

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20706

研究課題名(和文) 中枢性免疫寛容を制御する新規オートファジー誘導因子の解析

研究課題名(英文) C150RF48 is the inducing factor of thymic autophagy that regulates autoimmunity.

研究代表者

高倉 勇気 (Takakura, Yuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・特任研究員

研究者番号：70963007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺上皮細胞は恒常的にオートファジー(胸腺オートファジー)を活性化させることによりT細胞に自己抗原を提示する。自己抗原を認識したT細胞は排除されることにより、未然に自己免疫疾患を防いでいる。我々は胸腺オートファジーを誘導する新規因子C150RF48を発見した。C150RF48はミトコンドリア膜電位や細胞内ATP量を低下させ、AMPK-ULK1経路の活性化を介してオートファジーを誘導することがわかった。C150RF48欠損マウスの胸腺オートファジー活性は低下していることがわかった。また、C150RF48欠損マウスはT細胞に自己抗原を提示できなくなり、結果として自己免疫を発症することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺上皮細胞では恒常的なオートファジーの誘導が報告されているが、オートファジーは飢餓応答時に誘導されると広く認識されており、飢餓非依存的なオートファジー誘導機構はあまりよくわかっていない。我々はC150RF48を飢餓非依存的なオートファジー誘導因子として同定しており、本研究成果は免疫システムのみならずオートファジーの基礎研究においても学術的に重要な知見を与え得るものと考えている。

研究成果の概要(英文)：TECs (Thymic epithelial cells) show high autophagy activity without starvation. This implies that such stress-independent autophagy might contribute to self-protein degradation for generating self-antigen peptides in TECs. Consistently, autophagy in TECs is important for acquisition of T cell self-tolerance. However, the mechanism by which TECs induce autophagy in the absence of starvation is unknown. We found novel autophagy-inducing factor C150RF48 in TECs. C150RF48 reduces the mitochondrial membrane potential and lowers intracellular ATP levels, thereby activating AMP-activated protein kinase and its downstream ULK1. C150RF48<sup>-/-</sup> mice show a reduction in stress-independent autophagy in TECs. Moreover, C150RF48<sup>-/-</sup> mice develop autoimmunity, which is consistent with the fact that the stress-independent autophagy in TECs is crucial for the thymic self-tolerance. These results suggest that C150RF48 induces stress-independent autophagy, thereby regulating self-tolerance.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 オートファジー ミトコンドリア 自己免疫 上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は人口の 3~5%が罹患する難治性の疾患である (Lifeng W., J Intern Med., 2015)。現在、自己免疫疾患の治療方法は対症療法が中心となっている。そのため、予防と根本的治療には自己免疫疾患を発症する機構の理解が必要である。胸腺は免疫応答に重要な T 細胞を産生する臓器である。胸腺で T 細胞が分化する際、自己の抗原を認識する自己応答性 T 細胞

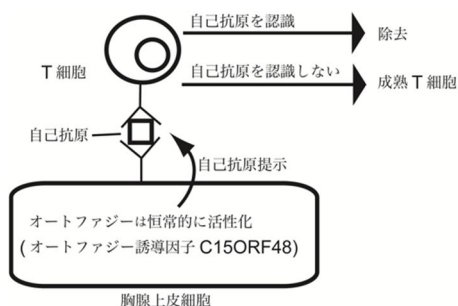


図 1: 胸腺上皮細胞はオートファジーを介して自己抗原を T 細胞に提示することにより自己免疫疾患を未然に防いでいる。申請者はオートファジー誘導因子として C15ORF48 を同定した。

は除去される。その除去機構に胸腺上皮細胞が必須である。胸腺上皮細胞は自己タンパク質を分解して自己ペプチドとし、それを T 細胞に提示する。T 細胞が自己ペプチドを認識した場合、自己応答性 T 細胞として排除される。その結果、自己免疫疾患の発症が未然に抑制される。抗原提示に必要な自己タンパク質の分解はオートファジーにより行われていると考えられている。オートファジーは、栄養飢餓に応じてタンパク質や細胞小器官をリソソームによって分解する現象である (Mizushima N, Cell, 2011)。興味深いことに、オートファジーは胸腺上皮細胞では栄養飢餓と関係なく恒常的に活性化している (J Nedjic, Nature, 2008)。しかし、胸腺上皮細胞でオートファジー (胸腺オートファジー) を恒常的に活性化する分子メカニズムは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

胸腺オートファジーは自己免疫疾患を未然に防ぐ上で非常に重要なプロセスである。胸腺オートファジーは栄養飢餓と関係なく恒常的に活性化されているが、その分子メカニズムは明らかになっていない。そこで、我々は胸腺上皮細胞の飢餓非依存的オートファジーを誘導する新規因子 C15ORF48 (Chromosome open reading frame 48) を同定した。本研究の目的は C15ORF48 による胸腺上皮細胞におけるオートファジー誘導機構とその機能解明である (図 1)。

### 3. 研究の方法

本研究では、(目的 1) C15ORF48 依存的オートファジーの分子機構と (目的 2) T 細胞の選択への寄与について解析する。

#### 目的 1: C15ORF48 依存的オートファジーの分子機構解析

C15ORF48 の細胞内局在を顕微鏡観察にて解析したところ、ミトコンドリアに局在することを見出した。このことから、C15ORF48 はミトコンドリアの機能制御を介してオートファジーを誘導すると予想している。

まず、C15ORF48 の強制発現や NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を刺激させ、ミトコンドリア膜電位や細胞内 ATP を測定しミトコンドリア活性を評価する。次に、ミトコンドリア活性とオートファジーの関連について解析する。

#### 目的 2: 胸腺における T 細胞の選択における C15ORF48 の機能解明

胸腺上皮細胞内のオートファジーは抗原提示による T 細胞の選択に重要である。C15ORF48 欠損マウスを用いて、C15ORF48 依存的オートファジーの T 細胞選択にお

ける機能を解明する。

まず、CRISPR-Cas9 システムを用いて *C15ORF48* 欠損マウスを作製する。次に、オートファジー活性を生体にてモニター可能な *GFP-LC3* マウス (Mizushima N., Mol Biol Cell., 2003) と交配させ、胸腺上皮細胞におけるオートファジー活性が *C15ORF48* に依存するのか検証する。

胸腺における T 細胞選択に異常が生じると自己反応性 T 細胞による自己免疫疾患を発症すると予想される。そのため、*C15ORF48* 欠損マウスにおいて自己免疫疾患の症状が認められるかどうかを解析する。具体的には、マウスの各臓器の組織学解析により炎症性細胞浸潤の有無を検討する。また、マウスの血清を採取して、血清中の自己抗体価を評価する。自己免疫疾患の症状が認められた場合は、ヌードマウスに対する胸腺移植により胸腺の T 細胞選択機能を評価する。

#### 4. 研究成果

##### 目的 1: *C15ORF48* 依存的オートファジーの分子機構解析

細胞に *C15ORF48* を安定発現させ、ミトコンドリアの膜電位や細胞内 ATP 量を解析した。*C15ORF48* を発現している細胞では、ミトコンドリアの膜電位や細胞内 ATP 量が低下した。細胞内 ATP 量の低下が AMPK を活性化させ、AMPK-ULK1 経路を介してオートファジーを誘導することが知られている。そこで、これらのシグナル伝達について解析したところ、*C15ORF48* 安定発現細胞でこれらのシグナル伝達が活性化していることがわかった。このことから、*C15ORF48* がミトコンドリアの膜電位を低下させることにより細胞内の ATP 量を低下させること、この細胞内 ATP 量の低下によりオートファジー誘導経路 AMPK-ULK1 経路の活性化を介してオートファジーを誘導することがわかった。

##### 目的 2: 胸腺における T 細胞の選択における *C15ORF48* の機能解明

CRISPR-Cas9 システムにより作製した *C15ORF48* 欠損マウスを *GFP-LC3* マウスと交配させて *C15ORF48* と生体内のオートファジーの関係性について解析した。まず、飢餓依存オートファジーとの関連を調べるために、マウスを絶食させて飢餓ストレスを与え、筋肉組織のオートファジー活性を解析したところ、*C15ORF48* 欠損マウスではオートファジー活性は変化が認められなかった。一方で、恒常的にオートファジーが活性化する胸腺上皮細胞のオートファジー活性を測定したところ、*C15ORF48* 欠損マウスでは顕著に減少した(図 2)。

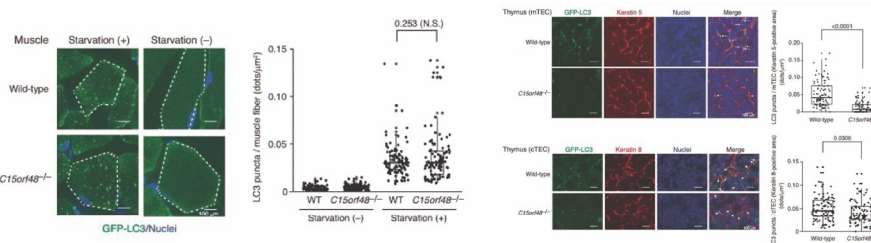


図 2: マウスを絶食させて飢餓ストレスを与え、筋肉組織のオートファジー活性を解析したところ、*C15ORF48* 欠損マウスではオートファジー活性は変化が認められなかった。一方で、恒常的にオートファジーが活性化する胸腺上皮細胞のオートファジー活性を測定したところ、*C15ORF48* 欠損マウスでは顕著に減少した。

このことから、*C15ORF48* は飢餓依存的オートファジーには関与せず、恒常的に活性化する胸腺オートファジーのような特殊なオートファジーに必要な分子であることが

明らかとなった。

胸腺オートファジーの活性が低下すると、未熟な T 細胞に自己抗原を提示できなくなると考えられる。そのため、胸腺上皮細胞は自己反応性 T 細胞を除去することができなくなり、結果として、自己免疫を発症すると予想される。そこで、*C15ORF48* 欠損マウスが自己免疫を発症するののかについて解析した。すると、*C15ORF48* 欠損マウスでは涙腺、顎下腺、目、卵巣といった臓器に自己抗体が検出された。さらに *C15ORF48* 欠損マウスの全身臓器の細胞性浸潤を解析したところ、*C15ORF48* 欠損マウスは肺、腎臓、肝臓といった臓器に細胞性浸潤が見られた。これらの結果から *C15ORF48* 欠損マウスは自己免疫を発症していることがわかった。

*C15ORF48* 欠損マウスによる自己免疫疾患の発症が胸腺由来であるかどうか調べるために、ヌードマウスに胸腺移植を行い自己免疫について解析した。すると、*C15ORF48* 欠損マウスの胸腺を移植したヌードマウスでは、涙腺、顎下腺、肺、肝臓、目、卵巣、腎臓といった臓器に自己抗体が検出された。さらに、*C15ORF48* 欠損マウスの胸腺を移植したヌードマウスの身臓器の細胞性浸潤を解析したところ、涙腺、顎下腺、腎臓、肝臓、肺といった臓器に細胞性浸潤が見られた(図 3)。これらの結果から *C15ORF48* が中枢性免疫寛容を制御していることが考えられる。

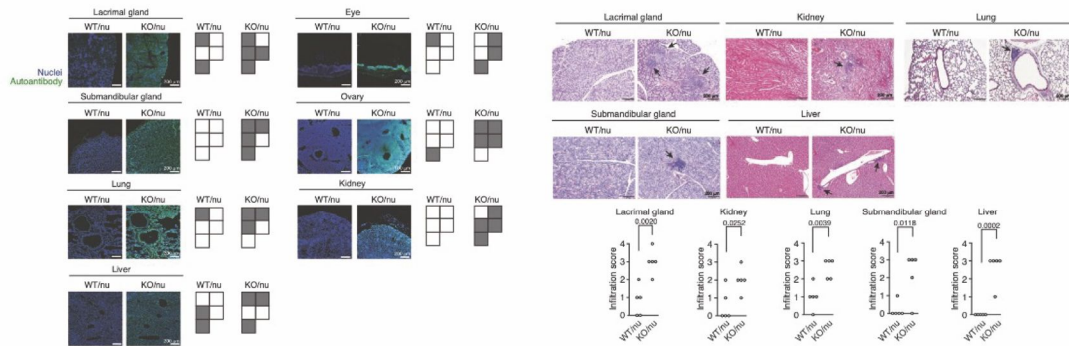


図 3:*C15ORF48* 欠損マウスの胸腺を移植したヌードマウスでは、涙腺、顎下腺、肺、肝臓、目、卵巣、腎臓といった臓器に自己抗体が検出された。  
*C15ORF48* 欠損マウスの胸腺を移植したヌードマウスの身臓器の細胞性浸潤を解析したところ、涙腺、顎下腺、腎臓、肝臓、肺といった臓器に細胞性浸潤が見られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takakura Y., Machida M., Terada N., Katsumi Y., Kawamura S., Horie K., Miyauchi M., Ishikawa T., Akiyama N., Seki T., Miyao T., Hayama M., Endo R., Ishii H., Maruyama Y., Hagiwara N., Kobayashi T. J., Yamaguchi N., Takano H., Akiyama T., Yamaguchi N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Mitochondrial protein C15ORF48 is a stress-independent inducer of autophagy that regulates oxidative stress and autoimmunity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-45206-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Tatsuya, Horie Kenta, Takakura Yuki, Ohki Houko, Maruyama Yuya, Hayama Mio, Miyauchi Maki, Miyao Takahisa, Hagiwara Naho, Kobayashi Tetsuya J., Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 28
2. 論文標題 T cell receptor repertoire analysis of CD4 positive T cells from blood and an affected organ in an autoimmune mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 929 ~ 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takakura Yuki, Suzuki Takayuki, Hirai Naoto, Araki Takuro, Ohishi Mai, Sato Hiromi, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 669
2. 論文標題 VGLL3 confers slow-twitch muscle differentiation via PGC-1 expression in C2C12 myocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 30 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.05.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura Tomohiro, Takehara Yuki, Hori Naoto, Takakura Yuki, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 123
2. 論文標題 VGLL3 increases the dependency of cancer cells on de novo nucleotide synthesis through GART expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1064 ~ 1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.30251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyao Takahisa, Miyauchi Maki, Kelly S Thomas, Terooatea Tommy W, Ishikawa Tatsuya, Oh Eugene, Hirai Sotaro, Horie Kenta, Takakura Yuki et al.,	4. 巻 11
2. 論文標題 Integrative analysis of scRNA-seq and scATAC-seq revealed transit-amplifying thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.73998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hori Naoto, Takakura Yuki, Sugino Ayumi, Iwasawa Shuto, Nomizo Kota, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Vestigial like family member 3 stimulates cell motility by inducing high mobility group AT hook 2 expression in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 2686 ~ 2697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.17279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高倉勇氣, 秋山伸子, 高野博之, 秋山泰身, 山口憲孝
2. 発表標題 中枢性免疫寛容を抑制する胸腺オートファジー誘導機構の解析
3. 学会等名 第144回日本薬学会年会 (横浜)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 河村星香, 高倉勇氣, 勝見優香, 高野博之, 山口憲孝
2. 発表標題 ミトコンドリアタンパク質C150RF48によるMitophagyの抑制
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会 (東京)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大石まい, 高倉勇気, 高野博之, 山口恵孝
2. 発表標題 転写共役因子VGLL3によるPGC-1 発現を介した筋線維型変化の解析
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会(東京)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田卓真, 南須原杏律, 高倉勇気, 石川千夏, 高野博之, 山口恵孝
2. 発表標題 LPA刺激による脂肪細胞分化への影響の解析
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会(東京)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高倉勇気, 秋山伸子, 高野博之, 秋山泰身, 山口恵孝
2. 発表標題 胸腺上皮細胞の恒常的なオートファジー誘導因子の同定
3. 学会等名 2023年度 日本生化学会関東支部例会 (山梨)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高倉勇気, 高野博之, 山口恵孝
2. 発表標題 新規NF- $\kappa$ B標的遺伝子による飢餓非依存的オートファジーの誘導メカニズムと機能解明
3. 学会等名 第143年回 日本薬学会年会(札幌)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 Yuki Takakura , Moeka Machida , Natsumi Terada , Yuka Katsumi , Hiroyuki Takano , Nobuko Akiyama , Taishin Akiyama , Noritaka Yamaguchi
2. 発表標題 Stress-independent autophagy driven by a mitochondrial small protein in thymus regulates self-tolerance.
3. 学会等名 The 9th Global Network Forum on Infection and Immunity. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高倉勇気 , 高野博之 , 山口憲孝
2. 発表標題 NF- B依存的オートファジー誘導因子による細胞増殖
3. 学会等名 2022年度 日本生化学会 関東支部大会(千葉)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>がんの新しい治療薬開発に光明～がんの進行を早める新たな鍵分子の発見～  <a href="https://www.chiba-u.ac.jp/others/topics/info/20220425_VGLL3.html">https://www.chiba-u.ac.jp/others/topics/info/20220425_VGLL3.html</a></p> <p>免疫はなぜ、自己組織を攻撃しないのかー自己免疫疾患を防ぐ胸腺オートファジーの誘導機構を解明ー <a href="https://www.p.chiba-u.jp/lab/mcp/pdf/20240208_1.pdf">https://www.p.chiba-u.jp/lab/mcp/pdf/20240208_1.pdf</a></p>
--

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