

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790692

研究課題名（和文） AIRE 発現細胞株を用いた自己抗原遺伝子の異所性発現の解析

研究課題名（英文） Analysis of ectopic expression of autoantigen genes using Aire<sup>+</sup> cell lines

研究代表者

山口 良考 (YAMAGUCHI YOSHITAKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50365433

研究成果の概要：自己免疫性多腺性内分泌不全症Ⅰ型（APECED）は、AIRE 遺伝子の突然変異により発症する。その発症メカニズムを解明するため、申請者は胸腺の中にごく僅かしか存在しない AIRE を発現する細胞をマウスより株化し AIRE の役割を探求している。この Aire 発現細胞株における Aire 遺伝子の発現を強制発現によって過剰にしたり、あるいは RNAi により、ノックダウンすることに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：胸腺、免疫学的寛容、自己免疫疾患、AIRE、末梢組織特異的遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性多腺性内分泌不全症Ⅰ型（APECED）は、自己免疫疾患による内分泌臓器の障害と慢性皮膚粘膜カンジダ症を高率に合併する症候群であり、常染色体劣性遺伝の単一遺伝子疾患である。所属研究室は1997年に APECED の原因遺伝子をクローニングし AIRE (autoimmune regulator) と命名した。AIRE 遺伝子は、胸腺髄質上皮細胞や樹状細胞など免疫系組織の極めて限られたごく一部の細胞でのみ特異的に発現している。正常の胸腺髄質上皮細胞で末梢組織特異的遺伝子が異所性に発現していること、またノックアウトマウスを用いた実験から AIRE 遺

子がその異所性発現を支配しており、免疫寛容の成立に関与している事が明らかになっているが、AIRE が一群の末梢組織特異的遺伝子の異所性発現を転写段階で調節するメカニズムは全く判っていない。AIRE 遺伝子は最も発現が高い胸腺においてさえ、ごく一部の胸腺髄質上皮細胞でしか発現しておらず、胸腺全体を用いて生化学的手段により AIRE の作用機構を解析することは困難であった。

申請者は、Aire 遺伝子プロモーター DNA 断片の下流に SV40 ラージ T 抗原遺伝子（動物細胞を不死化させる特質を持つ）を融合させたトランスジーンを用いてトランスジェニックマウ

スを作製することに数年がかりで成功した。このマウスにおいては、*Aire* 遺伝子プロモーター支配下で *Aire* 遺伝子発現細胞においてのみ特異的にラージ抗原が発現し、その細胞が不死化することが期待された。実際、得られたトランスジェニックマウスにおいては、胸腺においてのみラージ抗原の発現が観察された。この胸腺由来の細胞から、ラージ抗原および *Aire* 遺伝子を発現し、同時に胸腺髄質上皮細胞のいくつかの表面マーカーを発現している *Aire* 発現細胞株（以下 *Aire*<sup>+</sup>細胞 -TEC1, TEC2株）とさらに樹状細胞のマーカーである Cd11c も発現している *Aire* 発現細胞株（以下 *Aire*<sup>+</sup>細胞 -DC株）を樹立することに成功した。

これらの *Aire*<sup>+</sup>細胞株は、*Aire* ノックアウトマウスにおいて発現の低下した末梢組織特異的遺伝子（Preproinsulin II, Fatty acid binding protein など）や APECED 患者血清中の自己抗体の標的となる末梢組織特異的抗原遺伝子（Calcium sensing receptor, Glutamic acid decarboxylase 2 など）も発現しており、正常マウス由来の未成熟な胸腺細胞と混合すると互いに結合した。さらに *Aire*<sup>+</sup>細胞に結合した全ての胸腺細胞がアポトーシスに陥っている事を突き止めた。

このように *Aire*<sup>+</sup>細胞株は、本来の胸腺髄質上皮細胞の特質を保持している事が示唆され、現在まで不可能であった胸腺内における *Aire* を発現する髄質上皮細胞内での *Aire* の生化学的解析を行うのに最も優れた研究材料である。この *Aire*<sup>+</sup>細胞株を用いる事で、胸腺髄質上皮細胞における末梢組織特異的抗原遺伝子の異所性発現に関わる *Aire* の真の機能解析が可能となった。

## 2. 研究の目的

申請者が樹立した *Aire*<sup>+</sup>細胞株を用いて胸腺髄質上皮細胞における末梢組織特異的抗原遺伝子の異所性発現に関わる *Aire* の真の機能を追究する。

