

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19564

研究課題名（和文）自己免疫病態におけるアンビバレンス（両価性）の解読

研究課題名（英文）Studies on the mechanisms underlying autoimmune ambivalence

研究代表者

松本 満（MATSUMOTO, Mitsuru）

徳島大学・先端酵素学研究所（次世代）・教授

研究者番号：60221595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：Aire-TgではAire発現のためのプロモーターとしてMHC-IIを用いているので、胸腺髄質上皮細胞（mTEC）に加え、MHC-IIを発現するDCやB細胞などの骨髄由来の抗原提示細胞（BM-APC）でもAireの発現を認める。Aire-Tgに認めた多発性筋炎様病態については、mTECとBM-APCの両方で発現するAireが必要であることをBMT実験によって明らかにしたが、糖尿病抵抗性についてはBM-APCが発現するAireが糖尿病発症抑制に関与しており、Aireの過剰発現によってXcr1陽性DCの産生が低下することが糖尿病抵抗性獲得機構の原因であ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

多発性内分泌疾患I型（APS1）の原因遺伝子Aireは自己寛容の成立機構に必須の役割を担う。本研究ではmTECやBM-APCなどの抗原提示細胞におけるAireの過剰発現が、どのようなメカニズムによって自己免疫病態の発生と修復（両価性）をもたらすかを明らかにし、それによってAireの本質的な機能解明を図った。Aireの過剰発現によるI型糖尿病抵抗性の獲得機構のメカニズムについてはXcr1陽性DCの減少がその原因であることを突き止めた。さらに、Aireの過剰発現によって多発性筋炎様病態が観察された事実から、ヒトの多発性筋炎においてもAireの過剰発現が病気の原因であるという大胆な仮説を検証した。

研究成果の概要（英文）：Roles of Aire in the pathogenesis of tissue-specific autoimmune diseases remain elusive. In order to elucidate the function of Aire, we have established transgenic mice expressing Aire. Aire-Tg which express Aire under the control of MHC-II promoter showed an ambivalent phenotype with polymyositis-like autoimmunity and resistance to type I diabetes (T1D). We have revealed that polymyositis-like autoimmunity was caused by the combination of mTECs and BM-APCs with the use of BM transfer. In contrast, T1D resistance was mediated by BM-APCs. Finally, we have discovered that over-expression of Aire in DCs resulted in the reduced numbers of Xcr1-positive DCs, that play a critical role in the development of T1D. Thus, our studies for the first time uncovered a dual role of Aire in the induction (polymyositis-like autoimmunity) and suppression of autoimmunity (development of T1D).

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 Aire 多発性筋炎 I型糖尿病 抗原提示細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、未だに原因不明の難病である。この最重要課題の突破口となる素材が、メンデル型遺伝(常染色体劣性)を示す自己免疫疾患の原因遺伝子の同定によってもたらされた。すなわち、遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 Aire は自己寛容の成立に必須の役割を担う。そのため、抗原提示細胞で Aire の発現を増強させれば、自己免疫病態を改善できる可能性がある。事実、MHC class II プロモーター下で Aire を過剰発現するトランスジェニックマウスを I 型糖尿病を自然発症する NOD 背景で作製したところ、I 型糖尿病の発症は完全に阻止された。しかしながら驚くべきことに、本トランスジェニックマウスは同時にヒトの多発性筋炎に酷似する病気も発症した。すなわち、Aire の過剰発現によって、「病気(1型糖尿病)が治る」ことと「病気(多発性筋炎)になる」ことの両方が同一個体内で観察された。この予想外の結果に端を発し、本研究課題では新たな自己免疫疾患研究へのアプローチを構築する。これまで行われてきた自己免疫疾患の研究は、「病気のなりやすさ」あるいは「病気のなりにくさ」のいずれかのメカニズムの解明を目指して行われてきたものであるのに対して、本研究課題は「病気が治る」ことと、「病気になる」という相反する現象(両価性「アンビバレンス」)の意味を読み解くことで自己免疫疾患の原因を探ろうとする試みである。

本研究課題では、Aire 遺伝子改変マウスを駆使して、胸腺における自己寛容の成立機構を明らかにし、自己免疫疾患の発症過程を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 2. 研究の目的

