

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791093

研究課題名(和文) Aireによる天疱瘡標的抗原に対する免疫寛容機序の解明

研究課題名(英文) Aire-mediated mechanism of tolerance against Dsg3, the autoantigen in pemphigus vulgaris

研究代表者

和田 直子 (WADA NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：50306776

研究成果の概要(和文):

転写因子 Aire は多くの臓器特異的自己抗原の胸腺内発現を促進し、それらの抗原は自己反応性 T 細胞の胸腺内除去に寄与することが近年明らかとなった。我々は天疱瘡抗原 Dsg3 が野生型マウス胸腺髄質上皮細胞に Aire 依存性に発現すること、Aire 非存在下で産生された T 細胞が Dsg3^{-/-} マウス B 細胞に抗 Dsg3 抗体産生を誘導しうることを示した。Aire による胸腺内 Dsg3 発現が Dsg3 に対する免疫寛容に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文):

The transcription factor Aire promotes the expression of a wide range of peripheral organ-specific antigens in the thymus, which will serve as self antigens in negative selection. We demonstrated desmoglein 3 (Dsg3), the autoantigen in pemphigus vulgaris, expressed in mouse thymus dependent on Aire. Aire^{-/-} T cells, but not Aire^{+/-} T cells, induced low levels of anti-Dsg3 IgG production when transferred with Dsg3^{-/-} B cells in Rag2^{-/-} recipient mice. These findings suggest that Aire plays a role in tolerance against Dsg3 through the selection of T cells in thymus.

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
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：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：Aire 天疱瘡 免疫寛容 胸腺

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Aire(Autoimmune regulator) はヒトの遺伝性自己免疫疾患である APECED (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy) の責任遺伝子として発見された。その後のマウスを用いた実験により、Aire は胸腺髄質上皮細胞において多くの末梢抗原の発現を促進し、それらの末梢抗原は negative selection の際に胸腺内で提示される自己抗原として自己反

応性 T 細胞の除去に寄与することが示された。このことは、これまで臓器特異的に存在すると考えられてきた高度に分化した自己抗原に対しても胸腺が関与する中枢性免疫寛容機序が存在することを示唆した。

天疱瘡は皮膚粘膜デスモゾームの構成タンパク、デスモグレイン 3 (Dsg3) を標的とする臓器特異的自己免疫疾患である。その病態について抗 Dsg3 抗体と抗原の結合が直接的に細胞接着を障害し皮膚粘膜に水疱を誘導

することが証明されているが抗 Dsg3 抗体産生に至る機序は不明で、Dsg3 に対する免疫寛容における胸腺の役割も未だ示されていない。これまでに我々は野生型マウス胸腺において少数の髄質上皮細胞に Dsg3 が発現していることを示した。また Aire 遺伝子欠損マウスの胸腺 Dsg3 発現が著明に抑制されていたことから、胸腺 Dsg3 発現は Aire 依存性であることが示唆された。

2. 研究の目的

転写因子 Aire により胸腺内に発現する Dsg3 は、胸腺におけるネガティブセレクションの際に自己抗原として提示され、Dsg3 反応性 T 細胞の胸腺内除去に寄与しているのではないかと推測した。言い換えれば、Aire^{-/-}マウスでは胸腺 Dsg3 発現が抑制される結果、ある程度の Dsg3 反応性 T 細胞が胸腺内除去をのがれて末梢に出現しており、Dsg3 に対する免疫寛容が完全には保たれていない可能性がある。

Aire^{-/-}マウスを用いた実験により、Dsg3 に対する免疫寛容機序に Aire が果たす役割を追究することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) Aire^{+/+}、Aire^{+/-}、Aire^{-/-}マウス胸腺における Dsg3 発現細胞の定量的比較

同腹の Aire^{+/+}、Aire^{+/-}、Aire^{-/-}マウス胸腺を採取し、免疫組織化学染色により Dsg3 発現細胞を検出した。胸腺組織切片同一面積当たりの Dsg3 陽性細胞数を数え、Aire の有無に伴う胸腺 Dsg3 発現の変化を定量的に比較した。

