

博士論文

多階層網羅的分子発現解析による胸腺上皮細胞の性状解明

田中 優

多階層網羅的分子発現解析による胸腺上皮細胞の性状解明

所属 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官 岡 明 教授

申請者名 田中 優

目次

略語	3
要旨	4
序文	5
方法	28
結果	42
考察	95
謝辞	105
引用文献	107

略語

cTEC: Cortical thymic epithelial cell

LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MHC: Major histocompatibility complex

mTEC: Medullary thymic epithelial cell

TCR: T cell receptor

TEC: Thymic epithelial cell

要旨

胸腺は抗原認識が可能で自己寛容性を獲得した T 細胞の成熟の場であり、幼若な T 前駆細胞と胸腺上皮細胞との双方向作用が T 細胞の産生に不可欠である。胸腺上皮細胞は皮質胸腺上皮細胞と髄質胸腺上皮細胞とに大別され、各々が T 細胞の選択に異なる重要な役割を果たしているが、その細胞学的特徴には不明な点が多い。本研究では、皮質および髄質胸腺上皮細胞のトランスクリプトームおよびプロテオームによる網羅的な解析を行うことで、それぞれに特徴的な分子を多数同定した。さらに皮質胸腺上皮細胞に特異的に発現する胸腺プロテアソームを欠損するマウスを用いてプロテオーム解析を行い、胸腺プロテアソームの重要性について評価した。

序文

疾患の病態生理および治療を考える上で免疫系の関与は以前にも増して重要になってきている。感染症をはじめとした急性疾患、自己免疫疾患や悪性腫瘍などの慢性疾患のいずれにおいても、免疫系がその病態に大きく関わっている。さらに近年では自己免疫疾患の治療のみならず、悪性腫瘍の治療においても免疫系を標的とした治療が盛んに行われるようになり、臨床における免疫系の重要性は増すばかりである。一般小児科診療を行う中で比較的良好に遭遇する疾患でも、感染症をはじめ、川崎病、腎炎、ネフローゼ症候群、急性脳炎・脳症、1型糖尿病など、数多くの疾患の発症に免疫系が関与していることが示唆されている。また、母体—胎児間寛容も免疫系の重要性を示す好例である。さらに、免疫異常をきたす先天性疾患は稀少ではあるが免疫系の成り立ちを理解するのに重要であり、現在でも原因遺伝子が日進月歩の勢いで新規に同定されている。このように小児科の一般診療に当たる中で、私は臨床における免疫系の重要性を痛感してきた。

小児の特徴はその発達、発育にある。Scammon は臓器の発育様式を神経系型、生殖器系型、リンパ系型、一般型の 4 つに分類した。Scammon の分類では胸腺はリンパ系型に属するが、胸腺は出生直後より急激に重量を増し思春期を前にピークを迎え以後は萎縮するという推移パターンを示す点で、他のリンパ系型に分類された臓器と異なっている¹ (図 1)。

小児科の臨床においても胸腺は重要な臓器である。新生児期や乳児期において正常胸腺は大きく、胸部単純写真を解釈する上で胸腺陰影と異常陰影の識別は重要である。また最近では胎児超音波検査が精度良く行われるようになり、胎児心疾患の存在に加えて胸腺の無／低形成があることから 22q11.2 欠失症候群が出生前に疑われる場合も多くなったが²、現在でも出生後に胸腺が欠損していることから同症候群が疑われ診断に至ることは少なくない。このように画像検査において胸腺を正しく認識することは実臨床において重要である。また先天性心疾患の手術を行う際には術野の確保のために胸腺の摘除が必要であるが、手術時に胸腺の全摘除を行うと術後

T細胞数および免疫機能が抑制されるという報告もあり³、これは小児期における胸腺でのT細胞産生の重要性が窺い知られる好例である。このような理由で免疫系に興味のあった私は特に胸腺に興味を持つに至り、研究を開始した。

免疫は外来抗原への反応性を事前に有して即時的に誘導される自然免疫と、抗原特異性を構築し効率良い外来抗原の排除および免疫記憶の形成に関わる獲得免疫に大別される⁴ (図2)。自然免疫に関与する代表的な細胞としては好中球をはじめとする顆粒球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、樹状細胞などが挙げられる。好中球やマクロファージ、樹状細胞は病原細菌そのものを貪食し排除する。ナチュラルキラー細胞は主にウイルス感染細胞を認識してそれを傷害する。マクロファージや樹状細胞は貪食した細胞に由来する抗原をT細胞に提示することができるが、マクロファージは感染局所で活性化されその場に留まるのに対し、樹状細胞は所属リンパ節に移行して抗原提示を行い、T細胞の活性化に寄与している。

一方、獲得免疫に関与する代表的な細胞としてはT細胞とB細胞が挙げられる

(図2)。獲得免疫による外来抗原の排除はより特異性が高い一方、活性化するのに自然免疫よりも時間を要する⁵。抗原提示細胞による抗原提示を受けて活性化されたT細胞はエフェクターT細胞となるが、エフェクターCD8+ T細胞は感染細胞を抗原特異的に直接傷害するのに対し、エフェクターCD4+ T細胞は種々のサイトカインを産生してT細胞やB細胞などを活性化しさらなる効率の良い外来抗原の排除に貢献する。またB細胞は抗体を産生し外来抗原の抗原特異的な排除に寄与する。一部のT細胞は免疫応答が終了した後もメモリーT細胞として生存し、免疫記憶を行いその後の同一抗原への速やかな免疫応答を可能にしている。過剰な免疫応答は時として生体に有害な場合もあるが、それを避けるために制御性T細胞がエフェクターT細胞やB細胞による免疫応答を適切な範囲に制御している⁶。

このように、自然免疫と獲得免疫は相互に深く連関しながら感染症や腫瘍の排除に寄与しており各々を構成するいずれの細胞も重要である。その中でもT細胞は獲得免疫の根幹を構成する重要な細胞群であり、胸腺における適切なT細胞の産生は

免疫全体において不可欠である⁷ (図3)。

胸腺は第三咽頭嚢に由来する上皮器官であり⁸、機能的には獲得免疫系の主要な構成細胞である T 細胞の産生を担う一次リンパ器官である^{9,10}。骨髄で産生された T 前駆細胞は胸腺へと移入し、機能的に成熟した T 細胞が末梢へと移出していく。胸腺の構造は皮質と髄質の二つに大別される¹¹ (図4)。胸腺内での分化において T 前駆細胞は、皮質胸腺上皮細胞 (cortical thymic epithelial cells: cTECs) が産生する Dll4 (Delta-like 4) や IL-7 (Interleukin-7) の刺激によって増殖し T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) を細胞表面上に発現し、加えて CD4 と CD8 の双方を発現した double positive 胸腺細胞 (DP) となる。発現された TCR は、cTEC 内で断片化されたペプチドを提示した主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex: MHC) と相互作用し、TCR シグナルを受けた胸腺細胞のみが髄質へと移行する。一方 TCR シグナルを受けなかった胸腺細胞はアポトーシスにより死滅する。生体防御に有用である、TCR シグナルを受けた幼若 T 細胞のみが胸腺皮質で選択されるこのプロセ

スを正の選択と呼ぶ。一方髄質へ移行した CD4+ CD8+胸腺細胞は CD4 あるいは CD8 のいずれか一方のみを発現する single positive 胸腺細胞となる。これらの single positive 胸腺細胞は髄質胸腺上皮細胞 (medullary thymic epithelial cells: mTECs) や樹状細胞が提示した自己ペプチド-MHC と相互作用し、高親和性の TCR シグナルを受けた細胞はアポトーシスにより死滅する他、一部は制御性 T 細胞などへと分化する。T 細胞の自己寛容性を確立する胸腺髄質での胸腺細胞の選択プロセスを負の選択と呼ぶ¹²⁻¹⁴ (図 5)。

cTEC と mTEC はそれぞれ胸腺内における正の選択および負の選択に重要な役割を果たしているが、各々の機能の特徴付ける分子が複数同定されている¹⁵ (図 6)。

cTEC では、Dll4、Cathepsin L、Tssp (Thymus-specific serine protease)、Psm11

(Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 11; $\beta 5t$) が特徴的な機能的分子として挙げられる。Dll4 は Notch1 のリガンドの一つであり胸腺内での T 細胞の生存に必須である^{16,17}。Cathepsin L や Tssp はプロテアーゼであり、cTEC のライソゾーム

内で MHC class II に会合するペプチドを産生し、CD4+ T 細胞の産生に関わる^{18,19}。

一方、 $\beta 5t$ は cTEC に特異的に発現している胸腺プロテアソームを構成するサブユニットの一つであり、機能的な CD8+ T 細胞の産生に重要である²⁰⁻²³。

一方 mTEC では Ccl21 (C-C motif chemokine ligand 21)、Aire (Autoimmune regulator) などが機能的に重要な分子として挙げられる。正の選択を受けた胸腺細胞はケモカインレセプター Ccr7 (C-C motif chemokine receptor 7) を発現するようになる。一方 Ccr7 のリガンドの一つである Ccl21 は mTEC の一部が発現しており、正の選択を受けた胸腺細胞が髄質に移行するのに重要な役割を果たしている^{24,25}。mTEC は集団として生体に存在するほぼすべての組織特異的抗原を発現することができ、これを無差別遺伝子発現 (promiscuous gene expression) と呼ぶ²⁶。核内因子である Aire は無差別遺伝子発現の一部を担っており、Aire 欠損マウスにおいては自己寛容を獲得できなかった T 細胞が様々な臓器において自己免疫疾患を惹起する²⁷。

このように T 細胞の胸腺内分化において cTEC と mTEC は全く異なる重要な役割

を各々果たしているが、依然として細胞学的特徴には不明な点が多い。マウスにおいて胎生期、生後のいずれも胸腺内に cTEC および mTEC いずれにも分化できる細胞が存在することが示されている^{28,29}。β5t は先述の通り生後胸腺においては cTEC に特異的に発現しているが、発生の過程において cTEC のみならず mTEC も β5t を発現する段階を経ることが示されている^{30,31}。このように cTEC と mTEC はともに胸腺内に存在する共通の前駆細胞から分化することが知られている。現在も精力的に分化メカニズムについては研究が続けられているが、現時点では各々の細胞系譜への分化を特徴づける分子、特に転写因子や転写調節因子は明らかにされていない。

様々な段階特異的な転写因子の発現が様々な細胞系譜への分化に重要であることが示されている胸腺細胞に比べて、TEC の研究には困難な点が多い。胸腺細胞や T 細胞は比較的容易に解析することが可能であり、また培養、刺激、移入といった介入が行いやすい。対して TEC は胸腺内に占める頻度が極めて低く、大量の細胞を必要とする生化学的な解析が難しい。加えて初代培養が難しく、また *in vivo* での動態

を正確に反映するような細胞株も樹立されていないことが TEC の研究が難しい原因として挙げられる。このような観点からも、cTEC および mTEC の網羅的な解析による細胞学的特徴のさらなる解明が求められている。

また、先述の通り、 $\beta 5t$ は cTEC に特異的に発現する胸腺プロテアソームを構成するサブユニットの一つである。プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を ATP 依存性に分解する巨大プロテアーゼ複合体である。プロテアソームには通常型プロテアソームに加え、免疫系で重要な役割を果たしている 2 つのプロテアソームが存在する。免疫プロテアソームでは通常型プロテアソームの酵素活性中心である $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ がそれぞれ $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5i$ に置き換わっており、抗原提示細胞である樹状細胞や mTEC で発現が見られる。一方 cTEC に特異的に発現する胸腺プロテアソームでは免疫プロテアソームの $\beta 5i$ が $\beta 5t$ に置き換わっている (図 7) ³²。 $\beta 5t$ の欠損マウスでは胸腺における CD4⁻ CD8⁺ 胸腺細胞、末梢における CD8⁺ T 細胞が減少し、加えて $\beta 5t$ の欠損マウスではインフルエンザウイルス感染モデルでの死亡率が高

く、機能的な CD8+ T 細胞の産生が障害されることは報告されている²⁰⁻²³。しかしながら、どのように $\beta 5t$ が機能的な CD8+ T 細胞の産生を調整しているのかについてはいまだなお不明である。加えて、 $\beta 5t$ が cTEC におけるプロテオームやトランスクリプトームを変化させるのか、その結果 cTEC の細胞機能に影響を与えるか否かについても明らかになっていない。近年 $\beta 5t$ の欠損によって cTEC が mTEC の特徴を持つようになる主張する報告も見られるが³³、今回 $\beta 5t$ KO マウス cTEC の網羅的解析をすることでその主張を検証することとした。

昨今、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析が爆発的な勢いで行われるようになり新たな知見を生み出している。TEC についても RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析が近年行われているものの mTEC に主眼を置いた解析が多く^{26,27,34,35}、cTEC に焦点を当てた網羅的解析は少ない。また次世代シーケンサーを用いた網羅的解析は主に核酸が対象であるが、一方でタンパク質の挙動も重要である。特に、抗原認識を行いつつ自己寛容を獲得した T 細胞の産生を行うために、

cTEC と mTEC は異なるタンパク質分解系を持っており、それゆえタンパク質レベルでの解析は非常に重要である^{12,32,36}。タンパク質の網羅的な解析は質量分析器を用いて行われているが、解析には必要なタンパク質の量が多くまた核酸のように増幅させることができないこともあり、TEC でのデータは今までに報告がない。通常 1 匹のマウス胸腺からは 10^3 のオーダーの TEC しか精製することができない。プロテオームのためには 1 サンプル 5×10^5 個以上の細胞が通常必要であることを考えると、必要な量の細胞を精製するためには数百個のマウス胸腺が必要になる計算となる。つまり通常のマウスを用いて TEC のプロテオーム解析を行うことは、現時点では費用や実験数の観点からハードルが高く、特に遺伝子改変マウス由来の胸腺を用いる際には大変困難であると考えられる。また先述したように、マウス胸腺上皮細胞由来の細胞株は機能的に重要な分子の発現が十分に見られないこともあり、*in vivo* の動態を正確に反映するものではなくプロテオーム解析には有用ではない。

そこで本研究では、プロテオーム解析に十分な TEC を比較的少数の胸腺から精製
するべく Keratin 5 promoter-driven cyclinD1-transgenic (K5D1) マウスを用いた。

K5D1 マウスは元々皮膚の研究のために樹立されたトランスジェニックマウスである
が、研究の過程においてこのマウスに胸腺の過形成が見られることが判明した (図
8)。後に Keratin 5 は mTEC および TEC の共通前駆細胞に発現が見られることがわ
かり、そのためこのトランスジェニックマウスでは胸腺の過形成が見られることが
明らかとなった^{37,38}。この過形成胸腺が胸腔内臓器、特に肺を圧排し呼吸窮迫を示す
ため K5D1 マウスの成獣は自然死しやすいことが判明した³⁷。K5D1 マウス胸腺にお
いても皮質および髄質の構造は保たれ T 細胞の産生は維持されており、加えて、B
細胞の産生も保たれていた³⁸。このマウスの過形成胸腺を用いることで、TEC の網
羅的なタンパク質解析を比較的容易に行うことが可能であった。そして RNA レベル
での網羅的解析であるトランスクリプトームと、タンパク質レベルでの網羅的解析
であるプロテオームを組み合わせ、TEC における多階層網羅的分子発現解析を本研

究では行った。さらに、cTEC で特異的に発現している胸腺プロテアソームを欠損する cTEC については K5D1-β5tKO マウス cTEC を用いてプロテオーム解析を行った。このデータをもとに胸腺プロテアソームの欠損が cTEC に及ぼす影響についても評価を行った。なお、K5D1-β5tKO マウス胸腺も K5D1 マウス胸腺と同様過形成が見られ、成獣は自然死しやすい傾向にあった。

プロテオーム解析にはいくつかの種類があるが、本研究では TMT (Tandem mass tag) 法と Label-Free 法の 2 つを使用した。サンプルから抽出されたタンパク質はトリプシンなどの酵素を用いてペプチドへと断片化された後、質量分析器により解析される。TMT 法では複数のサンプルを同時に解析する目的で、消化された後のペプチドに tag でラベリングを行い、それらをプールした後に質量分析器での解析に供する。このようにすることで、質量分析器での解析の結果得られたペプチドのシグナルがどのサンプル由来かを retrospective に知ることができ、多サンプルを同時に扱い直接比較することが可能な点で優れている (図 9)³⁹。しかしながら、ダイナミック

レンジがやや狭いことやプロテオームの結果への tag による ratio distortion⁴⁰ に注意する必要がある。一方 Label-Free 法は断片化されたペプチドをラベリングすることなく質量分析器での解析に供するもので、簡便であり TMT 法と比較するとダイナミックレンジが広い利点というがあるが、1 実験で 1 サンプルしか解析することができず実験間のばらつきが大きくなる傾向にある (図 9)³⁹。今回の研究では K5D1 マウス cTEC と K5D1 マウス mTEC、および K5D1-β5tKO マウス cTEC の以上 3 群の比較を同時に行うことを主な目的として、TMT 法での解析を行った。加えて、K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC との比較では β5t に由来するペプチドの比較を行う目的で、ダイナミックレンジの広い Label-Free 法を用いた。

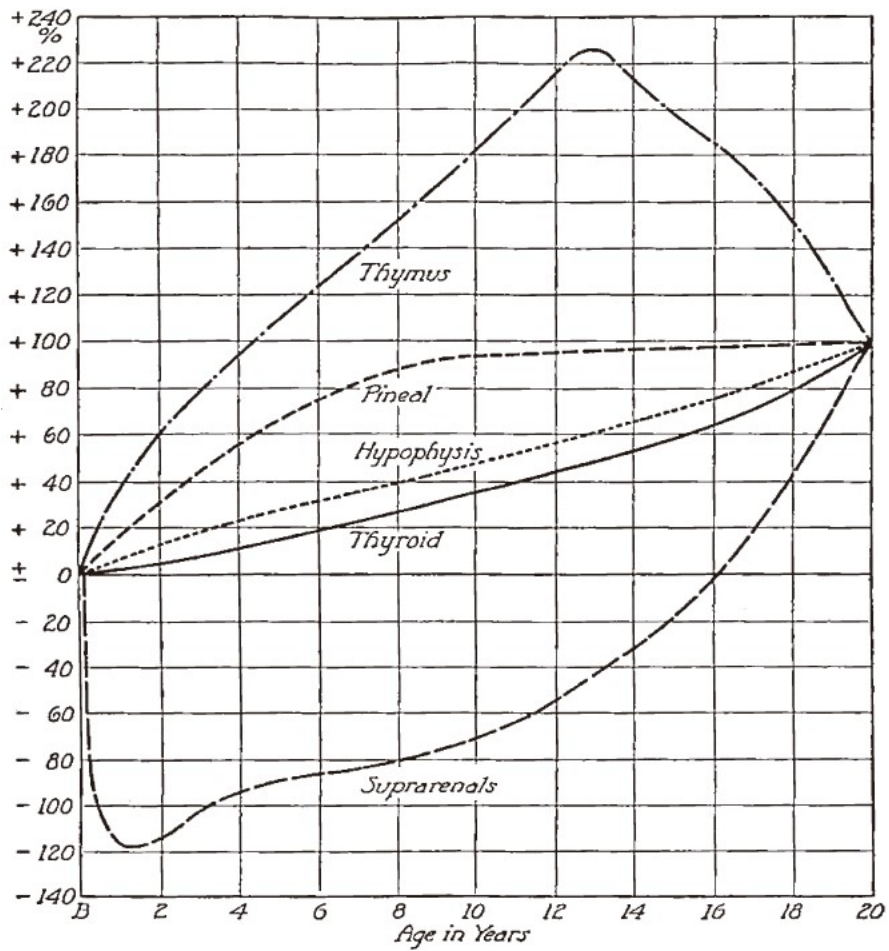


図1. 胸腺、松果体、脳下垂体、甲状腺、副腎重量の経時的変化（引用文献1より引用）

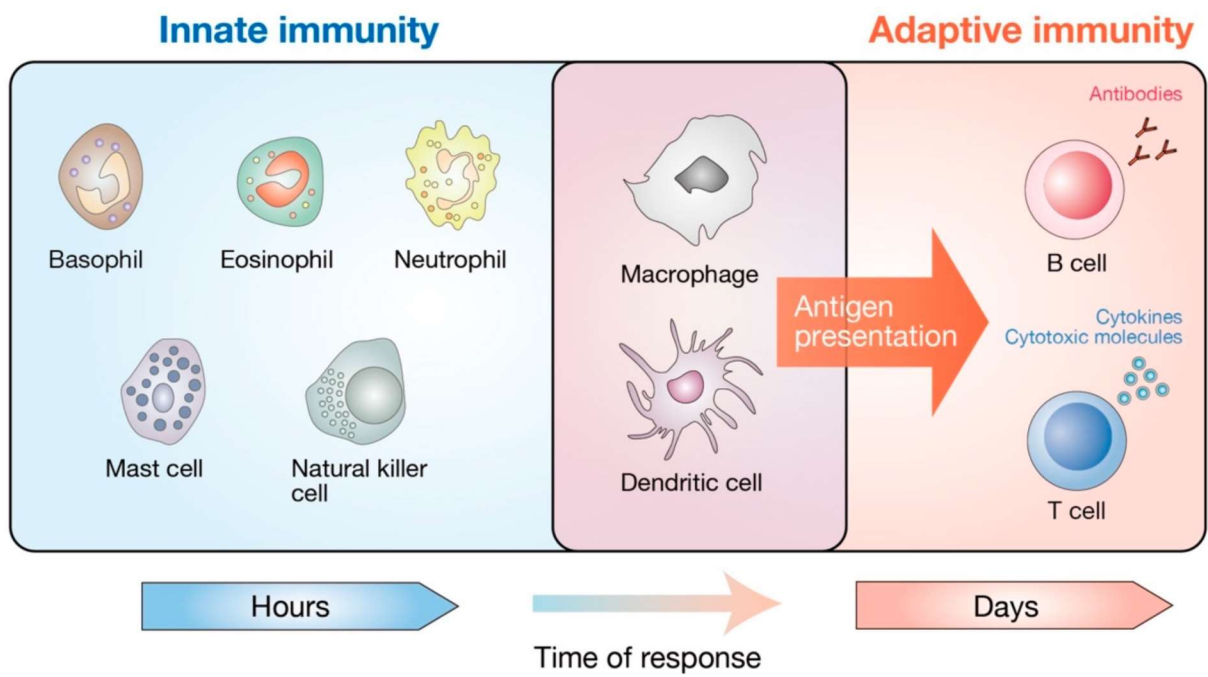


図2. 自然免疫と獲得免疫の関係 (引用文献4より引用)

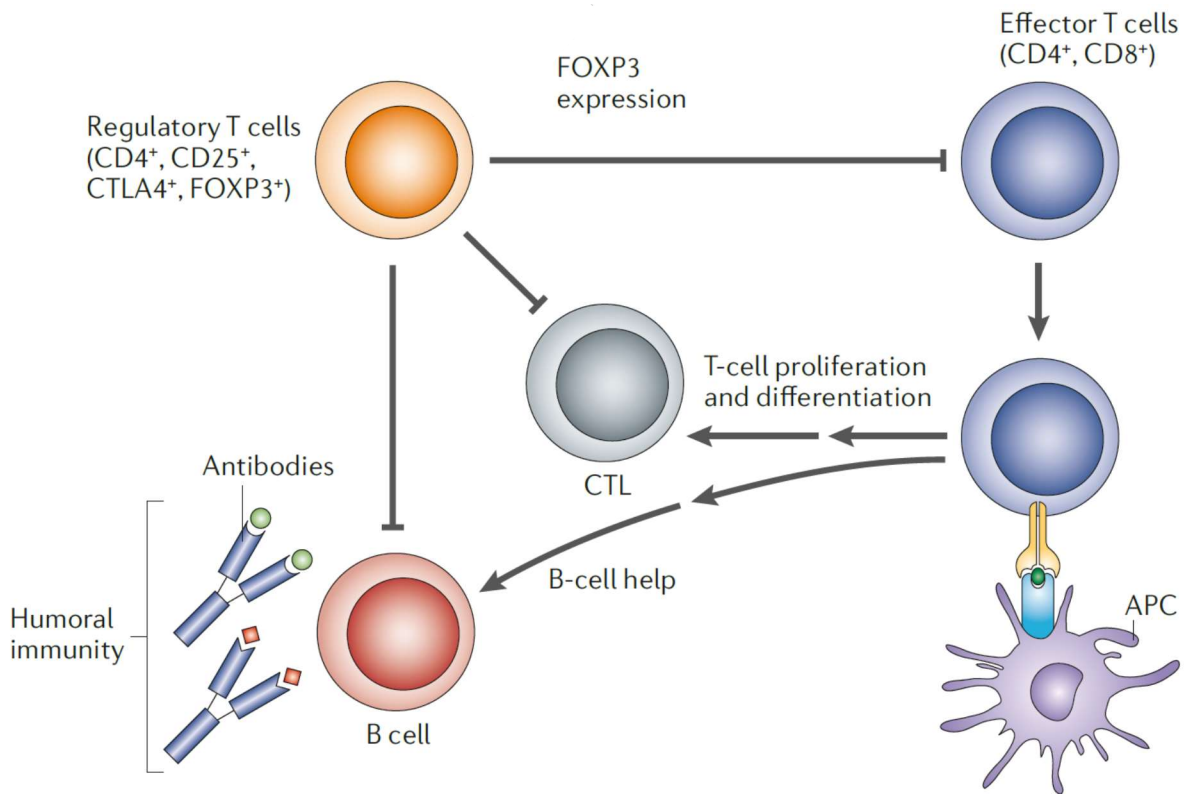


図 3. 獲得免疫の概要 (引用文献 7 より引用、改変)

APC: Antigen presenting cell; CTL: Cytotoxic lymphocyte; MHC: Major histocompatibility complex

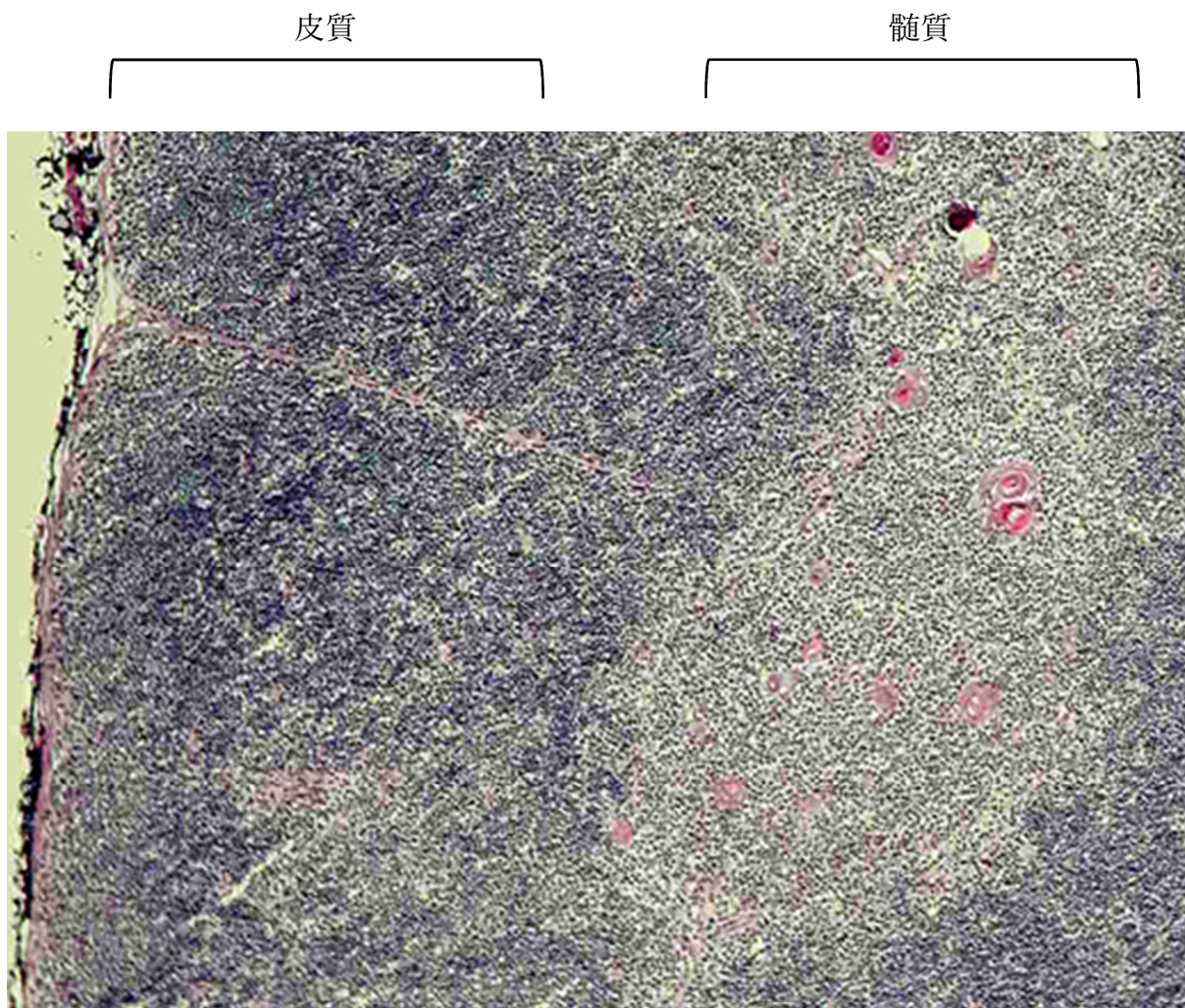


図4. ヒト胸腺の構造 (HE 染色：引用文献 11 より引用、改変)

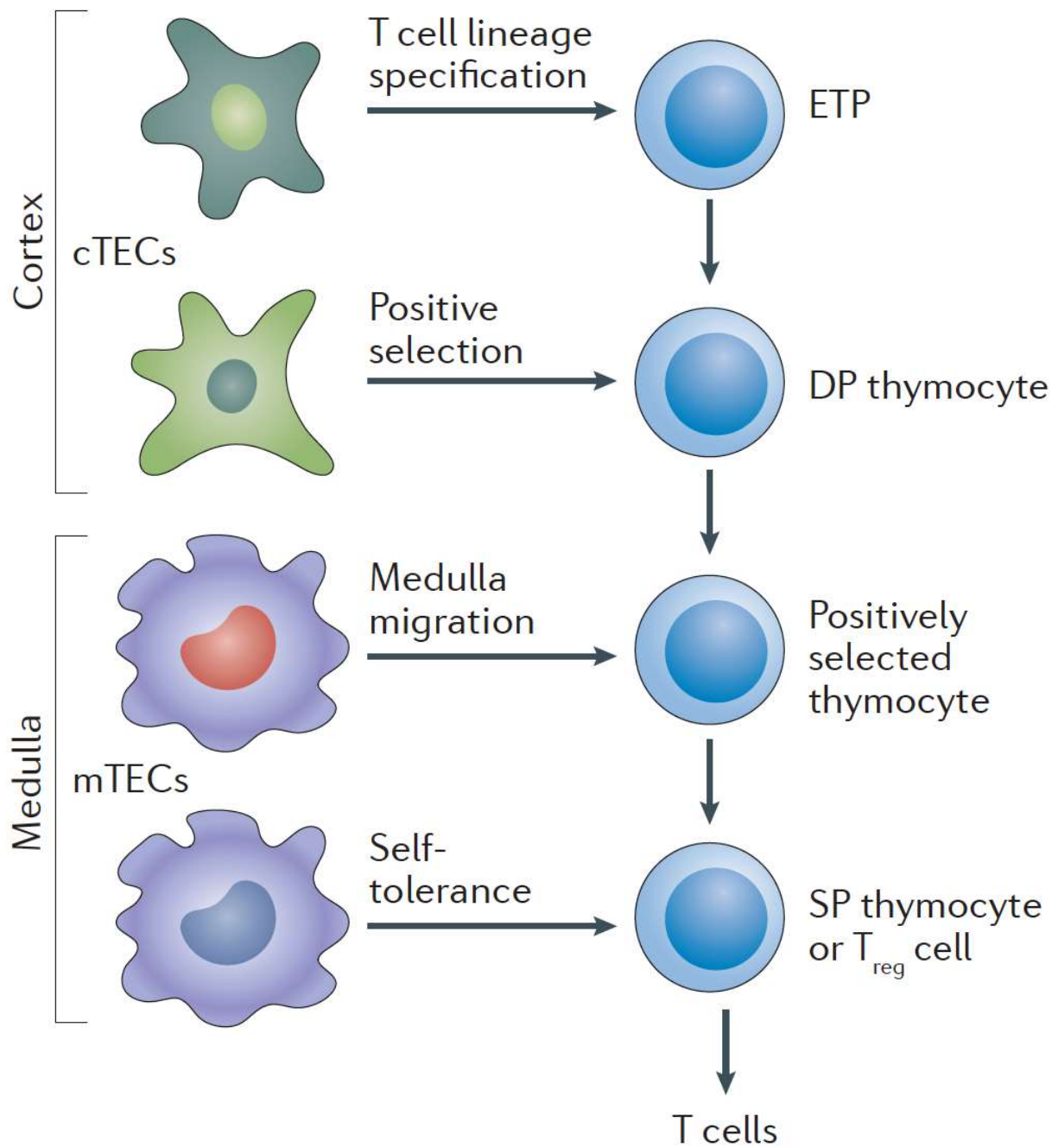


図5. TEC と T 細胞の分化および選択との関係 (引用文献 14 より引用)

cTECs: Cortical thymic epithelial cells; DP: Double positive; ETP: Early T cell progenitor;

mTECs: Medullary thymic epithelial cells; SP: Single positive; T_{reg} cell: Regulatory T cell

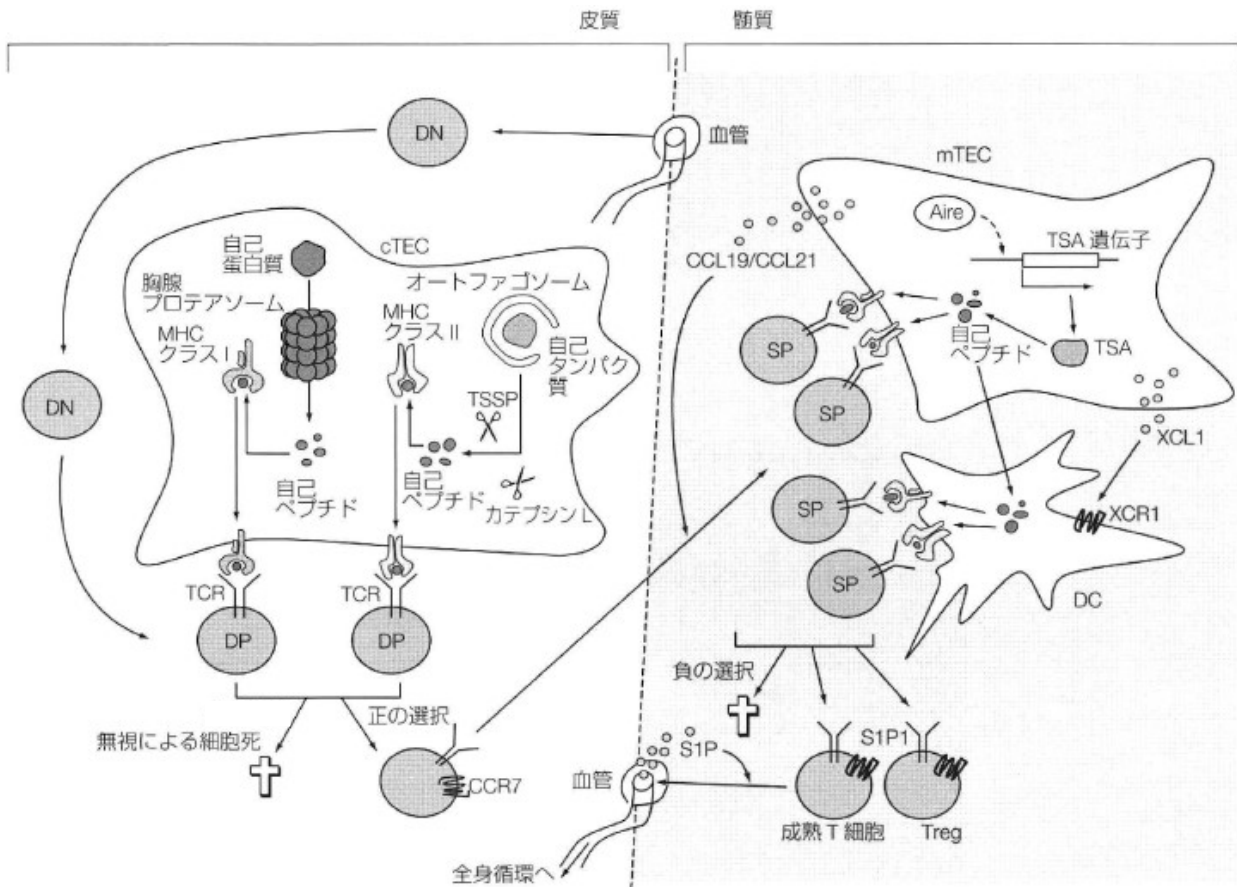


図 6. T 細胞の胸腺内における分化と選択を司る cTEC と mTEC (引用文献 15 より引用、一部改変)

cTEC: Cortical thymic epithelial cell; CCL19: C-C chemokine ligand 19; CCL21: C-C chemokine ligand 21; CCR7: C-C chemokine receptor 7; DC: Dendritic cell; DN: CD4⁻ CD8⁻ double negative cells; DP: CD4⁺ CD8⁺ double positive cells; MHC: Major histocompatibility complex; mTEC: Medullary thymic epithelial cell; S1P: Sphingosine-1-phosphate; S1P1: Sphingosine-1-phosphate receptor 1; SP: CD4⁺ CD8⁻ / CD4⁻ CD8⁺ single positive cells; TCR: T cell receptor; Treg: Regulatory T cell; TSA: Tissue specific antigen; TSSP: Thymus-specific serine protease; XCL: X-C motif chemokine ligand 1; XCR1: X-C motif chemokine receptor 1

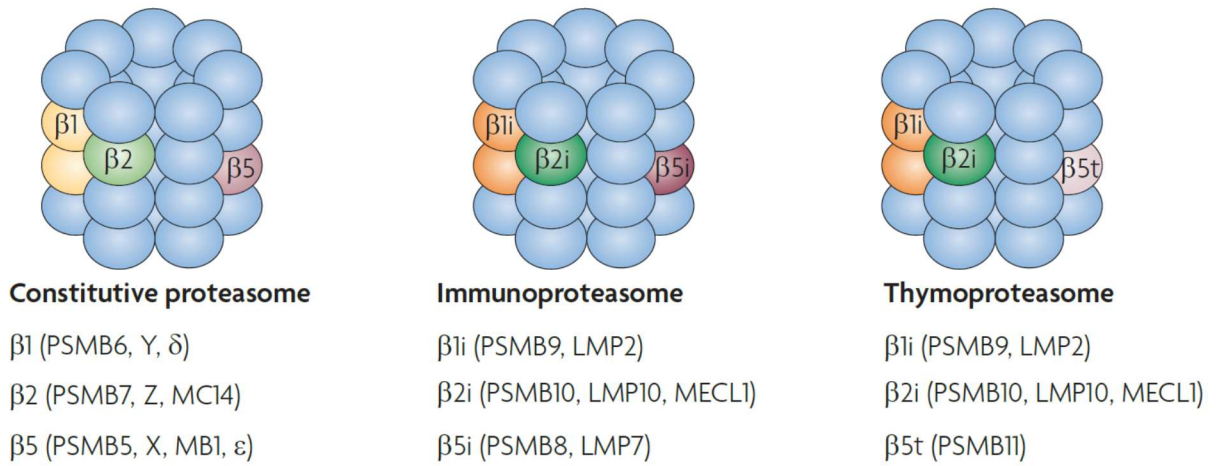


図 7. プロテアソームの種類 (文献 32 より引用)

左より通常型プロテアソーム、免疫プロテアソーム、胸腺プロテアソームの構造を示す。それぞれの構造の下に、組み込まれている酵素活性中心のサブユニットが示されている。

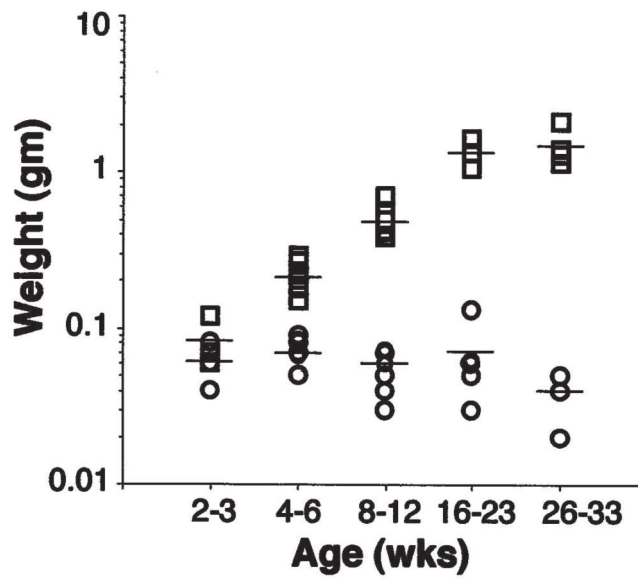


図 8. K5D1 マウスの過形成胸腺

上：7 週齢雄マウスの K5D1 マウス胸腺および B6 マウス胸腺の写真

スケールバーは 1cm である。

下：K5D1 マウス胸腺および B6 マウス胸腺の重量の変化（引用文献 38 より引用）

□が K5D1 マウス胸腺、○が B6 マウス胸腺を示す。

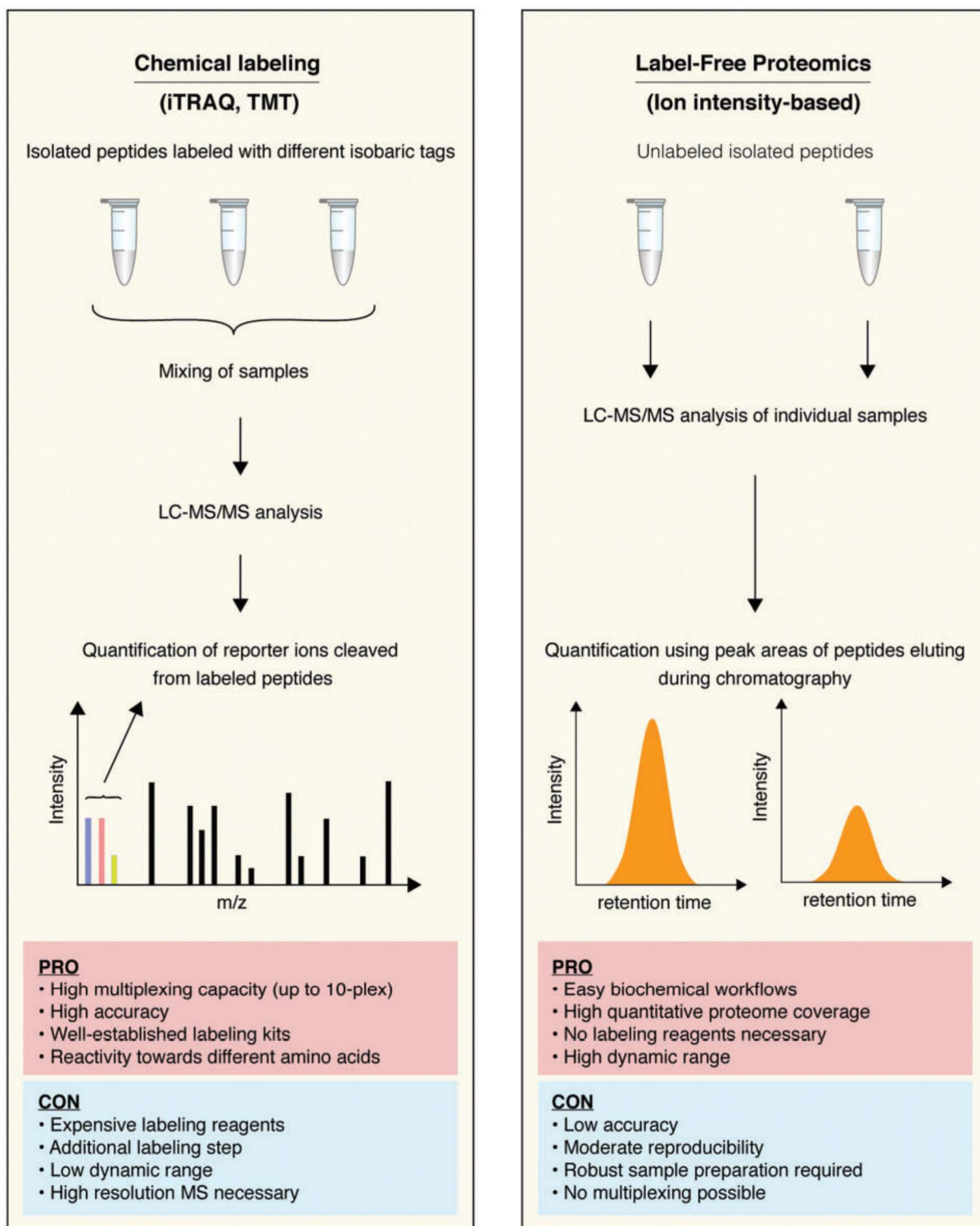


図 9. LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) における TMT (tandem mass tag) 法と Label-Free 法の比較 (文献 39 より引用)

方法

マウス

C57BL/6 (B6) マウス (MHC haplotype: b) はSLC JapanあるいはThe Jackson Laboratoryから購入した。BALB/cマウス (MHC haplotype: d) およびDBA/2マウス (MHC haplotype: d) はThe Jackson Laboratoryから購入した。Keratin 5 promoter-driven cyclinD1-transgenic (K5D1)マウス (B6背景)⁴¹、B6- β 5tKOマウス (β 5t-Venus knockin mouse²⁰、 β 5t-iCre knockin mouse³⁰のいずれかを用いた。いずれもB6マウスと十分に戻し交配を行い、B6背景となっている)、AireKOマウス (B6マウスと十分に戻し交配を行い、B6背景となっている)⁴²は過去に報告のあるマウスを用いた。K5D1- β 5tKOマウスはK5D1マウスと β 5t-Venus knockin mouseマウスの交配で得た。マウスを用いた実験は徳島大学動物実験委員会 (T28-589) およびAnimal Care and Use Committee of the National Cancer Institute (ASP 18-431, EIC-076-2) の承認の下行った。マウスの週齢について、成獣は4~20週齢、仔は1~2週齢のものを用いた。

蛍光免疫染色による胸腺切片解析

胸腺は4%パラホルムアルデヒドで固定、スクロース溶液で置換した後にoptimum cutting temperature compound (SakuraFinetek) を用いて包埋、凍結させ、クライオスタットを用いて10 μ m厚の切片を作成し、これを用いて β 5t/Aire/UEA1 (Ulex europaeus agglutinin 1) の免疫染色を行った。またCD4/CD8/UEA1の免疫染色を行う際には、4%パラホルムアルデヒドで固定せずにoptimum cutting temperature compound内に包埋、凍結させた胸腺を用いて10 μ m厚の切片を作成し、アセトン固定をした切片を用いた。染色に用いた抗体あるいは試薬の一覧は以下の表の通りである (抗体名 (括弧内はモノクローナル抗体におけるクローン名) および製造元を示した)。

Antibody/Reagent	Source
Rabbit anti-mouse β 5t polyclonal antibody	MBL International Corporation
Biotin Ulex europaeus agglutinin I	Vector Laboratories
eFluor 660 anti-mouse Aire antibody (5H12)	Invitrogen
FITC anti-mouse CD4 antibody (RM4-5)	
eFluor 660 anti-mouse CD8 α antibody (53-6.7)	
Streptavidin Alexa Fluor 546	
Goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody, Alexa Fluor 488 highly cross-adsorbed secondary antibody	

HE染色による組織切片解析

各臓器を10%ホルマリンで固定した後パラフィン内に包埋し、クライオスタットを用いて5 μ m厚の切片を作成し、ヘマトキシリンとエオジンによって染色を行った。

フローサイトメーターによる実験およびセルソーターによる細胞精製

胸腺細胞および脾臓細胞を含む細胞懸濁液の調製は、ピンセットを用いて臓器を細断して行った。TECを含む細胞懸濁液は、摘出した胸腺をハサミで細断し、TECを胸腺細胞から分離するため0.5 U/mL Liberase TM (Roche) の存在下37°Cで反応させ、反応終了後緩やかにピペッティングを行って調製した。細胞表面抗原の染色は4°Cで45分を行った。死細胞の除去にはpropidium iodideを用いた。細胞内抗原の染色については細胞表面抗原を染色した後、2%パラホルムアルデヒドで細胞を固定、0.05%サポニンで透過処理しその後 β 5t, α 6, β -cateninに対する抗体染色を行った。

染色に用いた抗体あるいは試薬の一覧は以下の表の通りである（抗体名（括弧内

はモノクローナル抗体におけるクローン名）および製造元を示した）。

Antibody/Reagent	Source
FITC anti-mouse CD4 antibody (RM4-5)	Invitrogen
APC anti-mouse CD4 antibody (RM4-5)	
Pacific Blue anti-mouse CD8 α antibody (5H10)	
Streptavidin Alexa Fluor 594	
Streptavidin APC-eFluor780	
Goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody, Alexa Fluor 488 highly cross-adsorbed secondary antibody	
PE/Cy5 anti-mouse CD45 antibody (30-F11)	BioLegend
PE/Cy7 anti-mouse CD45 antibody (30-F11)	
PE anti-mouse TCR β antibody (H57)	
Alexa Fluor 647 anti-mouse TCR β antibody (H57)	
PE/Cy7 anti-mouse CD326 (EpCAM) antibody (G8.8)	
Brilliant Violet 421 anti-mouse CD326 (EpCAM) antibody (G8.8)	
Alexa Fluor 647 anti-mouse Ly51 antibody (6C3)	BD PharMingen
PE anti-mouse CD25 antibody (PC61)	
FITC anti-mouse TCR γ/δ antibody (GL3)	BD Horizon
BV421 rat anti-mouse CD45 antibody (30-F11)	BD OptiBuild
BV786 anti-mouse MHC class I (H2-Kb) antibody (AF6-88.5)	Vector Laboratories
Biotin Ulex europaeus agglutinin I	
DyLight594 labeled Ulex europaeus agglutinin I	Dr. Shigeo Murata (The University of Tokyo)
Rabbit anti-mouse β 5t antibody	
Rabbit anti-mouse α 6 antibody	BD Transduction Laboratories
Mouse anti-Catenin, beta monoclonal antibody (Clone 14)	

また、プロテアソーム活性の測定には細胞透過性のあるプローブ Me4BodipyFL-Ahx3Leu3VS (Boston Biochem; 作業濃度は 1 μ M) を用い、このプローブによる染色を行った後、細胞表面抗原の染色を行い、フローサイトメーターによる解析に供した。プロテアソーム阻害は汎プロテアソーム阻害薬の一つである MG132 (Millipore; 作業濃度は 1 μ M または 10 μ M) を用いて 37°C、30 分処理し、その後上記プローブでの染色、細胞表面抗原の染色を行い、フローサイトメーターによる解析に供した。

Brefeldin A による TEC 表面における MHC Class I の発現減少を見た実験においては、細胞懸濁液を調製した後、5 μ g/mL の Brefeldin A (Sigma-Aldrich) の存在下に細胞を 37°C で 2 時間または 4 時間培養し、その後細胞表面抗原の染色を行い、フローサイトメーターによる解析に供した。

TEC の精製について、細胞懸濁液を調整した後、マグネットビーズでラベルされた抗 CD45 抗体 (CD45 MagnetBeads, mouse; Miltenyi Biotec) を用いて CD45 陰性細

胞を濃縮した後に細胞表面抗原を染色し、セルソーターで cTEC および mTEC を回収した。K5D1 マウスあるいは K5D1-β5tKO マウスの腫大した胸腺からの TEC の精製については、Percoll (GE Healthcare) を用いた密度勾配遠心による濃縮とマグネットビーズを用いた濃縮とを併用した後、細胞表面抗原を染色し、セルソーターで cTEC および mTEC を回収した。

アロリンパ球混合試験

Responder として、13-15 週齢の K5D1 マウスおよび B6 マウスから摘出した脾臓細胞を 37°C で 20 分間、5 μM Cell Trace Violet (CTV ; Thermo Fisher Scientific) でラベルしたものをを用いた。Stimulator として、6-7 週齢の B6 マウス、BALB/c マウス、DBA/2 マウスのいずれかから摘出した脾臓細胞を放射線照射 (20Gy) したものをを用いた。2 × 10⁶ 個の responder と 8 × 10⁶ 個の stimulator を混合し 12-well-plate 上で 6 日間、37°C で共培養し、細胞表面抗原を染色しフローサイトメーターで解析した。

TEC の蛍光免疫染色

精製した cTEC および mTEC を 4%パラホルムアルデヒドで固定、0.05%サポニンで透過した後に染色し、Cytospin 4 によってスライドガラス上に集め、共焦点顕微鏡で観察した。染色に用いた抗体あるいは試薬の一覧は以下の表の通りである（抗体名（括弧内はモノクローナル抗体におけるクローン名）および製造元を示した）。

Antibody/Reagent	Source
FITC anti-mouse CD45 antibody (30-F11)	BioLegend
Alexa Fluor 647 anti-mouse Ly51 antibody (6C3)	
Biotin Ulex europaeus agglutinin I	Vector Laboratories
Streptavidin Alexa Fluor 546	Invitrogen

RNA およびタンパク質の量の測定

RNA は精製した細胞から RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。

タンパク質は精製した細胞から 6M グアニジン塩酸 (100mM Tris-HCl, 2mM DTT

(ジチオトレイトール) を含む) を用いて変性処理して抽出した。抽出した RNA と

タンパク質の量は Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

RNA シークエンス (RNA-seq)

B6 マウス cTEC・mTEC、K5D1 マウス cTEC・mTEC、B6-- β 5tKO マウス cTEC、K5D1- β 5tKO マウス cTEC に対して RNA-seq を行い、それぞれ 3 サンプルを用いた。精製した cTEC および mTEC から SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を合成し、次いで Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてシークエンスに必要なアダプター等を付与した cDNA ライブラリーを作成した。作成した cDNA ライブラリーを次世代シークエンサー HiSeq 1500 (Illumina) によるシークエンスに供した。シークエンスはシングルリード法で行い、リード長は 50bp とした。シークエンスデータは CLC Genomics Workbench 11 (QIAGEN) を用いて解析した。RNA-seq における転写産物発現量の指標として RPKM (reads per kilobase of transcript, per million mapped reads) または CPM (counts per million) を用いた。Gene ontology 解析には DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いた。

TMT 法によるプロテオーム解析

1 サンプルにつき 5×10^5 個以上の TEC を解析に用いた (K5D1 cTEC 4 サンプル、K5D1 mTEC 3 サンプル、K5D1- β 5tKO cTEC 3 サンプル、計 10 サンプル)。1 サンプルにつき 2-6 匹の K5D1 マウス胸腺あるいは K5D1- β 5tKO マウス胸腺を用いた。精製した細胞を 150 μ L の 6M グアニジン塩酸 (100mM Tris-HCl, 2mM DTT を含む) で変性処理してタンパク質を抽出し、超音波処理をした後遠心 (20000g, 4°C, 15 分) を行った。上清を 5mM DTT により 30 分室温で還元した後、27.5mM ヨードアセトミドにより 30 分室温、遮光下でアルキル化した。その後クロロホルム・メタノール沈殿によってタンパク質を精製し、25 μ L の 50mM 重炭酸トリエチルアンモニウム (0.1% RapiGest SF (Waters) を含む) に溶解した。数回超音波処理および攪拌を行い、0.5 μ g のトリプシン/Lys-C (Promega) を用いてタンパク質を消化した (37°C、16 時間)。消化後のペプチド濃度を測定した後、各々のサンプルから 10 μ g のペプチドを取り、0.2mg の TMT10-plex reagents (Thermo Fisher Science) を用いて 1 時間

室温でラベルをした。ヒドロキシルアミンで反応を終了させた後、全てのサンプルをプールし、トリフルオロ酢酸を用いて酸性条件にし、高 pH 逆相分画を用いて収量を増加させるために High pH Reversed Phase Fractionation Kit (Thermo Fisher Science) を用いた。その後アセトニトリルを用いて各分画を抽出した後溶媒を蒸発させ、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解させた。

上記の結果得られたペプチド (各サンプル 1 μ g) は、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析器 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) による解析に供された。液体クロマトグラフィーには EASY-nLC 1200 UHPLC (Thermo Fisher Science) を、質量分析器には Q Exactive Plus (Thermo Fisher Science) を用いこれらを接続して用いた。得られたデータはマウス (*Mus musculus*) の Swiss-Prot database をタンパク質のデータベースとして用いて解析した。

Label-Free 法によるプロテオーム解析

Label-Free 法での実験は 2 回行った。TMT 法と同様の方法で抽出したタンパク質はトリプシン/Lys-C (Promega) を用いて消化した後、GL-Tip SDB (GL Sciences) を用いて脱塩し溶媒を蒸発させ、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解させた。得られたペプチド (各サンプル 400ng) は、LC-MS/MS による解析に供された。液体クロマトグラフィーには EASY-nLC 1200 UHPLC (Thermo Fisher Science) を、質量分析器には Q Exactive Plus (Thermo Fisher Science) を用いこれらを接続して用いた。得られたデータはマウス (*Mus musculus*) の Swiss-Prot database をタンパク質のデータベースとして用いて解析した。

Quantitative RT-PCR (reverse-transcribed polymerase chain reaction)

セルソーターを用いて精製した細胞から RNeasy Plus Micro Kit を用いて RNA を抽出した後、PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いて逆転写を行って

cDNA を作成した。定量的リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用い StepOnePlus Real-Time PCR System あるいは QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。遺伝子発現量は $2^{\Delta\text{CT}}$ 法で求めた (ΔCT は Gapdh とターゲット遺伝子の CT 値の差)。

イムノブロット

セルソーターで精製した細胞を 6M グアニジン塩酸 (100mM Tris-HCl, 2mM DTT を含む) で変性処理を行ってタンパク質を抽出し、超音波処理をした後クロロホルム・メタノール沈殿によってタンパク質を精製して、sample buffer (2% SDS, 62.5mM Tris HCl, 10% Glycerol, 0.1M DTT, 0.005% bromophenol blue) に溶解して細胞溶解液とした。これを 12%ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動して分離したのち、PVDF メンブレン (Millipore) に転写した。Blocking One solution (Nacalai Tesque) によりブロッキングを行った後室温で一晩一次抗体と反応、翌日二次抗体

と反応させ、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) で処理した後にメンブレン上

のバンドを検出した。イムノブロットの結果を用いたタンパク質の定量には ImageJ

v1.49 software を用いた。

染色に用いた抗体あるいは試薬の一覧は以下の表の通りである（抗体名（括弧内はモノクローナル抗体におけるクローン名）および製造元を示した）。

Antibody/Reagent	Source
Rabbit anti-mouse β 5t antibody	Dr. Shigeo Murata (The University of Tokyo)
Rabbit anti-mouse α 6 antibody	
Rabbit anti-mouse α 7 antibody	
Rabbit anti-mouse β 3 antibody	
Rabbit anti-mouse Rpn1 antibody	
Rat anti-mouse Rpn13 antibody	
Rabbit anti-mouse β 5i antibody	
Rabbit anti-mouse β 5 antibody	
Rabbit anti-mouse β 1i antibody	
Rabbit anti-mouse β 1 antibody	
Rabbit anti-mouse β 2i antibody	
Rabbit anti-mouse β 2 antibody	
Rabbit anti-beta-Actin antibody	Cell Signaling Technology
Donkey anti-rabbit IgG ECL antibody, HRP conjugated	GE Healthcare
Goat anti-rat IgG, whole Ab ECL antibody, HRP conjugated	

統計解析

統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad) を用いて行った。統計解析は等分散を仮定しない Welch の補正を用い、two-tailed unpaired Student's *t*-test で検定を行った。多重検定に際しては、false discovery rate approach を用いて unpaired *t*-test を行い、*Q* 値を算出した。結果のグラフには平均値および平均値の標準誤差を示した。

結果

1. K5D1 マウスの過形成胸腺内における成熟し自己寛容を獲得した T 細胞の産生

K5D1 マウスの腫大した胸腺では週齢が同じ B6 マウスに比べて 80-100 倍の数の TEC を含んでいた (図 10)。cTEC (CD45- EpCAM+ Ly51+ UEA1-) および mTEC (CD45- EpCAM+ Ly51- UEA1+) のフローサイトメーターでの解析において、それぞれの頻度は B6 と K5D1 マウスの間で有意な差は見られなかった (図 10)。一方、K5D1 マウスの胸腺は B6 マウスに比べて 30-50 倍の数の胸腺細胞を含んでいたが、CD4/CD8 および TCR β /TCR δ のプロファイルは B6 と K5D1 マウスの間で同様であった (図 11)。蛍光免疫染色による胸腺の切片解析では、K5D1 マウスの胸腺では B6 マウスと同様、皮質には $\beta 5t$ を発現する cTEC および CD4+ CD8+胸腺細胞が、髄質には Aire を発現する mTEC および CD4+ CD8-胸腺細胞または CD4- CD8+胸腺細胞が集積していた (図 12)。脾臓 CD4+ T 細胞数、CD8+ T 細胞数のいずれも、K5D1 マウスで B6 マウスに比べて約 2-3 倍に増加していた (図 13)。アロリンパ球

混合試験において、K5D1 マウスの脾臓 T 細胞は MHC haplotype の同じ B6 マウス脾臓細胞には寛容であるのに対し、MHC haplotype の異なる BALB/c または DBA/2 マウス脾臓細胞には反応しその結果細胞増殖が見られ、K5D1 マウスの脾臓 T 細胞はアロ反応性をもつ機能的な T 細胞であることが確かめられた (図 14)。K5D1- β 5tKO マウスでは K5D1- β 5tHet マウスに比べて胸腺での CD4⁺ CD8⁺胸腺細胞数は低下していた (図 15)。また、K5D1-AireHet マウスでは網膜や唾液腺に炎症所見は見られなかったが、K5D1-AireKO マウスではこれらの組織に細胞浸潤が見られた (図 16)。

これらの結果から、胸腺が過形成であり cTEC および mTEC の細胞数が著しく増加している K5D1 マウスにおいても、B6 マウスと同様に抗原認識が可能で自己寛容を獲得した T 細胞の産生および選択が可能であることが確認できた。K5D1 マウスの cTEC および mTEC は、胸腺における T 細胞分化に関わるタンパク質の研究目的に耐えうると考えられた。

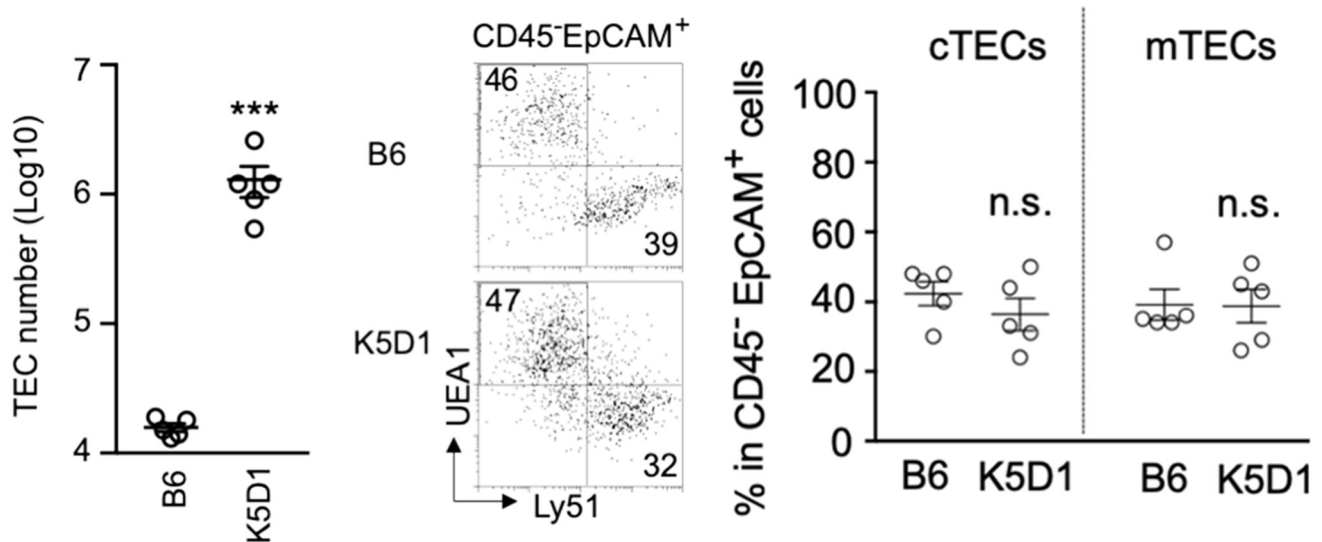


図 10. B6 マウス、K5D1 マウス TEC の比較

左：B6 マウス、K5D1 マウス TEC の個数の比較

フローサイトメーターにより得られた CD45- EpCAM+細胞頻度より TEC の個数を算出した。実験は 3 回行い、各群 5 サンプルの結果を示した (***: $p < 0.001$)。

中：B6 マウス、K5D1 マウス TEC における Ly51 と UEA1 の発現

TEC (CD45- EpCAM+細胞) における Ly51 と UEA1 のフローサイトメータープロファイルのうち代表的なものを示した。プロファイル内の右下の数字は cTEC、左上の数字は mTEC の CD45- EpCAM+細胞における頻度を表す。

右：B6 マウス、K5D1 マウス TEC 中の cTEC と mTEC の頻度の比較

実験は 3 回行い、各群 5 サンプルの結果を示した (n.s.: not significant)

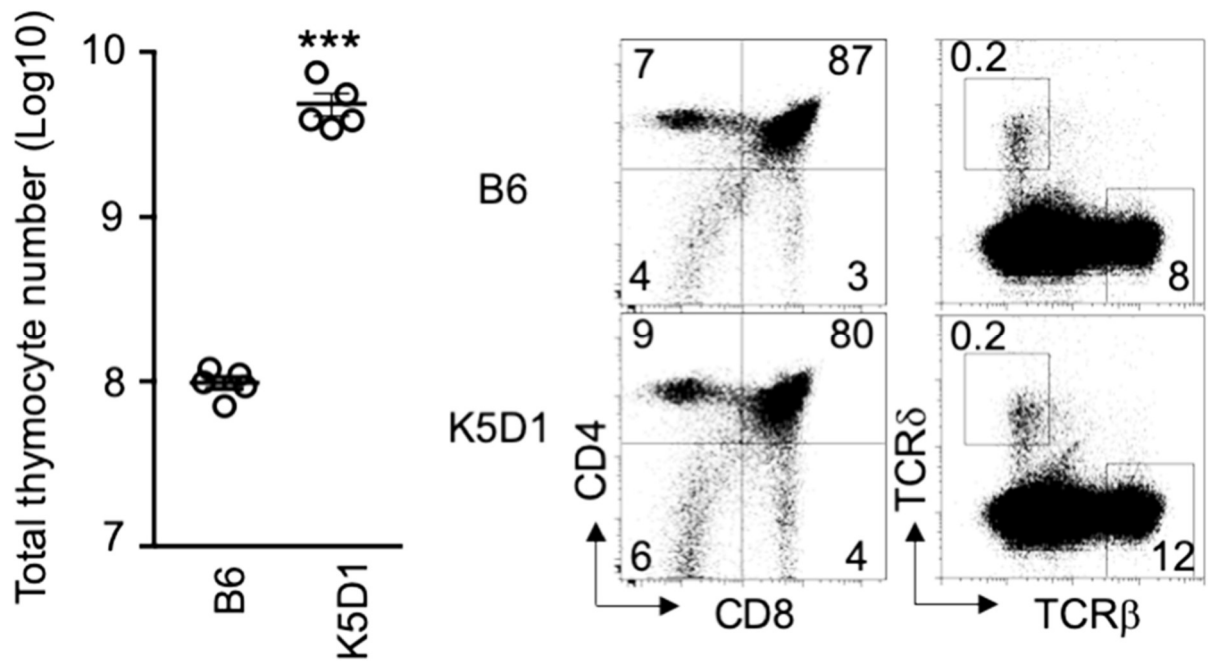


図 11. B6 マウス、K5D1 マウス胸腺細胞の比較

左：B6 マウス、K5D1 マウス胸腺細胞の個数の比較

実験は 3 回行い、各群 5 サンプルの結果を示した (***: $p < 0.001$)。

右：B6 マウス、K5D1 マウス胸腺細胞のフローサイトメーターによる解析

フローサイトメーターによる CD4/CD8 および TCRβ/TCRδ のプロファイルのうち代表的なものを示した。CD4/CD8 のプロファイル内の各数字はそれぞれ CD4⁺CD8⁺細胞 (右上)、CD4⁺CD8⁻細胞 (左上)、CD4⁻CD8⁻細胞 (左下)、CD4⁻CD8⁺細胞 (右下) の頻度を表す。TCRβ/TCRδ のプロファイル内の各数字は TCRβ^{high}細胞 (右下)、TCRδ 陽性細胞 (左上) の頻度を表す。

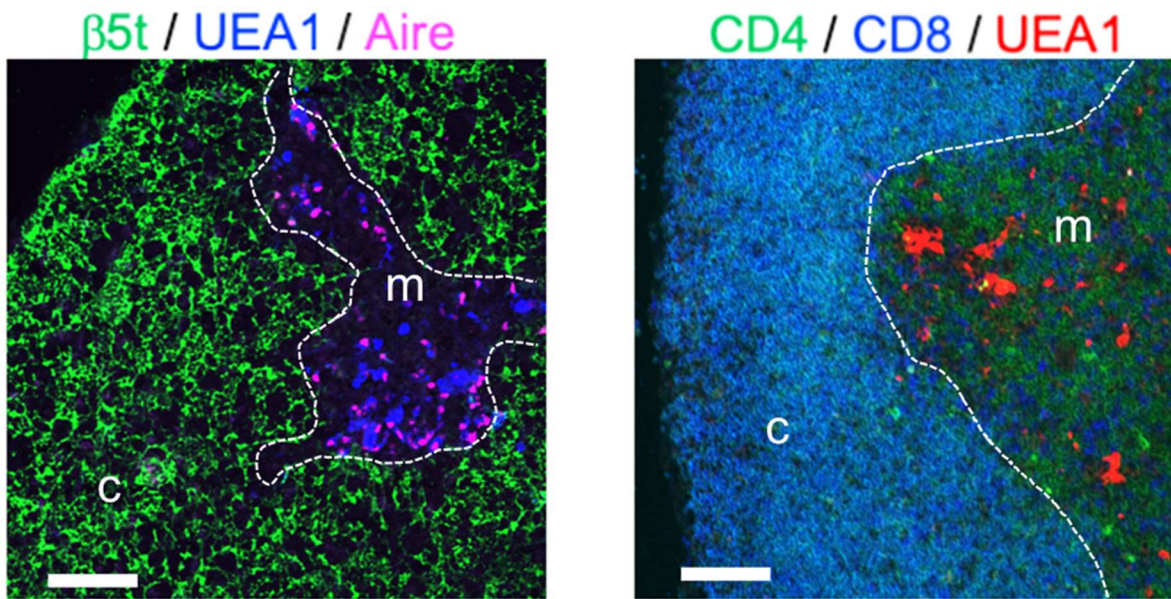


図 12. 蛍光免疫染色による K5D1 マウスの胸腺の切片解析

左： $\beta 5t$ （緑）、Aire（紫）、UEA1（青）の染色

右：CD4（緑）、CD8（青）、UEA1（赤）の染色

CD4+CD8+細胞は水色で示されている。スケールバーは $100\mu\text{m}$ 、図内の c は皮質、m は髄質、白点線は皮質と髄質の境界を表す。

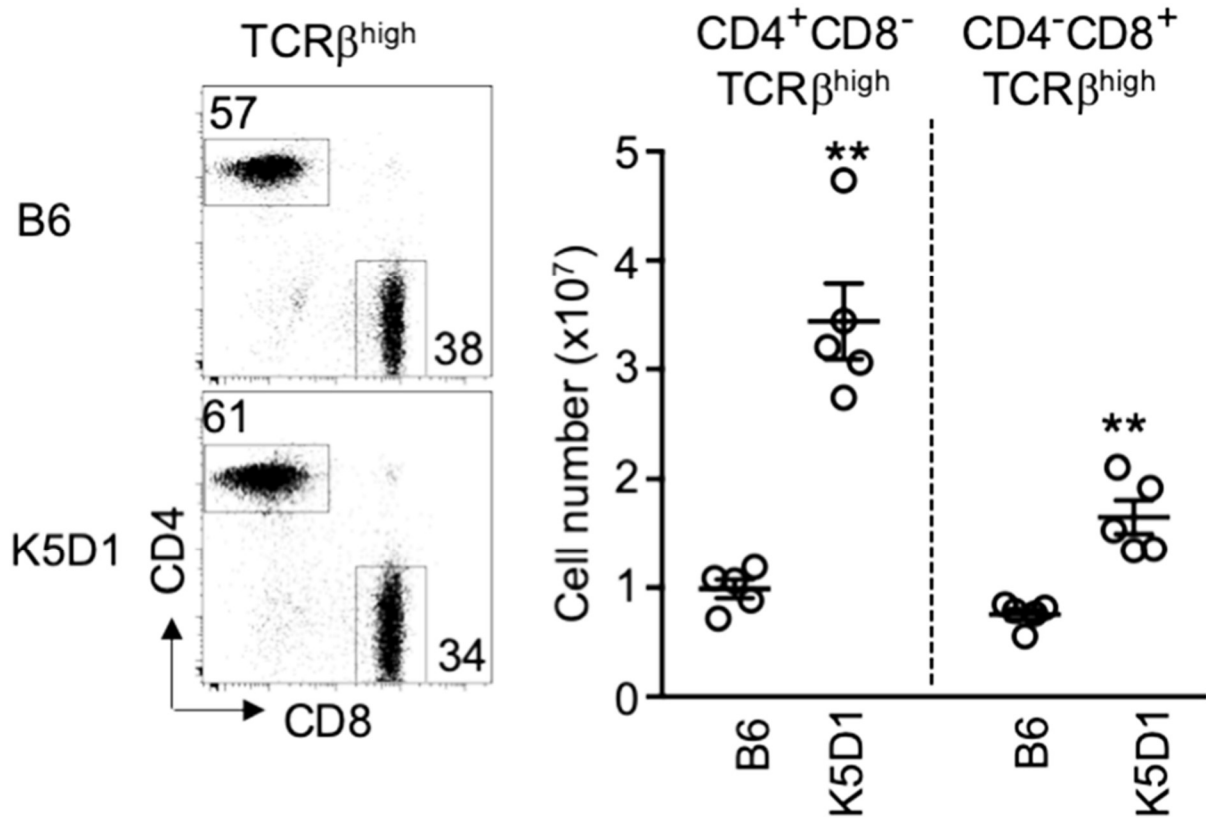


図 13. B6 マウス、K5D1 マウス脾臓細胞の比較

左：B6 マウス、K5D1 マウス脾臓細胞のフローサイトメーターによる解析

T 細胞 (TCRβ^{high} 細胞) における CD4/CD8 のプロファイルのうち代表的なものを示した。

右：脾臓細胞中における CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞の個数

CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞はおのおの CD4+CD8-TCRβ^{high} 細胞、CD4-CD8+TCRβ^{high} 細胞として定義した。実験は 3 回行い、各群 5 サンプルの結果を示した (**: $p < 0.01$)。

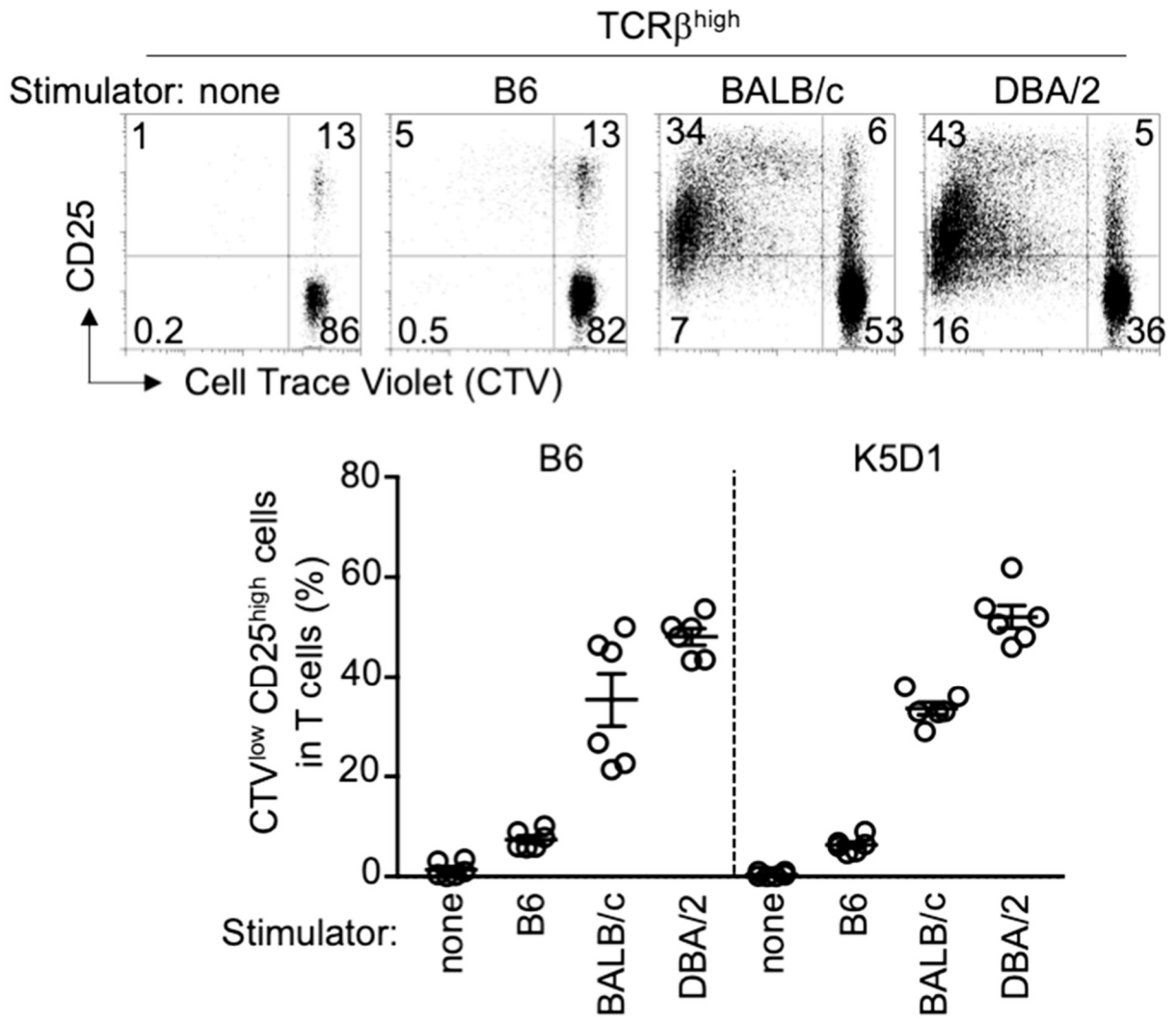


図 14. B6 マウスおよび K5D1 マウスの脾臓 T 細胞を用いたアロリンパ球混合試験
 上：K5D1 マウス脾臓 T 細胞を responder に用いた群のフローサイトメーターの結果
 プロファイル上に用いた stimulator を示した。プロファイル内の数字は各分面の頻度を示す。このうち CTV^{low}CD25^{high}TCRβ^{high} 細胞を細胞増殖した分画として用いた。
 下：T 細胞中における CTV^{low}CD25^{high} 細胞の頻度
 実験は 2 回行い、各群 6 サンプルの結果を示した。

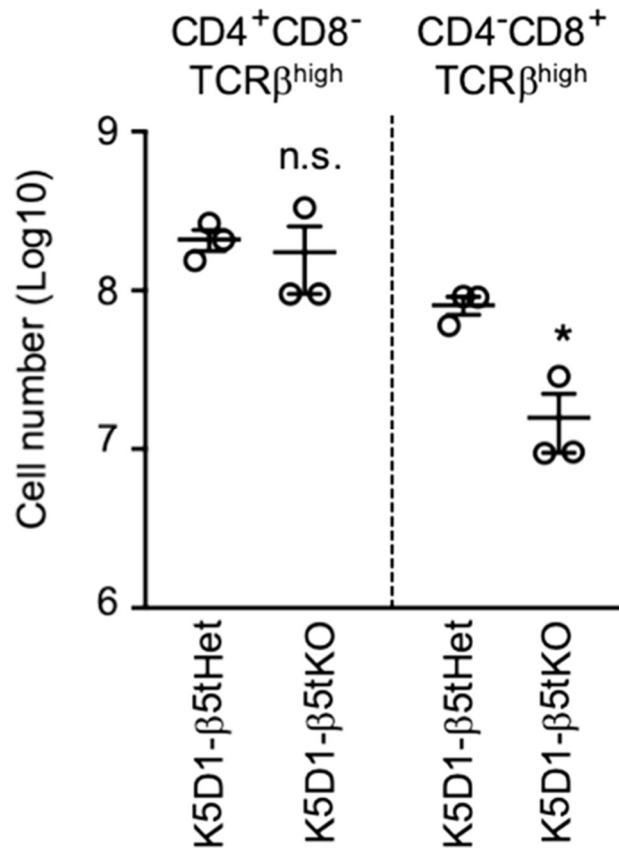


図 15. K5D1-β5tKO マウス胸腺における CD4-CD8⁺細胞の減少

フローサイトメーターを用いて、K5D1-β5tヘテロマウス (K5D1-β5tHet) 胸腺と K5D1-β5tKO マウス胸腺における CD4⁺ CD8⁻ TCRβ^{high} 細胞および CD4⁻ CD8⁺ TCRβ^{high} 細胞の個数を算出し比較した。実験は 3 回行い、各群 3 サンプルの結果を示した (*: $p < 0.05$; n.s.: not significant)。

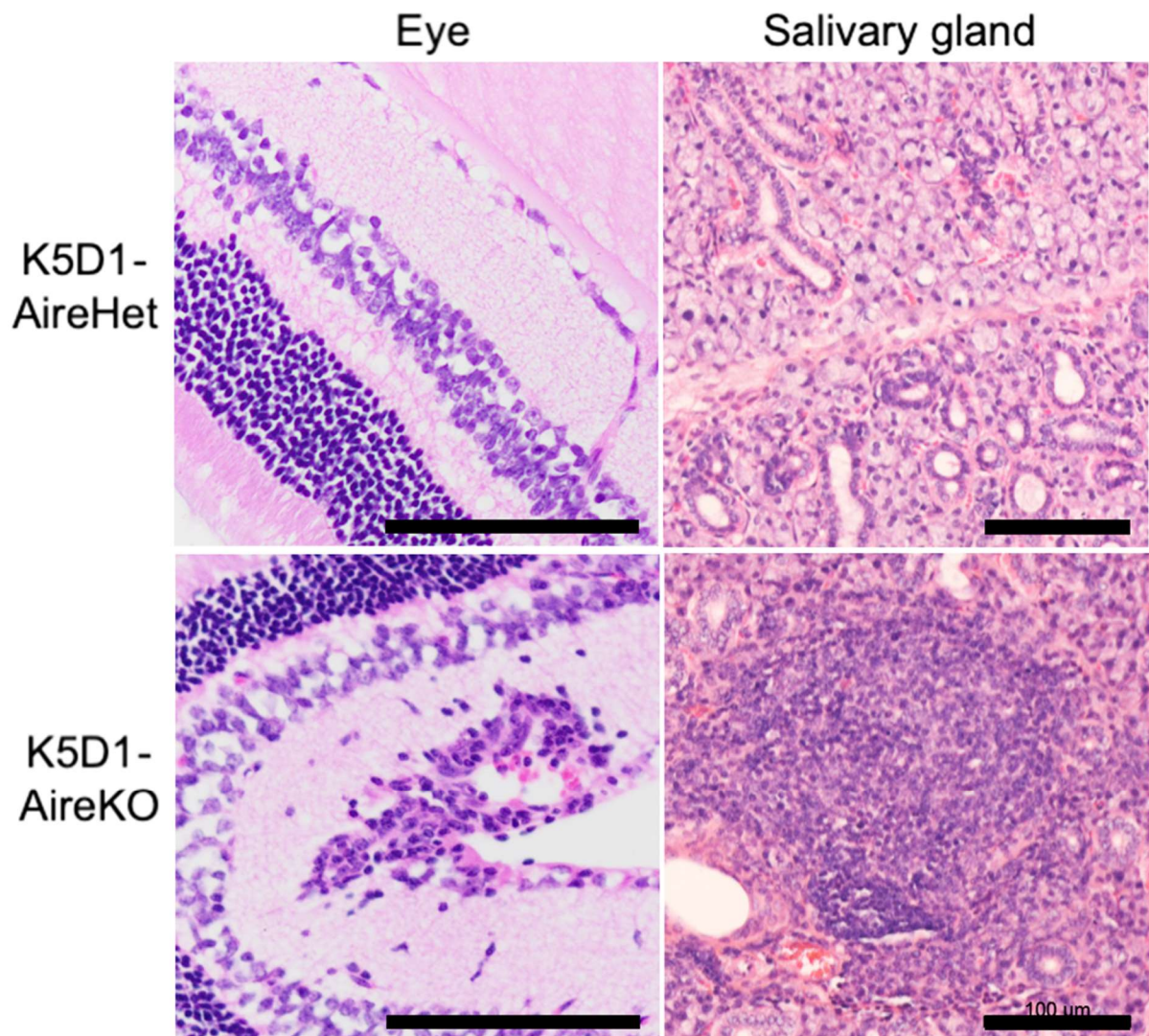


図 16. K5D1-AireKO マウスにおける組織炎症

K5D1-Aire ヘテロマウス (K5D1-AireHet) および K5D1-AireKO マウスの網膜および唾液腺の HE 染色を示した。スケールバーは 100 μ m である。

2. K5D1 マウスの cTEC と mTEC のセルソーターによる精製

前項の結果を鑑み、K5D1 マウスの過形成胸腺から cTEC と mTEC とをセルソーターを用いて精製し、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析に供することとした。K5D1 マウスおよび B6 マウスの胸腺を Liberase TM で処理して TEC を含む細胞懸濁液を調製し、マグネットビーズを用いて TEC を濃縮し、その後セルソーターで cTEC と mTEC とを精製した (図 17) ^{34,35,43-47}。精製した cTEC と mTEC を共焦点顕微鏡で観察したところ、B6 マウス cTEC の 15%、K5D1 マウス cTEC の 22%が 4-8 個の胸腺細胞を細胞内に含む複合体を形成していた (図 18)。これらの cTEC と胸腺細胞からなる複合体は胸腺ナース細胞 (thymic nurse cell: TNC) と呼ばれ、cTEC と長期間生存した CD4+ CD8+胸腺細胞との双方向作用が持続した結果形成されている ⁴⁸⁻⁵⁰。TNC に含まれる CD4+ CD8+胸腺細胞は cTEC に包含されているため、表面分子マーカーに基づいた cTEC の精製の際に CD4+ CD8+胸腺細胞が混入することは

不可避である。一方、mTEC ではこのような複合体の形成は見られなかった (図 18)。

TNC に包含された CD4+ CD8+胸腺細胞がどの程度 cTEC から抽出した RNA およびタンパク質量に影響を及ぼすかを推定した。5x10³ 個の cTEC および CD4+ CD8+胸腺細胞から平均 21.3ng、5.1ng の RNA が抽出された (図 19)。細胞 1 個あたりに換算するとそれぞれ平均 4.3pg、1.0pg であった。精製した cTEC は 15-22% の TNC を含み、それぞれの TNC は 4-8 個の CD4+ CD8+胸腺細胞を含んでいることをもとに、cTEC から抽出した RNA のうち CD4+ CD8+胸腺細胞由来の RNA の割合を次式より計算したところ、その値は 20-27% と推定された (図 19)。

$$\frac{\text{DP 1 個の RNA の量} \times \text{cTEC 1 個に含まれる DP の個数} \times \text{cTEC における TNC の割合}}{\text{cTEC 1 個の RNA の量}}$$

一方、cTEC および CD4+ CD8+胸腺細胞のタンパク質に関しては、細胞 1 個あたりに換算するとそれぞれ平均 7pg、157pg であった。cTEC から抽出したタンパク質

のうち CD4+ CD8+胸腺細胞由来のタンパク質の割合を次式より計算したところ、その値は 3-5%と推定された (図 19)。

$$\frac{\text{DP 1 個のタンパク質の量} \times \text{cTEC 1 個に含まれる DP の個数} \times \text{cTEC における TNC の割合}}{\text{cTEC 1 個のタンパク質の量}}$$

CD4+ CD8+胸腺細胞由来の RNA またはタンパク質の割合に差がある理由については、cTEC と CD4+ CD8+胸腺細胞とを比較した時に RNA の量の比よりもタンパク質の量の比の方が大きいことに由来すると考えられた。

K5D1 マウスから cTEC と mTEC を純度良く精製することが可能であったが、現時点での TEC の精製方法では cTEC に TNC を含むことが避けられず、cTEC から抽出した RNA およびタンパク質のうち、20-27%の RNA および 3-5%のタンパク質は TNC に包含された CD4+ CD8+胸腺細胞に由来すると考えられた。一方 mTEC に関しては、胸腺細胞との複合体形成は見られず、胸腺細胞の混入なしに精製することが可能であった。

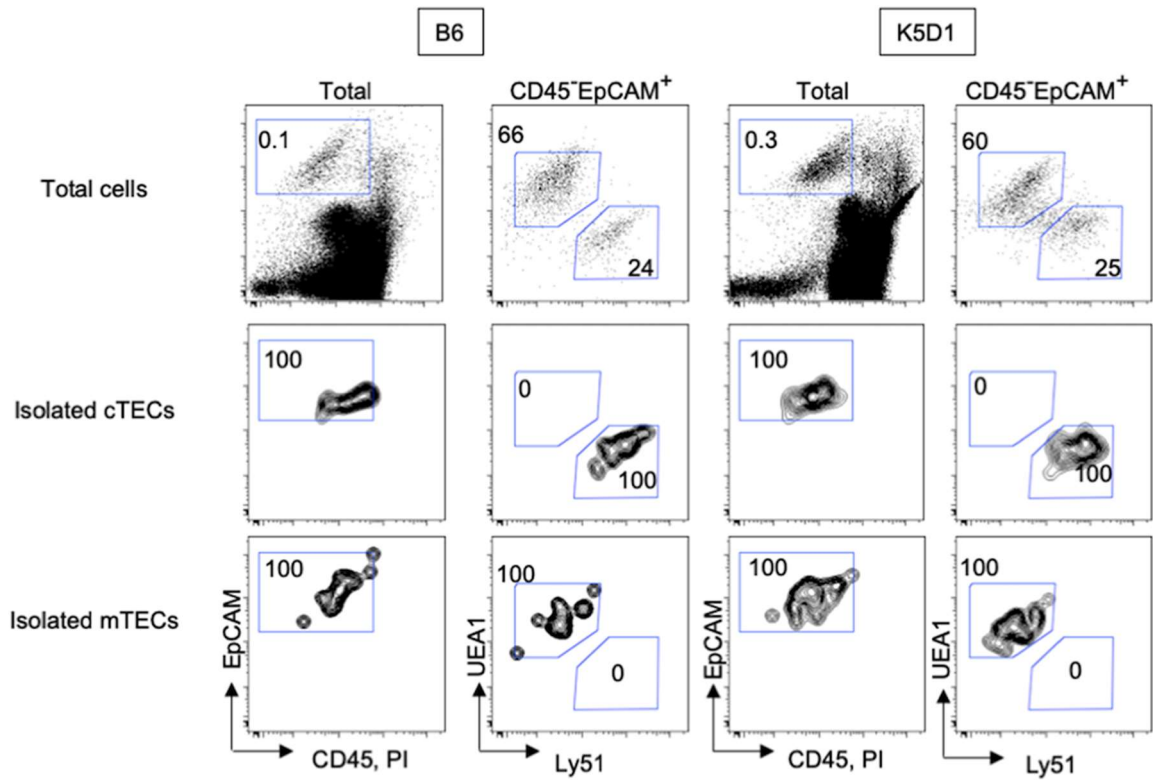


図 17. セルソーターによる B6 マウス、K5D1 マウス cTEC と mTEC の精製

セルソーターによる精製における、代表的なプロファイルを示す。上段は精製前のプロファイル、中段は精製した cTEC のプロファイル、下段は精製した mTEC のプロファイルを示す。プロファイル中の数字は Total 細胞中の CD45-EpCAM⁺細胞の頻度、CD45-EpCAM⁺細胞中の cTEC 及び mTEC の頻度を示している。

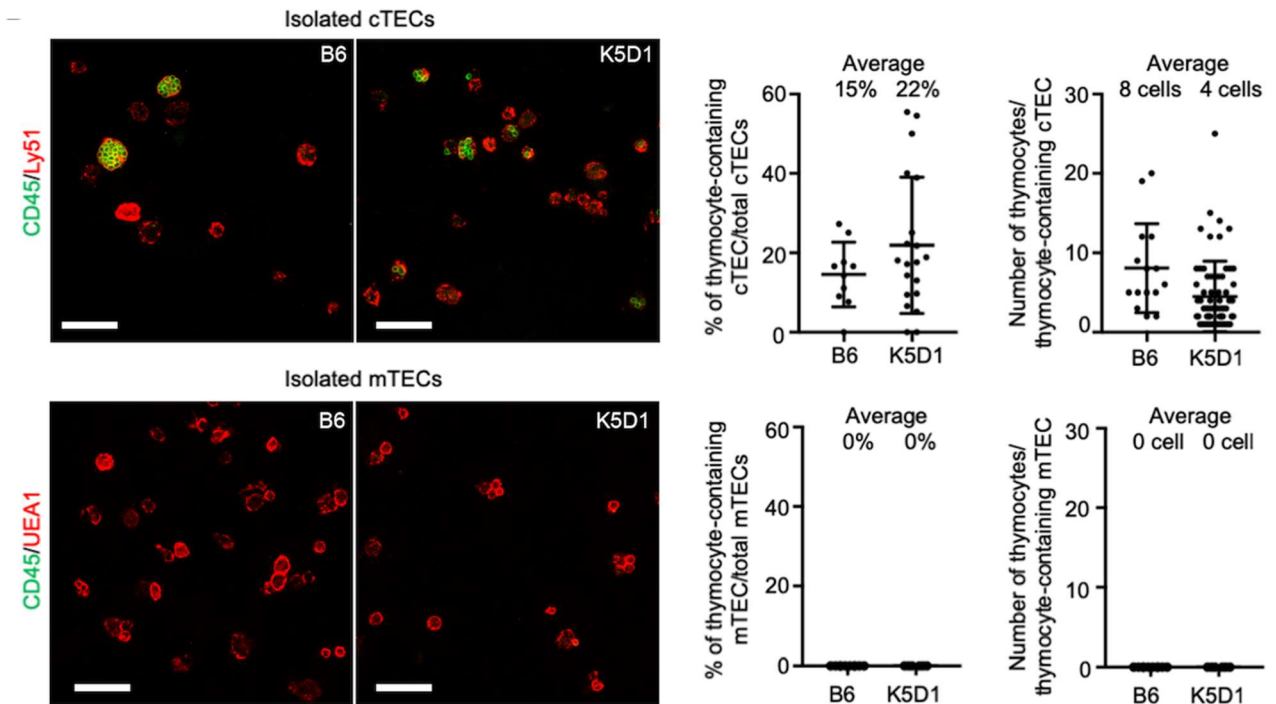


図 18. 精製した B6 マウス、K5D1 マウス cTEC と mTEC の比較

左：精製した B6 マウス、K5D1 マウス cTEC と mTEC の蛍光免疫染色

CD45 を緑、Ly51（上段）または UEA1（下段）を赤で示した。スケールバーは 50 μ m である。

右：B6 マウス、K5D1 マウス cTEC と mTEC における、CD45 陽性細胞を内部に含む細胞（TNC）の頻度、および 1 個の TNC が含む CD45 陽性細胞の個数

実験は 2 回行い、各群 10-20 視野から得られた結果を示した。各視野で CD45 陽性細胞を内部に含む TNC の cTEC における頻度、および 1 個の TNC が含む CD45 陽性細胞の個数をプロットした。

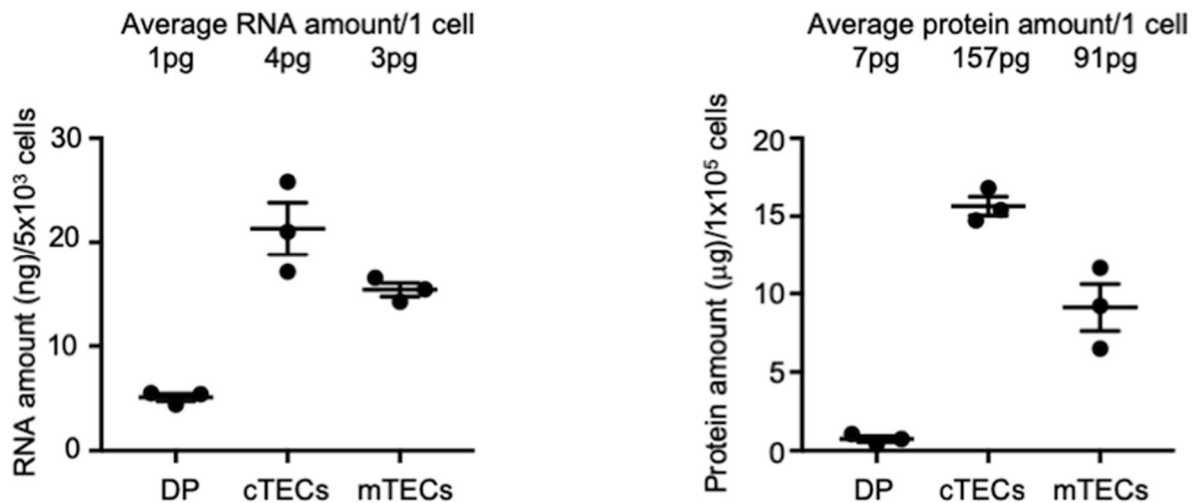


図 19. CD4+ CD8+胸腺細胞、cTEC、mTEC における RNA 量およびタンパク質の量

左：精製した CD4+ CD8+胸腺細胞、cTEC、mTEC における RNA 量

K5D1 マウス胸腺より、セルソーターを用いて CD4+ CD8+胸腺細胞、cTEC、mTEC を精製し、 5×10^3 個の細胞から抽出した RNA の量を測定しプロットした。グラフ上には 1 細胞あたりの RNA 量を記載した。

右：精製した CD4+ CD8+胸腺細胞、cTEC、mTEC におけるタンパク質の量

K5D1 マウス胸腺より、セルソーターを用いて CD4+ CD8+胸腺細胞、cTEC、mTEC を精製し、 1×10^5 個の細胞から抽出したタンパク質の量を測定しプロットした。グラフ上には 1 細胞あたりのタンパク質の量を記載した。

3. 精製した B6 マウスおよび K5D1 マウス cTEC と mTEC を用いた RNA-seq

B6 マウスおよび K5D1 マウスから cTEC と mTEC とを精製し、RNA-seq を施行し
トランスクリプトームを比較した。検出された遺伝子数は既報と同等であり^{26,27,34}、
その数は cTEC に比べて mTEC で多く無差別遺伝子発現を反映したものと考えられ
た (図 20)。クラスター解析を行ったところ、cTEC と mTEC とでは全体的な遺伝
子発現パターンが著しく異なっていた (図 21)³⁴。一方、K5D1 マウス cTEC と B6
マウス cTEC、あるいは K5D1 マウス mTEC と B6 マウス mTEC との間では全体的な
遺伝子発現は相似していた。主成分解析でも、cTEC と mTEC との間での相違、
K5D1 マウスと B6 マウスとの間での相似関係が示された (図 21)。さらに B6 マウ
スと K5D1 マウスとの間で、cTEC と mTEC との遺伝子発現比を比較しても両者は非
常に相関が強いことが示された (図 22)。

主成分解析の第二主成分で検出されている K5D1 マウス cTEC と B6 マウス
cTEC、あるいは K5D1 マウス mTEC と B6 マウス mTEC との間の差に関しては、

K5D1 マウスで強制発現されている CyclinD1 をコードする *Ccnd1* 遺伝子、および細胞周期に関連する *Ccnb1* (CyclinB1 をコード)、*Ccna2* (CyclinA2 をコード)、*Fbxo5* (F-box protein 5 をコード) などの遺伝子の発現量の差に起因すると考えられた。B6 マウス mTEC に比べて K5D1 マウス mTEC で発現の高かった遺伝子の Gene ontology 解析を行ったところ、細胞周期、核分裂、細胞分裂に関連する遺伝子群に特に差が見られた (図 23)。*Ccnd1* 遺伝子は K5D1 マウス mTEC のみならず K5D1 マウス cTEC でも強制発現されているが、他の細胞周期に関連する遺伝子群は K5D1 マウス cTEC で発現が高いとは言えなかった。これは、Keratin 5 プロモーターによって誘導される *Ccnd1* 遺伝子の発現は mTEC や TEC 共通前駆細胞よりも cTEC で低いこと⁴¹、および cTEC は mTEC よりも細胞増殖が乏しいこと⁴³に起因すると考えられた。cTEC においては、主に *Rag2*、*Zap70*、*Cd8a* などの T 細胞関連遺伝子群が、B6 マウス cTEC に比べて K5D1 マウス cTEC で発現が低いことが明らかとなっ

