

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 田中 優

胸腺は抗原認識が可能でかつ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 (thymic epithelial cell: TEC) 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 (cortical TEC: cTEC) と髄質胸腺上皮細胞 (medullary TEC: mTEC) 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未だ不明な点が多い。

近年次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析が盛んに行われるようになり TEC においても報告が多くなされているが、cTEC に主眼を置いた研究は少ない。また、抗原認識が可能で自己寛容性を獲得した T 細胞の産生のために、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。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いこと、核酸のように増幅させることが不可能であることもあり、TEC でのデータは今まで報告がない。

本研究では胸腺の過形成が見られる Keratin 5 promoter-driven cyclinD1-transgenic (K5D1) マウスを用い、プロテオームによる網羅的なタンパク質解析に十分な細胞を精製した。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行い、cTEC および mTEC のそれぞれに特徴的な分子を多数同定した。さらに cTEC 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たプロテオーム解析を行い、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

### 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 マウスでは胸腺が過形成であり、cTEC および mTEC の細胞数は正常マウスと比較して著しく増加していた。しかし K5D1 マウスにおける過形成胸腺の環境においても、正常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明らかになった。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。

### 2. K5D1 マウスの cTEC と mTEC の FACS による精製

K5D1 マウス胸腺から B6 マウスと同様に、セルソーターを用いて cTEC と mTEC を純度良く精製することが可能であった。しかしながら、表面分子マーカーを用いて cTEC を精製する際には cTEC 内部に CD4+ CD8+胸腺細胞を包含する胸腺ナース細胞も同時に精製さ

れるため、cTEC から抽出した RNA およびタンパク質には CD4+ CD8+胸腺細胞に由来する RNA およびタンパク質が混入することが避けられない。実際に 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 CD4+ CD8+胸腺細胞に由来すると推定された。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。

### 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

プロテオームによる cTEC と mTEC の比較に先立ち、B6 マウスおよび K5D1 マウス cTEC と mTEC のトランスクリプトームによる比較を行ったところ、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 または mTEC の全体的な遺伝子発現は B6 マウス cTEC または mTEC と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。

### 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

前項 3 の結果を鑑み、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 を用いてプロテオーム解析を行うこととし、精製した K5D1 マウス cTEC および mTEC を LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) での解析に供した。その結果、K5D1 マウス cTEC または mTEC で発現されているタンパク質が計 5753 種類同定され、加えて 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た。特に cTEC の機能を特徴付ける分子である Cathepsin L、 $\beta 5t$ 、Tssp のタンパク質発現は K5D1 マウス cTEC で高く、mTEC の機能を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 mTEC で高かった。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して CD4+ CD8+胸腺細胞の影響が少なかった。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 種類同定することができた。この中には TEC での機能が未知の分子が多く含まれており、今後の研究のさらなる研究が期待される。

### 5. B6- $\beta 5t$ KO マウス、K5D1- $\beta 5t$ KO マウスの cTEC を用いた RNA-seq

$\beta 5t$  は胸腺プロテアソームを構成するサブユニットの一つで cTEC に特異的に発現しており、この欠損により胸腺プロテアソームは構成されなくなる。プロテオームの観点から胸腺プロテアソームの欠損が cTEC に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。

B6- $\beta 5t$ KO マウス cTEC および K5D1- $\beta 5t$ KO 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ところ、B6- $\beta 5t$ KO 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。

#### 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 5 の結果を鑑み、K5D1-β5tKO マウス cTEC と K5D1 マウス cTEC のプロテオームを比較したところ、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。

K5D1-β5tKO 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-β5tKO 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 β5 および β5i は増加していた。またフローサイトメーターの実験では B6-β5tKO 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。

#### 7. β5tKO 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

前項 6 で β5tKO マウス cTEC ではコントロールマウス cTEC と比較してプロテアソームが減少することが明らかになったが、プロテアソームの活性には変化がなかった。また β5tKO マウス cTEC でストレス応答反応やオートファジーが亢進するという結果は得られなかった。また β5tKO マウス cTEC ではコントロールマウス cTEC と比較して MHC class I の発現にも差が見られなかった。

今回、K5D1 マウスを用いることで正常マウスと近い細胞学的特徴を示す TEC を大量に精製することで TEC のタンパク質の網羅的解析が比較的少数の胸腺から行うことができた。トランスクリプトームとプロテオームを統合することで、cTEC と mTEC に特徴的な分子を多数同定できた。同定され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 TEC における機能解明がさらに進むことが大いに期待される。また、K5D1-β5tKO マウス cTEC のプロテオームからは、大部分のプロテアソームサブユニットの発現が低下し β5 および β5i が上昇していることが判明した。しかしながら β5tKO マウス cTEC において、ストレス応答反応やオートファジーの更新などはみられず、胸腺プロテアソームは 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ことが考えられた。