

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790321

研究課題名（和文） 遺伝性自己免疫疾患のエピジェネティクス

研究課題名（英文） Epigenetic approach to the elucidation of the molecular pathogenesis of autoimmune disease

研究代表者

矢野 雅司（YANO MASASHI）

徳島大学・疾患酵素学研究センター・技術員

研究者番号：10531858

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患は原因不明の難病である。免疫学的自己を発現する胸腺上皮細胞において膨大な数の自己抗原遺伝子の発現を制御する *AIRE* 遺伝子の発見から、その病態解明に大きな進展が得られると期待されている。本研究課題では *AIRE* 遺伝子による自己抗原遺伝子の発現制御機構をエピジェネティックな視点から解明し、新たな視点からの病態理解を目指した。その過程で、*AIRE* 遺伝子が ES 細胞に発現していることを見出したので、本課題では ES 細胞を研究対象として、*AIRE* 発現機構のエピジェネティクスに取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：Autoimmune disease is still intractable with unknown mechanisms for the disease. Because *AIRE* gene has been demonstrated to regulate a large battery of tissue-restricted antigen (TRA) genes from medullary thymic epithelial cells (mTECs), there is a good hope that elucidating the roles of *AIRE* would reveal the molecular pathogenesis of autoimmune disease. In this study, we have tried to understand the molecular mechanisms underlying the expression of TRA genes regulated by *AIRE* from mTECs from an epigenetic viewpoint. Especially, we have focused on the function of *AIRE* in ES cells, since we have discovered its expression in this unique cell-type.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：自己寛容、胸腺、*AIRE*

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の基本的メカニズムである自己・非自己の識別機構破綻の解明は、免疫学における最重要課題である。しかしながら、I型糖尿病、リウマチといった罹患頻度の高い自己免疫疾患のほとんどは、様々な環境要因ならびに多数の遺伝子が関与する多因子疾患であるため、その病態を分子レベルで解

明することは非常に困難である。この難題に対して、フィンランドをはじめとする北欧に多数の疾患家系が存在する自己免疫性多腺性内分泌疾患I型（autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: APECED）の原因遺伝子として同定された *AIRE* (autoimmune regulator) が重要な手がかりになると期待されている。す

なわち、AIRE 欠損症では、わずか1 遺伝子の異常により、種々の内分泌臓器を標的とする自己免疫疾患が例外なく引き起こされる。この点は、主要組織適合抗原 (HLA)、性などの様々な要因が複雑に絡み合って発症すると考えられる他の多くの自己免疫疾患と一線を画する。しかも、AIRE の発現は成熟過程にある T 細胞との直接の接触によって自己寛容 (self-tolerance) の成立機構に関わる胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell : mTEC) でもっとも強いことから、AIRE の機能異常に基づく疾患病態の解明により、自己免疫疾患についての基本概念および原理を一挙に検証することができる。

胸腺上皮細胞における AIRE の欠損が、一体、どのようなメカニズムによって自己免疫疾患を引き起こすのかについて、現在活発な研究が展開されている。AIRE が発現する mTEC では、自己のゲノム由来するプロテオームが網羅的に自己抗原として提示され、それによって自己抗原と反応する T 細胞がアポトーシスによって除去される (負の選択 : negative selection)。ところが、自己免疫疾患においては何らかの障害により自己反応性 T 細胞の除去が不完全となり、免疫細胞が自己の組織を攻撃し、発病に至る。AIRE 欠損マウスを用いた研究から、AIRE は mTEC における自己抗原の発現機構を制御していると考えられている。すなわち、AIRE 欠損マウスおよび対照マウスの mTEC から調製した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、AIRE 欠損マウスの mTEC では、I 型糖尿病において膵臓ランゲルハンス島破壊の標的分子となる insulin や AIRE 欠損患者の血清中に高頻度に検出される自己抗体の対応抗原である副腎皮質 P450 cytochrome の発現低下が認められた (Science 298: 1395, 2002)。この実験結果から AIRE は未知のメカニズムによって mTEC における自己抗原、とりわけ病変が特定の臓器に限局して起こる臓器特異的自己免疫の標的分子となる組織特異抗原 (tissue-restricted self-antigen: TRA) の発現を制御しており、AIRE の機能欠損にともなう自己抗原の発現低下が自己反応性 T 細胞の残存を許してしまうものと推察される。したがって、AIRE が一体、どのようなメカニズムで膨大な数の組織特異抗原遺伝子の発現をコントロールしているかを解明することがきわめて重要である。ここで興味深いのは、AIRE 欠損マウスの mTEC で発現が低下する遺伝子はゲノム上でクラスターを形成して存在することである (PNAS 102: 7233, 2005; J. Exp. Med. 202: 33, 2005)。すなわち、AIRE は mTEC 内で染色体ドメインレベルで組織特異抗原の発現を制御していることが示唆される。

