

中枢性免疫寛容の成立に必須の遺伝子の探索

東京大学大学院医学系研究科 免疫学
室 龍之介

(背景)

胸腺はT細胞が分化するために必須の臓器である。胸腺は未熟なT細胞である胸腺細胞とわずかに存在するストロマ細胞群から構成される。胸腺の構造は、皮質と髄質に分けられ、それぞれには機能的に異なる胸腺上皮細胞(TEC)、すなわち、皮質上皮細胞(cTEC)と髄質上皮細胞(mTEC)が存在し、メッシュワーク構造を形成している。

胸腺では一定の割合で自己成分に反応するT細胞が分化する。mTECはそのような自己反応性T細胞を末梢組織へ流出する前に排除する役割がある。mTECは細胞の恒常性維持に必須のタンパク質に加え、インスリンやC反応性タンパク(CRP)などの特定の末梢組織にのみ発現するタンパク質も発現する。これらは組織特異的抗原(TRA)として知られ、プロセッシングを受けることで自己抗原としてmTEC上に提示される。このようなmTECに固有の遺伝子発現の一部は、核内因子Aireによって担われている。

mTECはCD80とMHC class IIの発現によってmTEC^{hi}とmTEC^{lo}の二集団分類されてきた。しかし、近年の研究からmTECは極めて不均一な細胞集団であることが示されている。単一細胞遺伝子発現解析(scRNA-Seq)の結果、従来から知られていたCCL21陽性mTECやAire発現mTECに加え、粘膜上皮に存在するタフト細胞に類似した細胞が存在することが指摘された。これらはAireの発現を失ったmTECに由来している。より詳細な単一細胞解析の結果、mTEC集団にはタフト細胞に加え、末梢組織に存在するM細胞や線毛細胞などが含まれることが明らかになった。これらは、模倣細胞と呼称されている。つまり、mTECは、遺伝子発現レベルの制御だけでなく細胞集団を多様化させることでもTRAの多様化に寄与している。mTECが模倣細胞へと分化することで、髄質における自己抗原の多様性が増加し、結果として大部分の自己反応性T細胞が効率よく生体内から排除されると考えられる。しかし、mTECが模倣細胞へ分化するメカニズムはほとんど解明されていない。

SRY-box転写因子4 (Sox4) は、様々な組織で幹細胞の維持と分化を制御するほか、一部のリンパ球の分化にも重要な役割を果たしている。Sox4はmTECで高発現していることが知られているが、mTECにおける機能的はこれまで示されていなかった。本研究では、遺伝子改変マウスを用いてmTECにおけるSox4の役割を検証した。

(結果)

scRNA-Seqデータ(GSE103967)を再解析し、Sox4の遺伝子発現解析を行なった(図1)。Sox4の発現は、CCL21陽性mTECと胸腺タフト細胞に高く発現していた。一方で、胸腺の線維芽細胞や血管内皮細胞、リンパ球にSox4の発現はほとんど認められなかった。その他のSox遺伝子ファミリーの発現を既報のBulk RNA-

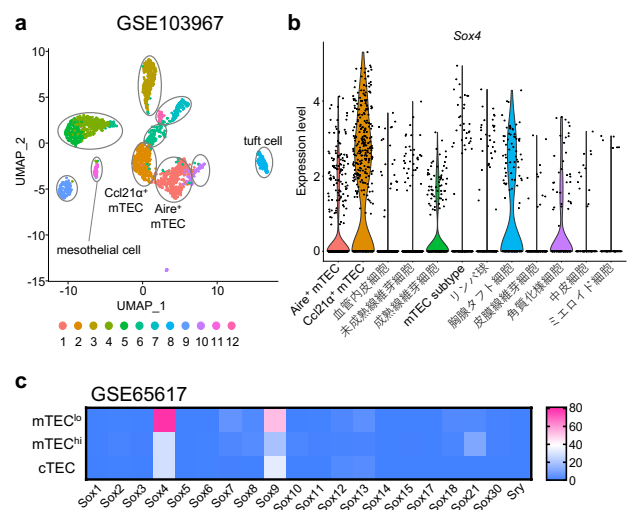


図1 胸腺ストロマ細胞におけるSox4の遺伝子発現解析

Seqデータ(GSE6517)を用いて解析した結果、Sox9を除いて、全てのSox遺伝子発現はほとんど発現していないことが示された。

次に、TEC特異的にSox4を欠損するマウスを樹立するためにFoxN1-CreとSox4^{fllox}マウスを交配し、Sox4-cKOマウスを作成した。Sox4-cKOマウスの体のサイズや体毛に異常はなく、正常に成長した。胸腺を酵素的に消化し、フローサイトメトリーによりTECの頻度および細胞数を評価した。コントロール群と比べて、sox4-cKOマウスのTECの総数と頻度に有意な変化は認められなかった。また、cTECやmTEC、さらに、mTECにおけるmTEC^{hi}とmTEC^{lo}についても細胞数および頻度は正常であった。mTECの機能因子であるAireの発現もSox4-cKOマウスのmTECにて正常に発現することがわかった。

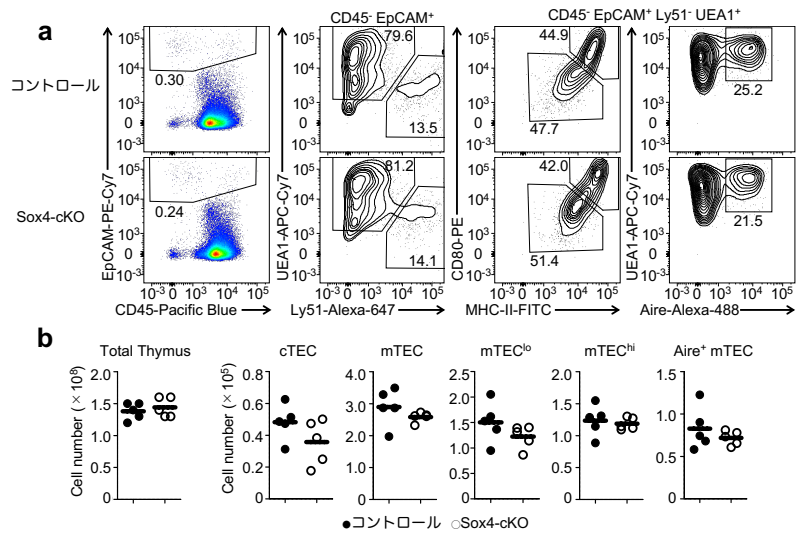


図2 Sox4-cKOマウスにおける胸腺上皮細胞の解析

Sox4欠損によるmTECにおける遺伝子発現変化を解析するために、mTEC^{hi}とmTEC^{lo}をフローサイトメトリーにより精製し、定量的PCRを実施した。Ccl21やAireのmRNA発現は、Sox4の欠損により影響されることはなかった。また、CRPやSpt2、Csn2などの代表的なTRAの遺伝子発現にも有意な変化は認められなかった。一方で、タフト細胞マーカーであるDcl1やタフト細胞の分化を制御する転写因子Pou2f3、胸腺タフト細胞に発現するTRAであるAvil、Lrmp、IL25の発現はSox4-cKOマウスのmTEC^{lo}で有意に減少した(図3)。これらの結果から、Sox4欠損マウスでは、主要なmTEC集団に影響を与えることなく、胸腺タフト細胞が欠損していると予想を立てた。

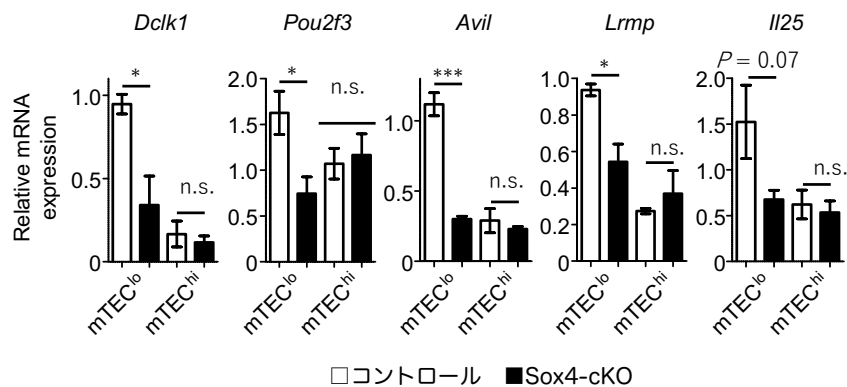


図3 タフト細胞関連遺伝子の発現解析

そこで、フローサトメトリーによりDCLK1を染色することで、胸腺タフト細胞の同定および定量を行なった。mTECにおけるDclk1陽性細胞の頻度は、コントロール群においておよそ2~3%程度であった。一方、Sox4-cKOマウスでは、その頻度が1%程度にまで減少した。細胞数を定量評価した結果、Dclk1陽性細胞は統計的有意差を持って減少した。さらに免疫組織化学染色法によりDCLK1発現細胞を定性的に評価した。

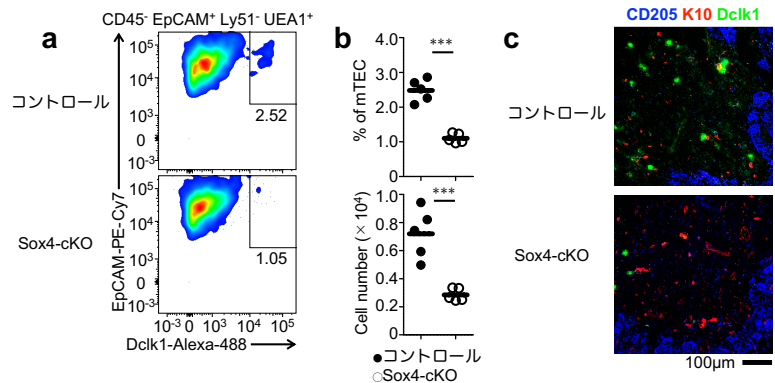


図4 Sox4は胸腺タフト細胞の分化に必須である

これまでの観察結果と一致して、DCLK1発現細胞は主に髄質にて観察され、ケラチン10(K10)陽性細胞に近接していることがわかった。一方、Sox4-cKOマウスの胸腺髄質には、DCLK1のシグナルがほとんど検出されなかった。以上の結果は、Sox4はタフト細胞の分化に必要な転写因子であることを示唆している。

mTECにおけるSox4発現の制御機構を探索するために、mTECサブセットの遺伝子発現データを解析した。Sox4のmRNA発現レベルはAireを欠損するmTEC^Δにて正常であることから、AireはmTEC^ΔにおけるSox4の発現に関与しないことが示唆された。次に、mTEC^Δにおける遺伝子発現を制御する受容体であるLTβ受容体に着目した。LTβ受容体を欠損したmTEC^Δでは、Sox4のmRNA発現レベルが著しく低下していた。これらの結果は、mTEC^Δ細胞において、Sox4の発現がLTβRシグナルの制御下にあることを示唆する。LTβ受容体をTEC特異的に欠損するマウスでは、胸腺タフト細胞の細胞数と頻度が減少しており、これは過去の報告と一致していた(Lucas et al., *Nat Commun.* 2020)。

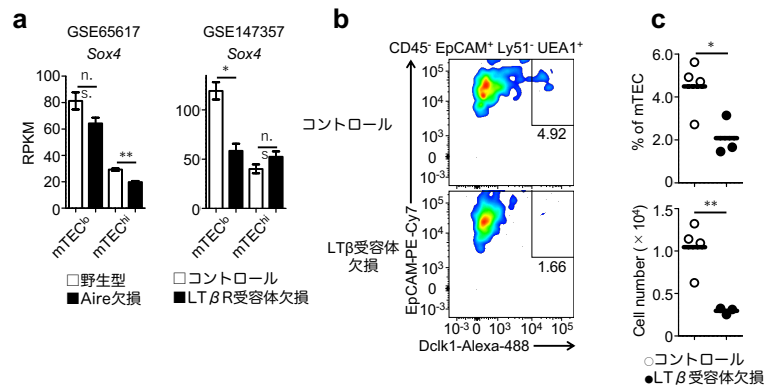


図5 Sox4の発現LTβ受容体シグナルによって制御される

(考察)

以上の結果から、転写因子Soxは、LTβ受容体シグナルにより発現制御され、胸腺タフト細胞の分化に必須であることが示された。腸管におけるタフト細胞分化や維持にSox4は必要であることから、mTECは転写因子を借用することで、末梢組織に特異的な上皮細胞へ異所性に分化し、TRAの多様化に寄与していると考えられる。

(謝辞)

本研究の推進にあたり、公益財団法人アステラス病態代謝研究会にご支援賜りましたことを深く感謝申し上げます。