た (図 23) 。これは、K5D1 マウス cTEC は B6 マウス cTEC よりも少ない個数の CD4+ CD8+胸腺細胞を内包している (図 16) ことと関連があると考えられた。

cTEC の機能の特徴付ける遺伝子である *Ctsl* (Cathepsin L をコード) 、*Dll4*、*Psmbl1* ($\beta 5t$ をコード) 、*Prss16* (Tssp をコード) は、B6 マウス mTEC および K5D1 マウス mTEC と比べて B6 マウス cTEC および K5D1 マウス cTEC で発現が高かった。また mTEC の機能の特徴付ける遺伝子である *Xcl1*、*Ccl21a* (*Ccl21Ser* をコード) 、*Tnfrsf11a* (Receptor activator of NF- κ B をコード) 、*Tnfrsf11b* (*Osteoprotegerin* をコード) 、*Aire* は B6 マウス cTEC および K5D1 マウス cTEC と比べて B6 マウス mTEC および K5D1 マウス mTEC で発現が高かった (図 24) 。さらに、*Aire* 依存的組織特異的抗原および *Aire* 非依存的組織特異的抗原をコードする遺伝子は mTEC でのみ発現が見られた (図 24) 。

これらの結果から、強制発現されている *Ccnd1* 遺伝子および細胞周期に関連する遺伝子の発現を除けば、K5D1 マウス cTEC および mTEC の全体的な遺伝子発現は

B6 マウス cTEC および mTEC と概ね同等であると見なせることが明らかとなった。

また、cTEC と mTEC との間には遺伝子発現に大きな差があることも確認された。

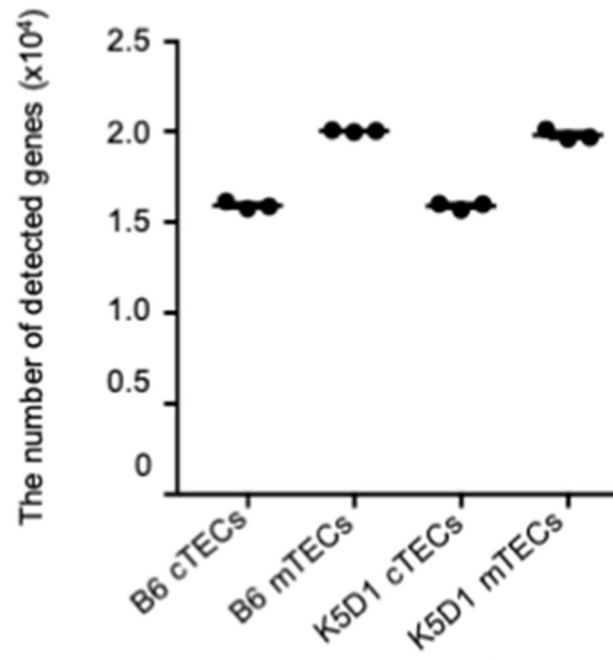


図 20. B6 および K5D1 マウスの cTEC および mTEC の RNA-seq において検出された遺伝子の個数

各群 3 サンプルの結果を示した。

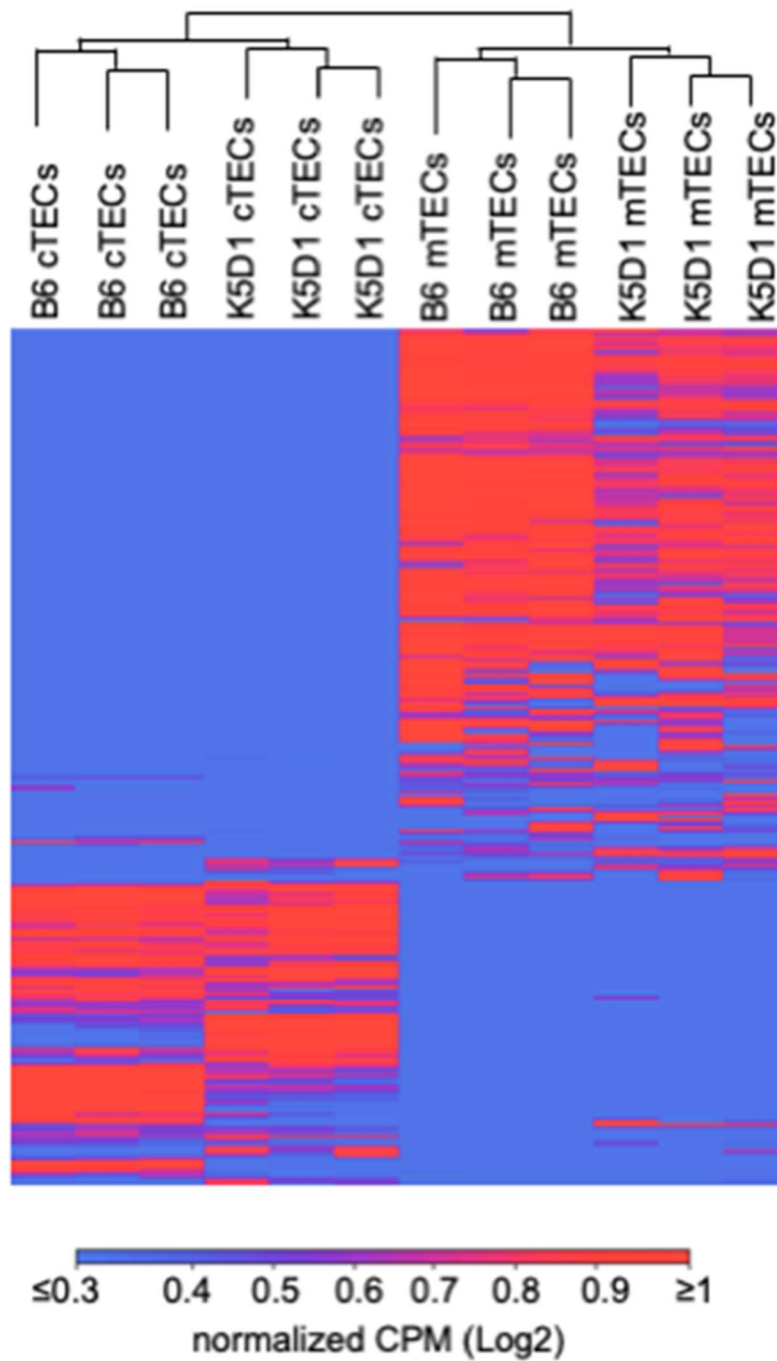


図 21 B6 および K5D1 マウスの cTEC および mTEC の RNA-seq

クラスター解析の結果をヒートマップで表示した。遺伝子発現量の表示方法の一つである CPM (counts per million) を標準化し、発現の高い遺伝子が赤、発現の低い遺伝子を青で示した。

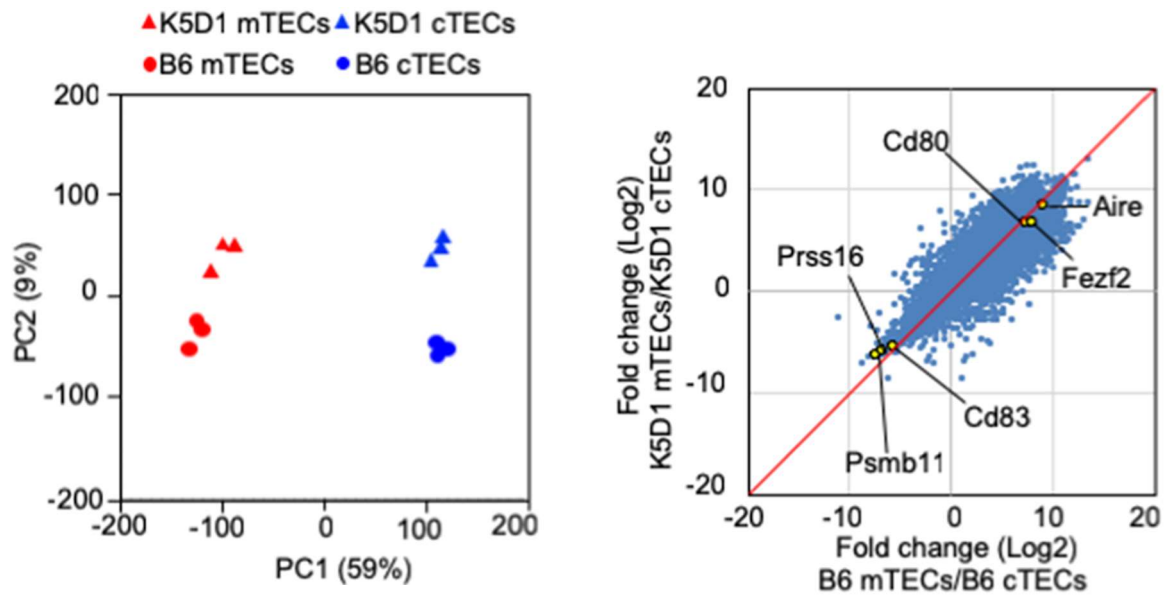


図 22. B6 および K5D1 マウスの cTEC および mTEC の RNA-seq

左：主成分解析の結果

右：B6 マウスと K5D1 マウス TEC の RNA 発現の相関

B6 マウス mTEC 対 cTEC の RNA 発現比 (Log2 表示) を横軸、K5D1 マウス mTEC 対 cTEC の RNA 発現比 (Log2 表示) を縦軸に取り、各遺伝子の RNA 発現比をプロットした。

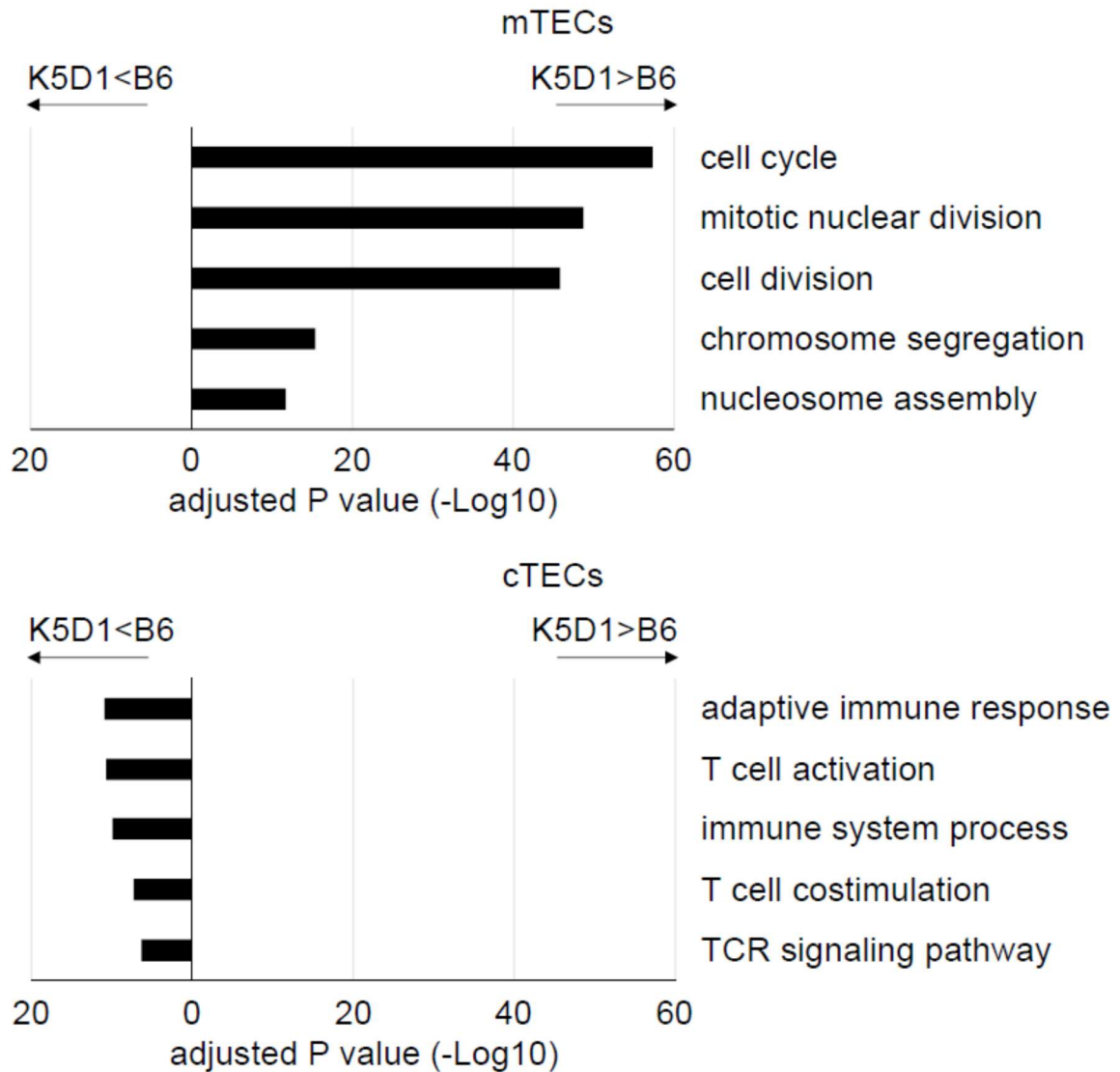


図 23. Gene ontology (GO) 解析による B6 マウス、K5D1 マウス TEC の比較

上 : B6 マウス mTEC に比べて K5D1 マウス mTEC で発現が高かった遺伝子群から抽出された GO

下 : B6 マウス cTEC に比べて K5D1 マウス cTEC で発現が低かった遺伝子群から抽出された GO

抽出された GO の内、p 値の小さいものから上位 5 つを示した。

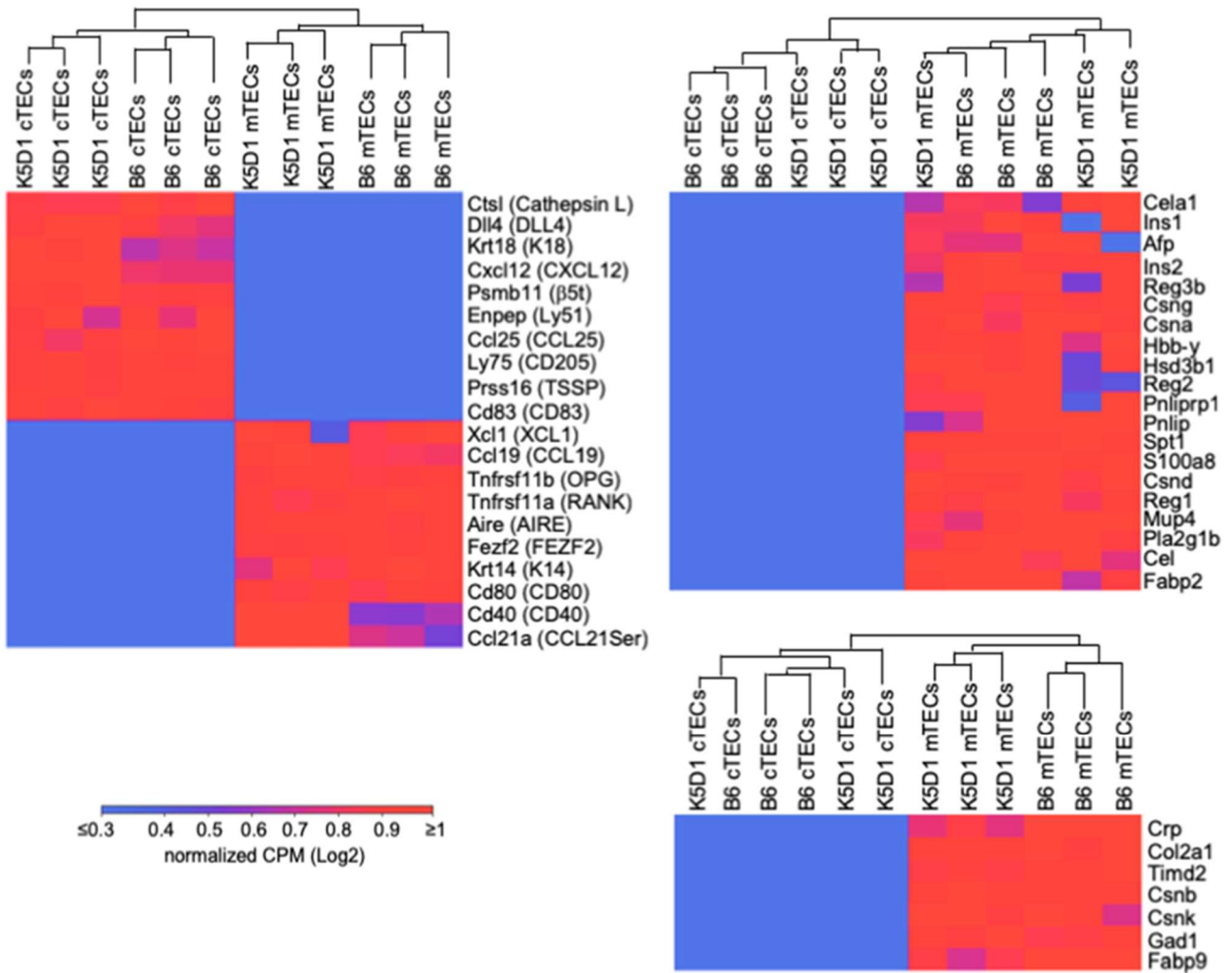


図 24. cTEC および mTEC を特徴づける遺伝子の発現比較

左：cTEC 又は mTEC に特徴的な、既知の遺伝子の発現比較

右：組織特異的抗原の発現の比較

Aire 依存的組織特異的抗原（上）、Aire 非依存的組織特異的抗原（下）を分けて示した。

遺伝子発現量の表示方法の一つである CPM（counts per million）を標準化し、発現の高い遺伝子が赤、発現の低い遺伝子を青で示した。

4. 精製した K5D1 マウス cTEC と mTEC を用いた LC-MS/MS の結果、および

RNA-seq の結果とのトランスオミクス解析の結果

過形成した K5D1 マウス胸腺を用いることで、B6 マウスに比べて数十倍の cTEC および mTEC を精製することが可能であること、K5D1 マウスの cTEC および mTEC の機能およびトランスクリプトームは B6 マウスの cTEC および mTEC と同様であったことから、K5D1 マウス胸腺を B6 マウス胸腺の代替として用い精製した cTEC と mTEC を用いて TMT 法によるプロテオーム解析を行うこととした。

TMT 法による LC-MS/MS の結果、K5D1 マウス cTEC と K5D1 マウス mTEC のいずれかで発現されているタンパク質が計 5753 種類同定された。cTEC と mTEC との間ではタンパク質の発現に明らかな差が見られ、特に cTEC の機能の特徴付ける分子である Cathepsin L、 β 5t、Tssp は K5D1 マウス mTEC と比べて K5D1 マウス cTEC でタンパク質発現が高く、mTEC の機能の特徴付ける分子である Cathepsin S、Aire、CD40 のタンパク質発現は K5D1 マウス cTEC と比べて K5D1 マウス mTEC でタンパ

ク質発現が高かった（図 25）。また cTEC のプロテオームでの解析の結果はトランスクリプトームの結果に比べて CD4+ CD8+胸腺細胞の影響が少なかった（図 26）。これは、cTEC から抽出した RNA のうち 20-27%が CD4+ CD8+胸腺細胞に由来していたのに対し、cTEC から抽出したタンパク質のうちわずか 3-5%が CD4+ CD8+胸腺細胞に由来していた結果を反映したものだと考えられる。

プロテオームの結果で cTEC に比べて mTEC で発現の有意に高かったタンパク質は 308 種類あり、そのうちトランスクリプトームにおいても K5D1 マウス cTEC に比べて mTEC で発現の有意に高かった分子は 202 種類同定された（図 26）。これらの分子には、mTEC の機能の特徴付ける上で重要な分子である Aire、Relb、Nfkb2 などが含まれていた。残りの 106 個の分子に関しては mTEC における機能が未知の分子が占めていた。

一方、プロテオームの結果で mTEC に比べて cTEC で発現の有意に高かったタンパク質は 232 種類あり、そのうちトランスクリプトームにおいても有意に K5D1 マ

ウス mTEC に比べて cTEC で発現の高かった分子は 199 種類同定された (図 27)。

これらの分子には、cTEC の機能の特徴付ける上で重要な分子である $\beta 5t$ 、Tssp、

Cathepsin L などが含まれていた。残りの 33 種類の分子に関しては cTEC においての機能が未知の分子が占めていた。

K5D1 マウス cTEC および mTEC のプロテオームおよびトランスクリプトームの比較と同様に、K5D1 マウス cTEC および mTEC のプロテオームと B6 マウス cTEC および mTEC のトランスクリプトームの比較を行っても、プロテオームとトランスクリプトームのいずれでも有意に差が見られた分子は cTEC で 207 種類、mTEC で 187 種類見られ、90%以上が先述の比較で得られた分子と共通していた (図 27)。このことは、B6 マウスと K5D1 マウスとの間で、cTEC あるいは mTEC のトランスクリプトームが類似していることに起因していると考えられる。

次に、トランスクリプトームで有意な差が見られたものの、プロテオームでは有意な差が見られなかった分子についても検討を行った。トランスクリプトームにおい

では cTEC に比べて mTEC で有意に高く発現されていたものの、プロテオームでは検出されなかった分子は 2989 種類あり、その中には Ccl21Ser、Xcl1、IL-25 といったサイトカインやケモカインが多く含まれていた。このことは、Liberase TM を用いた TEC を含む細胞懸濁液の調整過程で分泌タンパク質は失われてしまうことを反映している。一方、トランスクリプトームにおいては mTEC に比べて cTEC で有意に高く発現されていたもののプロテオームでは検出されなかった分子は 1070 種類あったが、それらに共通するような gene ontology は見つけられなかった。

トランスクリプトームとプロテオームの結果を統合することで、いずれの解析でも cTEC または mTEC で有意に発現の高い分子を計 401 (202+199) 種類同定した。これらの分子には TEC における機能が未知のものが多く含まれており、今後のさらなる研究が期待される。

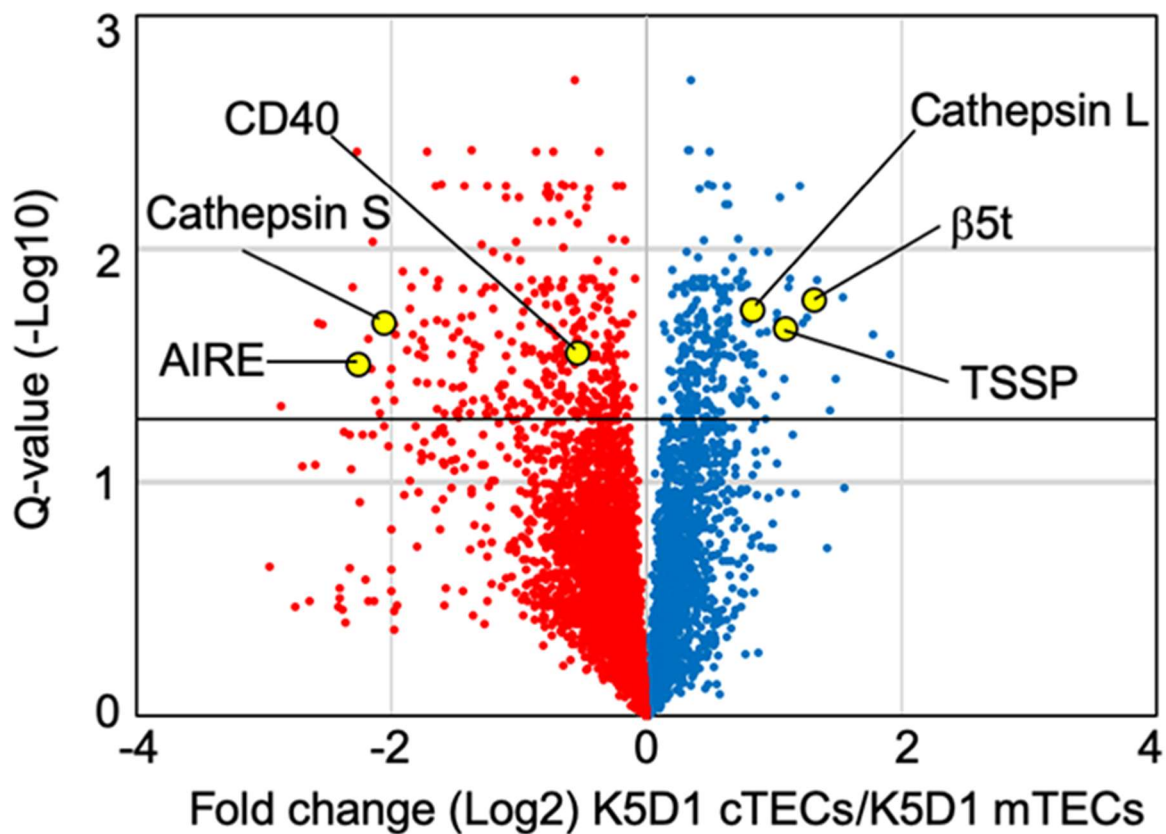


図 25. K5D1 マウス cTEC と mTEC の LC-MS/MS の結果

TMT 法を用いた。横軸に K5D1 マウス cTEC 対 mTEC のタンパク質発現比 (Log 2 表示)、縦軸に Q value (-Log 10 表示) を取り、K5D1 マウス cTEC と mTEC の LC-MS/MS によるプロテオーム解析の volcano plot を示した。青丸は mTEC より cTEC で発現の高いタンパク質、赤丸は cTEC より mTEC で発現の高いタンパク質を示し、cTEC 又は mTEC の機能に重要な代表的な分子を各々 3 つずつ図中に黄丸で示した。図中の黒い横線は $Q = 0.05$ を示す。

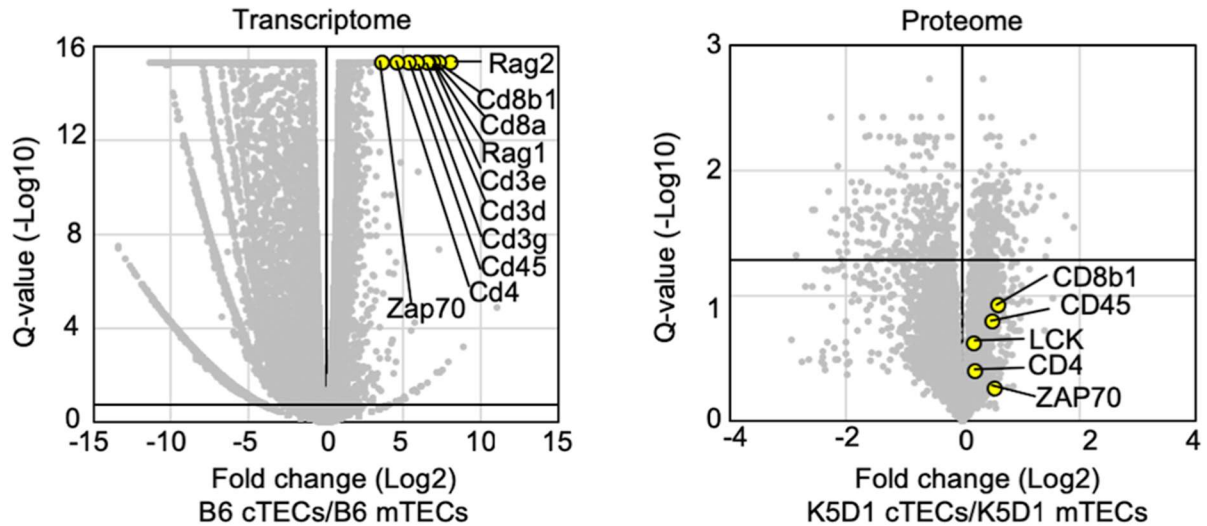


図 26. トランスクリプトームおよびプロテオームにおける T 細胞関連遺伝子の発現

左：B6 マウス cTEC と mTEC のトランスクリプトーム

横軸に B6 マウス cTEC 対 mTEC の RNA の発現比 (Log 2 表示)、縦軸に Q value (-Log 10 表示) を取り、トランスクリプトーム解析の volcano plot を示した。図中の黒い横線は $Q = 0.05$ を示す。

右：K5D1 マウス cTEC と mTEC のプロテオーム

横軸に K5D1 マウス cTEC 対 mTEC のタンパク質の発現比 (Log 2 表示)、縦軸に Q value (-Log 10 表示) を取り、プロテオーム解析の volcano plot を示した。図中の黒い横線は $Q = 0.05$ を示す。

T 細胞関連遺伝子を黄丸で示した。

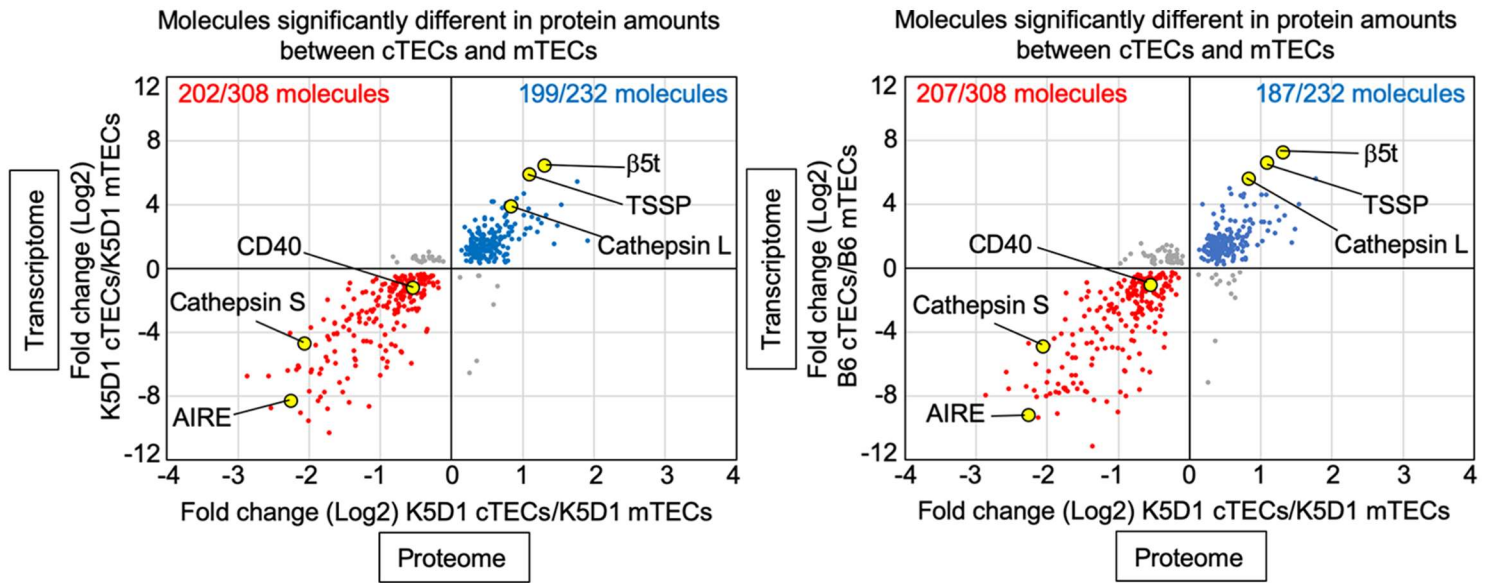


図 27. トランスクリプトームとプロテオームの相関

左：K5D1 マウス cTEC 対 mTEC のタンパク質発現比（Log 2 表示）と K5D1 マウス cTEC 対 mTEC の RNA 発現比（Log 2 表示）の相関

右：K5D1 マウス cTEC 対 mTEC のタンパク質発現比（Log 2 表示）と B6 マウス cTEC 対 mTEC の RNA 発現比（Log 2 表示）の相関

図中にはプロテオームの結果で $Q < 0.05$ であったタンパク質をプロットした

(cTEC で発現の高いタンパク質 232 種類、mTEC で発現の高いタンパク質 308 種類)。このうち、トランスクリプトームのデータでも cTEC あるいは mTEC で発現の高い分子を青丸又は赤丸で示し、cTEC および mTEC の機能に重要な代表的な分子を 3 つずつ図中に黄丸で示した。

5. B6- β 5tKO マウス、K5D1- β 5tKO マウスの cTEC を用いた RNA-seq の結果

β 5t の欠損が cTEC に及ぼす影響について問うために、まず B6- β 5tKO マウス cTEC および K5D1- β 5tKO マウス cTEC の RNA-seq を行い、B6 マウス cTEC・mTEC や K5D1 マウス cTEC・mTEC のトランスクリプトームとの比較を行った。主成分解析では、まず B6 マウス cTEC、K5D1 マウス cTEC、B6- β 5tKO マウス cTEC、K5D1- β 5tKO マウス cTEC の 4 群が大きなクラスターを作り、一方 B6 マウス mTEC、K5D1 マウス mTEC の 2 群が別のクラスターを作っていた。4 群の cTEC の中では、B6 マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC とが近い位置にあり、一方 B6- β 5tKO マウス cTEC と K5D1- β 5tKO マウス cTEC とが近い位置にあった (図 28)。主成分解析において B6- β 5tKO マウス cTEC と B6 マウス cTEC との間、K5D1- β 5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC との間に見られた相違に関しては、主に β 5t をコードする *Psmbl1* 遺伝子の相違に因ると考えられた (図 28)。また B6- β 5tKO マウス cTEC と B6 マウス cTEC との間の遺伝子発現比、および K5D1- β 5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス

cTEC との間での遺伝子発現比をプロットして比較したところ、両者は類似していた

(図 28)。

B6-β5tKO マウス cTEC と B6 マウス cTEC との間で *Psmbl1* 遺伝子の RPKM (reads per kilobase of transcript, per million mapped reads) の差は顕著であり、この差は定量的

RT-PCR でも再現された (図 29)。一方、B6-β5tKO マウス cTEC と B6 マウス cTEC

との間で有意な差が見られた他の遺伝子においては、RPKM は非常に低く定量的

RT-PCR では有意な差はほとんど見られなかった。唯一、機能未知の遺伝子 *Gm2004*

は RPKM が非常に低いものの、定量的 RT-PCR で RNA-seq と同様 B6-β5tKO マウス

cTEC と B6 マウス cTEC との間での有意な差が再現された (図 29)。

これらの結果より B6-β5tKO マウス cTEC と B6 マウス cTEC との間で全体的な遺伝子発現パターンは近いことが予想された。また B6-β5tKO マウス cTEC と K5D1-

β5tKO マウス cTEC の全体的な遺伝子発現パターンも相似していると考えられた。

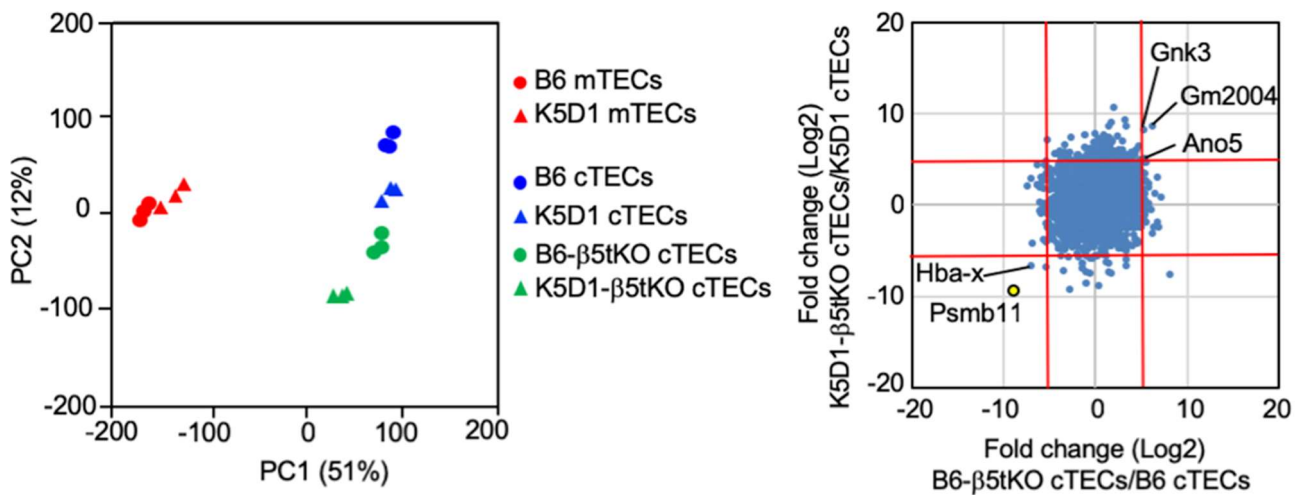


図 28. B6-β5tKO マウスおよび K5D1-β5tKO マウスの cTEC の RNA-seq

左：B6 マウス cTEC・mTEC、K5D1 マウス cTEC・mTEC、B6-β5tKO マウス cTEC
 および K5D1-β5tKO マウス cTEC の主成分解析

右：B6-β5tKO マウスと K5D1-β5tKO マウス cTEC の RNA 発現の相関

B6-β5tKO マウス cTEC 対 B6 マウス cTEC の RNA 発現比 (Log₂ 表示) を縦軸、
 K5D1-β5tKO マウス cTEC 対 K5D1 マウス cTEC の RNA 発現比 (Log₂ 表示) を横軸
 に取り、各遺伝子の RNA 発現比をプロットした。赤線は Fold change = 5 又は-5
 (Log₂ 表示) を示す。

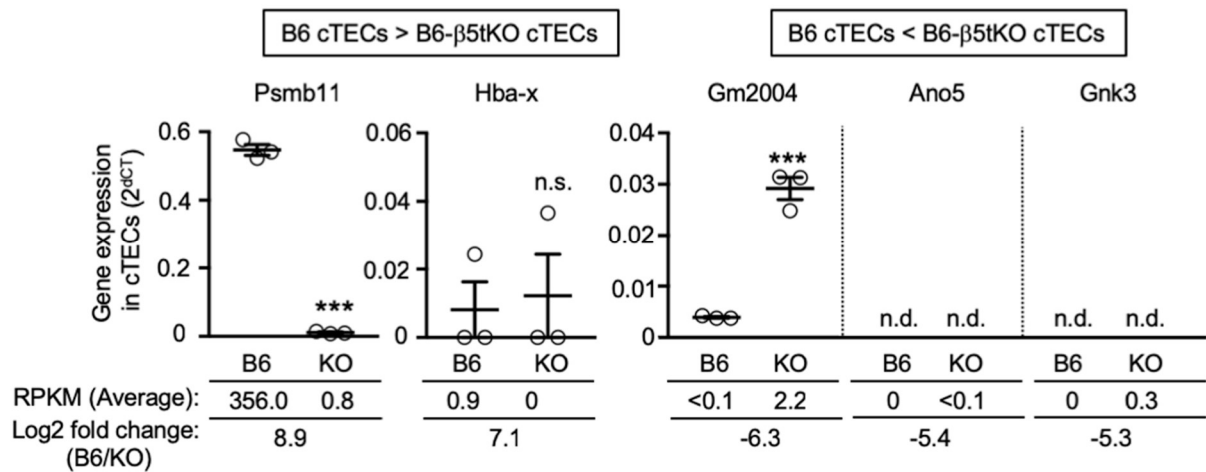


図 29. 定量的 RT-PCR による、B6 マウス cTEC と B6-β5tKO マウス cTEC との間での遺伝子発現比較

RNA-seq で B6 マウス cTEC と B6-β5tKO マウス cTEC との間で fold change 5 (Log 2 表示) 以上の有意な差が見られた遺伝子 (*Psmb11*、*Hba-x*、*Gm2004*、*Ano5*、*Gnkl3*) について、改めて発現量を定量的 RT-PCR により比較した。実験は 3 回行い、各群 3 サンプルの結果を示した (***: $p < 0.001$; n.s.: not significant; n.d.: not determined)。ここでは RNA-seq における転写産物発現量の指標として RPKM (reads per kilobase of transcript, per million mapped reads) を用い、グラフ下に各遺伝子の fold change と共に示した。

6. K5D1-β5tKO マウス cTEC のプロテオームおよび β5tKO マウス cTEC における

プロテアソームサブユニットのタンパク質発現量減少

前項の結果を踏まえ、K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC を用いて TMT 法によるプロテオーム解析を行ったところ、Q 値が 0.05 未満のタンパク質は見られなかった (図 30)。β5t タンパク質の発現が K5D1-β5tKO マウス cTEC で K5D1 マウス cTEC に比べて減少してはいたが、K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の間での β5t の fold change は 0.40 であり、本来 K5D1-β5tKO マウス cTEC では β5t が欠損しているにしては大きい値であると考えられた。

Q 値が 0.4 未満のタンパク質に対して gene ontology 解析を行うと、プロテアソームに関連する gene ontology が抽出された。K5D1-β5tKO マウス cTEC では K5D1 マウス cTEC に比べて、20S プロテアソームを構成するサブユニットのうち、α 鎖を構成する 7 つのサブユニット (α1-7)、β 鎖を構成する 7 つのサブユニットのうち酵素活性を持たない 4 つのサブユニット (β3、β4、β6、β7)、胸腺プロテアソームの酵素

活性を担う 3 つのサブユニット ($\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5t$) のタンパク質発現が減少していた。一方 $\beta 5$ と $\beta 5i$ のタンパク質発現に関しては、K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC では K5D1 マウス cTEC に比べて上昇していた^{20,21,51}。その他にも K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC では K5D1 マウス cTEC に比べて、19S プロテアソームを構成する ATPase サブユニット (Rpt1-6) および non-ATPase サブユニット (Rpn1-3、Rpn5-13) のタンパク質発現も減少していた。 $\beta 2$ だけは K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC との間でタンパク質発現に有意な差は見られなかった (図 31)。

TMT 法に加えて、ダイナミックレンジの広い Label-Free 法によるプロテオーム解析を K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC に対して行った。K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC では K5D1 マウス cTEC に比べて、 $\beta 5t$ をはじめ、大部分のプロテアソームサブユニットの発現が減少していた (図 32)。K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の間での $\beta 5t$ の fold change は 1 回目の実験では 0.06、2 回目の実験では 0.03 であった。加えて、 $\beta 5t$ に由来する 11 個のペプチドのうち 10 個が K5D1- $\beta 5t$ KO

マウス cTEC では完全に消失しており（表 1）、K5D1-β5tKO マウス cTEC では β5t タンパク質が消失していることが支持され、残り 1 個のペプチドは β5t に無関係ながらも偽陽性となっている可能性が示唆された。

プロテオーム解析で得られたプロテアソームサブユニットのタンパク質発現の変化について、他の方法でも再現可能かを検証した。イムノブロット法によるプロテアソームサブユニットの発現量の比較を K5D1 マウスおよび K5D1-β5tKO マウスの cTEC と mTEC に対して行ったところ、プロテオームでの結果と同様に、K5D1-β5tKO マウスの cTEC では酵素活性を持たないサブユニット（α6、α7、β3、Rpn1、Rpn13）の減少が見られた（図 33）。酵素活性を担うサブユニットについては、K5D1-β5tKO マウスの cTEC において β5t は消失、β1i、β2i、β1 は減少、β2 は大きな変化なし、β5、β5i は増加しており、これらについてもプロテオームの結果と同様であった（図 33）。さらにフローサイトメーターによる実験においても、B6-β5tKO マウス cTEC では B6 マウスに比べて α6 サブユニットが約 35%減少していた（図 34）。

定量的なプロテオームの結果からは、K5D1- β 5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC との間のタンパク質の発現パターンの差は軽度なものとどまっていた。しかしながら K5D1- β 5tKO マウス cTEC においては K5D1 マウス cTEC に比べて大部分のプロテアソームサブユニットは減少すること、一方 β 5 および β 5i は増加していた。

またフローサイトメーターの結果では B6- β 5tKO マウス cTEC においても、B6 マウス cTEC と比べてプロテアソームサブユニットの発現が低下しており、プロテアソームの量が減少していることが示唆された。

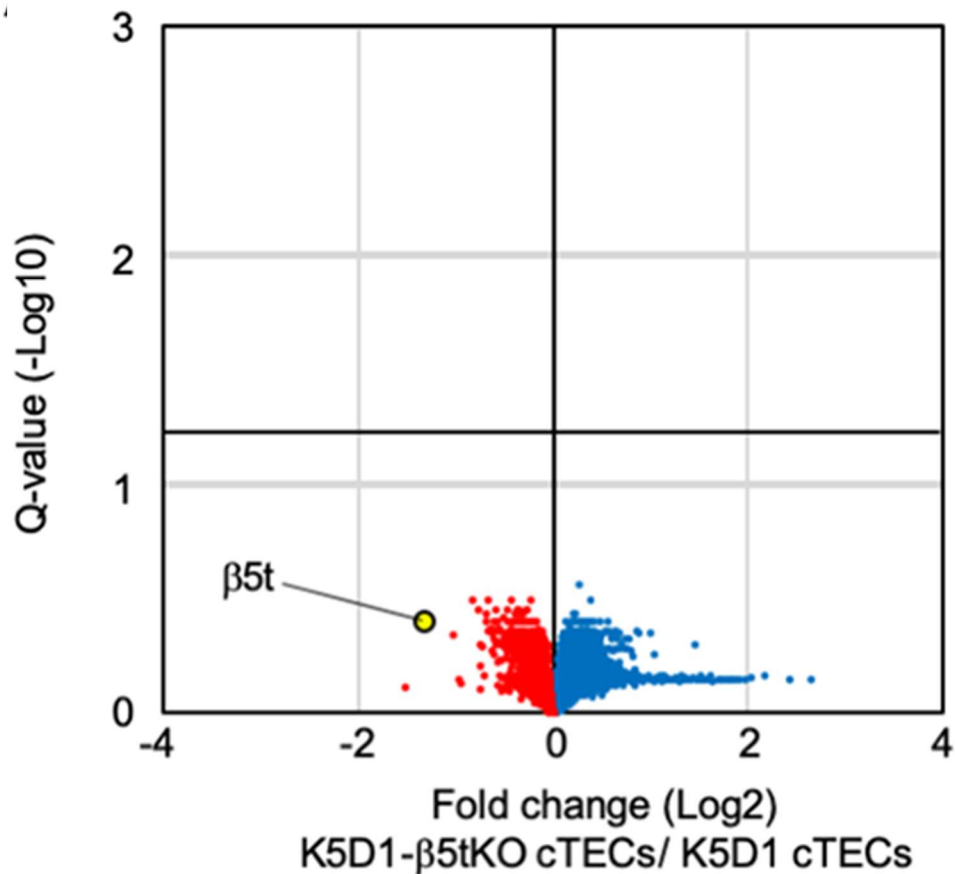


図 30. K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の LC-MS/MS の結果

TMT 法を用いた。横軸に K5D1-β5tKO マウス cTEC 対 K5D1 マウス cTEC のタンパク質発現比 (Log 2 表示)、縦軸に Q value (-Log 10 表示) を取り、K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の LC-MS/MS によるプロテオーム解析の volcano plot を示した。青丸は K5D1 マウス cTEC より K5D1-β5tKO マウス cTEC で発現の高いタンパク質、赤丸は K5D1 マウス cTEC より K5D1-β5tKO マウス cTEC で発現の低いタンパク質を示し、β5t を黄丸で示した。図中の黒い横線は $Q = 0.05$ を示す。

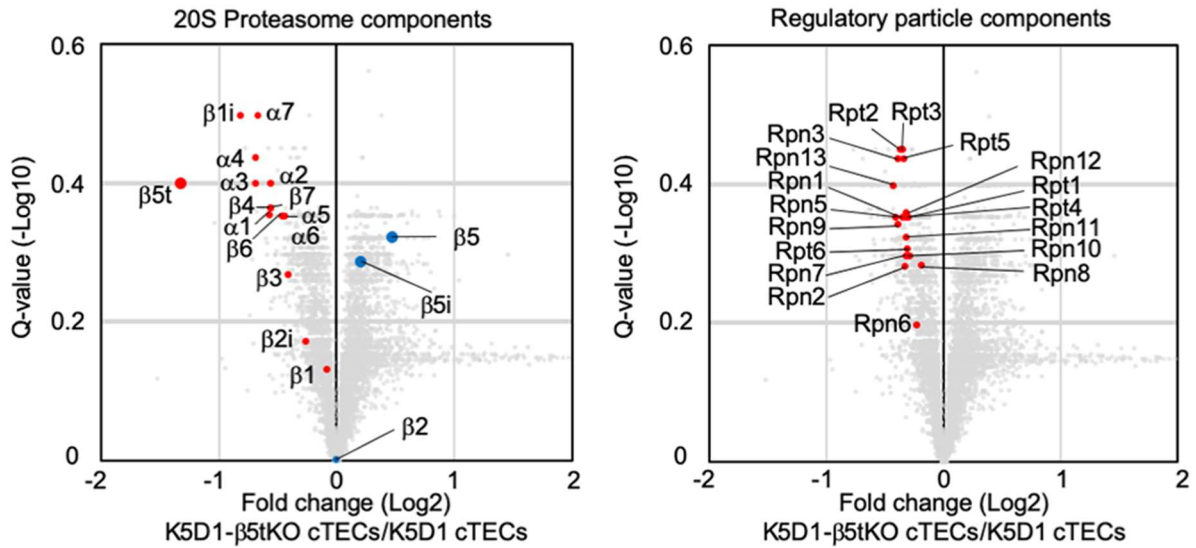


図 31. K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC におけるプロテアソームサブユニットのタンパク質発現比較

左：20S プロテアソームサブユニット (α1-7、β1-7、β2i、β1i、β5i、β5t) のプロット

右：19S プロテアソームサブユニット (Regulatory particle : Rpt1-6、Rpn1-3、Rpn5-13)

のプロット

K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC のプロテオームの volcano plot における、20S プロテアソームサブユニットおよび 19S プロテアソームサブユニットのプロットを示した。青丸は K5D1 マウス cTEC より K5D1-β5tKO マウス cTEC で発現の高いタンパク質、赤丸は K5D1 マウス cTEC より K5D1-β5tKO マウス cTEC で発現の低いタンパク質を示した。

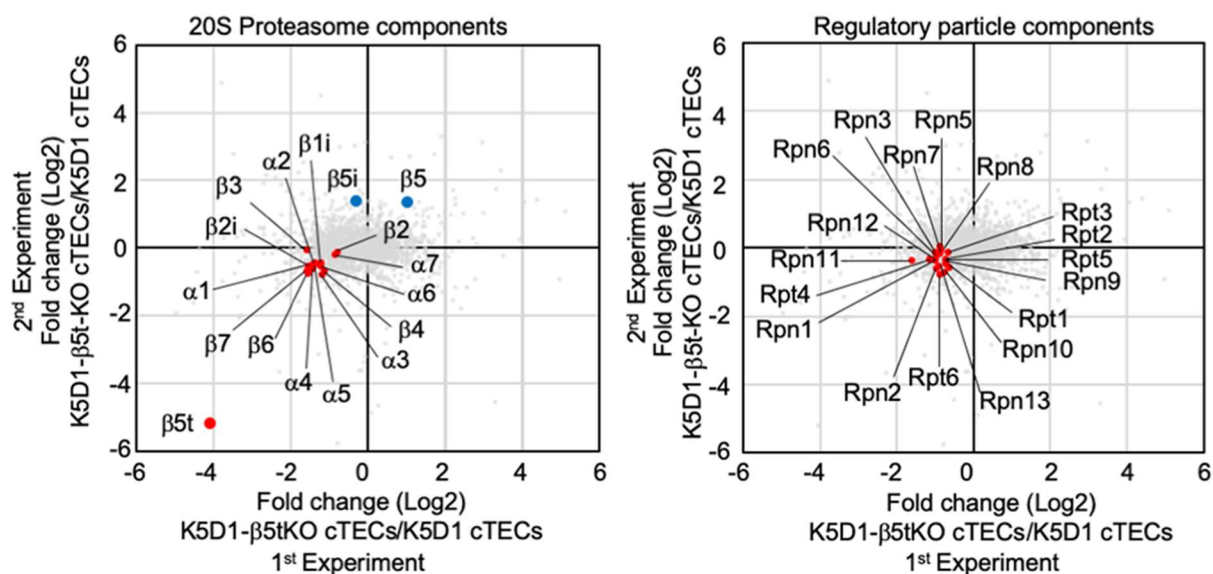


図 32. K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC におけるプロテアソームサブユニットのタンパク質発現比較

左：20S プロテアソームサブユニット (α1-7、β1-7、β2i、β1i、β5i、β5t) のプロット

右：19S プロテアソームサブユニット (Regulatory particle : Rpt1-6、Rpn1-3、Rpn5-13)

のプロット

Label-Free 法を用いた。横軸に 1 回目の実験から得られた K5D1-β5tKO マウス cTEC 対 K5D1 マウス cTEC のタンパク質発現比 (Log 2 表示)、縦軸に 2 回目の実験から得られた K5D1-β5tKO マウス cTEC 対 K5D1 マウス cTEC のタンパク質発現比 (Log 2 表示) を取った。青丸は図 28 で K5D1 マウス cTEC より K5D1-β5tKO マウス cTEC で発現の高かったプロテアソームサブユニット (β5i、β5)、赤丸は図 28 で K5D1 マウス cTEC より K5D1-β5tKO マウス cTEC で発現の低かったプロテアソームサブユニットを示した。

表 1. プロテオーム解析における、 $\beta 5t$ に由来する 11 個のペプチドの発現強度

Annotated Sequences	Positions	Abundance			
		KO-1	WT-1	KO-2	WT-2
[R].EGQLPSVAGTAK.[L]	119-130		3.10E+06		3.79E+06
[K].ACGIYPEPATPQGAR.[E]	262-276		8.56E+06		8.56E+06
[R].LLGTTSGTSADCATWYR.[V]	90-106		5.87E+06		6.35E+06
[K].ELFVEQEEVTPEDCAIIMK.[T]	280-298		2.93E+06		2.57E+06
[R].SDACVLYR.[E]	239-246		7.42E+06		1.36E+07
[R].SLEQELEAK.[A]	253-261		1.19E+07		9.62E+06
[R].SSCGSYVACPASR.[K]	69-81		9.79E+05		2.27E+06
[R].DAYSGGSVDLFHVR.[E]	216-229	4.03E+06	1.73E+07	1.65E+06	7.49E+06
[R].ESGWEYVSR.[S]	230-238		1.07E+07		8.90E+06
[R].HGVIAAADTR.[S]	59-68		4.64E+04		1.42E+07
[K].LLAAMMSCYR.[G]	131-140		5.76E+06		1.96E+06

Label-Free 法を用いた。K5D1 マウス cTEC (WT) および K5D1- $\beta 5t$ KO マウス cTEC

(KO) における、 $\beta 5t$ に由来する 11 個のペプチドの発現強度をそれぞれ示した。

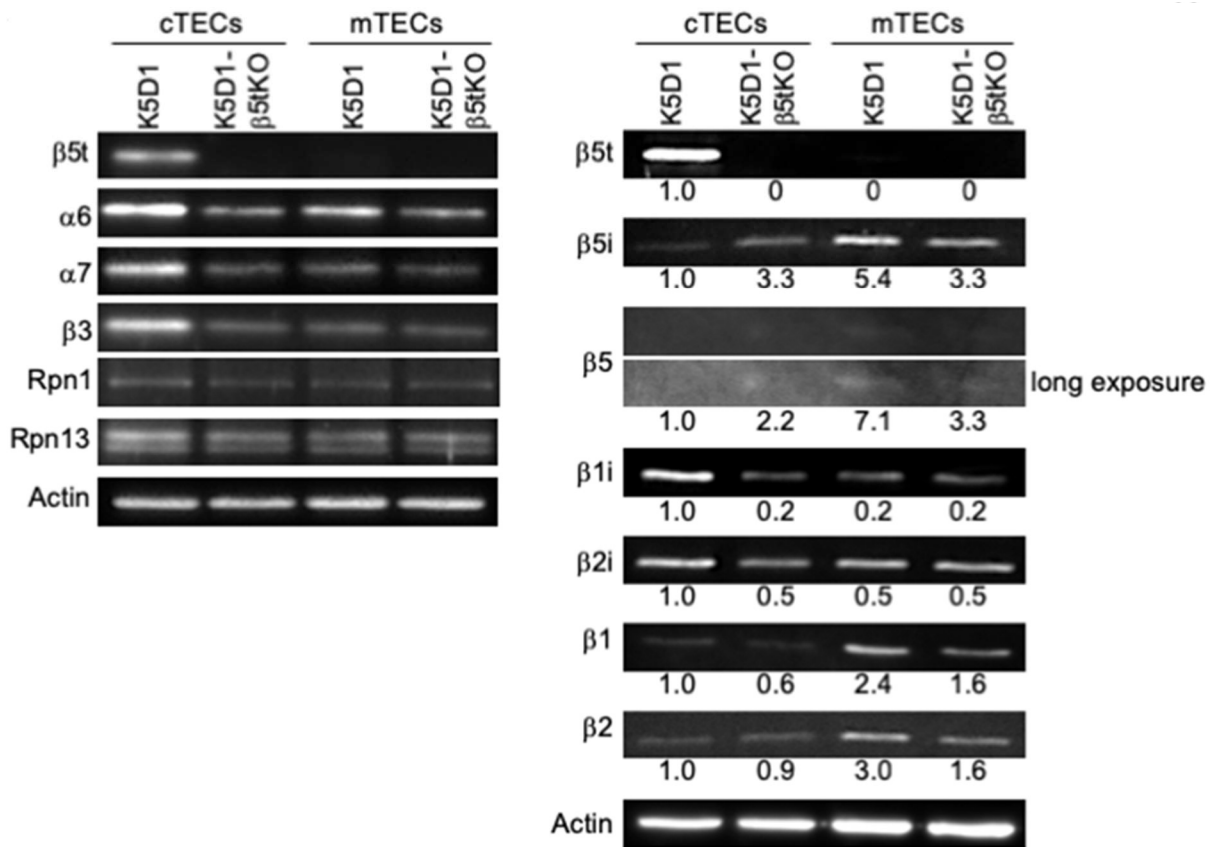


図 33. K5D1 マウスおよび K5D1-β5tKO マウスの cTEC と mTEC における、プロテアソームサブユニットの発現の比較

左：β5t、α6、α7、β3、Rpn1、Rpn13 の比較

右：β5t、β5i、β5、β1i、β2i、β1、β2 の比較

K5D1 マウスおよび K5D1-β5tKO マウスの cTEC と mTEC から抽出した細胞溶解液を用い、イムノブロットによる比較を行った。ローディングコントロールとして β-actin を用いた。右の図では各ブロットの下に K5D1 マウス cTEC の発現量で補正したシグナル強度を示した。β5 については露光時間を長くした結果も示した。

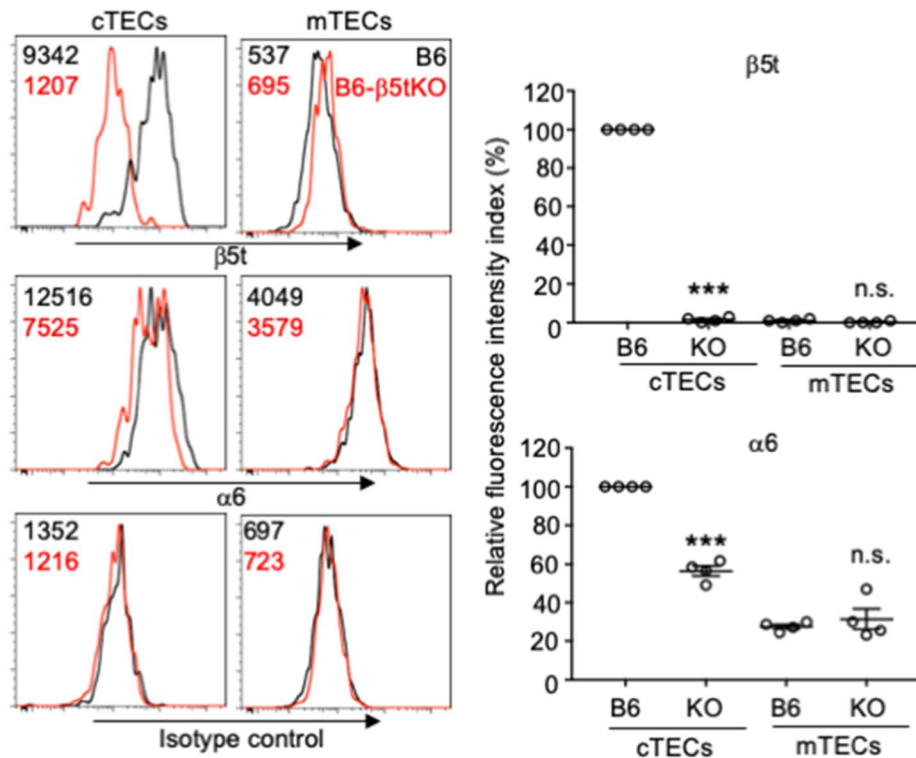


図 34. B6 マウスおよび B6-β5tKO マウスの cTEC と mTEC における、プロテアソームサブユニットの発現量の比較

左：B6 マウスおよび B6-β5tKO マウスの cTEC と mTEC における、β5t、α6 のフローサイトメータープロファイル

代表的なものを示した。プロファイル中の数字はヒストグラムの mean fluorescent intensity (MFI) を示す（黒字が B6 マウス、赤字が B6-β5tKO マウス）。

右：プロテアソームサブユニットの発現量の比較

Relative fluorescence intensity index は、各群の β5t 又は α6 の MFI と isotype control の MFI の差を、B6 マウス cTEC 群の β5t 又は α6 の MFI と isotype control の MFI の差で除した値を示し、負の値になる場合には 0 とした。実験は 4 回行い、各群 4 サンプルの結果を示した (***: $p < 0.001$; n.s.: not significant)。

7. β 5tKO マウス cTEC におけるストレス応答反応やオートファジー、MHC class I

の発現

β 5tKO マウス cTEC ではプロテアソームサブユニットの軽度の減少が見られた。

この減少によってプロテアソーム活性が減少しストレス応答反応が増強するか否か

を検討した。プロテアソーム活性を検出する細胞透過性のあるプローブ

(Me4BodipyFL-Ahx3Leu3VS) を用いると、汎プロテアソーム阻害薬の一つである

MG132 処理下に B6 マウス cTEC のプロテアソーム活性の低下を検出することがで

きた (図 35)。この系を用い、B6- β 5tKO マウス cTEC においてプロテアソーム活性

が低下するかを検討したところ、B6 または B6- β 5tHet マウス cTEC と比較してプロ

テアソーム活性は同等であった (図 36)。

さらに B6- β 5tKO マウス cTEC においてストレス応答関連遺伝子が上昇するかを見

る目的で、代表的なストレス応答関連分子である p62 や Nrf1 の RNA 発現を定量的

RT-PCR で比較した。B6- β 5tKO マウス cTEC では B6 マウス cTEC と比較してもそれ

らの上昇は見られなかった (図 37)。また、小胞体ストレス反応関連タンパク質の発現をプロテオームの結果で見ても、K5D1-β5tKO マウス cTEC では K5D1 マウス cTEC と比べて増加しているものもあれば減少しているものもあり、一定した結果は見られなかった (図 37)。

また、T 細胞の選択を行うために必要な自己抗原を提示するために cTEC では飢餓状態とは無関係にオートファジーが活性化しているが⁵²、β5tKO マウス cTEC においてオートファジーは亢進していなかった (図 38)。オートファジー関連タンパク質の発現をプロテオームの結果で見ても、K5D1-β5tKO マウス cTEC では K5D1 マウス cTEC と比べて増加しているものもあれば減少しているものもあり、一定した結果は見られなかった (図 38)。

さらに、B6 マウス、B6-β5tKO マウス、K5D1 マウス、K5D1-β5tKO マウスの cTEC または mTEC において、MHC class I 分子の発現には相違が見られなかった (図 39)。この結果については既報^{21,53}と同様であった。加えて MHC class I 分子はゴルジ体か

ら小胞輸送され細胞膜表面上に発現するが、タンパク質輸送阻害薬の一つである Brefeldin A によって細胞表面への発現が低下することが知られている⁵³。B6 マウス、B6-β5tKO マウス、K5D1 マウス、K5D1-β5tKO マウスの cTEC または mTEC において、Brefeldin A 処理による MHC class I の発現低下に関しても 4 群間で差は見られなかった (図 39)。

これらの結果から、β5tKO マウス cTEC においてプロテアソームサブユニットの軽度の減少が見られるものの、プロテアソーム活性に変化はなく、ストレス応答反応やオートファジーの亢進は見られないという結論が得られた。

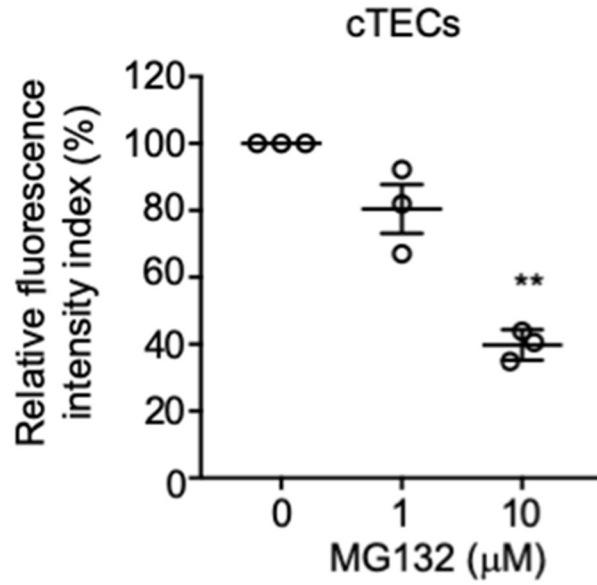


図 35. B6 マウス cTEC の MG132 処理によるプロテアソーム活性の変化

Relative fluorescence intensity index は、各群の probe ありのサンプルの MFI と probe なしのサンプルの MFI の差を、MG132 処理なし群の probe ありのサンプルの MFI と probe なしのサンプルの値で除した値を示した（次図 36 を参照）。実験は 3 回行い、各群 3 サンプルの結果を示した (**: $p < 0.01$)

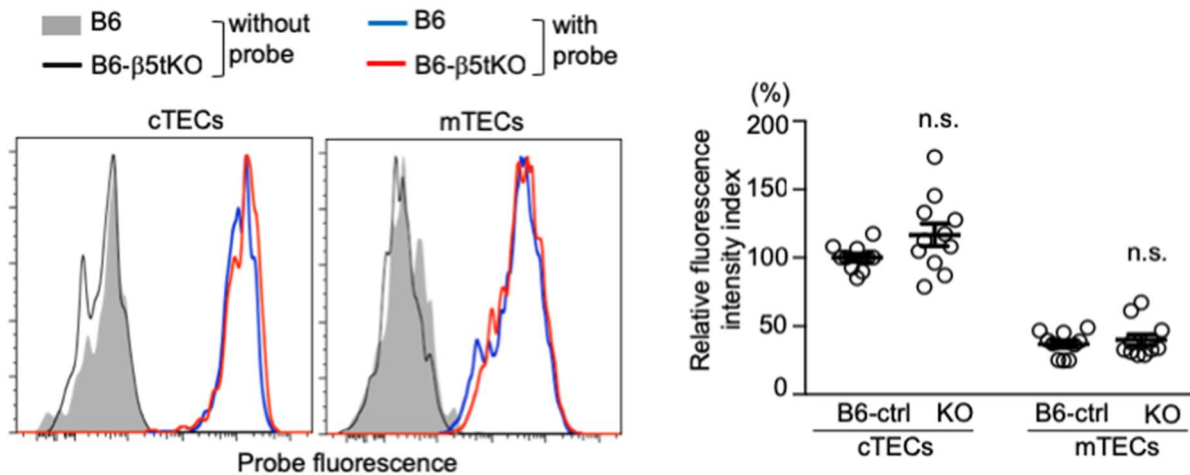


図 36. B6-β5tKO マウスおよび B6 マウスの cTEC と mTEC における、プロテアソーム活性の比較

左：B6 マウスおよび B6-β5tKO マウスの cTEC と mTEC における、プロテアソーム活性を示したフローサイトメータープロファイル

代表的なプロファイルを示した。プロテアソーム活性のプロファイルを cTEC および mTEC で別々に示した。

右：プロテアソーム活性の比較

B6 マウスおよび B6-β5Het マウスをコントロールとして用いた (B6-ctrl)。Relative fluorescence intensity index は、各群の probe ありのサンプルの MFI と probe なしのサンプルの MFI の差を、B6-ctrl cTEC 群の probe ありのサンプルの MFI と probe なしのサンプルの MFI の差で除した値を示した。実験は 6 回行い、各群 10-11 サンプルの結果を示した (n.s.: not significant)。

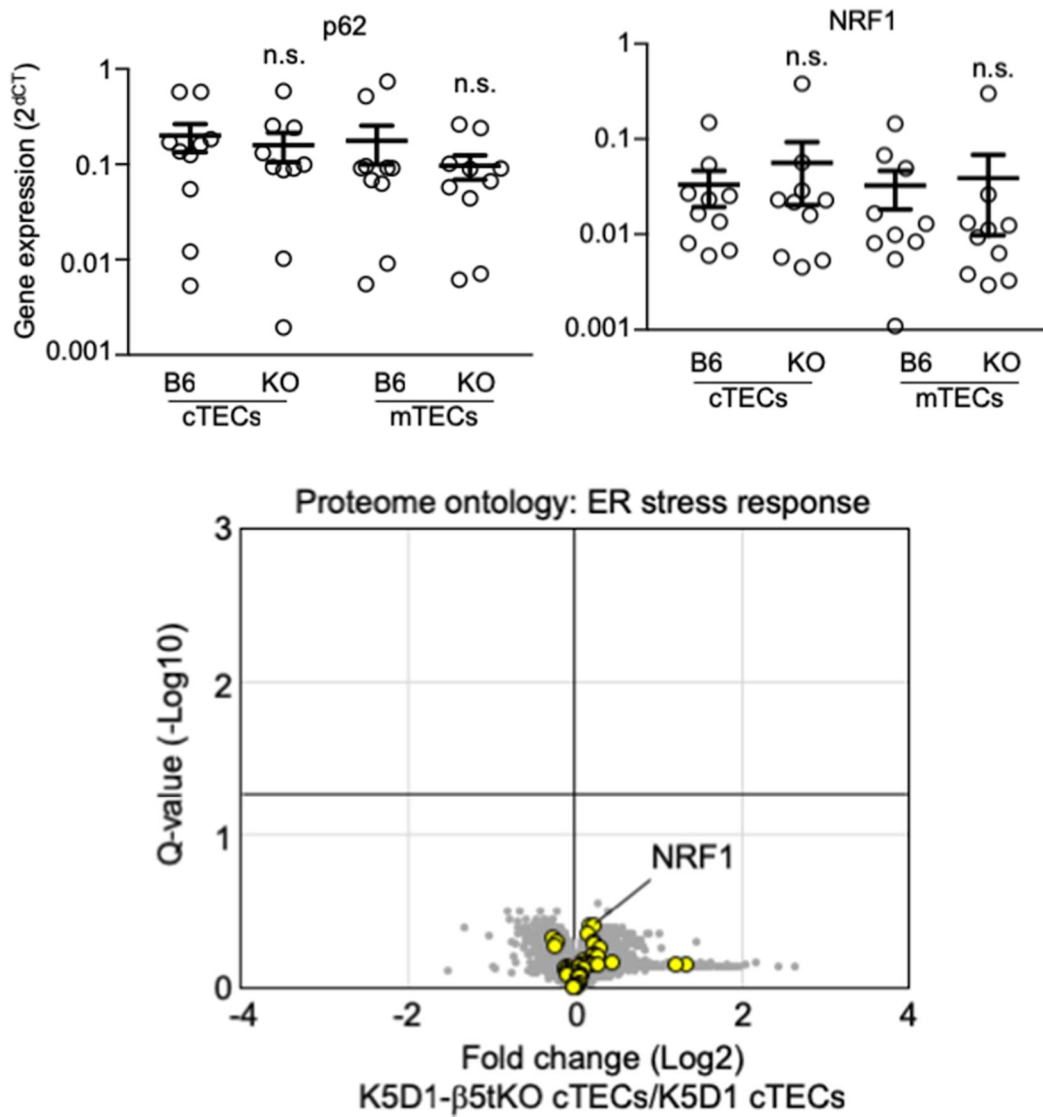


図 37. B6-β5tKO マウスにおけるストレス応答反応関連分子の発現比較

上：B6 マウスおよび B6-β5tKO マウスの cTEC と mTEC における、ストレス応答反応関連分子 p62、Nrf1 の発現比較

実験は 5 回行い、各群 10 サンプルの結果を示した (n.s.: not significant)。

下：K5D1-β5tKO マウスおよび K5D1 マウスの cTEC の volcano plot におけるストレス応答反応関連分子のタンパク質発現

ストレス応答反応に関連する分子を黄色で示した。

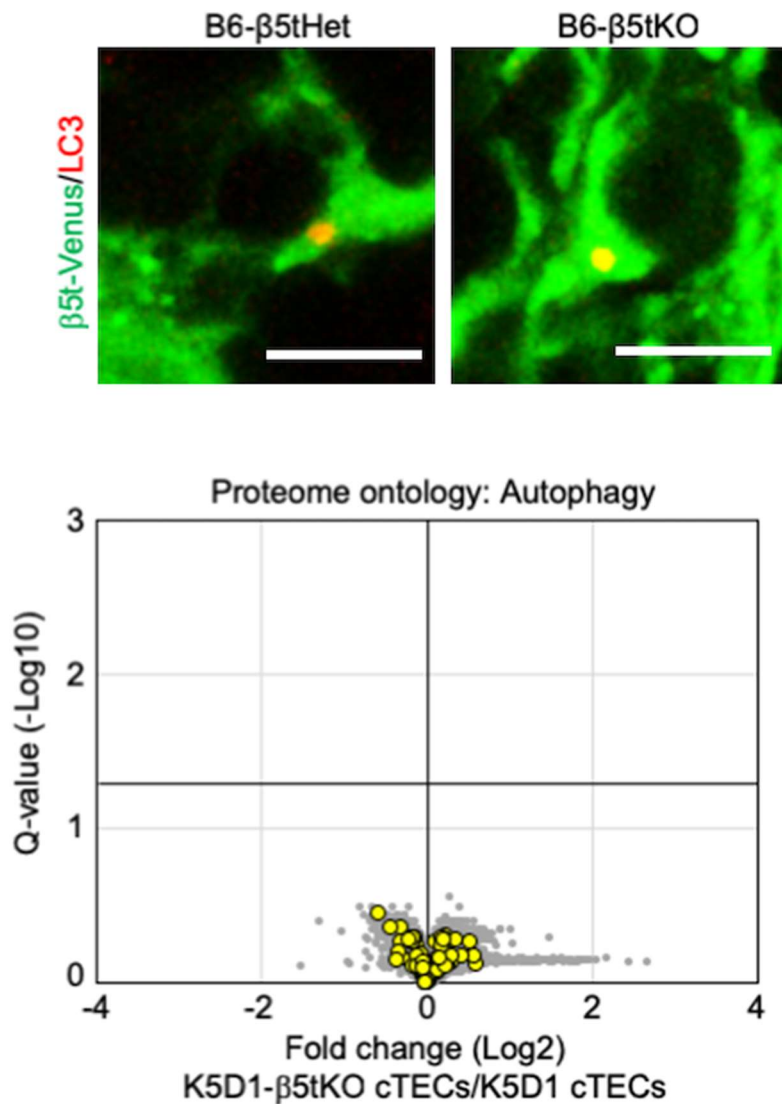


図 38. B6-β5tKO マウスにおけるオートファジー関連分子の発現比較

上：B6-β5tKO マウスおよび B6-β5tHet マウスの cTEC における、オートファジー関連タンパク質 LC3 の発現

Venus を緑、LC3 を赤で示した。スケールバーは 5μm である。

下：K5D1-β5tKO マウスおよび K5D1 マウスの cTEC の volcano plot におけるオートファジー関連分子のタンパク質発現

オートファジーに関連する分子を黄色で示した。

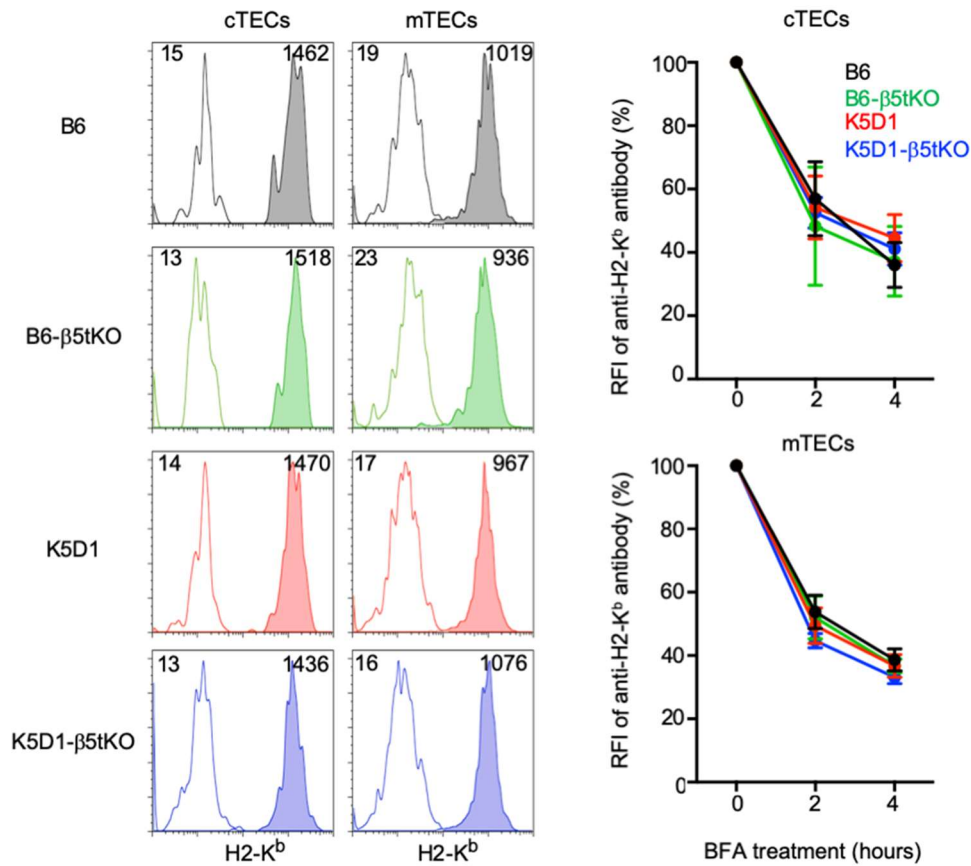


図 39. B6 マウス、B6-β5tKO マウス、K5D1 マウス、K5D1-β5tKO マウスにおける MHC class I 分子 (H2-Kb) の発現

左：MHC class I 分子 (H2-Kb) の cTEC および mTEC における発現

代表的なプロファイルを示した。プロファイル中の数字はヒストグラムの MFI を示す。中抜きのはistogramは isotype control の histogram である。

右：Brefeldin A (BFA) 処理による MHC class I 分子の細胞表面への発現低下

RFI (Relative Fluorescent Intensity) として、BFA 存在下 2 時間、4 時間培養したサンプルの H2-Kb の MFI と isotype control の MFI の差を、BFA 処理なしのサンプルの H2-Kb の MFI と isotype control の MFI の差で除した値を示した。実験は 4 回行い、各群 4-7 サンプルの結果を示した。

考察

本研究では、過形成した K5D1 マウスの胸腺は機能的に成熟し自己寛容を獲得した T 細胞を選択および産生することが可能であることを示し、K5D1 マウス胸腺を用いることで TEC のプロテオーム解析をはじめとした生化学的な解析を行うに十分な細胞数を効率良く精製することができた。通常のマウス胸腺 1 個からは 10^3 のオーダーでしか TEC は精製できないが、K5D1 マウス胸腺からは 10^5 のオーダーで TEC を精製することが可能である。K5D1 マウスの胸腺から精製した cTEC と mTEC を用いることで、本研究で定量的かつ網羅的なプロテオームのデータを初めて示すことができた。さらにトランスクリプトーム解析と組み合わせて cTEC と mTEC に対して多階層にわたる解析を行うことで、cTEC または mTEC で発現の高い分子の発現プロファイルを示すことができた。新たに提供できたこのリソースは今後の TEC の研究において非常に有用であると考えられる。

K5D1 マウス cTEC あるいは B6 マウス cTEC は CD4+ CD8+胸腺細胞を内包した TNC を含んでいることに注意が必要である。mTEC は cTEC と異なり胸腺細胞から容易に分離しやすく精製した mTEC には CD45+細胞の混入は見られなかった。このことから考えても mTEC のトランスクリプトームやプロテオームは胸腺細胞の混入を考慮する必要はほぼない。しかしながら、cTEC から抽出した RNA の 20-27%、タンパク質の 3-5%は TNC に含まれている CD4+ CD8+胸腺細胞に起因すると見積もっている (図 18)。その結果 cTEC のトランスクリプトームは同時に生成された CD4+ CD8+胸腺細胞の影響をかなり受けてしまう。実際 T 細胞関連遺伝子の発現は mTEC に比べて cTEC で非常に高い。このためトランスクリプトームのデータの解釈において CD4+ CD8+胸腺細胞の混入によるバイアスを念頭に置く必要がある。一方、プロテオームでは CD4+ CD8+胸腺細胞の影響はトランスクリプトームに比べると小さく、より cTEC そのもののタンパク質発現を反映すると考えられる。この点で、トランスクリプトームと比べて有用なリソースになっていると思われる。

K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC のプロテオームの比較において、K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の間での β5t タンパク質発現量の fold change は 0.40 と、本来 K5D1-β5tKO マウス cTEC では β5t が欠損しているにしては大きい値であると考えられた。

TMT 法による質量分析解析において、TMT のターゲットとなるイオン（すなわちサンプルから得られたペプチドに由来する）に、TMT そのものによるイオンが少量混入することは避けられない^{54,55}。ターゲットとなるイオンが十分にある際には TMT そのものによるイオンの混入の影響は無視できるが、ターゲットとなるイオンが全くないかごく少量である場合には、TMT イオンの混入がシグナルの大部分を占めてしまう。そのため、タンパク質の量の比が過小評価されてしまうことが報告されている^{54,55}。このことを今回の実験に当てはめて考えると、K5D1-β5tKO マウス cTEC 由来のサンプルにおいてはターゲットとなる β5t に由来するターゲットイオンが全くないため、TMT イオンの混入によるシグナルが β5t 由来のシグナルとして検

出されてしまったため、K5D1- β 5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の間での β 5t の fold change が大きめの値になってしまったと考えられた。一方、Label-Free 法では K5D1- β 5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC の間での β 5t の fold change は 0.06、0.03 と TMT 法の結果よりは小さかったことも、上記の考察を支持するものである。

その上で、大部分の 20S プロテアソームおよび 19S プロテアソームサブユニットが β 5tKO マウス cTEC で減少していることが明らかになった。 β 5i と β 5 の発現は増加していたが、これは β 5t の欠損に対する代償と考えられる。B6- β 5tKO マウス cTEC と B6 マウス cTEC との間でプロテアソームサブユニットの RNA の発現には有意な差が見られなかったが、それにも関わらず B6- β 5tKO マウス cTEC においてプロテアソームサブユニットのタンパク質発現が減少するメカニズムは明らかではない。 β 5i や β 5 に関しては、 β 5 サブユニットはプロテアソームが構築されていく際のシャペロンになること^{56,57}、 β 1i や β 2i を含む中間体のプロテアソームに β 5i は β 5 に

比べてより組み込まれやすいこと^{58,59}が知られている。これらの事実を参考にする

と、もともと胸腺プロテアソームを構築するために $\beta 5t$ が $\beta 5i$ や $\beta 5$ に比べて組み込

まれやすいが、cTECにおいて $\beta 5t$ の欠損をさせるとプロテアソーム構築の効率が低

下しプロテアソームの総量が減少するという可能性はあるかもしれない。

細胞透過性のあるプローブを用いたプロテアソーム活性の評価を行ったところ、

B6- $\beta 5t$ KO マウス cTEC のプロテアソーム活性は B6 または B6- $\beta 5t$ Het マウス cTEC に

比べて低下していないことが明らかとなった。 $\beta 5t$ KO マウス cTEC では、 $\beta 5i$ を組み

込んだ免疫プロテアソームが代償的に発現されているが、免疫プロテアソームは胸

腺プロテアソームに比べてキモトリプシン様活性が高いとされている^{20,53}。そのた

め、 $\beta 5t$ KO マウス cTEC ではプロテアソームの総量は減少しているが、代償的に発

現した免疫プロテアソームのプロテアソーム活性が高いために、全体としてのプロ

テアソーム活性に変化が見られなかったと考えている。

また、 $\beta 5t$ KO マウス cTEC においてプロテアソームサブユニットのタンパク質発現は減少しているものの、ストレス応答反応やオートファジーは誘導されていないことが明らかになった。これは、 $\beta 5t$ を欠損させたとしてもプロテアソームの減少は軽度で、加えて全体的なプロテアソーム活性は変化しないことに起因しているのではないかと考えられた。つまり、cTEC における $\beta 5t$ は cTEC のストレス応答やオートファジーなどに広範な影響を与えることなく、CD8 T 細胞の適切な選択を行うために必要な MHC class I に提示される自己ペプチドを産生することに特化しているのではないかと推察している。

大部分の 20S プロテアソームおよび 19S プロテアソームサブユニットの発現は mTEC に比べて cTEC で有意に高いこと、およびプロテアソーム活性も cTEC で有意に高いことが判明した。しかしながら、mTEC で cTEC に比べて p62 や Nrf1 の遺伝子発現の亢進が見られないことから、mTEC におけるプロテアソーム活性は細胞の恒常性を維持するのに十分であると考えられる。cTEC において mTEC よりも高いプ

ロテアソーム活性が見られる理由としては、cTEC は mTEC に比べて細胞が大きく

⁵⁰、恒常性維持により高いプロテアソーム活性が必要であると考えられる。

K5D1 マウス胸腺は機能的かつ自己寛容を獲得した T 細胞を産生することが可能である。B6 マウスと比較して、K5D1 マウスは約 80-100 倍の TEC を含むことが示された。同様に、B6 マウスと比較して K5D1 マウスは約 30-50 倍の胸腺細胞を含む。しかし脾臓においては、B6 マウスと比較して K5D1 マウスは約 2-3 倍の T 細胞しか含まないことも明らかになった。胸腺と比較して末梢での T 細胞の増加が軽度に止まることから、何らかの恒常性維持機構があり末梢の T 細胞数を制限するメカニズムがあることが示唆される。臨床的な観点から TEC を再構成することで T 細胞数の回復を促進させる試みがなされているが^{60,61}、末梢 T 細胞数に関して恒常性維持機構がある可能性があり、この点に注意が必要である。

今回は大量の TEC を精製することのできる K5D1 マウスを用い TEC に対して LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析を行ったが、現時点でもプロテオーム解析に必要

なタンパク質を採取するのに十分な細胞数を確保するのは難しい場合は多々あり、特に *in vivo* における希少な細胞集団においては非常に困難である。臨床検体は実験動物から得られる検体と異なり、同一条件の検体を繰り返し採取することは不可能である。また小児の検体であれば成人に比べて採取できる量が極めて限られる場合も多い。今後の臨床検体の網羅的な生化学的解析を考える上でも、さらなる技術革新によりより少量のタンパク質、特に 1 細胞レベルでのタンパク質の量で網羅的な解析が可能になることが期待される。

1 細胞レベルでの網羅的な解析は現在核酸を対象に盛んに行われおり、特に細胞集団の多様性や分化を解析する上で *single cell RNA-seq* の重要性が増している。今回の研究を発展させる形で *single cell RNA-seq* を用いた TEC の解析を開始し様々な新たな知見を見出している段階にあり、今後さらなる新しい知見が得られることが期待される。

近年、腫瘍関連抗原特異的な抗体と TCR の細胞内ドメインとのキメラとを遺伝子組み替え技術を用いて結合させ、T 細胞に導入した CAR-T (Chimeric Antigen Receptor-T cell) 療法が、患者細胞に由来する細胞を用いた腫瘍特異的な治療として臨床応用されるようになり注目を浴びている⁶²。しかしながら、CAR-T 療法に特有な副作用も見られ、その克服のためにはさらなる研究が必要である。このような遺伝子工学を用いて改変された T 細胞の機能を知る上で、胸腺内での T 細胞分化に立ち返ることは重要であり、そのため T 細胞の胸腺内での分化と選択を司る胸腺上皮細胞について知見を深めることは、臨床との関係からも有用であると考えられる。

ヒトにおいて重症筋無力症と胸腺腫の合併はよく知られており。治療においても胸腺の摘除が重要な選択肢の一つとなっている。小児科領域においても重症筋無力症は少ないながらも見られ、侵襲性の高さや免疫能への影響を考慮して内科的治療が優先されるが、重症例に対しては胸腺摘出も行われる。重症筋無力症の病態には CD4+ T 細胞依存性に抗アセチルコリン受容体抗体の産生がされることが関係して

いとされているが、このような異常な T 細胞が産生される背景に TEC の異常が関与している可能性が考えられる。今回用いたプロテオーム解析をヒト TEC に対して応用して TEC の機能異常を発見できれば、その発見は重症筋無力症などの胸腺種が関係する自己免疫疾患の病態解明において大きく貢献すると考えられる。

また、小児科領域では、様々な多発奇形症候群と考えられる患者の診療にあたることが多い。それらの患者で免疫機能の低下が見られるとされていることも多いが、具体的にどのような免疫が低下しているか不明なことも多い。今回 TEC で発現の見られたタンパク質の発現を中心に TEC の観点から免疫機能を評価することで、より良い T 細胞免疫の評価が可能になり易感染性に対する予防に有用な情報を提供することも考えられる。今後、今回得られた知見を元に TEC の観点からヒトの免疫疾患の理解が進むことに期待したい。

謝辞

本研究は徳島大学先端酵素学研究所並びに米国国立衛生研究所（NIH：National Institutes of Health）において行いました。国内外に留学して研究を行う機会を与えて頂き、多大なるご高配を賜りました東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児科学岡明教授に心より感謝致します。また本研究に導き多大なご支援を頂いた平田陽一郎講師（現北里大学小児科准教授）に感謝致します。

本研究は徳島大学および NIH で高濱洋介博士の下に行いました。博士のきめ細やかかつ的確なご指導に深く感謝申し上げます。また、共同研究者である大東いずみ博士、藤森さゆ美博士、香西美奈博士、近藤博之君（徳島大学先端酵素学研究所免疫系発生学分野）、片桐豊雅博士、松下洋輔博士（徳島大学先端酵素学研究所ゲノム制御学分野）、小迫英尊博士（徳島大学先端酵素学研究所細胞情報学分野）、久保田浩行博士、宇田新介博士（九州大学生体防御医学研究所統合オミクス分野）、村田茂穂博士、濱崎純博士、本杉良君（東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学

教室)、田中啓二博士(東京都医学総合研究所)、近藤健太博士、Dr. Amy Colleen

Palin (Experimental Immunology Branch, NCI, NIH)、Dr. Victoria Joan Hoffmann

(Division of Veterinary Resources, Office of Research Service, NIH) に御礼申し上げます。

す。

最後に、研究生生活を支え暖かくサポートをしてくれた妻、有美に深謝します。

引用文献

1. R. E. Scammon, The measurement of the body in childhood. *Meas. man*, 173–215 (1930).
2. R. Chaoui, K. D. Kalache, K. S. Heling, C. Tennstedt, C. Bommer, H. Körner, Absent or hypoplastic thymus on ultrasound: A marker for deletion 22q11.2 in fetal cardiac defects. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **20**, 546–552 (2002).
3. H. Kurobe, T. Tominaga, M. Sugano, Y. Hayabuchi, Y. Egawa, Y. Takahama, T. Kitagawa, Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response: Three-year tracing study after pediatric cardiac surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **145**, 656–62 (2013).
4. T. Yamauchi, T. Moroishi, Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. *Cells.* **8**, 398 (2019).

5. K. Murphy, C. Weaver, Janeway's Immunobiology, 9th edition, 445 (2017).
6. S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. **133**, 775–787 (2008).
7. P. K. Gregersen, T. W. Behrens, Genetics of autoimmune diseases - Disorders of immune homeostasis. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 917–928 (2006).
8. C. C. Blackburn, N. R. Manley, Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 278–289 (2004).
9. T. Boehm, Thymus development and function. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 178–184 (2008).
10. H.-R. Rodewald, Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 355–388 (2008).
11. Y. Takahama, Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 127–135 (2006).

12. G. Anderson, Y. Takahama, Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol.* **33**, 256–263 (2012).
13. J. Derbinski, B. Kyewski, How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 592–600 (2010).
14. Y. Takahama, I. Ohigashi, S. Baik, G. Anderson, Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 295–305 (2017).
15. 高田健介、高濱洋介, T細胞免疫におけるチェックポイント. 炎症と免疫. **23**, 3–9 (2015).
16. K. Hozumi, C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Holl, D. T. Shima, S. Habu, Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* **205**, 2507–2513 (2008).
17. U. Koch, E. Fiorini, R. Benedito, V. Besseyrias, K. Schuster-gossler, M. Pierres, N. R.

- Manley, A. Duarte, H. R. Macdonald, F. Radtke, Delta-like 4 is the essential ,
nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp.*
Med. **205**, 2515–2523 (2008).
18. T. Nakagawa, W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos,
H. Ploegh, C. Peters, A. Y. Rudensky, Cathepsin L: Critical role in Ii degradation and
CD4 T cell selection in the thymus. *Science (80-.).* **280**, 450–453 (1998).
19. J. Gommeaux, C. Grégoire, P. Nguessan, M. Richelme, M. Malissen, S. Guerder, B.
Malissen, A. Carrier, Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a
subset of CD4+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **39**, 956–964 (2009).
20. S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. I. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka,
Regulation of CD8 + T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*
(80-.). **316**, 1349–53 (2007).

21. T. Nitta, S. Murata, K. Sasaki, H. Fujii, A. M. Ripen, N. Ishimaru, S. Koyasu, K. Tanaka, Y. Takahama, Thymoproteasome Shapes Immunocompetent Repertoire of CD8+ T Cells. *Immunity*. **32**, 29–40 (2010).
22. Y. Xing, S. C. Jameson, K. A. Hogquist, Thymoproteasome subunit- β 5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6979–6984 (2013).
23. K. Takada, F. Van Laethem, Y. Xing, K. Akane, H. Suzuki, S. Murata, K. Tanaka, S. C. Jameson, A. Singer, Y. Takahama, TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 2–7 (2015).
24. T. Ueno, F. Saito, D. H. D. Gray, S. Kuse, K. Hieshima, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, R. L. Boyd, Y. Takahama, CCR7 signals are essential for cortex-medulla

- migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* **200**, 493–505 (2004).
25. M. Kozai, Y. Kubo, T. Katakai, H. Kondo, H. Kiyonari, K. Schaeuble, S. A. Luther, N. Ishimaru, I. Ohigashi, Y. Takahama, Essential role of CCL21 in establishment of central self tolerance in T cells. *J. Exp. Med.* **214**, 1925–1935 (2017).
26. J. Derbinski, J. Gäbler, B. Brors, S. Tierling, S. Jonnakuty, M. Hergenahn, L. Peltonen, J. Walter, B. Kyewski, Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* **202**, 33–45 (2005).
27. M. S. Anderson, E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. Von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, D. Mathis, Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (80-.).* **298**, 1395–1401 (2002).
28. S. W. Rossi, W. E. Jenkinson, G. Anderson, E. J. Jenkinson, Clonal analysis reveals a

- common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*. **441**, 988–991 (2006).
29. C. C. Bleul, T. Corbeaux, A. Reuter, P. Fisch, J. S. Mönning, T. Boehm, Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature*. **441**, 992–996 (2006).
30. I. Ohigashi, S. Zuklys, M. Sakata, C. E. Mayer, S. Zhanybekova, S. Murata, K. Tanaka, G. A. Holländer, Y. Takahama, Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from $\beta 5t$ -expressing progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9885–90 (2013).
31. C. E. Mayer, S. Žuklys, S. Zhanybekova, I. Ohigashi, H. Y. Teh, S. N. Sansom, N. Shikama-Dorn, K. Hafen, I. C. Macaulay, M. E. Deadman, C. P. Ponting, Y. Takahama, G. A. Holländer, Dynamic spatio-temporal contribution of single $\beta 5t^+$

- cortical epithelial precursors to the thymus medulla. *Eur. J. Immunol.* (2016).
32. L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, K. A. Hogquist, Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
33. A. Apavaloaei, S. Brochu, M. Dong, A. Rouette, M.-P. Hardy, G. Villafano, S. Murata, H. J. Melichar, C. Perreault, PSMB11 Orchestrates the Development of CD4 and CD8 Thymocytes via Regulation of Gene Expression in Cortical Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* (2019).
34. S. N. Sansom, N. Shikama-Dorn, S. Zhanybekova, G. Nusspaumer, I. C. Macaulay, M. E. Deadman, A. Heger, C. P. Ponting, G. A. Holländer, Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* **24**, 1918–1931 (2014).

35. C. N. Miller, I. Proekt, J. von Moltke, K. L. Wells, A. R. Rajpurkar, H. Wang, K. Rattay, I. S. Khan, T. C. Metzger, J. L. Pollack, A. C. Fries, W. W. Lwin, E. J. Wigton, A. V. Parent, B. Kyewski, D. J. Erle, K. A. Hogquist, L. M. Steinmetz, R. M. Locksley, M. S. Anderson, Thymic tuft cells promote an IL-4-enriched medulla and shape thymocyte development. *Nature*. **559**, 627–631 (2018).
36. K. Kondo, I. Ohigashi, Y. Takahama, Thymus machinery for T-cell selection. *Int. Immunol.* **31**, 119–125 (2019).
37. A. I. Robles, F. Larcher, R. B. Whalin, R. Murillas, E. Richie, I. B. Gimenez-Conti, J. L. Jorcano, C. J. Conti, Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7634–7638 (1996).
38. D. B. Klug, E. Crouch, C. Carter, L. Coghlan, C. J. Conti, E. R. Richie, Transgenic

- Expression of Cyclin D1 in Thymic Epithelial Precursors Promotes Epithelial and T Cell Development. *J. Immunol.* **164**, 1881–1888 (2000).
39. D. A. Megger, D. A. Megger, W. Naboulsi, H. E. Meyer, B. Sitek, Proteome Analyses of Hepatocellular Carcinoma Review Article Proteome Analyses of Hepatocellular Carcinoma. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2**, 22–30 (2014).
40. L. Ting, R. Rad, S. P. Gygi, W. Haas, MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat. Methods.* **8**, 937–940 (2011).
41. D. B. Klug, C. Carter, E. Crouch, D. Roop, C. J. Conti, E. R. Richie, Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998).
42. Y. Lei, A. M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L. T. Jeker, M. R. Bösl, G. a Holländer, Y. Hayashi, R. D. W. Malefyt, T. Nitta, Y. Takahama, Aire-dependent

- production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* **208**, 383–394 (2011).
43. D. H. D. Gray, N. Seach, T. Ueno, M. K. Milton, A. Liston, A. M. Lew, C. C. Goodnow, R. L. Boyd, Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood.* **108**, 3777–3785 (2006).
44. M. Meredith, D. Zemmour, D. Mathis, C. Benoist, Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat. Immunol.* **16**, 942–949 (2015).
45. C. Bornstein, S. Nevo, A. Giladi, N. Kadouri, M. Pouzolles, F. Gerbe, E. David, A. Machado, A. Chuprin, B. Tóth, O. Goldberg, S. Itzkovitz, N. Taylor, P. Jay, V. S. Zimmermann, J. Abramson, I. Amit, Single-cell mapping of the thymic stroma identifies IL-25-producing tuft epithelial cells. *Nature.* **559**, 622–626 (2018).
46. G. Anderson, E. J. Jenkinson, N. C. Moore, J. J. T. Owen, MHC class II-positive

- epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature*. **362**, 70–73 (1993).
47. M. Sakata, I. Ohigashi, Y. Takahama, Cellularity of Thymic Epithelial Cells in the Postnatal Mouse. *J. Immunol.* **200**, 1382–1388 (2018).
48. H. Wekerle, U. P. Ketelsen, Thymic nurse cells-Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature*. **283**, 402–404 (1980).
49. B. Kyewski, H. S. Kaplan, Lymphoepithelial interactions in the mouse thymus: phenotypic and kinetic studies on thymic nurse cells. *J. Immunol.* **128**, 2287–2294 (1982).
50. Y. Nakagawa, I. Ohigashi, T. Nitta, M. Sakata, K. Tanaka, S. Murata, O. Kanagawa, Y. Takahama, Thymic nurse cells provide microenvironment for secondary T cell receptor rearrangement in cortical thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 20572–20577 (2012).

51. S. Murata, Y. Takahama, M. Kasahara, K. Tanaka, The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nat. Immunol.* **19**, 923–931 (2018).
52. J. Nedjic, M. Aichinger, J. Emmerich, N. Mizushima, L. Klein, Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature.* **455**, 396–400 (2008).
53. K. Sasaki, K. Takada, Y. Ohte, H. Kondo, H. Sorimachi, K. Tanaka, Y. Takahama, S. Murata, Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8+ T cells. *Nat. Commun.* **6**, 7484 (2015).
54. Y. O. Saw, M. Salim, J. Noirel, C. Evans, I. Rehman, P. C. Wright, iTRAQ underestimation in simple and complex mixtures: “The good, the bad and the ugly.” *J. Proteome Res.* **8**, 5347–5355 (2009).

55. L. Ting, R. Rad, S. P. Gygi, W. Haas, MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat. Methods.* **8**, 937–940 (2011).
56. P. Chen, M. Hochstrasser, Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell.* **86**, 961–972 (1996).
57. Y. Hirano, T. Kaneko, K. Okamoto, M. Bai, H. Yashiroda, K. Furuyama, K. Kato, K. Tanaka, S. Murata, Dissecting β -ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* **27**, 2204–2213 (2008).
58. T. A. Griffin, D. Nandi, M. Cruz, H. J. Fehling, L. Van Kaer, J. J. Monaco, R. A. Colbert, Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of Interferon γ (IFN- γ)–inducible Subunits. *J. Exp. Med.* **187**, 97–104 (1998).
59. K. Tanaka, The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **85**, 12–36 (2009).

60. M. R. M. Van Den Brink, Ö. Alpdogan, R. L. Boyd, Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 856–867 (2004).

61. M. S. Chaudhry, E. Velardi, J. A. Dudakov, M. R. M. van den Brink, Thymus: The next (re)generation. *Immunol. Rev.* **271**, 56–71 (2016).

62. R. G. Majzner, C. L. Mackall, Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat. Med.* **25**, 1341–1355 (2019).