(2) Aire^{-/-}マウスに Dsg3 に対する自己免疫反応を誘起する試み

Aire^{-/-}マウスは唾液腺、膵臓、卵巣など多臓器に自己免疫性反応を自然発症するが天疱瘡発症はこれまでに報告されていない。我々も Aire^{-/-}マウスを長期間飼育し観察したが天疱瘡様症状は認めなかった。Aire^{-/-}マウスにおける Dsg3 に対する免疫寛容が無症候性のレベルでわずかに破綻している可能性を考え、以下の方法で Aire^{-/-}マウスの Dsg3 に対する反応を増強させることを試みた。

Aire^{-/-}マウスの Dsg3 による強制免疫

バキュロウイルスにより発現させたマウス組み換え Dsg3 タンパクをアジュバントと共に Aire^{-/-}マウスおよび Dsg3^{-/-}マウスに繰り返し皮下注した。この方法は Dsg3^{-/-}マウス血清中に抗 Dsg3 抗体を誘導することがわかっている。Dsg3 で免疫したマウスの外観の観

察、体重測定、血清中抗 Dsg3 抗体価測定を行った。

Dsg3 で免疫した Aire^{-/-}マウス脾細胞の Rag2^{-/-}マウスへの移入

リンパ球を持たない Rag2^{-/-}マウス体内へ移入することによってドナーのリンパ球は大きく増数する。Aire^{-/-}マウスの全リンパ球のうち Dsg3 反応性リンパ球の頻度は小さく少数であることが予想されるが Rag2^{-/-}マウスへ移入することで Dsg3 反応性リンパ球が増数し、レシピエントマウス内で Dsg3 に対する反応が顕性化する可能性があると考えた。

(3) Aire^{-/-}マウス T 細胞と Aire^{+/+}マウス T 細胞の Dsg3 に対する反応の比較

Aire は主に胸腺髄質上皮細胞で発現しており、T 細胞のネガティブセレクションを介して免疫寛容機序に関わると考えられている。Aire の有無によって胸腺内で Dsg3 反応性 T 細胞が受けたネガティブセレクションに差があるかどうかを調べるために、Aire^{-/-}マウス T 細胞と Aire^{+/+}マウス T 細胞の Dsg3 に対する反応を比較した。

T 細胞 proliferation assay

Aire^{-/-}マウスおよび Aire^{+/+}マウスの脾細胞から磁気ビーズを用いて T 細胞を分離、in vitro で抗原提示細胞と共に Dsg3 タンパクを負荷、T 細胞の増殖をトリチウムの取り込みにより測定した。

Aire^{-/-}マウス T 細胞の Dsg3^{-/-}マウス B 細胞への抗 Dsg3 抗体産生誘導能の検証

Dsg3 で免疫した Dsg3^{-/-}マウス T 細胞を Dsg3^{-/-}マウス B 細胞と共に Rag2^{-/-}マウスに移入するとレシピエントマウス血清中に抗 Dsg3 抗体を認めることから、Dsg3^{-/-}マウス T 細胞は Dsg3^{-/-}マウス B 細胞に対しヘルパー活性を有し抗 Dsg3 抗体産生を誘導することがわかる。Aire^{-/-}マウス T 細胞と Aire^{+/+}マウス T 細胞の Dsg3^{-/-}マウス B 細胞に対するヘルパー活性を移入実験により調べた。

Aire^{-/-}、Aire^{+/+}、Dsg3^{-/-}マウス脾細胞から T 細胞を、Dsg3^{-/-}マウスから B 細胞を磁気ビーズを用いて分離する。各 T 細胞と Dsg3^{-/-} B 細胞と共に Rag2^{-/-}マウスに移入、レシピエントマウスの観察、抗 Dsg3 抗体測定を行った。

