

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293223

研究課題名(和文) 根本的治療法確立のための遺伝性自己免疫疾患の病態解明

研究課題名(英文) Studies aiming the establishing self-tolerance for the cure of autoimmune disease

研究代表者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：60221595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の難病である自己免疫疾患に対して、根本的な治療法を確立するには、本症の原因を明らかにする他に取るべき手段はない。本研究では、その機能障害がヒトに遺伝性の自己免疫疾患をもたらす転写因子AIREを研究対象に選び、遺伝子改変マウスを駆使して自己免疫疾患の原因究明に取り組んだ。AIREは胸腺上皮細胞に発現し、胸腺における負の選択機構にはたらく。得られた成果は以下の2点である。1) 負の選択を確立するためのAIREの機能胸腺髄質上皮細胞においてのみ発揮され、胸腺皮質上皮細胞ではそのような機能は発揮されなかった。2) 全ての胸腺髄質上皮細胞は成熟過程において、一度はAIREを発現する。

研究成果の概要(英文)：Cortical thymic epithelial cells (cTECs) and medullary TECs (mTECs) play essential roles in the positive and negative selection, respectively. Aire in mTECs plays an essential role in the latter. We used BAC technology to establish a semiknockin strain expressing Aire under control of the promoter of 5t, a thymoproteasome expressed exclusively in the cortex. Although Aire was expressed in cTECs as typical nuclear dot protein, cTECs expressing Aire ectopically did not confer transcriptional expression of Aire-dependent tissue-restricted antigen genes. We also established a novel Aire reporter strain in which endogenous Aire is replaced by the human AIRE-GFP-Flag tag gene. The hAGF reporter protein was produced and retained very efficiently within mTECs as authentic Aire nuclear dot protein. Remarkably, snapshot analysis revealed that mTECs expressing hAGF accounted for >95% of mature mTECs, suggesting that Aire expression does not represent a particular mTEC lineage(s).

研究分野：免疫学

キーワード：AIRE thymus autoimmunity

1. 研究開始当初の背景

免疫学における最重要課題である「自己免疫疾患の原因究明」の突破口となる素材が、メンデル型遺伝(常染色体劣性)を示す自己免疫疾患の原因遺伝子の同定によってもたらされた。すなわち、私どもが臨床医として膠原病患者診療に携わっていた1997年に、遺伝性の自己免疫疾患である自己免疫性多腺性内分泌疾患型(autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: APECED)の原因遺伝子としてAIRE(autoimmune regulator)が同定された(Nature Genet, 1997)。APECEDでは、わずか1遺伝子の異常により種々の腺組織を標的とする自己免疫疾患が例外なく引き起こされる。しかもAIRE遺伝子の発現は、自己抗原(self antigen)の提示によって自己反応性T細胞の除去にはたらく胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cell: mTEC)で、もっとも強い。そのため、AIREの機能異常に基づく疾患病態の解明は、APECEDのみならず、他の自己免疫疾患の原因究明とほぼ同義であると言える。ここで重要な点は、AIRE欠損症(APECED)は単一遺伝子の異常による病気であるため、マウスAIRE遺伝子の改変操作によってヒトの病気と同じ病態をもつ疾患モデルマウスを樹立できることである。事実、AIRE欠損マウスはヒトの場合と同様に例外なく自己免疫病態を発症する(*J. Immunol.* 174: 1862-1870, 2005に発表済み)。このように、AIREは実際のヒトの病気の原因遺伝子であり、かつヒトと同じ病態モデルマウスを作製・利用できることから、自己免疫疾患の原因究明のための理想的な研究対象である。すなわち、AIREの出現によって、自己免疫疾患においても真の実験医学が初めて可能となった。

2. 研究の目的

AIREはその機能異常によって、胸腺における負の選択の障害をもたらす、実際にヒトに自己免疫疾患を引き起こす。すなわち、AIRE遺伝子改変マウスによって、マウスにヒトと同じ病態を作り出し、そのメカニズムを詳細に解析することが出来る。そこで、本研究課題では、AIREを敢えて胸腺皮質上皮細胞(cTEC)で発現させるトランスジェニックマウスや、AIRE遺伝子座にレポーター分子を挿入したノックインマウスを作製し、AIREがどのような免疫学的性状をもっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 胸腺皮質で異所性にAIREを発現するマウスの樹立: mTECとcTECは共通の前駆細胞から分化するが、cTECに特異的に発現する因子として $\beta 5t$ があり、胸腺皮質における正の選択に寄与している。我々はBAC(大腸菌人工染色体)上の $\beta 5t$ 遺伝子の1stメチオ

ンをマウスAireコーディング領域に組換えたBACベクターを作製し、NODマウス受精卵に導入してBACトランスジェニックマウスを作成した。さらに内在性Aireノックアウトマウスと交配することによって、mTECでAireが発現する野生型マウスとAireノックアウトマウスに加え、AireをmTEC、cTECで発現するマウス、及び、cTECのみで発現するマウスを樹立した。

(2) レポーター分子として、Aire nuclear dot proteinを発現する新規ノックインマウス: 従来のAireレポーターマウスを用いたAire⁺mTECの解析の問題点は、蛍光物質とAire蛋白とが、細胞内局在(Aireはnuclear dot蛋白であるのに対して、蛍光物質は細胞全体に分布する)、および合成・分解速度において、大きく異なることであった。事実、Aire/GFPノックインマウスにおいては、GFPシグナルと抗Aireモノクローナル抗体との一致率が必ずしも高くないことから、Aire⁺mTECの性状が把握し難い問題があった¹⁴。こうした問題を解決する目的で、ヒトAIRE遺伝子とGFP遺伝子との融合遺伝子をAire遺伝子座に挿入した新たなAireレポーターマウス(Aire/huAIRE-GFPノックインマウス)を樹立した。

4. 研究成果

(1) AireはmTECにおいてのみ機能的である cTECで発現したAireもmTECにおけるAire同様、核内ボディーを形成しておりAireの核内における構造的性質は維持されている。しかし、 $\beta 5t$ はcTECの大部分の細胞で発現するにも関わらず、フローサイトメーターによって定量的に検出したAire発現cTECは10%程度であり、cTECの一部にはAireタンパク質を維持できる機構か、Aireタンパク質を積極的に排除する機構が備わっていると考えられる。Aire発現が細胞の生死に關与するのかという命題については議論があるが、AireをcTECに発現させてもcTEC数は野生型マウスと違いがなく、Aireが積極的にアポトーシスを誘導することはcTECでは観察されなかった。

AireはmTECにおいて組織特異的遺伝子群の発現を制御しており、Aireノックアウトマウスではその発現低下が観察される。Aireを発現させたcTECにおいても組織特異的遺伝子群が誘導されるのかを検討した。胸腺に酵素処理を施して分離した細胞からcTEC(CD45⁻, EpCAM⁺, Ly51⁺, UEA-1⁻)及び、mTEC(CD45⁻, EpCAM⁺, Ly51⁺, UEA-1⁺)分画を単離して各細胞集団のRT-qPCRを行った。mTECではAireノックアウトによって発現が低下する遺伝子群(Aire依存的遺伝子)であるIns2、Sap1においても、cTECで発現したAireでは誘導されなかった。また、mTECで発現するが、Aire依存性を示さないCRPもAire発現cTECでは誘導されなかった。すなわち、Aireの機能的な場としてのmTECの

独自性が明らかとなった。

(2) Aire 発現 mTEC は特殊な系列 (lineage) ではない

成熟過程で Aire/huAIRE-GFP ノックインマウス由来の mTEC を従来通り抗 Aire モノクローナル抗体を用いて Aire 発現細胞を解析すると、やはり mTEC 中の 30~40% の細胞が Aire⁺ mTEC と判定されたが、これを GFP 蛍光を指標として Aire⁺ mTEC を測定すると、約 65% の細胞が Aire⁺ mTEC であることが判明した。この結果を成熟 mTEC に限って見てみると、ほぼ 80% の細胞が Aire を発現していることになる。さらに、このレポーターアレルをホモで保有する個体の解析では約 80% の細胞が Aire⁺ mTEC であり、成熟 mTEC に限ると、ほぼ 95% の細胞が Aire を発現しており、Aire⁺ mTEC が TRA 発現のための特殊な lineage である可能性を否定する結果であった。すなわち、ほぼ全ての成熟 mTEC は発現レベルに違いはあっても Aire を発現しており、個々の mTEC が死ぬまでの過程を考慮すると、全ての mTEC が一度は Aire を発現すると考えられる。

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 6 件)

1. Ectopic Aire expression in the thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a tolerogenic factor within the medulla.

Hitoshi Nishijima, Satsuki Kitano, Hitoshi Miyachi, Junko Morimoto, Hiroshi Kawano, Fumiko Hirota, Ryoko Morita, Yasuhiro Mouri, Kiyoshi Masuda, Issei Imoto, Koichi Ikuta and Mitsuru Matsumoto.

Journal of Immunology 2015, 195, 4641-4649.
(doi: 10.4049/jimmunol.1501026) (査読あり)

2. Aire expression is inherent to most medullary thymic epithelial cells during their differentiation program.

Hiroshi Kawano, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Fumiko Hirota, Ryoko Morita, Yasuhiro Mouri, Yasuhiko Nishioka and Mitsuru Matsumoto.

Journal of Immunology 2015, 195, 5149-5158.
(doi: 10.4049/jimmunol.1501000) (査読あり)

3. Switching on the Aire conditioner.

Mitsuru Matsumoto.

European Journal of Immunology 2015, 45, 3237-3240.

(doi: 10.1002/eji.201546098) (査読あり)

4. NIK in thymic stroma establishes central tolerance by orchestrating cross-talk with not only thymocytes but also dendritic cells.

Yasuhiro Mouri, Hitoshi Nishijima, Hiroshi Kawano, Fumiko Hirota, Nobuo Sakaguchi, Junko Morimoto, and Mitsuru Matsumoto.

Journal of Immunology 2014, 193, 4356-4367
(doi: 10.4049/jimmunol.1400389) (査読あり)

5. Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells reveals a requirement for Aire in their maturation program

Yumiko Nishikawa, Hitoshi Nishijima, Minoru Matsumoto, Junko Morimoto, Fumiko Hirota, Satoru Takahashi, Hervé Luche, Hans Joerg Fehling, Yasuhiro Mouri and Mitsuru

Matsumoto

Journal of Immunology, 2014, 192, 2585-2592.
(doi: 10.4049/jimmunol.1302786) (査読あり)

6. Which model better fits the role of Aire in the establishment of self-tolerance: the transcription model or the maturation model?

Mitsuru Matsumoto, Yumiko Nishikawa, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Minoru Matsumoto and Yasuhiro Mouri.

Frontiers in Immunology 2013, 4, Article number 210

(doi: 10.3389/fimmu.2013.00210) (査読あり)

[学会発表] (計 18 件)

松本 満

AIRE 遺伝子と自己免疫疾患と胸腺について
第35回日本胸腺研究会 (招待講演)

2016年02月06日

徳島大学藤井節郎記念医科学センター (徳島県徳島市)

Mitsuru Matsumoto

Role of Aire in the establishment of self-

tolerance.

第 44 回日本免疫学会総会(招待講演)

2015 年 11 月 20 日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Hiroshi Kawano, Yasuhiro Mouri,

Hitoshi Nishijima, and Mitsuru Matsumoto

A novel Aire- dependent subset of medullary thymic epithelial cells that express Ly6 family protein

第 44 回日本免疫学会総会 (招待講演)

2015 年 11 月 20 日

札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Hitoshi Nishijima, Yasuhiro Mouri, Junko Morimoto, Hiroshi Kawano, and

Mitsuru Matsumoto

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity by the additive expression of AIRE.

第 44 回日本免疫学会総会(招待講演)

2015 年 11 月 20 日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Hiroshi Kawano, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Yasuhiro Mouri and

Mitsuru Matsumoto

Aire expression is inherent to all medullary thymic epithelial cells during their differentiation program.

The 4th European Congress of Immunology (国際学会)

2015 年 09 月 07 日

Vienna (Austria)

Mitsuru Matsumoto, Hiroshi Kawano, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto,

Yasuhiro Mouri and Yasuhiko Nishioka

Aire expression is inherent properties of all medullary thymic epithelial cells during their

differentiation program.

Venice Thymus Meeting (国際学会)

2015 年 04 月 09 日

Venice(Italy)

Kawano, H., Matsumoto, M.

Unexpected disturbance of the development of medullary thymic epithelial cells at immature stages by the long-term ablation of Aire-expressing cells

2015 年 03 月 12 日 ~ 2015 年 03 月 14 日

Hilton Hotel Sorrento (Sorrento, Italy)

Nishijima, H., Morimoto, J., Kawano, H., Matsumoto, M.

Approaches to identify Aire-regulated non-tissue-restricted antigen genes by the ectopic expression of Aire in thymic cortex

第 44 回日本免疫学会総会

2014 年 12 月 10 日 ~ 12 月 12 日

京都国際会議場(京都府・京都市)

Kawano, H., Morimoto, J., Mouri, Y., Nishijima, H., Nishioka, Y., Matsumoto, M.

Unexpected disturbance of the development of medullary thymic epithelial cells at immature stages by the long-term ablation of mature Aire-expressing cells

第 44 回日本免疫学会総会

2014 年 12 月 10 日 ~ 12 月 12 日

京都国際会議場(京都府・京都市)

Matsumoto, M., Nishijima, H.

Ectopic Aire expression in thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a medullary stromal factor

European Society for Immunodeficiencies 2014

2014 年 10 月 29 日 ~ 2014 年 11 月 01 日

Prague Congress Centre (Prague Czech Republic)

西嶋 仁, 生田宏一, 松本 満

胸腺皮質上皮細胞への異所性発現による Aire の機能解析

第 24 回 Kyoto T Cell Conference

2014年05月16日～2014年05月17日
京都平安ホテル(京都府・京都市)

Nishijima, H., Morimoto, J., Kawano, H.,
Mouri, Y., Ikuta, K., Matsumoto, M.

Ectopic Aire expression in thymic cortex reveals
inherent properties of Aire as a medullary stromal
for medullary thymic microenvironment
ThymOz7

2014年04月02日～2014年04月07日
Heron Island (Australia)

Nishijima, H., Morimoto, J., Kawano, H.,
Mouri, Y., Ikuta, K., Matsumoto, M.

Requirement of Aire expression within thymic
medulla but not cortex for establishing
self-tolerance

第42回日本免疫学会総会

2013年12月11日

幕張メッセ(千葉県・千葉市)

Matusumoto, M., Nishikawa, Y., Mouri, Y.,
Nishijima, H.

Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells
reveals a requirement of Aire for their maturation
program

15th ICI2013

2013年08月27日

Mico Milano Congress (Italy)

Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Nishijima, H.,
Morimoto, J., Takahashi, S., Luce, H., Fehling,
H., Mouri, Y.

Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells
reveals a requirement for Aire in their maturation
program

The 6th International Workshop of Kyoto T Cell
Conference

2013年06月03日～2013年06月07日
芝蘭会館(京都府・京都市)

西嶋 仁, 毛利安宏, 西川裕美子, 松本 満
Aire 遺伝子を導入した Hela 細胞における細
胞周期依存的な AIRE タンパク質のリン酸化

第54回日本生化学中国・四国支部例会

2013年05月31日～2013年06月01日
徳島大学大塚講堂(徳島県・徳島市)

Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Mouri, Y.,
Nishijima, H.

Temporal fate-mapping study reveals essential
roles of Aire in the maturation program of
Aire-expressing cell lineage

IMMUNOLORY 2013-AAI Annual Meeting

2013年05月03日～2013年05月07日
Hawaii Convention Center (USA)

Nishikawa, Y., Mouri, Y., Nishijima, H.,
Matsumoto, M.

Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells
reveals a requirement of Aire for their full
maturation program

Controversies in Rheumatology and
Autoimmunity

2013年04月04日～2013年04月06日
Hotel Novotel Budapest City (Hungary)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/>
(免疫病態研究部門/国立大学法人徳島大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
研究者番号: 60221595

(2) 研究分担者

西嶋 仁 (NISHIJIMA, Hitoshi)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号: 60425410

毛利 安宏 (MOURI, Yasuhiro)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号: 80464353