

令和元年6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08840

研究課題名(和文) Aireによる胸腺内抗原提示細胞の機能制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of thymic antigen presenting cells regulated by Aire in the negative selection

研究代表者

毛利 安宏 (MOURI, Yasuhiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：80464353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の原因遺伝子であり、胸腺髄質上皮細胞に発現しているAireが、胸腺における自己反応性T細胞の除去過程において、どのような抗原提示細胞を制御しているのかをイメージング解析や各種移植実験によって検討した。その結果、Aireは胸腺髄質上皮細胞自体の抗原提示を制御しているというよりはむしろ、B細胞・樹状細胞といった骨髄由来の細胞の抗原提示を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺における自己反応性T細胞の除去過程のメカニズムに関する理解は、自己免疫疾患の発生過程や病態形成を知る上で重要である。我々はこの過程においてAireがどのような抗原提示細胞を制御しているかに焦点を当てて研究を行った。これらの結果は胸腺における自己反応性T細胞の除去過程の学術的な知見にとどまらず、ヒトAIRE欠損症の発生メカニズムを理解する上で重要な知見であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The regulation mechanism of negative selection by Aire remains elusive. Especially it is important which type of antigen presenting cells (APCs), medullary thymic epithelial cells (mTECs) or bone marrow (BM)-derived cells, are regulated by Aire in the negative selection. We have approached these issues by generating two different types of transgenic mouse (Tg) model, which express a prefixed model self-antigen driven by the insulin promoter or the Aire promoter. In the insulin-promoter Tg model, imaging analysis showed the dispensable role of Aire in cognate interaction between mTECs and autoreactive T cells. In the Aire-promoter Tg model, both mTECs and BM-derived APCs could independently induce clonal deletion. And production of Tregs by BM-derived APCs, which express and present the self-antigen, was impaired by the lack of Aire in mTECs, but not in BM-derived APCs. These results suggest that Aire regulates antigen presenting processes in BM-derived APCs rather than mTECs.

研究分野：免疫学

キーワード：Aire 負の選択 胸腺髄質上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腺髄質上皮細胞 (medullary Thymic Epithelial Cell : mTEC) は様々な組織特異抗原 (tissue-specific antigen : TSA) を転写しており、AIRE (AutoImmune Regulator) 遺伝子が mTEC における TSA 発現を制御していることが明らかとなっている。AIRE/Aire を欠損するヒトおよびマウスは、自己免疫疾患を発症する。また、Rat Insulin promoter (RIP) 制御下で Ovalbumin (OVA) 抗原を発現する Tg (RIP-OVA Tg) と、OVA 特異的 T 細胞レセプター (TCR) の Tg (OT2 Tg) の double-Tg (dTg) モデルを用いた研究から、Aire を欠損すると負の選択が障害されることが明らかとなっている。このような一連の研究から、Aire は mTEC における TSA 発現を介して自己反応性 T 細胞の負の選択を制御しているという仮説が広く受け入れられている。しかし、RIP-OVA モデルの OVA 発現は Aire 欠損下でも正常であり、なぜ Aire 欠損下で RIP-OVA : OT2 dTg モデルの負の選択が障害されるのかは明確にはなっていない。我々は、MHC II を欠損する OT2 Tg の腎皮膜下に RIP-OVA Tg の胸腺を移植すると、負の選択が障害されるという結果を得ている。他のグループも骨髄移植を用いて同様の結果を報告しており、これらの結果から、RIP-OVA モデルにおける OT2 T 細胞の負の選択には骨髄由来抗原提示細胞 (BM-APC) の抗原提示が必要であることが示唆されている。この dTg モデルにおいて Aire 欠損で負の選択が障害されること、負の選択に BM-APC が必要であることから、Aire は BM-APC の抗原提示を制御している可能性が示唆されるが、そのメカニズムに関しては不明確な点が多い。また、RIP-OVA モデルにおける OVA 抗原のソースは mTEC であると考えられており、そのことから mTEC から BM-APC へと抗原が受け渡されるというメカニズムも考えられている。

