国際共同研究事業
スイスとの国際共同研究プログラム
平成 29 年度実施報告書

平成 30 年 4 月 2 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

所属機関・部局 徳島大学・先端酵素学研究所

職・氏名 (ふりがな) 教授・高濱 洋介 たかはま ようすけ

1. 事業名 国際共同研究事業スイスとの国際共同研究プログラム
2. 研究課題名 (和文) 胸腺上皮細胞の分化と機能を裏付ける転写エピゲノム分子機構の研究
(英文) Transcriptional control and Epigenetic Mechanisms of Thymic Epithelial Cell Development and Function

3. 共同研究実施期間 (全採用期間)

平成 29 年 1 月 1 日 ~ 平成 31 年 12 月 31 日 (3 年 0 ヶ月)

4. 研究参加者

(1) 日本側参加者 4 名 (2) スイス側参加者 3 名

5. 主要な物品購入状況 (一品又は一組若しくは一式の価格が 50 万円以上のもの)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名

備考：50 万円以上の物品を購入等した場合のみ記入してください。

6. 人件費使用状況

氏名	金額	雇用期間	専門及び本研究における役割
山下 布紗乃	1,676,234 円	平成29年4月1日～平成30年3月31日	転写制御分子の探索

備考： 研究者及び専門技術員・研究補助者を雇用した場合のみ記入してください。
雇用期間の欄の記入例：「平成25年6月1日～平成27年5月31日」

7. 渡航実施状況

(a) 日本側参加者（代表者を含む）の国内出張

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
計 名 (延べ人数)			計 日		

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、10日間」（現地到着日～現地出発日）

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(b) 当該年度にスイスを訪問した日本側参加者

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
計 名 (延べ人数)			計 日		

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、10日間」（現地到着日～現地出発日）

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(c) 当該年度にスイス以外の国を訪問した日本側参加者*

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	用務先 (国名・都 市名)	旅行期間**	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担***
高濱 洋介	徳島	オースト ラリア・ヘ ロン島	3月19日～ 3月26日	ヘロンアイランドリゾー ト・学会参加、研究打ち合 わせ	有
大東 いずみ	徳島	オースト ラリア・ヘ ロン島	3月18日～ 3月28日	ヘロンアイランドリゾー ト・学会発表	無
計 2名 (延べ人数)			計 19日		

* 外国出張の渡航先は原則としてスイスのみとします。ただし、当該共同研究の研究成果発表を目的とする学会等への出席や、フィールドワーク等で当該第三国へ行くことが必須である研究上の理由がある場合に限り、スイス以外の国を訪問することが可能です。

** 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、10日間」（現地到着日～現地出発日）

*** 本経費使用予定の有無を記入すること

(d) 当該年度に受入れたスイス側参加者

出張者 (氏名)	用務先	旅行期間*	用 務
計 名 (延べ人数)		計 日	

* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日、10日間」（来日～離日）

8. 研究実施状況

※ 申請書の内容及び当該年度実施計画書の「6. 本年度実施計画の概要」と対応させつつ、当該年度の研究の実施状況を簡潔に日本語にて記入してください。

免疫システムの司令塔として自己と非自己の識別を担う T 細胞分化を支持する胸腺上皮細胞の分化機構を明らかにすべく、本年度は (1) 皮髄共通前駆細胞から皮質上皮細胞と髄質上皮細胞への分岐制御を担う転写制御分子の発見を目指すとともに、胸腺上皮細胞の機能に関わる分子機構および細胞機構を解明するために (2) T 細胞の自己免疫寛容確立に重要な胸腺髄質上皮細胞分子 CCL21Ser の同定と、(3) 生後胸腺における上皮細胞数の正確な評価方法の開発を行った。

