

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03507

研究課題名（和文）自己免疫寛容に関わる新規因子の生理的意義とその作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of a new factor involved in immune tolerance

研究代表者

吉田 英行 (Yoshida, Hideyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80800523

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：胸腺上皮細胞において発現が特異的に低下するRNA結合タンパク質Zfp3611(zinc finger protein 36, C3H type-like 1)および Zfp3612に注目し、遺伝子改変マウスを用いつつその生理的意義とメカニズムの解析を行った。これらマウスでは複数の組織において自己免疫様の変化が観察され、これらの遺伝子発現の低下が自己免疫寛容の形成に必要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫システムは多種多様な病原微生物に反応する一方、自己の成分には反応しない特性を備え、「自己免疫寛容」とよばれる状態が形成される。自己免疫寛容の異常は自己免疫疾患を惹起すると考えられ、そのメカニズムの解明は免疫学の重要な課題となっている。本研究ではこれまで注目されていなかった因子に焦点を当てつつ解析を行い、新しい知見を得ることができた。この知見は自己免疫疾患の病態の理解や新規治療方法の確立に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we have focused on Zfp3611 (zinc finger protein 36, C3H type-like 1) and Zfp3612, RNA-binding proteins whose expression is specifically reduced in the mature thymic epithelial cells. We have employed genetically modified mice to examine their physiological significance and elucidate the mechanisms involved. Autoimmune-like changes were observed in multiple tissues in these mice, underscoring the necessity of these genes' reduced expression for the formation of immune tolerance. This has led to a clearer understanding of their critical role in the maintenance of immune homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは多種多様な病原微生物に反応する一方、自己の成分へは反応しない。この自己に対する不反応は自己免疫寛容とよばれ、そのメカニズムとして胸腺内での自己反応性リンパ球の負の選択と、末梢組織での制御性 T 細胞 (Treg 細胞) による末梢性免疫寛容が重要である。胸腺で増殖、分化成熟する未熟 T 細胞のうち、胸腺上皮細胞が提示する自己抗原ペプチドと MHC 分子との複合体を非常に強く認識した細胞はアポトーシスにより除去 (負の選択) され、比較的強く認識した細胞は制御性 T 細胞 (Treg 細胞) へと誘導される。胸腺上皮細胞では、例えば、膵臓特異的に発現するインスリンや皮膚特異的なケラチンといった末梢組織特異的抗原 (PTA, peripheral Tissue-specific Antigen) も発現しており、負の選択や Treg 細胞への誘導は自己を構成する幅広い成分に対して実行される。

これら PTA を胸腺上皮細胞で発現させる因子として、AIRE (autoimmune regulator) や FEZF2 (forebrain embryonic zinc finger 2) といった転写因子が知られている。しかしながら、約 40% の PTA の発現はこのどちらにも依存せず、PTA 発現メカニズムの全容解明にはいたっていない。また、負の選択や Treg 細胞への誘導における胸腺上皮細胞の機能として、PTA 発現は重要な側面であると考えられるが、それ以外の機能については不明な部分が多く残っている。

2. 研究の目的

私は各種データベースを用い、バイオインフォマティクスを活用した in-silico スクリーニングを行い、PTA 発現を含む胸腺上皮細胞の機能に関わる候補遺伝子として Zfp3611 (zinc finger protein 36, C3H type-like 1) および Zfp3612 を同定していた。これらホモログは冗長な機能を持つと考えられているが、胸腺上皮細胞では分化に伴い両者とも発現が低下し、またデータベースの検索では、両者ともに低い発現パターンは胸腺上皮細胞に特異的であった。

Zfp3611 および Zfp3612 は RNA 結合タンパク質であり、mRNA を分解に導くことが知られている。したがって、その発現低下はターゲット RNA の安定化につながり、胸腺上皮細胞で負の選択に必要な PTA 発現の増強や、胸腺上皮細胞の他の機能の制御に働く可能性が考えられた。そこで本研究では、胸腺上皮細胞における Zfp3611 および Zfp3612 の発現低下の生理的意義とそのメカニズムを自己免疫寛容の側面から明らかにすることを目的とした