Aire はトレランスの成立に必須の役割をはたすことから、Aire の過剰発現によって膵臓ラ氏島を標的とする自己免疫性の I 型糖尿病を阻止できるのではないかと考え、Aire を過剰に発現するトランスジェニックマウス(Aire-Tg)を NOD(Non-obese diabetic)背景で作製した。予想した通り、Aire-Tg では I 型糖尿病の発症が完全に阻止された。その反面、大変驚くべきことに新たにヒトの多発性筋炎(Polymyositis)に類似する筋組織特異的な自己免疫病態が発生した。すなわち Aire の過剰発現により、臓器特異的自己免疫疾患の阻止(I 型糖尿病)と発生(多発性筋炎)というアンビバレンス(両価性)な現象を認めた。この予想外の結果を得て、本研究では同一個体内で Aire を基軸として発生した相反する二つのメカニズムをそれぞれ解明するとともに、両者の関係を読み解き、最終的に自己免疫疾患の鍵を握る免疫トレランス破綻の全貌解明を図ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

Aire-Tg には、Aire 発現のためのプロモーターとして MHC class II (MHC-II) を用いたので、本来 Aire を発現する胸腺髄質上皮細胞(Medullary thymic epithelial cell: mTEC)とともに、樹状細胞(DC)や B 細胞などの骨髄由来の抗原提示細胞(Bone-marrow derived antigen-presenting cell: BM-APC)でも Aire の発現を認める。そのため、Aire 発現細胞がどのようなメカニズムによって「トレランスの獲得」(I 型糖尿病の阻止)と「トレランスの破綻」(多発性筋炎)を同時に果たすかについて、以下の実験から明らかにした。

(1) Aire-Tg において I 型糖尿病阻止と多発性筋炎発症とはたらく細胞集団を骨髄移植実験(BMT)によって特定する。B 細胞の関与については B 細胞欠損マウスを併用して調べた。

#### (2) Aire-Tg 由来 BM-APC の膵臓ラ氏島由来自己抗原の抗原提示能の検討

T 細胞受容体(TCR)トランスジェニックマウス(TCR-Tg)を用いた実験から、Aire を過剰に発現する mTEC では負の選択と制御性 T 細胞(Treg)産生の両方が障害されることを見出している。一方、Aire-Tg の膵臓リンパ節においては Aire を過剰に発現する BM-APC が膵臓ラ氏島由来の自己抗原を提示していない可能性を示唆する結果を得ており、所属リンパ節である膵臓リンパ節に存在する樹状細胞が、Aire の過剰発現によって膵臓ラ氏島の自己抗原を提示できない理由を探った(その一方で、筋組織特異的な自己抗原の抗原提示は行なわれており、多発性筋炎様の自己免疫病態を示す点に注意)。

### 4. 研究成果

#### (1) Aire の過剰発現は逆説的に組織特異的自己免疫応答を誘導する

末梢血 B 細胞における huAIRE の発現を FACS によって調べたところ、ライン 2m9L、1m4L、8L の順に発現レベルが高いことが分かった。huAIRE がマウス体内で機能をもつことは、huAIRE-Tg との交配によって、Aire 欠損マウスの形質を補完できることによって確認した。すなわち、NOD 背景の Aire 欠損マウスは肺臓炎および膵臓の腺房炎によって早期の致死性を示すが、huAIRE-Tg と交配することによって、その致死性を回避することが出来た。また理由は不明であるが、Aire 欠損マウス(NOD)は I 型糖尿病に対して抵抗性を示すが、huAIRE-Tg との交配によって I 型糖尿病を発症することも確認した(ライン 2m9L を除く)。こうした遺伝学的な実験によって、huAIRE がマウス体内で機能しうることを最初に確認した。

私どもが樹立した Aire-Tg では Aire 発現のためのプロモーターとして MHC-II を用いているので、Aire の発現がもっとも強い胸腺髄質上皮細胞(mTEC)に加え、MHC-II を発現する DC や B 細胞といった骨髄由来の抗原提示細胞(BM-APC)でも Aire の発現を認めた。既に多発性筋炎様病態の発症については、mTEC と BM-APC の両方で発現する Aire が必要であることを BMT 実験によって明らかにしているが、糖尿病抵抗性を担う細胞が mTEC と BM-APC のいず