我々は RIP-OVA Tg に加えて Aire promoter 下で OVA を発現する Aire/OVA-KI マウスを複製・解析しており、こちらは Aire 欠損下でも正常に OT2 T 細胞の負の選択が起きることがわかっている。また、Aire/OVA モデルは前述の胸腺移植の実験系から mTEC 自身の抗原提示のみで負の選択が起きることが明らかとなっている。このように抗原モデルによって負の選択における Aire の必要性、抗原提示に必要な細胞種が異なるという複雑な状況もあり、負の選択において Aire がどのような役割を果たしているかの統一的な見解は得られていない。

Hsieh らのグループは従来の抗原と TCR の dTg とは異なるアプローチで、Aire と負の選択に関する興味深い報告を行っている (*Immunity*. 41:414 2014)。彼らは TCRβ鎖を固定し TCR Vα2 鎖のシーケンスをするという手法で、

Aire は mTEC による抗原提示を制御する

Aire は骨髄由来抗原提示細胞 (BM-APC) による抗原提示を制御する

という 2 つの結果を導いている。

このように Aire による負の選択制御に関する研究は、解析アプローチによって様々な結果が得られるために未だに解決されていない点が多い問題である。また、ヒトでは解析が難しく負の選択障害が Aire 欠損症における病態形成に本当に関わっているのかさえよくわかっていない。このような背景から本研究では、2 種類の抗原モデル (RIP-OVA, Aire/OVA) を用いて Aire がどのように負の選択を制御しているかについて様々な角度から検討を行った。

2. 研究の目的

前述のような背景を受けて Aire がどのように負の選択を制御しているのかを明らかにする目的で、以下の 2 点に焦点を当てて研究を行っている。

- (1) Aire は mTEC による抗原提示を制御しているか？
- (2) Aire は胸腺において BM-APC の抗原提示を制御しているか？
制御しているならそれはどの細胞種か (B 細胞か樹状細胞か)？
制御しているならそれはどのようなメカニズムによるか？

どの抗原提示細胞種が Aire の影響を受けるかという問題は、Aire 欠損下で生じる自己反応性 T 細胞がどの抗原を認識しているのかということと密接に関わっており、Aire 欠損における病態形成を考える上で重要な問題である。

3. 研究の方法

目的(1)に関して

抗原を発現する mTEC と抗原特異的 T 細胞の相互作用を、2 光子顕微鏡を用いたイメージングによって解析した。具体的には RIP-OVA Tg マウスの胸腺スライス上で OVA 特異的な OT2 T 細胞を培養し、イメージング解析を行った。Aire 発現 mTEC を可視化するため、RIP-OVA Tg は Aire promoter 下で GFP を発現する Aire/GFP-KI マウスと交配し、Aire 欠損状態のマウス、RIP-OVA Tg : Aire (gfp/gfp) も同時に解析した。

目的(2)に関して

研究背景で述べたように RIP-OVA モデルにおける負の選択は Aire と BM-APC の抗原提示を

両方必要とし、間接的には Aire が BM-APC の抗原提示を制御しているモデルと言える。そこで、目的(2)- を解析するために B 細胞欠損、樹状細胞欠損の RIP-OVA : OT2 dTg を作製し、それらのマウスにおける負の選択を検討した。

目的(2)- に関しては、2 種類のアプローチを取った。1 つ目のアプローチとして RIP-OVA Tg において mTEC から BM-APC への抗原受け渡しが起こるかどうかを検討した。前述の通り RIP-OVA モデルは負の選択に BM-APC の抗原提示を必要とするが、OVA 抗原を発現しているのは mTEC である。つまり BM-APC は何らかのかたちで mTEC の発現する OVA を取り込まなければならない。このような抗原受け渡しを評価するためには、mTEC が抗原を発現しているが抗原提示はできない、そして BM-APC のみが抗原提示能を有するというモデル系を作成する必要がある。そこで MHC II が欠損した RIP-OVA Tg に正常骨髄を移植し、このキメラマウスの胸腺スライス上で OT2 T 細胞を培養し、制御性 T 細胞の発達を指標として BM-APC による抗原提示を検討した。

(2)- に関する 2 つ目のアプローチとして、OT2 Tg かつ Aire/OVA-KI の骨髄を野生型、もしくは Aire-KO マウスに移植し、そのキメラマウスにおける負の選択・制御性 T 細胞分化を検討した。本研究において Aire/OVA-KI は RIP-OVA Tg と異なり、mTEC だけではなく BM-APC 自身も OVA を産生していることが明らかとなった。そこで、BM-APC が自身の発現する抗原を提示する過程が、Aire 欠損の影響を受けるかどうかを、Aire/OVA-KI の骨髄移植を用いた実験系で評価した。

4. 研究成果

まず Aire が mTEC の抗原提示を制御しているか(目的(1))に関する結果を示す。イメージング解析の結果から我々の用いたモデルでは Aire 欠損下でも mTEC は正常に抗原提示できることが明らかとなった。この実験系では、右図に示したように GFP 陽性の Aire 発現 mTEC が提示する OVA 抗原とそれを認識する OT2 T 細胞のクラスターが形成され(抗原がない場合は形成されない)、クラスター形成によって mTEC の抗原提示能を評価することができる。

このクラスターは Aire 欠損下であっても正常に形成され、クラスターの数もコントロールと同程度であった。この結果から、Aire 欠損 mTEC であっても OVA 抗原を正常に提示していること、つまり Aire は mTEC の抗原提示能に影響を与えないことが示唆された。

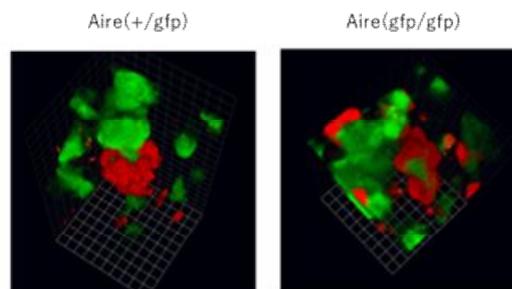


図1. OT2 T細胞とmTECのクラスター形成

目的(2)- を明らかにする目的で B 細胞欠損下、樹状細胞欠損下それぞれにおいて RIP-OVA 抗原による OT2 T 細胞の負の選択を評価した結果、意外なことにどちらの場合も正常に負の選択が起きた。この結果から、RIP-OVA モデルの負の選択には B 細胞・樹状細胞両者が重複して関わっている可能性、もしくは B 細胞・樹状細胞以外の別の細胞種が関わっている可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、B 細胞・樹状細胞の両者を欠損させた状態で負の選択を評価する必要がある。また、後述するようにこのモデルにおいて BM-APC は本当に OVA 抗原を提示しているのか? という新たな疑問も生じたため、どの細胞種が何をしているのかを詳細に検討する必要があると思われる。

