

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15182

研究課題名(和文) Aireを発現する自然リンパ球様細胞の解析

研究課題名(英文) Aire expressing ILC3-like cells in the lymph node display potent APC features

研究代表者

山野 友義 (Yamano, Tomoyoshi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40724183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト遺伝性自己免疫疾患APECEDはAire遺伝子の変異によって引き起こされる自己免疫疾患である。Aireは胸腺髄質上皮細胞特異的に発現し、胸腺内で自己反応性T細胞を除去するのに必須の因子の一つと考えられている。

本研究で申請者は末梢リンパ組織において3型自然リンパ球の特徴を持つ細胞分画の一部にAireを発現する分画(AireILC3様細胞)の存在を発見した。またAireILC3様細胞は3型自然リンパ球(ILC3)の特徴を持つ点、AireILC3様細胞はRORrt依存的に分化することを示した。AireILC3様細胞は末梢リンパ組織で自己反応性T細胞に末梢性の寛容を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患は本来自己を守るための免疫系が自己を攻撃してしまうためにおこる疾患で、その根本的な治療法は未だ確立されておらず、また多くの場合その発症の原因がわかっていない。

Aire遺伝子は免疫寛容に必須の遺伝子で、最近リンパ節にもAireの発現が報告されていたが、どの細胞がAireを発現しているかは議論があった。本研究はリンパ節でAireを発現する細胞は何であるのかという議論に終止符を打つものであり、免疫寛容の一部を担う新たな細胞を発見したものである。このような知見の積み重ねによって、将来、原因が不明である膠原病や自己免疫疾患に対する原因解明およびその治療法の確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：APECED is an autoimmune disease caused by mutations in the Aire gene, which is expressed specifically in thymic medullary epithelial cells. Aire is essential for the central tolerance induction in the thymus.

In this study, I discovered Aire-expressing cells (AireILC3-like cells) in LN, which have a characteristic of type 3 innate lymphocyte. I showed that the development of AireILC3-like cells is RORrt-dependent, and AireILC3-like cells induce peripheral tolerance to self-reactive T cells in peripheral lymphoid tissues.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容 Aire 胸腺

## 1. 研究開始当初の背景

### Aire は免疫寛容に必要な因子である

胸腺は T 細胞が分化・成熟する場であり、T 細胞は様々な抗原に対応するため多様な TCR レパトワを形成する。多様な TCR レパトワの中には自己に反応する分画が存在しており、胸腺に存在する抗原提示細胞は自己反応性 T 細胞を除去すると同時に、未熟 T 細胞から制御性 T 細胞への分化を促すことで自己に対する免疫寛容を確立する。胸腺に存在する抗原提示細胞の中で胸腺髄質上皮細胞は非常にユニークな細胞で異所性の組織特異的抗原、例えば膵島特異的抗原であるインスリンや脳特異的抗原であるプロテオリピドタンパク質 (PLP) 等を発現する。これら組織特異的抗原の発現はそれらに反応性を持つ自己反応性 T 細胞の除去に必須である。胸腺髄質上皮細胞による組織特異的抗原の発現の多くを制御しているのが Aire である。Aire を欠損したマウスでは Aire 依存的に発現する組織特異的抗原に反応性を持つ T 細胞を除去することができず、その結果、多臓器における自己免疫疾患が発症する。

Aire は胸腺髄質上皮細胞特異的に発現すると考えられてきたが、近年、Aire を発現する細胞が他にも存在することが報告されてきた。筆者らは胸腺 B 細胞が Aire を発現することを報告した (Yamano et al., *Immunity*)。また他のグループは胎生期に Aire が発現すること、ガン化したケラチノサイトが Aire を発現することを報告した (Hobbs et al., *Nature Genetics*)。Mark Anderson のグループは脾臓、リンパ節におけるストローマ細胞の一部で Aire を発現することを報告した (Gardner et al., *Science*)。一方、他のグループからは脾臓、リンパ節のストローマ細胞は mRNA レベルでは Aire の発現が見られるがタンパク質レベルでは Aire の発現はみられないとの報告があった。このように末梢リンパ組織における Aire を発現する細胞に関しては高い注目を集める一方で、どの細胞が Aire を発現するかに関しては確固たる結論は出ておらず、またその細胞の生理的役割についてもわかっていない。

## 2. 研究の目的

末梢リンパ組織で Aire を発現する細胞を同定し、その役割を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) Aire を発現する自然リンパ球様細胞 (AireILC3 like cell) は ILC3 に属するかを評価する