4. 研究成果

(1) 胸腺 Dsg3 発現は Aire に依存する。

Aire^{+/+}、Aire^{+/-}、Aire^{-/-}マウス胸腺の免疫組織化学染色の結果から、Dsg3 陽性細胞は Aire^{-/-}マウス胸腺にはほとんど認められず、胸腺 Dsg3 発現が Aire に依存することが強く示唆された (図 1)。

ち Dsg3 反応性 T 細胞の頻度が小さすぎるためにこの方法では差を検出できない可能性がある。今後は近年作製された Dsg3 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスを用い、同マウスから Aire^{-/-}、Aire^{+/+}マウスに骨髓移植することによって Dsg3 反応性 T 細胞の分画を増やした状態で proliferation assay を行うことを計画している。

Aire^{-/-}マウス T 細胞は Dsg3^{-/-}マウス B 細胞に抗 Dsg3 抗体産生を誘導できる。

Dsg3^{-/-} T 細胞 + Dsg3^{-/-} B 細胞を移入した Rag2^{-/-}マウスには予想どおり天疱瘡の表現型；皮膚粘膜びらん、体重減少、抗 Dsg3 IgG 抗体産生が観察された。Aire^{-/-} T 細胞 + Dsg3^{-/-} B 細胞移入群では皮膚粘膜びらんや体重減少は認めなかったが、血清中抗 Dsg3 IgG 抗体が軽度ながら検出された(図3)。Aire^{+/+} T 細胞 + Dsg3^{-/-} B 細胞移入群および Dsg3^{-/-} B 細胞のみの移入群では抗 Dsg3 IgG 抗体産生を含めすべての天疱瘡表現型を認めなかった。これらの結果から Aire^{-/-}マウス T 細胞は Dsg3^{-/-}マウス B 細胞に対して抗 Dsg3 抗体産生を誘導しうることが示唆された。

本研究によって、Aire 依存性の胸腺 Dsg3 発現が胸腺における Dsg3 反応性 T 細胞のネガティブセレクションに一定の影響を持つこと、また Dsg3 に対する免疫寛容機序には T 細胞以外の因子、T 細胞 B 細胞間作用や B 細胞側の因子も重要であることが示唆された。今後は胸腺内除去をのがれた Dsg3 反応性 T 細胞の末梢における動向を研究する予定である。

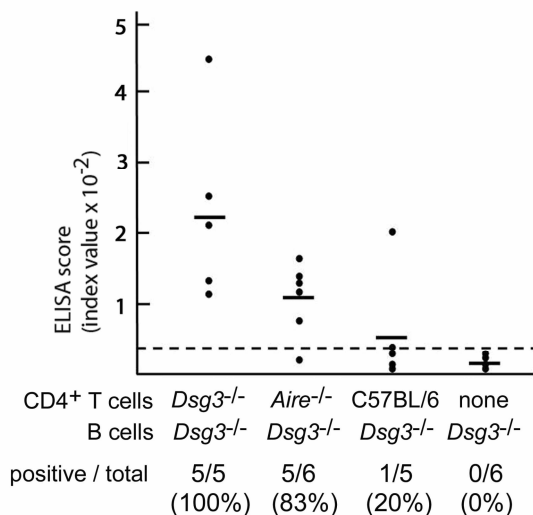


図3 Dsg3^{-/-}、Aire^{-/-}、Aire^{+/+}の各マウス T 細胞 + Dsg3^{-/-}マウス B 細胞を移入した Rag2^{-/-}マウスの血清中抗 Dsg3 抗体
Aire^{-/-} T 細胞 + Dsg3^{-/-} B 細胞群で軽度の抗 Dsg3 抗体産生を認める。

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)

Naoko Wada, Koji Nishifuji, Taketo Yamada, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Mitsuru Matsumoto, Leena Peltonen, Seiho Nagafuchi, Masayuki Amagai:
Aire dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T-cell tolerance. Journal of Investigative Dermatology, 131: 410-417, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 直子 (WADA NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：50306776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし