

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23846

研究課題名(和文) AGFマウスを用いた、Aire発現樹状細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Aire expressing dendritic cell with AGF mice.

研究代表者

宮澤 龍一郎 (MIYAZAWA, Ryuichiro)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：70848374

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)： AIRE欠損患者では、自己免疫疾患の症状に加え口腔カンジダ症を発症するが、その原因は依然不明な点が多い。本研究では免疫系における司令塔である樹状細胞で発現するAIREが、口腔カンジダ症の制御に重要な役割を持つと仮定し、AIRE発現樹状細胞の機能解析を実施した。本研究により、AIRE発現樹状細胞はカンジダ感染症に重要なTh17細胞の誘導を行い、AIRE欠損状態ではその機能の低下傾向を示した。また、胸腺髄質上皮細胞でAIRE依存的に認められる自己抗原は発現せず、AIREは胸腺とは異なる機能を樹状細胞で持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺髄質上皮細胞で発現するAIREは、免疫システムの根幹である自己・非自己の教育を行う重要な遺伝子であり、その機能の全容解明が求められている。本研究において樹状細胞におけるAIREの機能を示したことは、AIREに関する知見の拡充に繋がると考えられる。更に、AIRE欠損症を始め多くの免疫疾患では、カンジダを始めとする常在細菌への感染が認められるが、AIRE欠損症における口腔カンジダに対する新たな治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Though APECED patients show autoimmune and candida albicans infection, there are still many unclear points about the cause. In this study, we hypothesized that AIRE expressed in dendritic cells plays an important role in the control of oral candidiasis. Therefore, we analyzed the immune system of AIRE expressing dendritic cell against candida albicans. We found that AIRE expressing dendritic cell showed lower response against candida albicans in the AIRE deficient condition. In one hand, AIRE expressing dendritic cell showed no expression of tissue-restricted antigens expressed in medullary thymic epithelial cell. These results indicate that AIRE in dendritic cell has different function to AIRE in medullary thymic epithelial cell.

研究分野：免疫学

キーワード：Aire 樹状細胞 カンジダ・アルビカンス

## 1. 研究開始当初の背景

AIRE は胸腺髄質上皮細胞(mTEC)に発現する転写調節因子であり、組織特異的自己抗原の発現に関与することにより、自己反応性T細胞の除去(負の選択)に寄与する。このAIRE 遺伝子を欠損した患者では、自己免疫疾患の発症が認められることから、免疫機構の根幹形成に重要な因子として位置付けられる。しかし、AIRE の機能には未だ不明な点が多く、全容解明には至っていない。

このAIRE 遺伝子を欠損したAIRE 欠損患者は北欧に比較的多く存在し、粘膜皮膚カンジダ症、副甲状腺機能低下症、副腎不全(アジソン病)、外胚葉形成異常などを示す。その特徴的な症状の頭文字をとり、APECED(Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal syndrome)とも呼ばれる。これらの症状とAIRE 欠損との関係性の全容は解明されておらず、特にAIRE 欠損症の最初の兆候であるカンジダ症は、その原因に関して依然議論の余地がある。

口腔カンジダ症の原因となるカンジダ・アルビカンスには、Th17 を中心とした免疫機構が重要である。これまで、AIRE 欠損症におけるカンジダ症の発症原因として、Th17 細胞から分泌されるIL-17 に対する自己抗体の産生が考えられた(引用論文)。しかしながら、自己抗体の産生が認められないAIRE 欠損患者においても口腔カンジダ症が発生することから(引用論文)自己抗体以外の要因も考えられる。

近年、末梢リンパ節においてAIRE を発現する樹状細胞(DC)が同定された。DC は免疫システムを活性化する免疫系の司令塔であり、ナイーブT細胞をTh1 や Th2、Th17 へと誘導する。そのため、AIRE 欠損患者では、DC によるTh17 誘導に関する機能不全が生じていることが考えられる。そこで本研究では、AIRE を発現するDC がTh17 誘導において重要な役割を担い、AIRE 欠損状態ではその機能不全を起こすと仮定し、AIRE 発現DC の機能解析を実施した。

## 2. 研究の目的

AIRE 欠損症では、mTEC におけるAIRE 欠損に伴い自己抗原遺伝子の発現が低下し、負の選択に障害をきたす。一方、AIRE 欠損症では多くの症例において、自己免疫疾患の発症に先立ち口腔カンジダ症を発症するが、その原因には依然不明な点がある。そこで、本研究では、リンパ節に存在するAIRE 発現DC が、カンジダに対する免疫応答に重要な役割を担うと仮定し、AIRE 発現DC の機能の解明を目的とする。

(1)AIRE は胸腺上皮細胞において自己抗原遺伝子の発現に関与するが、AIRE 発現DC においてもAIRE が自己抗原遺伝子の発現に関与するか明らかにする。

(2)Th17 誘導におけるAIRE 発現DC の機能解析を明らかにする。

(3)AIRE 発現DC においてAIRE を欠損した場合に生じる変化から、AIRE 発現DC におけるAIRE の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

human AIRE-GFP-Flag tag ノックインマウス(AGF マウス)は、好感度AIRE レポーターマウスで

あり、抗体などでは検出が難しい微弱な AIRE の発現を GFP のシグナルにより検出することが可能である。更に、片方のアレルに AGF 融合遺伝子を持つ +/KI 個体では、GFP のシグナルとともに、内在性の AIRE の発現を認める。一方、両アレルに AGF を持つ KI/KI 個体では、AIRE 遺伝子が AGF に置き換わり AIRE 欠損状態になるが、GFP のシグナルにより AIRE 発現運命にあった細胞の検出が可能である。つまり、+/KI 個体と KI/KI 個体の AIRE 発現 DC の機能を比較することは、AIRE 発現運命にあった DC の AIRE 欠損による影響を直接的に比較することが可能である。

そこで本研究では AGF マウスをモデルに、以下の研究を遂行する。

( 1 ) AIRE 発現 DC と AIRE を発現しない DC の表面分子や局在を比較することで、AIRE 発現 DC の特徴を明らかにする。更に、リンパ節より AIRE 発現 DC を FACS ソートにより回収し、胸腺上皮細胞で AIRE 依存的な自己抗原遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により解析する。

( 2 ) Th17 誘導における AIRE 発現 DC の機能解析を実施する。DC は白血球中に占める割合が低く、詳細な解析を行うためには、骨髓細胞を培養し AIRE 発現 DC を誘導することが必要である。そこで、GM-CSF などのサイトカイン含有培地で骨髓細胞培養し、AIRE 発現 DC の誘導を行う。更に、骨髓細胞より誘導した AIRE 発現 DC を FACS ソートにより回収し、カンジダ抗原によりプライミングを行なったマウスの CD4+T 細胞と共培養を行ない、Th17 への誘導に関する機能解析を実施する。

( 3 ) 上記の解析により AIRE 発現 DC の機能を明らかにするとともに、AGF +/KI マウスと AIRE 欠損状態となる AGF KI/KI マウスとの比較を行うことで、AIRE 発現 DC における AIRE の機能を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) AIRE 発現 DC の局在及び発現分子の特徴

AIRE 発現 DC は全身の末梢リンパ節及び脾臓に認められ、特に口腔の所属リンパ節である頸部リンパ節でその割合が最も多かった。また、リンパ節では T 細胞領域において AIRE 発現 DC の多くが局在することが明らかになった。更に、AIRE 発現 DC は AIRE を発現しない DC と同様に MHC-2 や CD86 などの抗原提示に関連する分子を多く発現することが明らかになった。また、カンジダ感染において重要な役割を担う Mincle は AIRE 発現 DC で多く発現することも明らかになった。一方、AIRE 欠損状態となる AGF KI/KI マウスにおいてもこれらの分子の発現レベルは大きく変動することはなかった。

