

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659094

研究課題名（和文）胸腺髄質微小環境のウイルス感染擬態

研究課題名（英文）Mimetic virus-infection in thymic medullary microenvironment

研究代表者

秋山 泰身 (AKIYAMA TAISHIN)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50327665

研究成果の概要（和文）：免疫応答に重要な T リンパ球が胸腺で分化する際、自己組織に反応しない T リンパ球だけが選択される。この選択機構に重要な胸腺髄質上皮細胞は、体内の様々な組織のタンパク質を多種類にわたり発現しており、このタンパク質発現に反応する T リンパ球を胸腺で除くことで、結果として自己組織に反応する T リンパ球が除かれる。本研究課題で、ウイルス感染で誘導されるタンパク質が、胸腺髄質上皮細胞では感染がない状況でも発現することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Thymus generates T cells essential for acquired immune responses against pathogens or other foreign antigens. In the thymus, T cells tolerant to self-antigens are selected. Medullary thymic epithelial cells (mTECs) play a critical role of this selection mechanism. Thus, mTECs ectopically express a wide variety of self-antigens that are normally expressed in tissue restricted manner. mTECs present these self-antigens to developing T cells, thereby eliminating the T cells responsive to self-tissues. In this study, we found that proteins induced by virus-infection were ectopically expressed in mTECs. This finding implies the novel link between natural inflammation and self-tolerant mechanism in the thymus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫寛容・自己免疫

1. 研究開始当初の背景

胸腺で T 細胞が産生する際、自己抗原に反応する T 細胞は負の選択により除かれる。最近、負の選択機構に、胸腺髄質の微小環境を形成する上皮細胞（髄質上皮細胞）が関与することが明らかとなりつつある。髄質上皮細胞は、通常は特定組織にだけ発現する抗原

（組織特異的抗原）を異所的に発現し、それを認識する胸腺細胞を負の選択機構により除去する、と考えられている。この機構はヒト自己免疫疾患の原因遺伝子産物 AIRE により制御されることから、自己免疫疾患の発症抑制に重要である。

応募者は、髄質上皮細胞の分化を制御する

分子機構の解明を行ってきた。これまでに、TNF レセプターファミリーの RANK と CD40 が、TRAF6 や NIK などのシグナル伝達因子を介して NF- κ B を活性化することで、髄質上皮細胞の分化を誘導することを明らかとした。その研究過程において、組み換え RANKL を処理することで“組織特異的抗原”や Aire を発現する機能的な髄質上皮細胞を分化誘導できる実験系を構築した

2. 研究の目的

RANKL 刺激依存的に誘導される遺伝子を網羅的に解析したところ、I 型インターフェロン(I 型 IFN)により誘導される抗ウイルスタンパク質の遺伝子を多種類にわたって得た。すなわち、髄質上皮細胞は組織特異的抗原のみならず、通常はウイルス感染時に I 型 IFN 依存的に誘導され、生体防御の一翼を担う抗ウイルスタンパク質も異所的に発現していることになる。この結果から、胸腺髄質の微小環境では、ウイルス感染状態の“擬態”が起きているとの仮説を立てた。本研究は、胸腺髄質環境の“感染擬態”がどのような機構で形成されているのか、またそれが免疫系の自己—非自己識別において、どのような意義を持つのか明らかにすることを目的として研究を行った。

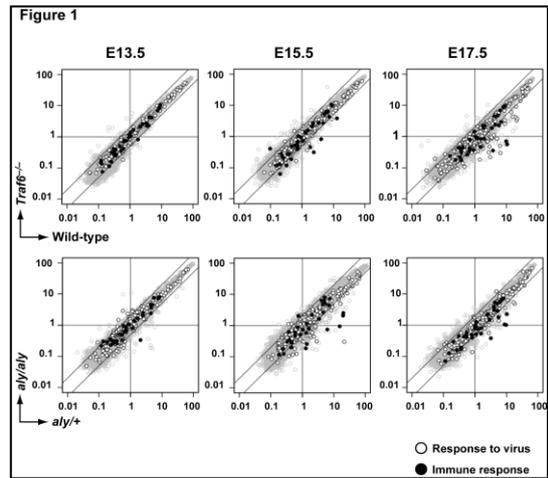
3. 研究の方法

胸腺髄質上皮細胞の分化には RANKL シグナルによる TRAF6 や NIK の活性化が重要であると考えられている。そこで TRAF6 欠損マウスと NIK 変異マウスの胎仔胸腺からリンパ球などを除いた胸腺ストローマを調製し、野生型に比べて発現減少している遺伝子をマイクロアレイ解析により同定した。さらに同定した遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子候補を得るために、胎齢 13.5、15.5、17.5 の胸腺ストローマで発現する全遺伝子と TRAF6 および NIK の変異マウスで減少する遺伝子の 5'側の非コード領域をデータベースより取得し、さらに JASPAR データベースを用いて、結合配列を持つ転写因子群を同定した。胸腺ストローマで発現する全遺伝子と TRAF6 および NIK の変異マウスで減少する遺伝子間で、該当する結合配列の数に有為な差がある転写因子候補を、超幾何分布を利用して同定した。

ついで、同定した転写因子候補の標的遺伝子を決定後、胸腺ストローマに RANKL 刺激することで、それらの遺伝子の発現が上昇するかを、定量的な PCR 法を用いて決定した。さらに、同定した転写因子候補が活性化されているのかをウエスタンブロッティング法を用いて検証した。

4. 研究成果

野生型マウスと TRAF6 欠損マウス、および NIK 変異マウスとコントロールマウス由来の胎仔胸腺ストローマで発現する遺伝子を比較した図を Figure 1 に示す。



TRAF6 あるいは NIK 依存的に変動する遺伝子を Gene Ontology で解析したところ、E15.5 および E17.5 でウイルスに応答する遺伝子が有為に多く存在することが判明した。

さらにこれらの遺伝子を制御する転写因子候補を In silico で予想したところ Table I で示す転写因子候補が得られた。

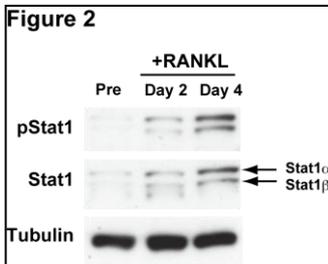
Table I. Summary of plausible transcription factors binding site in promoter region of the TRAF6-dependent genes in fetal thymic stroma.

E13.5 Wild-type vs <i>Traf6</i> ^{-/-}			
Relative profile score	Possible promoter regions used for analysis (Transcription start site is defined as position "+1")		
threshold	-200 ~ +50	-500 ~ +100	-1000 ~ +200
0.80	ND	ND	ND
0.85	IRF2	ND	ND
0.90	ND	ND	ND
E15.5 Wild-type vs <i>Traf6</i> ^{-/-}			
Relative profile score	Possible promoter regions used for analysis (Transcription start site is defined as position "+1")		
threshold	-200 ~ +50	-500 ~ +100	-1000 ~ +200
0.80	STAT1, IRF1, IRF2, MEF2A, Foxd3, Foxa2	STAT1, IRF1, IRF2	STAT1
0.85	STAT1, IRF1, IRF2, MEF2A	STAT1, IRF1, IRF2	STAT1
0.90	STAT1, IRF1, IRF2, FOXL1	STAT1, IRF1, IRF2	STAT1, IRF2, MEF2A
E17.5 Wild-type vs <i>Traf6</i> ^{-/-}			
Relative profile score	Possible promoter regions used for analysis (Transcription start site is defined as position "+1")		
threshold	-200 ~ +50	-500 ~ +100	-1000 ~ +200
0.80	STAT1, IRF1, IRF2, NFIL3, FOXD1, FOXL1, Gfi1, Foxq1, Foxd3, Foxl1, Foxa2, MEF2A, Nkx2-5, Pax4, PBX1, Prrx2, SOX9, Sox17, SRY, Sox5, Fox, NKX3-1, Nobox, Pdx1, Lhx3	STAT1, IRF1, IRF2, FOXF1, Foxd3, Foxa2, Prrx2, SOX9, NKX3-1, Lhx3	STAT1, IRF2
0.85	STAT1, IRF1, IRF2, FOXL1, Foxa2, MEF2A, Nkx2-5, Prrx2, Sox17, SPIB, SRY, Sox5, Hand1-Teef2a, NKX3-1, Nobox, Pdx1	STAT1, IRF1, IRF2, FOXF1, Foxd3, Foxa2, Prrx2, SOX9, NKX3-1, Lhx3	STAT1, IRF1, IRF2, FOXF2
0.90	STAT1, IRF1, IRF2, FOXL1, GATA3, Nkx2-5, SPIB, SRY, Pdx1	STAT1, IRF1, IRF2, FOXF2, FOXL1, Foxa2, Sox17, SRY	STAT1, IRF2, FOXL1, SOX9

すべての条件で STAT1 が予想されることから胸腺髄質上皮細胞の分化において STAT1 が活性化されると予想した。さらにマイクロアレイデータから STAT1 により誘導される遺伝子を探索したところウイルス感染時に誘導

される I 型インターフェロン誘導因子であることが判明した。すなわち、RANKL シグナルにより胸腺髄質上皮細胞が分化する際に、STAT1 が活性化し、I 型インターフェロン誘導因子が発現することが示唆された。

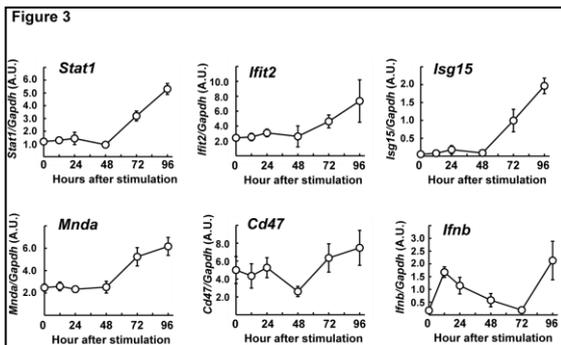
この仮説を検証するために、胸腺ストローマに RANKL 刺激することで胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導した際に、STAT1 が活性化されるのかウェスタンブロット法で調べたところ



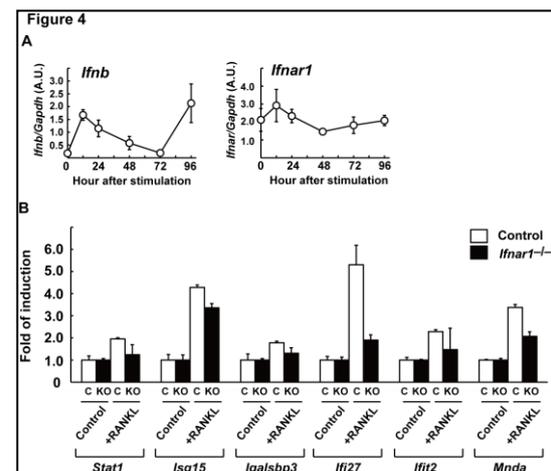
予想どおり、RANKL により STAT1 のリン酸化が検出できた (Figure 2)。

ついで RANKL により STAT1 が活性化

することで、I 型インターフェロン誘導遺伝子が胸腺ストローマで発現誘導されることが判明した (Figure 3)



これらの遺伝子が I 型インターフェロンにより誘導されるのか検討するために、I 型インターフェロンレセプター欠損マウスより胸腺ストローマを調製し、RANKL 刺激後に上記の遺伝子が誘導されるか調べたところ、発



現の一部は減少するものの、一部は残存した (Figure 4)。すなわち、I 型インターフェロン誘導遺伝子は、I 型インターフェロンを介

するシグナルに加えて、別のシグナルにより誘導することが判明した。

これらの結果から、胸腺の髄質環境では、ウイルス感染が起きていないのにも関わらず、I 型インターフェロンやその誘導遺伝子群が発現していることが判明した。今後、胸腺髄質上皮細胞や、自己免疫寛容における意義を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- ① Shinzawa M., Maruyama Y., Qin J., Akiyama N., Miyauchi M., Yanai H., Takami M., Inoue J., and Akiyama T*(corresponding author).

Splenic extramedullary hemopoiesis caused by a dysfunctional mutation in the NF- κ B-inducing kinase gene

Biochem. Biophys. Res. Commun., 414, 773-778 (2011)

DOI:10.1016/j.bbrc.2011.10.001

- ② Ohshima D., Qin J., Konno H., Hirosawa A., Shiraiishi T., Yanai H., Shimo Y., Shinzawa M., Akiyama N., Yamashita R., Nakai K., Akiyama T*(corresponding author), and Inoue J.

RANK signaling induces interferon-stimulated genes in the fetal thymic stroma

Biochem. Biophys. Res. Commun., 408, 530-536 (2011)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.049

- ③ Ohno T., Oboki K., Kajiwara N., Tanaka S., Ikeda M., Iikura M., Akiyama T., Inoue J., Matsumoto K., Sudo K., Azuma M., Okumura K., Kamradt T., Saito H., Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation

Plos One, 6, e18404 (2011)

DOI:10.1371/journal.pone.0018404

- ④ 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*(corresponding author), and Matsumoto M.

Lymphotoxin Signal Promotes Thymic Organogenesis by Eliciting RANK Expression in the Embryonic Thymic Stroma

J. Immunol., 186, 5047-57 (2011)

DOI: 10.4049/jimmunol.1003533

- ⑤ Shimo Y., Yanai H., Ohshima D., Qin J., Motegi H., Maruyama Y., Hori S., Inoue J., and Akiyama T*(corresponding author).

TRAF6 directs commitment to regulatory T cells in thymocytes

Genes Cells, 16, 437-447 (2011)

- DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01500.x
- ⑥ Shinzawa M., and Akiyama T.,
Regulation of central tolerance by RANKL signaling
Clin Calcium 21., 1193-1199 (2011)
DOI: CliCa110811931199
- ⑦ Motegi H., Shimo Y., Akiyama T. and Inoue J.
TRAF6 negatively regulates the Jak1-Erk pathway in interleukin-2 signaling
Genes Cells., 16, 179-89 (2011)
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01474.x
- ⑧ Ishiguro A, Akiyama T., Inoue J., and Nakamura Y
Therapeutic Potential of Anti-Interleukin-17A Aptamer: Suppression of Interleukin-17A signaling and Attenuation of autoimmunity in mouse models.
Arth. Rheu., 63, 455-66 (2011)
DOI: 10.1002/art.30108
- ⑨ Tando T, Ishizaka A, Watanabe H, Ito T, Iida S, Haraguchi T, Mizutani T, Izumi T, Isobe T, Akiyama T., Inoue J and Iba H.
Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a non-canonical NF- κ B pathway.
J. Biol. Chem., 285, 21951-60 (2010)
DOI: 10.1074/jbc.M109.087783
- ⑩ Ando K, Hasegawa K, Shindo K, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, Nakano H, Takeuchi O, Akira S, Akiyama T., Gohda J, Inoue J, Hayakawa M.
Human lactoferrin activates NF- κ B through Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling
FEBS J. 277, 2051-2066 (2010)
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07620.x

[学会発表] (計 15 件)

- ① 関 崇生
Oscillation of non-canonical NF- κ B activation pathway,
第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜、パシフィコ横浜
- ② Taishin Akiyama
Molecular mechanisms to establish the thymic microenvironment essential for central tolerance
6th Chiba University G-COE Symposium、
2011 年 11 月 30 日、千葉、ホテルニューオータニ幕張
- ③ 新澤 美穂
A novel regulatory mechanism of NF- κ B inducing kinase (NIK) activation in the immune system
第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、千葉 幕張メッセ
- ④ 秋山 伸子
Roles of TNF family signals in establishing thymic microenvironment
第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、千葉 幕張メッセ
- ⑤ 秋山 泰身
胸腺髄質上皮細胞の遺伝子発現制御機構
京都 T cell conference、2011 年 6 月 10 日、京都 芝蘭会館
- ⑥ Taishin Akiyama
Regulation of gene expressions in the development of medullary thymic epithelial cells
EUThyme-Rolduc Meeting、2011 年 5 月 21 日
オランダ、Leeuvenhorst
- ⑦ Taishin Akiyama
RANK signaling induces interferon-stimulated genes in the fetal thymic stroma
TNF conference 2011、2011 年 5 月 16 日、淡路島、夢舞台国際会議場
- ⑧ Taishin Akiyama
Roles of TNF receptor family members on development of thymic microenvironment required for immunological self-tolerance
TNF conference 2011、2011 年 5 月 16 日、淡路島、夢舞台国際会議場
- ⑨ 秋山 泰身
Molecular mechanisms underlying the development of thymic environment essential for immunological self-tolerance
第 33 回日本分子生物学会・第 83 回生化学会大会、2010 年 12 月 6 日、神戸 神戸ポートピア
- ⑩ 秋山 泰身
REGULATION OF GENE EXPRESSIONS IN MEDULLARY THYMIC EPITHELIAL CELLS
The Second Workshop of Synthetic Immunology、
2010 年 12 月 16 日、京都 芝蘭会館
- ⑪ Yusuke Shimo
TRAF6 controls commitment to regulatory T-cell lineage and T-cell receptor signals in thymocytes
14th International congress in Immunology、
2010 年 8 月 24 日、神戸 神戸ポートピア
- ⑫ Taishin Akiyama
A negative feedback regulation of medullary thymic epithelial cell development by RANK signal-dependent expression of osteoprotegerin
2010 年 8 月 23 日、神戸 神戸ポートピア

- ⑬ Taishin Akiyama
RANKL-RANK-OPG system in
establishment of immunological tolerance
3rd International Conference on
Osteoimmunology、2010年6月24日、ギ
リシャ、サントリーニ
- ⑭ 下茂佑輔
胸腺発生型の制御性 T 細胞分化を制御す
る TRAF6 シグナルの解析
京都 T cell conference、2010年6月4日、
京都 芝蘭会館
- ⑮ Taishin Akiyama
Development of thymic niches essential for
preventing autoimmunity
The 1st International Conference on Frontiers
of Regenerative Medicine & Biomedical
Science
2010年5月14日、中国、広州

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：RANKL アンタゴニストを含む癌免疫増
強

発明者：秋山泰身、箭内洋見、秋山伸子、保
田尚孝

権利者：オリエンタル酵母工業

種類：特許

番号：2011-079167

出願年月日：平成23年3月31日

国内外の別：国内

[その他]

アウトリーチ活動

免疫ふしぎ未来2011 実行委員

2011年8月21日、日本科学未来館

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/BunshiHatsugan/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 泰身 (AKIYAMA TAISHIN)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50327665

(2) 研究協力者

下茂 佑輔 (SHIMO YUSUKE)

東京大学・新領域創成科学科・大学院生

大島 大輔 (OHSHIMA DAISUKE)

東京大学・新領域創成科学科・大学院生

新澤 美穂 (SHINZAWA MIHO)

東京大学・新領域創成科学科・大学院生

秋山 伸子 (AKIYAMA NOUBUKO)

日本学術振興会特別研究員