目的(2)- に対する最初のアプローチである mTEC から BM-APC への抗原受け渡しを評価する実験系でも予想と異なる結果が得られている。まず RIP-OVA Tg に正常骨髄を移植したキメラマウス (mTEC も BM-APC も正常に抗原提示できる状態) を作製し、このキメラの胸腺スライス上で OT2 T 細胞を培養すると、OT2 T 細胞が抗原を認識した結果、制御性 T 細胞が分化してくる。そこで次に MHC II 欠損 RIP-OVA Tg に正常骨髄を移植し、BM-APC のみが抗原提示できる状態を作製し、そのキメラの胸腺スライス上で OT2 T 細胞を培養した。その結果、制御性 T 細胞はほとんど分化してこなかった。このことは RIP-OVA モデルでは、抗原発現 mTEC の存在下でも BM-APC の抗原提示のみでは負の選択が正常に起きない可能性を示唆している。前述のイメージング解析の結果、OT2 T 細胞とクラスターを形成するのは専ら Aire 発現 (抗原発現) mTEC であり、BM-APC と T 細胞の相互作用は観察されていない。mTEC による RIP-OVA 抗原の提示はイメージングによって観察されているにも関わらず、胸腺移植の解析では mTEC 単独の抗原提示では負の選択が起きない。また、胸腺スライス実験では BM-APC 単独の抗原提示では負の選択は起きない。これらの結果は、mTEC と BM-APC 両者の抗原提示が RIP-OVA モデルの負の選択に必要なことを示唆している。特にイメージング解析からは BM-APC は本当に OVA を提示しているか? という疑問も生じ、このモデルにおける負の選択が様々な細胞の相互作用を必要とする複雑なものであることが想像される。

目的(2)- に対する 2 つ目のアプローチである OT2 Tg かつ Aire/OVA-KI の骨髄を Aire-KO マウスに移植した実験では興味深い結果が得られている。我々は胸腺移植から Aire/OVA-KI モデルでは mTEC の抗原提示のみで OT2 T 細胞の負の選択を誘導できることを観察している

が、逆に BM-APC の抗原提示のみで負の選択が起きるのかをまず検討した。そのために OT2 Tg かつ Aire/OVA-KI の骨髄を正常マウスに移植し、そのキメラマウスの胸腺中で負の選択が起きるかどうかを検討した。その結果、キメラマウスの胸腺中では OT2 T 細胞の負の選択が起きることがわかった。RIP-OVA のモデルと異なり、Aire/OVA のモデルでは BM-APC 自身が抗原を発現し、それを BM-APC が抗原提示することにより負の選択が起きたと考えられる。この特性を利用して、BM-APC が自身の発現する抗原を提示する過程が Aire によって影響を受けるかどうかを検討した。Aire/OVA-KI : OT2 の骨髄を Aire-KO マウスに移植した場合、野生型をレシピエントとした場合と比較して制御性 T 細胞の産生が減少した。この結果は、mTEC に発現している Aire が抗原受け渡しとは全く異なるメカニズムで BM-APC の抗原提示を制御している可能性を示唆する興味深いものである。

以上の一連の解析から、我々のモデルでは

(1) Aire は mTEC の抗原提示能にはあまり影響しない

(2) Aire は BM-APC の抗原提示を抗原受け渡しとは異なるメカニズムで制御する

という結果が得られた。mTEC と BM-APC それぞれが単独で負の選択を行える場合 (Aire/OVA) 負の選択に mTEC と BM-APC の協調的な抗原提示が必要な場合 (RIP-OVA) など負の選択モデルによって必要とされる抗原提示細胞種が異なっており、Aire がどのような場合に必要とされるのかを明らかにする必要がある。このような知見は Aire 欠損によってどのような自己反応性 T 細胞レパトアが形成されるか、そしてどのように病態が形成されるかを知る上で重要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nishijima H, Kajimoto T, Matsuoka Y, Mouri Y, Morimoto J, Matsumoto M, Kawano H, Nishioka Y, Uehara H, Izumi K, Tsuneyama K, Okazaki IM, Okazaki T, Hosomichi K, Shiraki A, Shibutani M, Mitsumori K, Matsumoto M.

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of autoimmune regulator (AIRE).

J Autoimmun. 86:75-92. (2018)

doi: 10.1016/j.jaut.2017.09.006.

査読あり

Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M. Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen.

J Immunol. 199:3959-3971. (2017)

doi: 10.4049/jimmunol.1700892.

査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

毛利 安宏

Aire による負の選択制御機構の解析

第 26 回 Kyoto T cell Conference (KTCC) 比叡山延暦寺会館(滋賀県大津市) 2016 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。