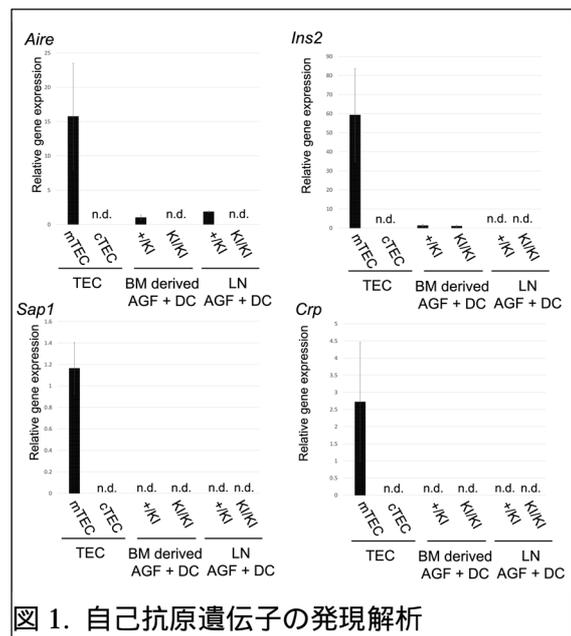


図 1. 自己抗原遺伝子の発現解析

##### ( 2 ) AIRE 発現樹状細胞において AIRE は自己抗原遺伝子には関与しない

AIRE 発現 DC を FACS ソートにより回収し、自己抗原遺伝子(Ins2, Sap1, Crp)の発現解析を実

施したところ、陽性コントロールの mTEC に比べ AIRE 発現 DC における自己抗原遺伝子の発現は弱く検出限界以下であった(図 1)。また、AIRE の発現レベルも mTEC に比べ非常に低い値を示した。この結果は、AIRE が DC において mTEC とは異なる機能を担うことを示している。

### (3) Th17 誘導に着目した AIRE 発現 DC の機能解析

GM-CSF などのサイトカインを用いて骨髓細胞より誘導した AIRE 発現 DC を FACS ソートにより回収し、予め In vivo でカンジダ感染もしくはカンジダの精製抗原によるプライミングを行なった個体の CD4+T 細胞と共培養し、抗原特異的な Th 誘導の評価を行なった。カンジダ感染を行なった CD4+T 細胞との反応では、抗原特異的に Th17 を誘導することが明らかになった(図 2 上)。一方、カンジダ精製抗原でプライミングを行なった場合でも、Th17 の顕著な上昇が認められた(図 3 上)。更に、内在性 AIRE が欠損状態になる AGF KI/KI マウス由来 AIRE 発現 DC では、有意に Th17 誘導能が低下することが明らかになった(図 3 下)。

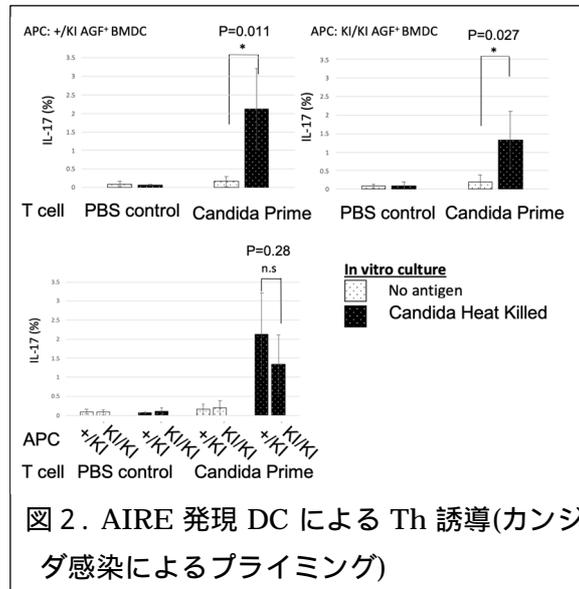


図 2. AIRE 発現 DC による Th 誘導(カンジダ感染によるプライミング)

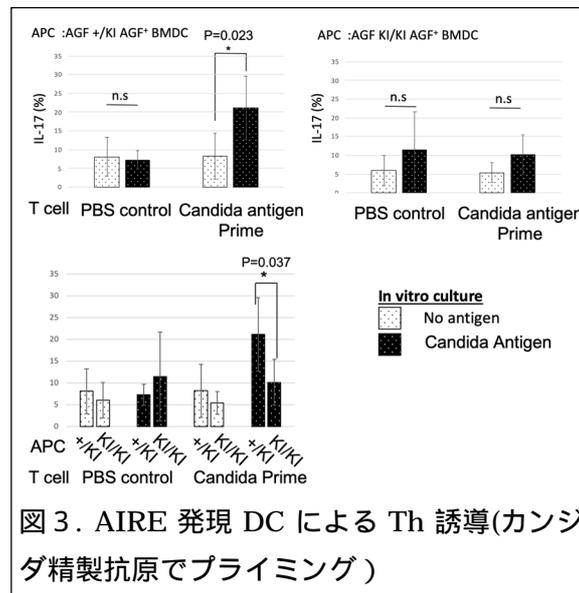


図 3. AIRE 発現 DC による Th 誘導(カンジダ精製抗原でプライミング)

### <引用論文>

Kisand et al., *J Exp Med*, 207 (2), 299-308, 2010.

Ferre et al., *JCI Insight*, 18; 1(13), e88782, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田晃志 宮澤龍一郎 松本穰 松本満
2. 発表標題 AIRE発現樹状細胞の機能解析
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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