

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07370

研究課題名(和文)自己免疫寛容にかかわる新規因子の解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel factor involved in immune tolerance

研究代表者

吉田 英行(Yoshida, Hideyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80800523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの免疫系は病原体には反応しますが、私たち自身には反応しません。この仕組みは自己免疫寛容と呼ばれ、様々な機構で成立しています。私は、Zfp3611とZfp3612という遺伝子が自己免疫寛容に重要と考え、それを検証するために培養細胞やマウスを用い、RNA-seq法による遺伝子発現解析を中心に実験を行いました。その結果、Zfp3611とZfp3612の発現に伴い自己免疫寛容に関連する遺伝子の発現変化が観察され、これらの遺伝子の作用を確認することができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫寛容の異常は関節リウマチや1型糖尿病といった様々な自己免疫疾患を惹起する原因ともなります。したがって、自己免疫寛容を成立させるメカニズムの解明は自己免疫疾患への理解を深め、発症予防や治療方法を発展させるうえで重要です。本研究は、自己免疫寛容に重要と考えられる新しい遺伝子を実験により実証したものであり、自己免疫疾患の理解を深めることに役立つものです。また、将来的には人々の健康増進へ貢献する研究への発展も期待できるものです。

研究成果の概要(英文)：Our immune system responds to pathogens but does not attack our body. The immune tolerance is the prevention of a response against self-antigens, which is maintained by multiple mechanisms including the negative selection of T cells where a bunch of self-antigens are expressed in thymus and the developing T cells are eliminated if they react to these self-antigens. I hypothesized that Zfp3611 and Zfp3612 are novel factors important for the regulations of self-antigens in thymus and investigated their significance employing a cell line and a mouse model. I performed the gene expression analysis by RNA-seq and found the expressions of self-antigen genes were obviously affected by Zfp3611 and Zfp3612 both in a cell line and a mouse model, which indicated that they are involved in the regulators of self-antigen genes.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫寛容 負の選択 胸腺上皮

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

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性を維持するため、免疫システムは病原微生物などに応答し、その排除に働きます。様々な病原微生物にもれなく応答するため、免疫細胞は遺伝子のランダムな再構成により多様性を獲得しますが、自己を構成する分子に対する応答は有害であり抑制される必要があります。この自己に対する不応答は自己免疫寛容と呼ばれ、生体内において複数のメカニズムにより成立しています。

自己免疫寛容を形成、維持する代表的な機構の一つが自己反応性リンパ球の負の選択です。胸腺で増殖、分化成熟する未熟T細胞のうち、胸腺ストローマ細胞が提示する自己抗原ペプチドとMHC分子との複合体を強く認識した細胞はアポトーシスにより除去(=負の選択)されます。胸腺上皮細胞では、膵臓特異的に発現するインスリンや皮膚特異的なケラチンといった組織特異的自己抗原(peripheral tissue antigen: PTA)の遺伝子の発現が認められ、様々な自己抗原に対して幅広く、もれなく負の選択が行われていると考えられています。

組織特異的自己抗原の発現異常は、自己免疫寛容を棄損し自己免疫疾患につながるものであり、その発現メカニズムは精力的に研究されてきました。その結果、これまでのところ、Aire(autoimmune regulator)やFezf2(forebrain embryonic zinc finger 2)といった転写因子による発現誘導が明らかになっています。しかしながら、約40%の組織特異的自己抗原の発現はこのどちらにも依存せず、組織特異的自己抗原の発現メカニズムの全容解明にはいたっていません。

2. 研究の目的

私は各種データベースを用い、バイオインフォマティクスを活用したin-silicoスクリーニングを行い、Zfp3611, Zfp3612を組織特異的自己抗原の発現に関わる候補遺伝子として同定しました。これらはRNAの分解に働くことが知られていましたが、Zfp3611とZfp3612両者の発現低下が胸腺上皮細胞特異的に認められ、この発現低下が、組織特異的自己抗原の発現に関与していることが考えられました。そこで、Zfp3611, Zfp3612の組織特異的自己抗原発現への関与を実験により検証するため、本研究を実施しました。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた予備実験

Zfp3611, Zfp3612はRNA結合タンパク質であり、特定の配列を持つmRNAに結合し、それらを分解へ導くことが知られていますが、これまでの研究ではサイトカイン遺伝子等の発現調整に焦点があてられており、ターゲット遺伝子の全体像は不明でした。また、胸腺での組織特異的自己抗原の発現は数千遺伝子にもおよびますが、報告されているZfp3611やZfp3612の作用メカニズムから考えると、それほど多くの遺伝子発現に影響を及ぼすことは想定しづらく、また、動物愛護の観点からも(2)の実験を実施する前に、Zfp3611やZfp3612のターゲットとなりえるmRNAを調べる予備実験を行うのが適当と考え、培養細胞でZfp3611やZfp3612を過剰発現させ、それらに伴うRNAの変化をRNA-seqにより網羅的に調べました。

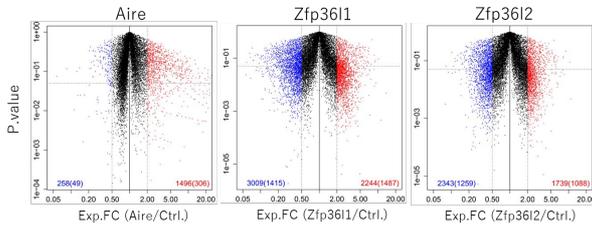
(2) マウスモデルを用いた実験

自己免疫寛容の成立には様々な細胞の連携が必要となるため、ある遺伝子の自己免疫寛容における働きを実証するには、生体を利用した実験が必要となります。マウスはヒトに極めて近い免疫系をもっており、マウスモデルを用いた実験は、Zfp3611やZfp3612の生体での機能を検証する上で非常に有用と考えられました。そこで、Zfp3611やZfp3612の胸腺上皮細胞特異的な発現低下が、組織特異的自己抗原の発現や自己免疫寛容へ及ぼす作用を調べるため、胸腺上皮細胞特異的に外来性のZfp3611, Zfp3612が発現し、元々の発現低下がキャンセルされるマウスモデルを作成しました。自己免疫寛容への影響を総合的に解析するには、マウスの表現型を経時的に追う必要があり、時間を要します。そこで、まずは組織特異的自己抗原の発現への影響を調べるため、RNA-seq法により網羅的遺伝子発現解析を行いました。

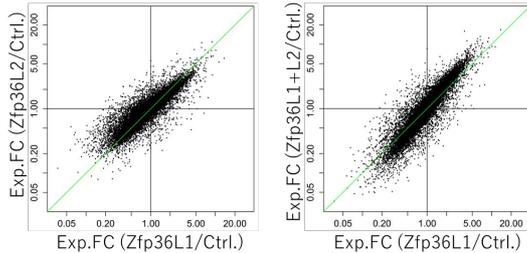
4. 研究成果

(1) Zfp3611, Zfp3612の過剰発現による遺伝子発現の変化(培養細胞)

Zfp3611, Zfp3612の一方あるいは両者のcDNAをトランスフェクションによりHEK293細胞へ導入し、48時間後にRNAを回収、RNA-seqによる遺伝子発現解析を行ったところ、これらの影響を受けるRNAは数千におよび、その数はAireの過剰発現により発現が誘導されるRNAよりも多いことが分かりました(図1)。また、Zfp3611とZfp3612を比較すると、ターゲットとなるRNAはほぼ同じであるものの、Zfp3611の方が影響の程度が大きく、さらにZfp3611とZfp3612両者の過剰発現がもっとも変化の程度が大きいことが分かりました(図2)。これらの結果は、多くのRNAがZfp3611とZfp3612のターゲットとなりえることと、また、それらターゲットの最大限の変化にはZfp3611とZfp3612の両者が必要であることを示唆するものでした。



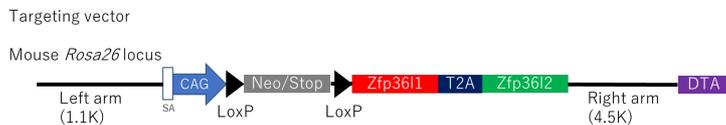
(図 1) Zfp3611, Zfp3612 の過剰発現による遺伝子発現の変化
横軸が遺伝子発現変化 (fold-change)、横軸が P-value (t. test) を示す。2 倍以上の変化があった遺伝子を赤色もしくは青色で表示



(図 2) Zfp3611 と Zfp3612 の比較
遺伝子発現変化を fold-change により表示。緑色の直線は $x=y$ を表す。

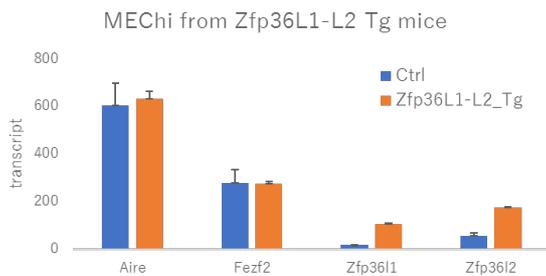
(2) マウスモデルの樹立ならびに遺伝子発現解析

培養細胞を用いた研究の結果より、Zfp3611 と Zfp3612 の両者を胸腺上皮細胞で発現させることとし、ES 細胞を用いた相同組み換えにより ROSA26 領域へ CAG-loxP-STOP-loxP-Zfp3611-T2A-Zfp3612 の DNA 断片が組み込まれたマウスを作成しました (図 4)。さらに、このマウスを Foxn1-cre マウスと交配することで、胸腺上皮細胞で Zfp3611 と Zfp3612 が外来性に発現するマウスを樹立しました。



(図 4) 相同組み換えを起こすために使用したターゲティングベクター

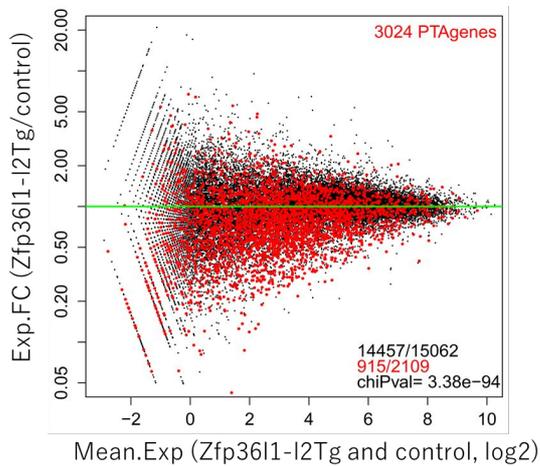
この遺伝子改変マウスはメンデルの法則に従って誕生し、5 週齢まで、外見・行動上の表現型なく成長しました。5 週齢で安楽死処置を行った後、胸腺を摘出し上皮細胞の解析を行ったところ、フローサイトメトリーでの解析では胸腺上皮細胞の細胞集団の割合、細胞数の変化は認められませんでした。次に、胸腺上皮細胞を FACS ソーティングにより単離し、RNA レベルでの変化を RNA-seq 法により解析を行いました。遺伝子改変マウスの細胞では、Zfp3611 と Zfp3612 の発現が期待通りに増加し、一方、組織特異的自己抗原の発現に働くことが知られている転写因子 Aire および Fezf2 の発現は変化していませんでした。(図 5)



(図 5) 遺伝子改変マウスにおける Zfp3611 と Zfp3612 の発現増強
コントロールマウス (青) および今回樹立した遺伝子改変マウス (橙) から単離された胸腺上皮細胞での各遺伝子の発現を図示。

一方、胸腺上皮細胞で発現が誘導される組織特異的自己抗原の発現はこの遺伝子改変マウスでは顕著に発現低下していることが認められ ($P\text{-value}=3.38 \times 10^{-94}$, カイ二乗検定) Zfp3611 と Zfp3612 は胸腺上皮細胞において組織特異的自己抗原の発現を負に制御していると考えられました。(図 6)

培養細胞、マウスモデルともに、Zfp3611 と Zfp3612 が組織特異的自己抗原の発現に関わっている可能性を示唆するものでした。今後さらなる研究により、Zfp3611・Zfp3612 と自己免疫寛容の関連が明らかになることが期待されます。



(図 6) Zfp3611・Zfp3612 の発現増強と組織特異的自己抗原の発現
 コントロールマウスおよび Zfp3611/12 の発現が増強する遺伝子改変マウスより単離した胸腺上皮細胞の遺伝子発現を比較。横軸をこれらマウスの平均、縦軸を fold-change として、検出された全遺伝子を表示。組織特異的自己抗原の遺伝子を赤色で強調。

5 . 主な発表論文等

なし。不明な部分が残り、論文発表等には追加実験が必要と考えます。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 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 0 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。