れか、あるいは両方かについて BMT 実験を行い検討した。その結果、BM-APC が発現する Aire が糖尿病の発症抑制に作用していることが明らかになった。また、B 細胞の関与については、B 細胞欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作製して BMT を行っており、その結果が待たれる。一方、TCR-Tg を用いた実験から、上記の Aire を過剰に発現する BM-APC の I 型糖尿病抵抗性獲得機能については、膵臓ラ氏島由来の自己抗原を認識する TCR-Tg の T 細胞を色素標識し、静脈内に投与して膵臓リンパ節における導入細胞の増殖状態を FACS で調べた。その結果、対照となる non-Tg の膵臓リンパ節内では膵臓リンパ節内に存在する BM-APC によって膵臓ラ氏島由来の自己抗原が提示され、それに反応して NY8.3T 細胞の増殖が観察されたが、Aire-Tg では膵臓ラ氏島抗原が提示されていないため、そのような増殖反応が見られなかった。すなわち、Aire-Tg では胸腺におけるトレランス成立機構の障害があるにもかかわらず、末梢においてはラ氏島由来の自己抗原が提示されず、I 型糖尿病を発症しない可能性が考えられた。以上のように、MHC-II 陽性細胞において huAIRE を一定以上のレベルに発現させると筋組織特異的自己免疫病態を発症することが明らかになった。すなわち、その欠損によって臓器特異的自己免疫を発症する AIRE が、過剰発現によって新たな臓器特異的自己免疫病態を誘導するというきわめて意外な（逆説的な）結果であった。

## (2) 糖尿病抵抗性獲得機構の解析

Aire はトレランスの成立に必須の役割をはたすことから、Aire の過剰発現によって膵臓ラ氏島を標的とする自己免疫性の I 型糖尿病を阻止できるのではないかと考え、Aire を過剰に発現する Aire-Tg を NOD 背景で作製したところ、上述のように Aire-Tg では I 型糖尿病の発症が完全に阻止された。その反面、大変驚くべきことに新たにヒトの多発性筋炎 (Polymyositis) に類似する筋組織特異的自己免疫病態が発生した。すなわち Aire の過剰発現により、臓器特異的自己免疫疾患の阻止 (I 型糖尿病) と発生 (多発性筋炎) というアンビバレンス (両価性) な現象を認めた。この予想外の結果を得て、本研究では同一個体内で Aire を基軸として発生した相反する二つの現象のメカニズムをそれぞれ解明する実験に取り組んだ。糖尿病抵抗性の獲得機序が Aire 発現胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) の作用によるものか、あるいは B 細胞や DC といった Aire 発現血球細胞 (骨髄由来の抗原提示細胞) によるものかを明らかにする目的で骨髄移植実験を行った。その結果、糖尿病抵抗性の獲得には、Aire 発現血球細胞の寄与が大きいことが判明した。最終的には、B 細胞欠損 Aire-Tg 骨髄細胞と NOD.scid 由来の骨髄細胞 (Aire 非発現 DC の供給源) を同時に non-Tg NOD に移植する実験を行い、Aire を過剰に発現する DC では自己免疫反応を誘導出来ないことを突き止めた。DC において Aire を過剰に発現すると Xcr1 陽性 DC の産生が低下することを Aire-Tg から採取した骨髄細胞を Flt3l で培養する実験によって明らかにした。

以上の結果をふまえ、臓器特異的自己免疫疾患の病態について考察する。樹立した Aire-Tg の中で最も Aire の発現レベルの高かった 2m9L ラインのヒト Aire 発現レベルをさらに上げるために 2m9L のホモ個体を作製したところ、驚くべきことにホモ化 2m9L 個体にはヒトの多発性筋炎と類似した自己免疫病態の発生を認めた。つまり本来、自己寛容の成立に働くべき Aire を過剰に発現させると逆説的に筋組織特異的自己免疫応答が発生した訳である。骨髄移植を用いた実験から、ホモ化 2m9L 個体における筋組織特異的自己免疫の発生には、胸腺 mTEC に発現する Aire と末梢 BM-APC に発現する Aire の両方が必要であることが分かった。これに対して、糖尿病に対する抵抗性については末梢 BM-APC のみで十分であった。一方、2m9L 個体の糖尿病抵抗性については、ヘテロ個体のみならずホモ個体の骨髄細胞も糖尿病抵抗性を付与することができた (上記の結果には示さず)。すなわち、ホモ化 2m9L 個体においては同一個体内で「筋組織特異的自己免疫の発生」と「膵ランゲルハンス細胞特異的自己免疫の抑制」という相反する現象、いわばアンビバレンス (両価性) と呼ぶべき現象が観察されたことになる。

Aire 欠損症のような臓器特異的自己免疫疾患 (organ-specific autoimmune disease) においては、一体、何が攻撃の対象となる臓器特異性 (organ specificity) を決めるかという問題は重要な研究課題である。例えば、同じ自己免疫疾患でありながら、なぜ関節リウマチでは関節滑膜が標的となり、また I 型糖尿病では膵ランゲルハンス細胞が標的となるのかという理由はよく分かっていない。この点、ホモ化 2m9L 個体では「筋組織特異的自己免疫の発生」と「膵ランゲルハンス細胞特異的自己免疫の抑制」という現象が、Aire を発現する免疫組織 (細胞) が胸腺 mTEC と末梢 BM-APC のいずれか一方か、あるいは両方であるかによって決まったのである。すなわち、本研究によって「胸腺トレランス」と「末梢性トレランス」の相互作用や、その組み合わせによっても標的臓器の種類と、「増悪」と「寛解」という異なる結果を導くことを新たに示すことができたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Minoru Matsumoto, Koichi Tsuneyama, Junko Morimoto, Kazuyoshi Hosomichi, Mitsuru Matsumoto, and Hitoshi Nishijima	4. 巻 32
2. 論文標題 Tissue-specific autoimmunity controlled by Aire in thymic and peripheral tolerance mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 117-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz066	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 Hatano S, Tun X, Noguchi N, Yue D, Yamada H, Sun X, Matsumoto M, Yoshikai Y	4. 巻 2
2. 論文標題 Development of a new monoclonal antibody specific to mouse Vg6 chain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.201900363	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 該当する
1. 著者名 Morimoto Junko, Nishikawa Yumiko, Kakimoto Takumi, Furutani Kohei, Kihara Naoki, Matsumoto Minoru, Tsuneyama Koichi, Kozono Yuko, Kozono Haruo, Hozumi Katsuto, Hosomichi Kazuyoshi, Nishijima Hitoshi, Matsumoto Mitsuru	4. 巻 201
2. 論文標題 Aire Controls in Trans the Production of Medullary Thymic Epithelial Cells Expressing Ly-6C/Ly-6G	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3244 ~ 3257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1800950	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 Hitoshi Nishijima, Tatsuya Kajimoto, Yoshiki Matsuoka, Yasuhiro Mouri, Junko Morimoto, Minoru Matsumoto, Hiroshi Kawano, Yasuhiko Nishioka, Hisanori Uehara, Keisuke Izumi, Koichi Tsuneyama, Hi-mi Okazaki, Taku Okazaki, Kazuyoshi Hosomichi, Ayako Shiraki, Makoto Shibutani, Kunitoshi Mitsumori, Mitsuru Matsumoto	4. 巻 86
2. 論文標題 Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of autoimmune regulator (AIRE)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 75-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaut.2017.09.006	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 Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama and Mitsuru Matsumoto	4. 巻 -
2. 論文標題 AIRE - The Autoimmune Regulator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9780470015902.a0027281	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8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Mitsuru Matsumoto, Junko Morimoto, Minoru Matsumoto, Koichi Tsuneyama, Ryuichiro Miyazawa, Hitoshi Nishijima
2. 発表標題 Aire-dependent establishment of self-tolerance studied by genetically modified mice
3. 学会等名 EMBO Workshop ThymE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minoru Matsumoto, Mitsuru Matsumoto
2. 発表標題 Tissue-specific autoimmunity controlled by Aire in thymic and peripheral tolerance mechanisms
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 満
2. 発表標題 胸腺におけるネオ・セルフ生成機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto M, Morimoto J, Matsumoto M, Tsuneyama K, Miyazawa R, Nishijima H
2. 発表標題 Aire-dependent establishment of self-tolerance
3. 学会等名 The 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 満
2. 発表標題 胸腺髄質上皮細胞に発現する転写調節因子Aireを用いた自己免疫病態の解析
3. 学会等名 第29回日本内分泌学会臨床内分泌代謝Update (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Naoki Kihara, Kazuyoshi Hosomichi, Hitoshi Nishijima, Mitsuru Matsumoto
2. 発表標題 Expression of Ly6C/6G defines a novel subset of medullary thymic epithelial cells
3. 学会等名 Immunology 2018 - AAI Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama and Mitsuru Matsumoto
2. 発表標題 Manipulation of thymic and peripheral tolerance by AIRE defines distinct tissue-specific autoimmunity
3. 学会等名 11th International Congress on Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuru Matsumoto
2. 発表標題 Amelioration of diabetes development in NOD by the transgenic human AIRE expression in DCs
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Minoru Matsumoto, Pedro M. Rodrigues, Laura Sousa, Koichi Tsuneyama, Mitsuru Matsumoto, Nuno L. Alves	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 31
3. 書名 Thymus Transcriptome and Cell Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学先端酵素学研究所 / 免疫病態学分野 <a href="https://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/">https://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/</a>
---

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
研究分担者	西嶋 仁  (NISHIJIMA Hitoshi)  (60425410)	徳島大学・先端酵素学研究所（次世代）・助教   (16101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	森本 純子  (MORIMOTO Junko)  (20451396)	徳島大学・先端酵素学研究所（次世代）・助教    (16101)	