(1) 皮質上皮細胞と髄質上皮細胞への分岐制御を担う転写制御分子の発見に関する研究

皮質上皮細胞と髄質上皮細胞での遺伝子発現を比較したマイクロアレイ解析結果、および、皮髄共通前駆細胞および髄質に系列決定したばかりの細胞での遺伝子発現解析結果から、発現差違のある転写関連分子を抽出した。その中からすでに欠損マウスが作製されている 10 遺伝子について胸腺を入手し、皮髄構造、および、機能タンパクの発現について検討した。その結果、いずれの欠損胸腺も皮髄共通前駆細胞から皮質・髄質上皮細胞への分岐は正常であったが、皮質上皮細胞と皮髄共通前駆細胞での発現が高い転写因子のひとつを欠損する胸腺は、正常胸腺に比べると組織の大きさが小さく、CD8 陽性 T 細胞数が減少していた。このことから、皮質上皮細胞での当該転写因子の発現は CD8 陽性 T 細胞の正常な産生に関与していることが示唆された。また、欠損マウスが作製されていない分子の中で、皮質上皮細胞および皮髄共通前駆細胞での発現が極めて高い転写活性化補助分子が上皮細胞分岐制御を含む上皮細胞での機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法による当該分子の欠損マウスの作製を始動した。

(2) T 細胞の自己免疫寛容確立に重要な胸腺髄質上皮細胞分子 CCL21Ser の同定

ケモカイン受容体 CCR7 のリガンド CCL19、CCL21Ser、CCL21Leu は、いずれも胸腺では髄質上皮細胞で高発現される。これまでに我々は、CCR7 欠損マウスや *Ccl19* と CCL21Ser をコードする *Ccl21a* の両遺伝子座を欠失する plt/plt マウスの解析から、CCR7 を介したシグナルは胸腺で分化途上にある T 細胞の皮質から髄質への移動を制御し、自己免疫寛容確立に重要であることを明らかにしてきた。しかし、胸腺における CCL21Ser 単独の機能的な重要性は明らかになっていない。そこで、胸腺における CCL21Ser の役割を明らかにするために CCL21Ser 単独欠損マウスを作製した。このマウスでは、plt/plt マウスと同様に T 細胞の皮質から髄質への移動に異常を来し、髄質は低形成を呈した。また、胸腺での自己反応性 T 細胞の負の選択に異常を来し、唾液腺や涙腺でのリンパ球浸潤と、涙量の低下を伴うシェーグレン症候群様の自己免疫疾患を発症した。一方、CCL19 単独欠損マウスでは、T 細胞の皮質から髄質への移動、および髄質形成は正常であった。これらの結果から、CCL21Ser は胸腺での T 細胞移動を制御することにより T 細胞の自己免疫寛容確立に非冗長な役割を果たしており、他のリガンドは CCL21Ser 欠損時にその機能を補完しないことが明らかになった。これらの結果は米国科学雑誌 *Journal of Experimental Medicine* に掲載された (Kozai, et al. 2017)。

(3) 生後胸腺における上皮細胞数の評価方法の開発

胸腺上皮細胞の分子生物学的および細胞生物学的解析は、しばしば、マウス胸腺を酵素消化により単離するという手法によって行われる。この方法では、成体マウスから単離した胸腺上皮細胞数は多くても 10^5 個と見積もられているが、 10^8 個以上ある胸腺細胞の分化とレパトア選択において、上皮細胞が複数の役割を果たしていることを考慮すると、この数は極めて少ない。そこで、酵素消化を行わずに、生後マウスの胸腺切片それぞれにおける $\beta 5t$ 発現皮質上皮細胞、および、Aire 陽性髄質上皮細胞の数を手動で数えることにより、胸腺全体における上皮細胞数の評価方法の開発を行った。その結果、5 週齢の雌マウスでは、 $\sim 9 \times 10^5$ 個の $\beta 5t$ 発現皮質上皮細胞、および、 $\sim 1.1 \times 10^6$ 個の Aire 陽性髄質上皮細胞を含め、上皮細胞数は 10^6 個を超えることが明らかになった。これらの結果から、従来の酵素消化法による胸腺上皮細胞の単離は、細胞数、および、上皮細胞の機能的な重要性の過小評価をもたらしている可能性があることが明らかになった。これらの結果は米国科学雑誌 *Journal of Immunology* に掲載された (Sakata, et al. 2018)。

9. 研究発表（平成29年度の研究成果）

【雑誌論文】 計（6）件 うち査読付論文 計（6）件

通番	共著の有無*	著者名	論文標題			
		Sakata M, <u>Ohigashi I</u> , <u>Takahama Y</u>	Cellularity of thymic epithelial cells in the postnatal mouse			
①		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		Journal of Immunology	有	200	2018	1382-1388
②		著者名	論文標題			
		Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, <u>Ohigashi I</u> , <u>Takahama Y</u>	Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells.			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		Journal of Experimental Medicine	有	214	2017	1925-1935
③		著者名	論文標題			
		<u>Ohigashi I</u> , Ohte Y, Setoh K, Nakase H, Maekawa A, Kiyonari H, Hamazaki Y, Sekai M, Sudo T, Tabara Y, Sawai H, Omae Y, Yuliwulandari R, Tanaka Y, Mizokami M, Inoue H, Kasahara M, Minato N, Tokunaga K, Tanaka K, Matsuda F, Murata S, <u>Takahama Y</u> .	A human PSMB11 variant affects thymoproteasome processing and CD8+ T cell production.			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		JCI Insight	有	2	2017	1-13
④		著者名	論文標題			
		Sornborger A, Li J, Timmons C, Lupu F, Eggenschwiler J, <u>Takahama Y</u> , Manley N R.	MiCASA is a new method for quantifying cellular organization.			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		Nature Communications	有	8	2017	1-10
⑤		著者名	論文標題			
		<u>Kondo K</u> , Takada K, <u>Takahama Y</u> .	Antigen processing and presentation in the thymus: implications for T cell repertoire selection			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		Current opinion in Immunology	有	46	2017	53-57
⑥		著者名	論文標題			
		<u>Takahama Y</u> , <u>Ohigashi I</u> , Baik S, Anderson G.	Generation of diversity in thymic epithelial cells.			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		Nature Reviews Immunology	有	17	2017	295-305

【学会発表】 計（5）件 うち招待講演 計（5）件

通番	発表者名	発表標題	
①	Takahama Y	Cellularity of thymic epithelial cells in postnatal mouse	
	学会等名	発表年月日	発表場所
	The 8th ThymOz	2018年3月21日	オーストラリア ヘロン島
②	Ohigashi I	Human PSMB11 polymorphisms that affect thymoproteasome processing and CD8+ T cell generation	
	学会等名	発表年月日	発表場所
	The 8th ThymOz	2018年3月24日	オーストラリア ヘロン島
③	大東 いずみ	T細胞の自己免疫寛容確立におけるCCL21の役割	

	学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所
	第37回胸腺研究会	2018年2月24日	愛知県名古屋市 (名古屋大学)
④	大東 いずみ	T細胞の自己免疫寛容確立におけるCCL21の役割	
	学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所
	第40回日本分子生物学会 年会	2017年12月9日	兵庫県神戸市 (神戸ポートアイランド)
⑤	藤森 さゆ美	マウス胸腺皮質上皮細胞亜集団における Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化	
	学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所
	第40回日本分子生物学会 年会	2017年12月7日	兵庫県神戸市 (神戸ポートアイランド)

【図 書】 計 () 件

通番	共著の有無*	著 者 名	出 版 社		
①		書 名	発 行 年	総ページ数	

*相手国研究代表者との共著がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり論文内に事業名を明記している場合は◎と記入した上で、明記されている箇所（頁、巻頭、巻末等）を記入。

*足りない場合は適宜行を追加して下さい。

10. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出 願】 計 () 件

通番	産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別
①						

【取 得】 計 () 件

通番	産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
①						

11. 本事業に対する要望等