我々は Aire reporter マウスを用いた解析より、リンパ節で Aire を発現する細胞は 3 型自然リンパ球様の細胞であるがわかった。自然リンパ球 (ILC) はリンパ球様の形態を持つ、ミエロイド系の表現型を有さない、RAG 非依存的と定義される。そのためまず、RAGKO マウスにおいても AireILC3 like cell が存在するかを調べた。また ILC3 は Th17 サイトカインを産生し、RORrt、IL7Ra 依存的な細胞と定義される。AireILC3 は ILC3 に属するかを調べるため RORrtKO マウスの骨髓細胞と野生型マウスの骨髓細胞を同様の割合で混合し、致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに移入することで混合骨髓キメラを作製した。混合キメラマウスにおける AireILC3 のキメラリズムを調べることで、AireILC3 の RORrt 依存性を調べた。RNA シークエンスによって遺伝子発現を調べることで、ILC3 と AireILC3 の比較を行った。また野生型、Aire 欠損マウスにおける AireILC3 の遺伝子発現を調べることで AireILC3 における Aire が制御する遺伝子発現を調べた。

### (2) どのシグナルが ILC3 に Aire の発現を誘導するかを評価する

胸腺髄質上皮細胞は CD40 および RANK からのシグナルによって Aire の発現が誘導される。ILC3 を精製し、*invitro* で抗 CD40 抗体、抗 RANK 抗体で刺激することでこれらのシグナルが ILC3 において Aire の発現を誘導するかを調べた。CD40KO マウス、RANKKO マウスを用いて AireILC3 の分化にこれらのシグナルが重要であるかを *invivo* で調べた。

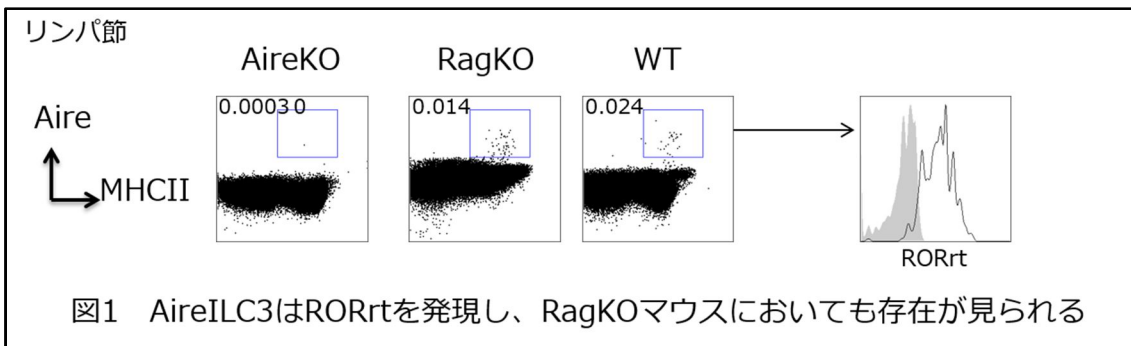
### (3) AireILC3 like cell の T 細胞寛容誘導への寄与を評価する

定常状態において樹状細胞は自己反応性 T 細胞に末梢性寛容を誘導することが知られている。AireILC3 が末梢性寛容に寄与するかを調べるためモデル抗原 HA が Aire を発現する細胞で発現する Aire-HCO マウスを用いた。Aire-HCO マウスに HA 特異的 T 細胞を移入し、末梢性寛容が誘導されるかを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) AireILC3 like cell は ILC3 の特徴を持つ。

自然リンパ球 (ILC) はリンパ球様の形態を持つ、ミエロイド系の表現型を有さない、RAG 非依存的と定義される。そのためまず、RAGKO マウスにおいても AireILC3 like cell が存在するかを調べた結果、RAGKO マウスにおいても AireILC3 like cell は存在した (図 1)。また細胞表面マーカーの詳細な解析を行った結果、AireILC3 like cell はミエロイドマーカーの発現を有さないことがわかった。



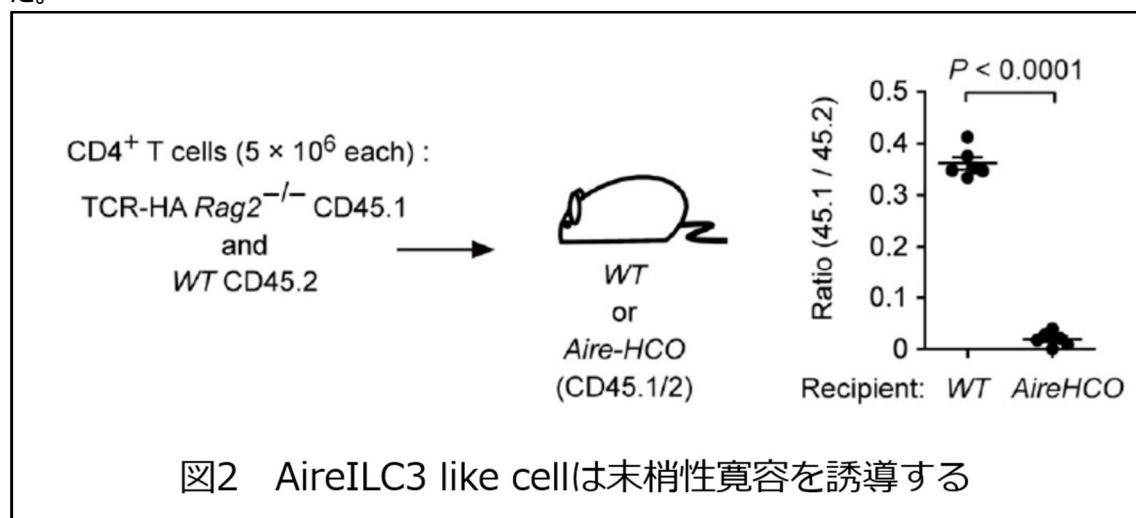
ILC3 の分化は RORrt に依存することが知られている為、RORrtKO マウスの骨髄細胞と野生型マウスの骨髄細胞を同様の割合で混合し、致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに移入することで混合骨髄キメラを作製、AireILC3 like cell を解析したところ、RORrtKO 由来の血球中には AireILC3 like cell がほとんど見られなかった。このことより、AireILC3 like cell は RORrt 依存的に分化することがわかった。RNA シークエンスによって遺伝子発現を調べた結果、AireILC3 like cell において 707 個の遺伝子が Aire によって制御されていることがわかった。

### (2) RANK シグナルが ILC3 に Aire の発現を誘導する

胸腺髄質上皮細胞は CD40 および RANK からのシグナルによって Aire の発現が誘導される。ILC3 を精製し、*invitro* で抗 CD40 抗体、抗 RANK 抗体で刺激することでこれらのシグナルが ILC3 において Aire の発現を誘導するかを調べた。結果 CD40 刺激では Aire の発現が誘導されなかったが、RANK 刺激で ILC3 における Aire の発現がみられた。また CD40KO マウスでは AireILC3 like cell の欠損は見られなかったが、RANKKO マウスを用いて AireILC3 like cell の欠損がみられた。このことより、RANK シグナルが ILC3 細胞における Aire の発現に重要であることがわかった。

### (3) AireILC3 like cell は末梢性 T 細胞寛容に寄与する

AireILC3 like cell が自己反応性 T 細胞に末梢性寛容を誘導するかどうかを調べる為に、AireILC3 が末梢性寛容に寄与するかを調べるためモデル抗原 HA が Aire を発現する細胞で発現する Aire-HCO マウスを用いた。Aire-HCO マウスに HA 特異的 T 細胞を移入し、末梢性寛容が誘導されるかを調べた結果、移入した HA 特異的 T 細胞は AICD が誘導され、細胞数が顕著に減少していた (図 2)。このことより AireILC3 like cell が末梢性寛容を誘導することが示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamano Tomoyoshi, Dobes Jan, Voboril Matous, Steinert Madlen, Brabec Tomas, Zietara Natalia, Dobesova Martina, Ohnmacht Caspar, Laan Martti, Peterson Part, Benes Vladimir, Sedlacek Radislav, Hanayama Rikinari, Kolar Michal, Klein Ludger, Filipp Dominik	4. 巻 216
2. 論文標題 Aire-expressing ILC3-like cells in the lymph node display potent APC features	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1027-1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okada H, Nakanishi C, Yoshida S, Shimojima M, Yokawa J, Mori M, Tada H, Yoshimuta T, Hayashi K, Yamano T, Hanayama R, Yamagishi M, Kawashiri MA	4. 巻 9
2. 論文標題 Function and Immunogenicity of Gene-corrected iPSC-derived Hepatocyte-Like Cells in Restoring Low Density Lipoprotein Uptake in Homozygous Familial Hypercholesterolemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 4695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41056-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamano Tomoyoshi, Steinert Madlen, Steer Beatrix, Klein Ludger, Hammerschmidt Wolfgang, Adler Heiko	4. 巻 49
2. 論文標題 B cells latently infected with murine gammaherpesvirus 68 (MHV 68) are present in the mouse thymus?A step toward immune evasion?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201847886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyatake Yuji, Yamano Tomoyoshi, Hanayama Rikinari	4. 巻 201
2. 論文標題 Myoferlin-Mediated Lysosomal Exocytosis Regulates Cytotoxicity by Phagocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3051 ~ 3057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoyoshi Yamano
2. 発表標題 A ROR $\gamma$ t-dependent innate lymphoid cell-type in secondary lymphoid organs expresses Aire and presents endogenously expressed antigen for T cell tolerance
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山野友義
2. 発表標題 胸腺細胞外小胞がT細胞分化に与える影響の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoyoshi Yamano
2. 発表標題 A role of extracellular vesicle in T cell development
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山野友義
2. 発表標題 胸腺細胞外小胞がT細胞分化に与える影響の解析
3. 学会等名 京都T細胞学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫寛容に関わる細胞の特定に世界に先駆けて成功！  
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/65824>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----