3. 研究の方法

細胞株を用いた研究では自己免疫寛容の解析は困難であるため、マウスモデルを用いた解析が必要と考えられた。そこで、ES 細胞を用いた相同組み換えにより、ROSA26 領域へ CAG-loxP-STOP-loxP-Zfp3611、もしくは Zfp3612 の DNA 断片が組み込まれたマウスを作成し、ジャクソン研究所より入手した Foxn1-Cre マウスと交配することで、胸腺上皮細胞特異的に Zfp3611 もしくは Zfp3612 が外来性に発現するマウスを樹立した (以降 Zfp3611-Tg マウス、Zfp3612-Tg マウスと表記)。このマウスを活用することで、(1) 自己免疫様の表現型の解析、(2) フローサイトメーター (FACS) を用いた免疫細胞の解析、(3) 1 細胞遺伝子発現解析 (scRNA-seq) を含む遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

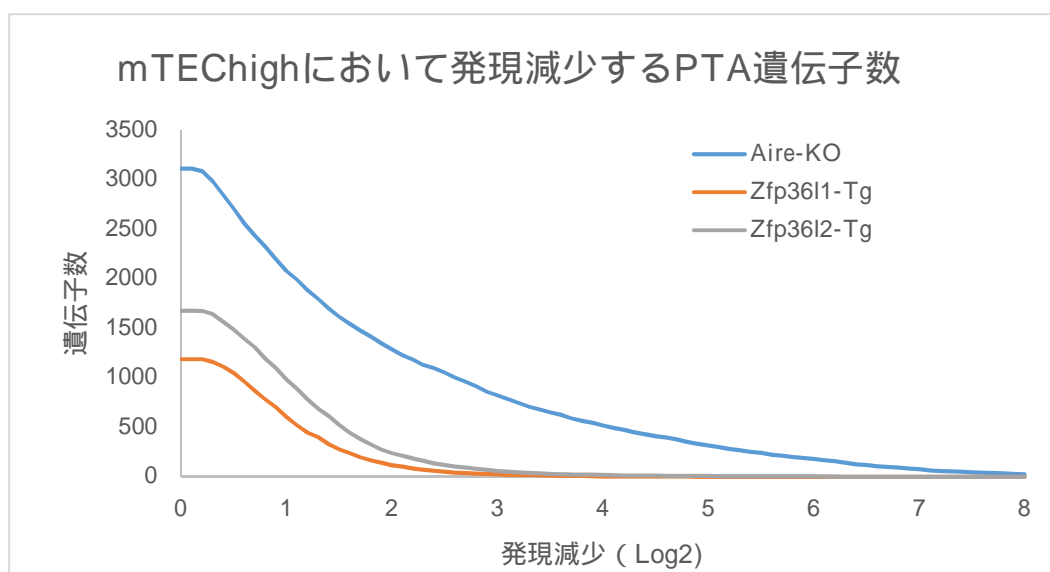
胸腺上皮細胞は MHC-II 発現の低いポピュレーション (mTEC^{low}) から高いポピュレーション (mTEC^{high}) へと分化・成熟し、それに伴い Zfp3611、Zfp3612 の発現が低下する。一方、Zfp3611-Tg マウスおよび Zfp3612-Tg マウスでは mTEC^{high} においても mTEC^{low} と同程度の発現が維持され、Zfp3611 および Zfp3612 の発現低下の生理的意義を解析する上で適切なモデルマウスとなった。そこで、これらマウスを用いて以下の知見を得た。

(1) 自己免疫の表現型は遺伝的系統 (バックグラウンド) に左右されることより、B6 と NOD バックグラウンドへの戻し交配を行い、表現型解析を行った。B6 は自己免疫に比較的耐性であり、NOD は感受性が高いことが知られるが、どちらのバックグラウンドにおいても、複数の臓器に対する自己抗体やリンパ球浸潤が観察され、胸腺上皮細胞における Zfp3611 と Zfp3612 両者の発現低下が自己免疫寛容の成立に重要なことが明らかとなった。特に NOD バックグラウンドでは、マウス個体の生存期間が 10 週齢 ~ 20 週齢と顕著に短くなった。これらマウスでは心筋炎が観察され、本遺伝子改変マウスは自己免疫性心筋炎のモデルとしても有用である可能性が示唆された。