*Aire*<sup>+</sup>細胞株は上述のように自己反応性胸腺細胞の除去を担う胸腺髄質上皮細胞の特質を示すため、純化された培養細胞として独創的な研究材料であり、これを有効利用してノックアウトマウス研究では知り得ない以下の事を明らかにする。

(1) AIRE 蛋白と特異的に結合する蛋白質の同定： *Aire* がどのように機能して、胸腺髄質上皮細胞における末梢組織特異的遺伝子の異所性発現制御機構に関与しているか明らかにする。

(2) AIRE が転写調節を行う遺伝子群の同定：

*Aire* がコントロールしている遺伝子群を同定する。さらにそれらの遺伝子が *Aire* によって直接的にあるいは間接的に調節を受けているか明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) AIRE 蛋白と特異的に結合する蛋白質の同定

所属研究チームでは既に AIRE 蛋白が、転写のコアクチベーター CBP (CREB 結合蛋白) と結合し、転写を活性化することを見出したが、それ以外の未知の因子については、実際に AIRE が発現して機能している胸腺髄質上皮細胞を生化学的解析に用いられるほど大量に純化することが困難であったため、解析が進んでいない (Pitkanen et al., J. Biol. Chem., 275: 16802-9, 2000)。

AIRE は核内でドット状に点在するが、染色体上の転写不活性領域の活性化に関する AIRE の機能を知るためには、AIRE と結合している蛋白質を同定することが必須である。申請者の樹立した *Aire*<sup>+</sup>細胞には、末梢組織特異的遺伝子の発現に必要なファクターはすべて揃っているため、この目的のために非常に優れた実験材料である。

*Aire*<sup>+</sup>細胞株に FLAG タグで標識した AIRE 蛋白を強制発現させた後、抗 FLAG 抗体を用い共免疫沈降を行い、AIRE 蛋白複合体を回収し、二次元電気泳動で分離した後、微量蛋白スポットを質量分析し、データベースと照合して蛋白質を同定する。データの信頼性を更に高めるため、高親和性を示す Streptavidin タグと Calmodulin タグを融合させた *Aire* 蛋白を、薬剤（テトラサイクリン）誘導型発現制御可能なレンチウイルスで全細胞に安定に発現させ、*Aire* 蛋白と相互作用を示す蛋白質を同定する。

(2) AIRE が転写調節を行う遺伝子群の同定

*Aire* ノックアウトマウスの研究より *Aire* の欠損により、胸腺髄質上皮細胞における様々な末梢組織特異的抗原遺伝子の転写レベルが低下していることが報告されている (Anderson et al., Science, 298: 1395-1401, 2002)。しかし、この報告は *Aire* が直接これらの末梢組織特異的抗原遺伝子群の転写を調節しているという証拠にはならない。

申請者が樹立した *Aire*<sup>+</sup>細胞株は胸腺髄質上皮細胞由来の純化された細胞株であり、これらの研究を行うのに優れた材料である。

RNAi の技法と薬剤選択により安定に *Aire* をノックダウンした *Aire*<sup>+low</sup> 細胞と *Aire*<sup>+</sup>細胞、*Aire* を過剰発現させた *Aire*<sup>+high</sup> 細胞における遺伝子発現を網羅的に比較解析する事で、*Aire* の制御下にある遺伝子群を同定する。

本研究においては、そのための第一段階としてマウス胸腺上皮細胞由来Aire<sup>+</sup>細胞株におけるAireの発現をロックダウンするための標的配列をAire遺伝子のエキソン5、7 (2カ所)、8、10、12、14から計7カ所選び、pENTR/H1/T0ベクターに各オリゴヌクレオチドをクローニングした。さらにH1/T0 pol III プロモーター+各標的配列オリゴヌクレオチドのDNA断片を、Blasticidin 耐性遺伝子をもつ pLenti6/Block-iT DEST ベクターに Gatewayテクノロジーにてサブクローニングした。これらのプラスミドDNAをAire<sup>+</sup>細胞に形質転換させた後、プラスミドが安定に導入されたAire<sup>+</sup>細胞を約9日間で選択するためのBlasticidin 最適培養条件を求めた。薬剤選択されたAire<sup>+</sup>細胞において、どの標的配列が高いAireロックダウン効率を示すかをリアルタイムRT-PCR法により比較解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) AIRE 蛋白と特異的に結合する蛋白質の同定