AIRE 研究において最も重要な解析モデル

になると考えられる AIRE 欠損マウスを作製し、予想通り種々の内分泌臓器でリンパ球浸潤を主体とする自己免疫病態を観察した (J. Immunol. 174: 1862-1870, 2005; J. Clin. Invest. 116: 1292, 2006)。

以上の知見に基づいて、本研究では AIRE がどのように組織特異抗原遺伝子の発現を制御しているかについて、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構に焦点を絞って研究を行うこととした。

2. 研究の目的

調和のとれた個体発生や細胞分化のための時期特異的・組織特異的遺伝子発現制御機構に DNA メチル化やヒストン修飾をはじめとするエピジェネティックな調節機構が大きな役割をはたしていることが近年明らかになりつつある。本研究課題では、AIRE 遺伝子による自己抗原遺伝子の発現制御機構をエピジェネティックな視点から解明し、新しい疾患理念の確立を目指す。

3. 研究の方法

AIRE 遺伝子の発現制御下に蛍光分子マーカー GFP を発現する AIRE/GFP ノックインマウス (AIRE/GFP-KI) を作製し、AIRE/GFP-KI (+/gfp) および AIRE/GFP-KI (gfp/gfp) の GFP 陽性細胞を免疫組織染色によって同定したところ、AIRE/GFP-KI (gfp/gfp) の GFP 発現細胞は形態変化と分布異常を認めた。このことから、AIRE が胸腺上皮細胞の分化やその細胞構築化に対しても重要なはたらきを持つことが明らかになった。この点をより明確する目的で AIRE 発現細胞の系譜を解析できる fate-mapping の実験系の構築を進めたところ、意外にも AIRE が初期胚にも発現していることを見出した。すなわち、AIRE は発生初期と mTEC という二相性発現を示すことが明らかになった。初期胚における AIRE 発現の意義、およびその発現制御機構を解析する目的で、AIRE/GFP-KI (+/gfp) および AIRE/GFP-KI (gfp/gfp) の両者から ES 細胞を樹立した。

4. 研究成果

(1) AIRE/GFP-KI (+/gfp) および AIRE/GFP-KI (gfp/gfp) の両者の胚盤胞の内部細胞塊 (inner cell mass) から ES 細胞を樹立した。いずれの ES 細胞でも GFP の発現を認め、AIRE が ES 細胞においても発現していることが明確になった。興味深いことに、AIRE/GFP-KI (+/gfp) および AIRE/GFP-KI (gfp/gfp) 由来の ES 細胞のいずれの場合にも GFP 発現集団と GFP 陰性集団とが混在し、AIRE の発現が確率論的 (stochastic) もしくは振動性 (oscillation) をもつことが示唆された (図 1)。

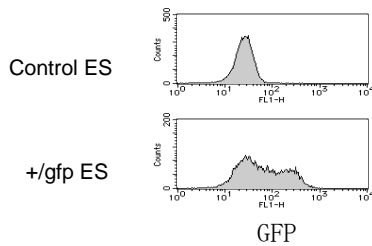
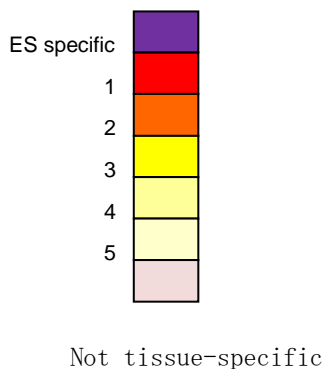


図 1

(2) 次に、これらの ES 細胞を用いて、AIRE 発現機構のエピジェネティクスに取り組むことにした。すなわち、AIRE/GFP-KI (+/gfp) および AIRE/GFP-KI (gfp/gfp) 由来の ES 細胞から GFP 発現集団を sorting し、AIRE 保有 (+/gfp) ES 細胞と AIRE 欠損 (gfp/gfp) ES 細胞の遺伝子発現プロファイルを micro array 法を用いて解析した。AIRE 欠損 ES 細胞と比較し、AIRE 保有 ES 細胞で 2.5 倍以上の発現上昇を認める 121 遺伝子を同定した。mTEC における AIRE 依存性は TRA 遺伝子で優位に観察されているが、ES 細胞において AIRE 依存性を示した TRA 遺伝子の割合は、約 50%であった (図 2)。



(注) 図 2 では、ES 細胞特異的遺伝子 (ES specific) に加え、発現組織の数を 1 から 5 で表記し、それぞれ対応する色で割合を示した。5 個以上の組織で発現されている遺伝子については、臓器非特異的 (Not tissue-specific) と分類した。