B6 バックグラウンドにおいて胸腺を詳細に調べたところ、Zfp3611-Tg マウスおよび Zfp3612-Tg マウスともに CD45+CD4+CD8-CD73-CD25+Foxp3+として検出される胸腺内 Treg 数が約半数に減少し、その前駆細胞 (CD45+CD4+CD8-CD73-CD25-Foxp3lo) も有意に減少していた。また、免疫染色により胸腺切片を調べたところ、Zfp3611-Tg マウスでは胸腺髄質において活性型カスパーゼ (caspase)3 陽性の細胞が顕著に減少し、負の選択が阻害されていることが示唆された。これらのことより、これらマウスモデルでは負の選択と Treg の分化がともに阻害され、自己免疫様の表現型を呈するものと考えられた。

(2) FACS による免疫細胞の解析では、CD4SP (single-positive), CD8SP 細胞分化における異常は観察されなかったが、胸腺内樹状細胞 (dendritic cells: DC) の減少が観察された。さらに詳細に調べたところ、pDC (plasmacytoid DC) と conventional DC2 (cDC2) の細胞数が有意に減少するものの、cDC1 の細胞数には有意な変化が認められなかった。後述するように、これらの変化は胸腺上皮細胞での Zfp3611、Zfp3612 の発現減少阻害に伴う二次的な変化と考えられ、胸腺上皮細胞が胸腺内微小環境の制御を介し、自己反応性 T 細胞の負の選択や Treg 細胞の誘導をコントロールしていることが示唆された。

(3) Zfp3611 マウス、Zfp3612 マウスの mTEChigh を用いた遺伝発現解析 (RNA-seq) では、発現量が有意に低下する遺伝子 (Fold-change < 0.5 & FDR < 0.05) に PTA 遺伝子が多く含まれ、Zfp3611、Zfp3612 の発現低下が mTEChigh における PTA 遺伝子の発現に関与すると考えられた。また、この発現低下は CCR4-NOT 複合体の構成因子である CNOT1 遺伝子改変マウスとの掛け合わせにより阻害され、RNA 分解の系を介した遺伝子発現制御であると考えられた。mRNA の安定化による PTA 遺伝子発現の増強というメカニズムは従来知られておらず、PTA 遺伝子発現のコントロールについて重要な知見となった。



一方、これら PTA 遺伝子発現の減弱の程度は AireKO マウスで観察されるほど小さくなく、発現は減弱するものの消失するほどではなかった (上図; RNA-seq により mTEChigh における PTA 遺伝子発現の変化を解析。有意 (FDR < 0.05) に発現低下した PTA 遺伝子について、発現減少の程度を横軸に遺伝子数を縦軸にプロット)。そのため、PTA 遺伝子発現の減弱そのものが自己免疫寛容の破綻につながっている可能性は低いと考えられた。そこで、これら RNA-seq のデータを基に PTA 遺伝子発現以外の変化を調べたところケモカイン、サイトカイン遺伝子の顕著な発現低下が認められた。これらには DC の胸腺への遊走に重要と考えられる Ccl8, Ccl20, Ccl25 等が含まれ、その結果、胸腺内 DC ポピュレーションの変化が起こっていると推測された。この結果は胸腺上皮細胞の PTA 遺伝子発現以外の機能が自己免疫寛容に重要であることを示唆するものであった。

通常、遺伝子は特定の機能を持ち、発現することで多種多様な機能を発揮する。胸腺上皮細胞において、発現が低下することで胸腺上皮細胞の機能に寄与する Zfp3611, Zfp3612 は大変興味深いメカニズムであると考えられた。また、従来、胸腺上皮細胞の機能としては PTA 発現を中心に考えられてきているが、それ以外の機能の重要性を示す本研究の結果は自己免疫寛容のメカニズムを解明する上で意義深いものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田英行
2. 発表標題 mTECs, peripheral tissue-specific antigens, and beyond
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------