

胸腺皮質上皮細胞の分化メカニズムの理解に基づく T細胞のレパトリー制御

国立国際医療研究センター研究所 免疫病理研究部
新田 剛

1. 緒言

T細胞は、免疫システムによる生体防御と生体維持の中心的な役割を担うリンパ球である。T細胞の抗原認識レパトリーが形成されるメカニズムを理解し制御することは、様々な新興感染症への対応や、移植における拒絶の制御、腫瘍に対する免疫治療、自己免疫疾患に対する根本的治療法の確立といった現在の高度医療における課題の克服はもとより、再生医療の一環としての免疫システムの再構築といった将来の応用を視野に入れた基礎研究課題として重要な位置づけにある。T細胞のレパトリーは、胸腺におけるT細胞の分化過程にて形成される。分化途上の未熟T細胞（胸腺細胞）は、胸腺微小環境を構成する多様な胸腺ストロマ細胞との相互作用により、主として皮質における正の選択と、それに続く髄質における負の選択を経て、多様かつ自己寛容性をそなえたT細胞集団へと成熟する¹⁾。皮質と髄質にはそれぞれ機能の異なる胸腺上皮細胞（皮質上皮細胞と髄質上皮細胞）が存在し、自己ペプチドとMHCの複合体を胸腺細胞に提示することで正負選択を制御する重要な役割を担う。我々は以前に、皮質上皮細胞に特異的に発現される「胸腺プロテアソーム」²⁾の機能解析に取り組み、胸腺プロテアソームを発現する皮質上皮細胞がユニークなMHC結合性ペプチドを産生することで、外来抗原への反応性をもつCD8 T細胞の正の選択に寄与することを明らかにした^{3、4)}。本研究では、胸腺プロテアソームを発現する皮質上皮細胞の性状解析を行い、皮質上皮細胞の大部分が、多数の胸腺細胞と会合した巨大な多細胞複合体を形成していることを発見した。特に、それらの複合体の構造を定性的かつ定量的に解析する手法を確立し、T細胞の抗原受容体のレパトリー選択における役割について検討した。

2. 方法

マウス胸腺をコラゲナーゼ処理することにより、全胸腺構成細胞を含む細胞懸濁液を調製した。皮質上皮細胞または胸腺細胞の細胞表面分子に対する蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメーターにて解析した。 $\beta 5t$ および細胞内CD45の染色にあたっては、表面染色後の細胞を0.2% パラホルムアルデヒドにて固定し、0.1% サポニン存在下で抗体反応を行った。また、皮質上皮細胞と胸腺細胞の会合様態の違いを定性的かつ定量的に解析するため、細胞内外に会合したCD45⁺細胞を染め分ける手法を確立した。コラゲナーゼ処理によって得た全胸腺構成細胞を対象として、PE-Cy5標識された抗CD45抗体を用いて細胞外CD45 (extracellular CD45、eCD45) を染色し、固定・透過処理の後、FITC標識抗CD45抗体を用いて細胞内CD45 (intracellular CD45、iCD45) を染色した。蛍光セルソーターによって皮質上皮細胞亜集団を単離し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3. 結果

(i) 胸腺皮質上皮細胞の大部分は血球系細胞との多細胞複合体を形成する

胸腺プロテアソームの構成因子 $\beta 5t$ を発現する皮質上皮細胞を、フローサイトメーターによって定量的に検出した。 $\beta 5t^+$ 細胞は胸腺上皮細胞の細胞表面マーカーであるEpCAM⁺細胞集団中に検出された（図1A）。EpCAM⁺ $\beta 5t^+$ 細胞の頻度はきわめて低い（0.03%）が、 $\beta 5t$ 欠損マウスではほとんど検出されない（0.01%未満）ことから、 $\beta 5t$ の発現を特異的に検出できていることが確認された。また、 $\beta 5t^+$ 細胞は、胸腺上皮細胞に高発現されるI-A分子、および皮質上皮細胞マーカーのCD205とLy51が陽性であり、髄質上皮細胞マーカーUEA1陰性であったことから、既知の皮質上皮細胞のカテゴリーに分類されうる細胞集団であった（図1B）。

EpCAM⁺ $\beta 5t^+$ 細胞は、Forward Scatter (FSC) 値およびSide Scatter (SSC) 値が非常に大きいこ

とから、サイズが大きく複雑な内部構造をもつ細胞であることがわかった (図 1 C)。さらにPI染色により、EpCAM⁺ β5t⁺細胞は胸腺細胞の数十倍のDNA量を有する多核細胞であることが示された。(図 1 C)。

EpCAM⁺ β5t⁺細胞を単離し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。EpCAM⁺ β5t⁺細胞の大部分は多くの核を有し、そのほとんどは表面にCD45を発現する血球細胞の核であることがわかった (図 2)。すなわち、EpCAM⁺ β5t⁺細胞は、多くの血球細胞と会合した、多細胞複合体を形成していることがわかった。一部の複合体は、多数のCD45⁺細胞がβ5t⁺細胞に完全に包み込まれた構造をとっていた (図 2 A)。また、会合するCD45⁺細胞が外側に露出した構造を含む複合体 (図 2 B)、および複合体を形成していない単独のβ5t⁺細胞も検出された (図 2 C)。EpCAM⁺CD205⁺細胞を単離し、透過型電子顕微鏡にて解析したところ、CD45⁺細胞を内包する複合体は、過去に「胸腺ナース細胞」⁵⁾として報告された機能未知の胸腺ストロマ細胞に酷似していた (図 2 D)。また、血球細胞が外側に露出した複合体 (図 2 E) や、単独の上皮細胞 (図 2 F) も確認された。

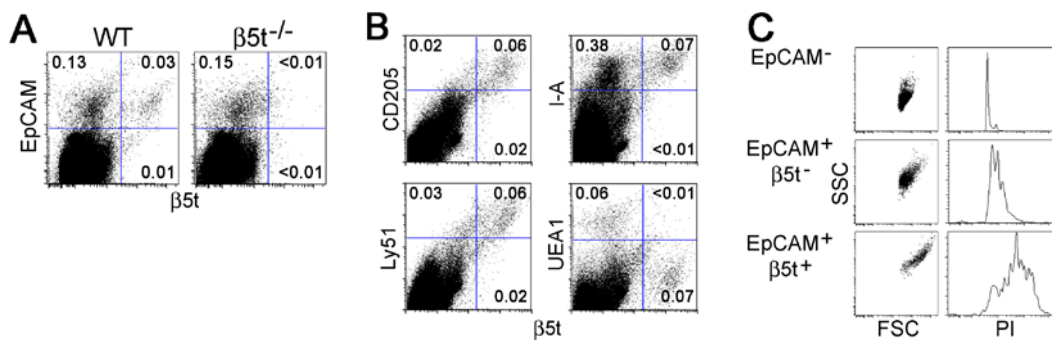


図 1 β5t⁺皮質上皮細胞のフローサイトメーター解析

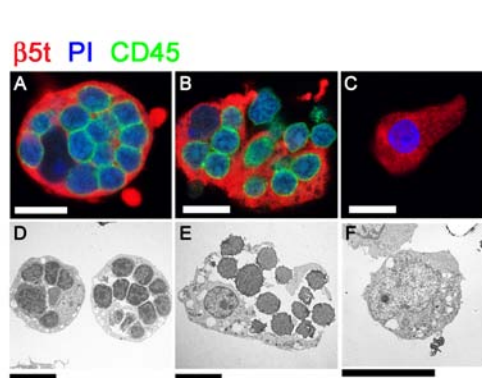


図 2 EpCAM⁺ β5t⁺細胞の顕微鏡解析

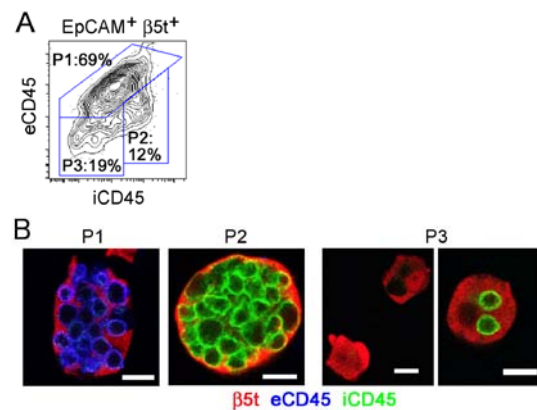


図 3 多細胞複合体の解析と単離

(ii) 多細胞複合体の構造多様性の解析

皮質上皮細胞と血球細胞との会合様態の違いを定性的かつ定量的に解析するため、細胞内外に会合したCD45⁺細胞を染め分ける手法を確立した。コラゲナーゼ処理によって得た全胸腺細胞画分を対象として、PE-Cy5標識された抗CD45抗体を用いて細胞外CD45 (extracellular CD45, eCD45) を染色し、固定・透過処理の後、FITC標識抗CD45抗体を用いて細胞内CD45 (intracellular CD45, iCD45) を染色した。これをフローサイトメーターで解析したところ、EpCAM⁺ β5t⁺細胞は、eCD45陽性の集団 (Population 1, P1)、eCD45弱陽性かつiCD45陽性の集団 (P2)、およびeCD45陰性かつiCD45陰性の集団 (P3) に分けられた (図 3 A)。P1はEpCAM⁺ β5t⁺細胞の約70%を占め、CD45⁺細胞がβ5t⁺細胞の外側に会合した開放型複合体であった (図 3 B)。P2は「胸腺ナース細胞」と類似の、多くのCD45⁺細胞がβ5t⁺細胞内に包み込まれた閉鎖型複合体であり、EpCAM⁺β5t⁺細胞の10~15%であった。P3は複合体を形成しないβ5t⁺細胞、あるいは少数のCD45⁺

細胞が包み込まれた複合体であった。よって、血球細胞との相互作用にもとづいて多細胞複合体の構造の多様性を定性的かつ定量的に検出することが可能となった。

(iii) 多細胞複合体に会合する胸腺細胞の単離と性状解析

多細胞複合体に会合する血球系細胞の性状を解析するため、多細胞複合体を単離してPE-Cy5標識抗CD45抗体で染色した後、物理的破碎によって複体内外の血球系細胞を取り出し、FITC標識抗CD45抗体で染色した。これにより、開放型複合体に会合していた細胞 (eCD45⁺) と閉鎖型複合体に包み込まれていた細胞 (eCD45⁻) を分離することができた (図4)。開放型複合体に会合していた細胞は、CD4⁺CD8⁻、CD4⁺CD8⁺、CD4⁻CD8⁻、CD4⁻CD8⁺胸腺細胞を含んでいたが、閉鎖型複合体に包まれていた細胞のほとんどはCD4⁺CD8⁺であった。

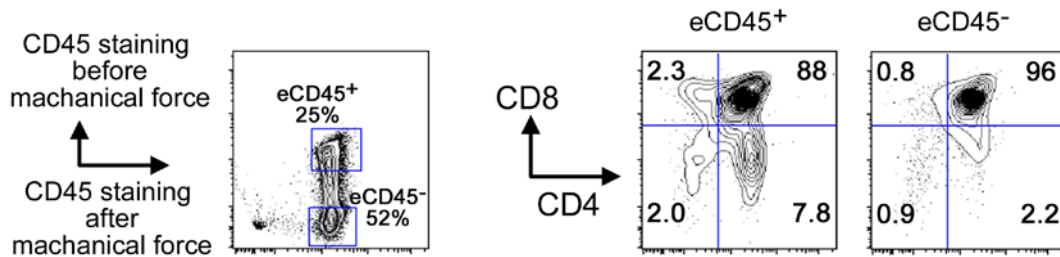


図4 多細胞複合体に会合する胸腺細胞の解析

4. 考察

本研究結果から、胸腺皮質上皮細胞の大部分が胸腺細胞との緊密な複合体を形成していることが示された。特に、内部にCD4⁺CD8⁺胸腺細胞を包み込んだ閉鎖型複合体は、過去に「胸腺ナース細胞」として報告された機能未知の細胞と同一であると考えられた。CD4⁺CD8⁺胸腺細胞は正負の選択を受ける分化段階にある細胞であり、これらが皮質上皮細胞内の膜小胞内に包み込まれることでレパトリー選択が制御される可能性が示唆された。本研究にて確立された閉鎖型複合体の内部に包まれたCD4⁺CD8⁺胸腺細胞の単離法は、T細胞レパトリー選択についての実体理解と人為的制御に向けた基盤技術としてきわめて重要な成果といえる。さらに、皮質上皮細胞の約70%を占める開放型複合体は、本研究結果によって初めて明らかになった構造であり、これまで広く用いられてきた胸腺細胞の除去による胸腺上皮細胞調製法によって排除されてしまうという技術的問題点が明らかとなった。多細胞複合体の形成機序およびその意義- とりわけT細胞のレパトリー選択における役割- を解明するため、更なる研究が必要である。

5. 共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学疾患ゲノム研究センター生命システム形成分野の高濱洋介教授である。最後に、本研究にご支援を賜りましたアステラス病態代謝研究会に深く感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) Nitta, T., Murata, S., Ueno, T., Tanaka, K., Takahama, Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv. Immunol.*, 99 : 59-94, 2008.
- 2) Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., Tanaka, K. Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*, 316 : 1349-1353, 2007.
- 3) Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., Takahama, Y. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8⁺ T cells. *Immunity*, 32 : 29-40, 2010.
- 4) Takahama, Y., Nitta, T., Ripen, A. M., Nitta, S., Murata, S., Tanaka, K. Role of thymic-cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells. *Semin. Immunol.*, 22 : 287-293, 2010.
- 5) Wekerle, H., Ketelsen, U. P. Thymic nurse cells-Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature*, 283 : 402-404, 1980.