細胞内で Aire 蛋白と結合している未知蛋白質を共免疫沈降法で解析するためにマウス Aire 発現プラスミドを作成した。マウス胸腺由来の Total RNA を用いて 1st cDNA 合成を行い、RT-PCR 法により増幅した Aire のコーディング領域を含む PCR 産物を p3xFLAG-CMV-7.1 ベクターにクローニングし、N 末端側に FLAG タグが融合された Aire 蛋白を発現するプラスミドを構築した (p3xFLAG/N-Aire)。また、N 末端側に Streptavidin タグと Calmodulin タグを融合した Aire 蛋白を発現するプラスミド pNTAP-B/Aire も構築した。Aire<sup>+</sup>細胞に p3xFLAG/N-Aire を形質転換し、約 7 割の細胞に Aire が強制発現される形質転換試薬 (FuGENE6、Roche) と最適条件を求めた。このようにして得られた Aire<sup>+/high</sup> 細胞における Aire mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。Aire<sup>+/high</sup> 細胞-TEC1、DC において各々通常の Aire<sup>+</sup>細胞-TEC1、DC の 849 倍、102 倍の Aire mRNA が発現していた (図 1、Aire<sup>+/high</sup> 細胞)。さらにウェスタンブロッティング法と免疫細胞化学染色法により、作成した抗マウス Aire 抗体が Aire 蛋白を検出している事を確認した。現在、共免疫沈降により Aire 蛋白複合体を回収するための細胞溶解や抗体反応の最適条件を検討中である。

##### (2) AIREが転写調節を行う遺伝子群の同定 マウス胸腺上皮細胞由来 Aire<sup>+</sup>細胞株における Aire の発現をロックダウンす

るために Aire 遺伝子のエキソン 5、7 (2カ所)、8、10、12、14 上に 7 つの標的配列を設定し、それぞれを導入した Aire<sup>+</sup>細胞-TEC1、DC における Aire 遺伝子の発現を、リアルタイム RT-PCR 法により比較解析した結果、エキソン 12 上の標的配列でそれぞれ 57 分の 1 と 357 分の 1 と大幅に Aire 遺伝子の発現が抑制されており、高いロックダウン効率を示した (図 1、Aire<sup>+/low</sup> 細胞)。

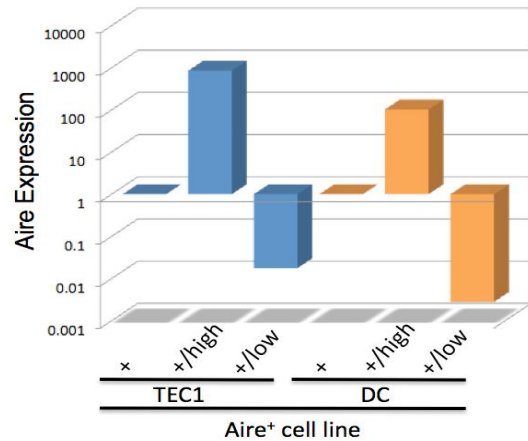


図1 Aire発現量

Aire<sup>+</sup>細胞と Aire を過剰発現させた Aire<sup>+/high</sup> 細胞、Aire をロックダウンした Aire<sup>+/low</sup> 細胞間における複数の末梢組織特異的遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により比較解析した。

今後は、Aire の標的遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に同定する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 山口良考、工藤 純、自己免疫調節遺伝子 AIRE、ホルモンと臨床、56:169-175、2008 年、(査読無し)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yoshitaka Yamaguchi, Autoimmune Regulator (AIRE) Expressing Thymic Epithelial Cell Lines: Use for Analysis of Ectopic Gene Expression in Thymus, Expert Workshop on the Biology of Chromosome 21 Genes: Towards Gene phenotype Correlations in Down Syndrome, 2007 年 9 月 28 日~10 月 1 日, ワシントン DC

2.山口良考、AIRE 発現胸腺上皮細胞株を用いた自己抗原遺伝子の異所性発現の解析、BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)、2007年12月11日~15日、横浜

3. 葦島伸生、視細胞特異的遺伝子プロモーターとSV40 *LargeT* 抗原遺伝子を用いた不死化培養細胞株樹立の試み、第15回日本遺伝子診療学会、2008年7月31日~8月2日、仙台

〔その他〕

慶應義塾大学 グローバル COE プログラム  
「In vivo ヒト代謝システム生物学拠点」ホームページ

<http://www.gcoe-metabo.keio.ac.jp/member/programmembers.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山口 良考 (YAMAGUCHI YOSHITAKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50365433

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし