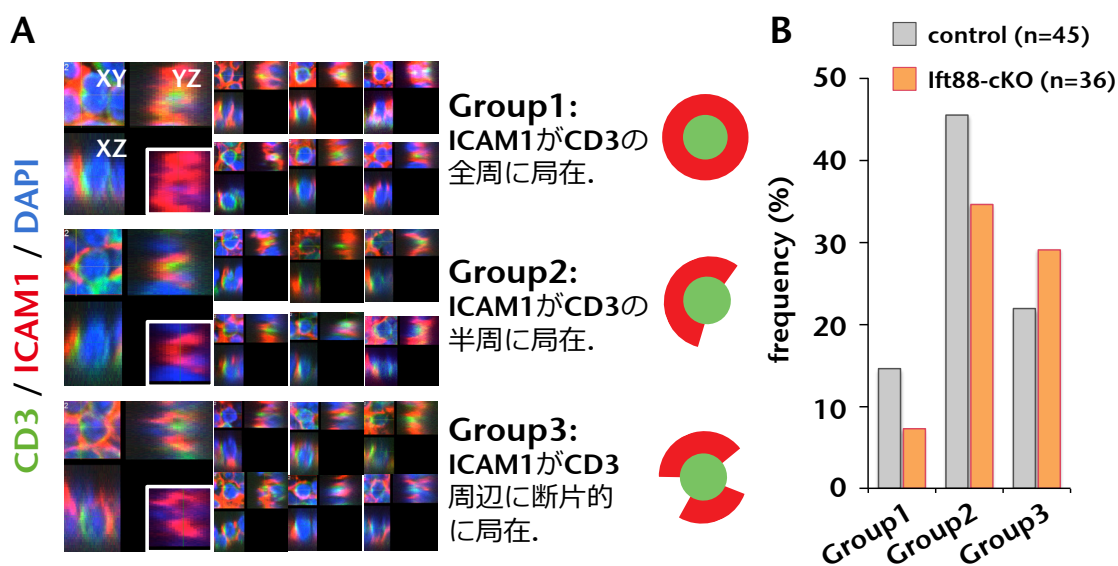


図 4: ft88-cKO マウスにおける胸腺シナプスの形態形成の変化。(A) 胸腺シナプスの形態の分類。T 細胞と胸腺上皮細胞との接触面において 3 次元再構築を行い、YZ 面における CD3 (緑) と ICAM1 (赤) の位置関係と ICAM1 の形態より、3 つのパターンに分類された。図左の染色像は代表例を、図右は胸腺シナプスの形態の模式図をそれぞれ示す。(B) control マウスと lft88-cKO マウスにおける胸腺シナプスの形態のパターンの検出頻度。

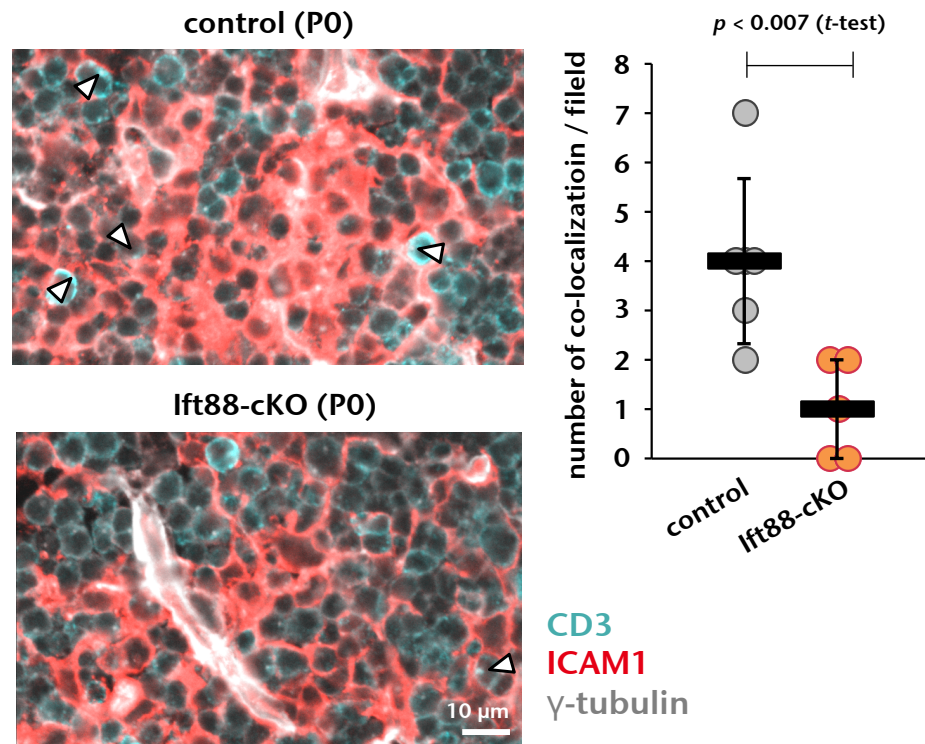


図 5: 新生児マウス (P0) の胸腺における胸腺シナプス上の中心体の局在。胸腺シナプスが形成される接触面に中心体 (マーカーとして抗 γ -tubulin 抗体で染色) が局在するのが見られた。この中心体の局在の頻度が lft88-cKO では有意に減少していた。