さらに、121 遺伝子について、既に mTEC で報告されている AIRE 依存性を個別に確認したところ、17 遺伝子 (14.0%) のみで ES 細胞、mTEC の両方で AIRE 依存性が観察された。すなわち、AIRE 依存性には細胞特異性が存在していた (図 3)。

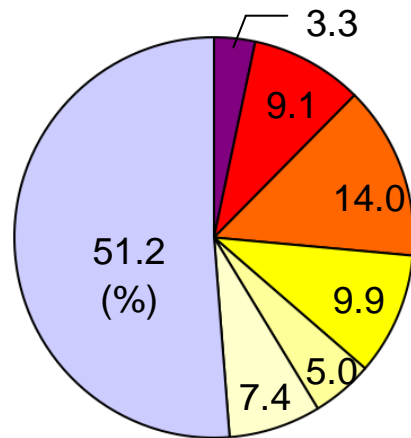


図 2

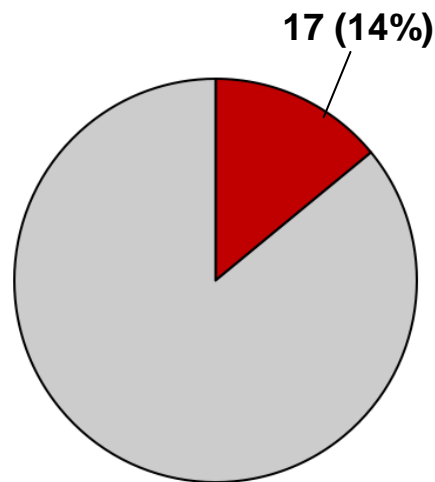


図 3

参照データ

GEO accession: Series GSE8563

Venanzi ES et.al J. Immunol. 179: 5693, 2007.

(3)最後に、AIRE 遺伝子はエピジェネティクスに深く関与すると考えられる Dnmt31 遺伝子のすぐ近傍に位置しているため、その遺伝子発現制御が Dnmt31 遺伝子のそれとリンクしているか否かを AIRE 保有 (+/gfp) ES 細胞と AIRE 欠損 (gfp/gfp) ES 細胞の両者について GFP 発現集団 (AIRE 発現集団) と GFP 非発現集団 (AIRE 非発現集団) を sorting し、real-time PCR 法によって定量した (図 4)。その結果、AIRE の有無に関わらず、AIRE の発現パターンに一致して、Dnmt31 遺伝子の発現が認められた。このことから、AIRE 遺伝子と Dnmt31 遺伝子の間には、遺伝子発現制御

における強い連関の存在が示唆された。

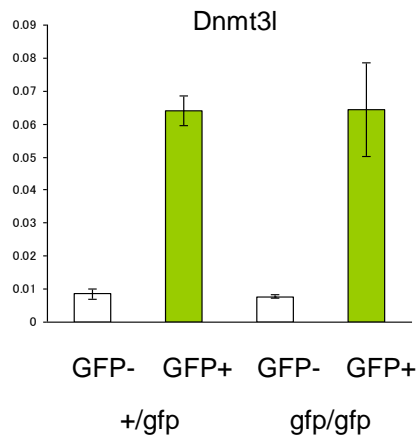


図 4

他方、cell free の実験系からは、AIRE の PHD domain が H3K4me0 に選択的に結合することが報告されているが、細胞種ごとに観察される AIRE 依存性の違いが、この点とどのように結び付くかについて引き続き検討が必要である。

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 2 件)

1. Mouri Y, Yano M, Shinzawa M, Shimo Y, Hirota F, Nishikawa Y, Nii T, Kiyonari H, Abe T, Uehara H, Izumi K, Tamada K, Chen L, Penninger JM, Inoue J, Akiyama T and Matsumoto M.

Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma.

J. Immunol. (査読あり) 186: 5047-5057, 2011.

2. Nishikawa Y, Hirota F, Yano M, Kitajima H, Miyazaki J-i, Kawamoto H, Mouri Y and Matsumoto M.

Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells prior to end-stage terminal differentiation.

J. Exp. Med. (査読あり) 207: 963-971, 2010.

[学会発表] (計 2 件)

1. 西川裕美子、廣田史子、矢野雅司、毛利安宏、松本 満

Aire は初期胚と終末分化初期にある胸腺髄質上皮細胞との 2 相性発現を示す

第 9 回四国免疫フォーラム

2010 年 6 月 19 日

愛媛大学医学部、愛媛県東温市

2. Mouri Y, Yano M, and Matsumoto M. Roles of NIK in thymic epithelial cells for the establishment of central tolerance.

12th International TNF Conference

2009 年 4 月 26 日

San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain.

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 雅司 (YANO MASASHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・技術員

研究者番号 : 1 0 5 3 1 8 5 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :