

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591437

研究課題名(和文) AIRE 遺伝子導入 NOD マウスにおける糖尿病抑制機構の解析

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms for the prevention of diabetes in NOD mice by AIRE expression

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：AIRE欠損によって臓器特異的自己免疫疾患を発症することから、AIREの過剰発現が自己免疫疾患の病態修復に働く可能性を検討した。すなわち、1型糖尿病のモデルマウスであるNODマウス受精卵にヒトAIRE遺伝子を導入し、AIREの過剰発現によって糖尿病発症の阻止を試みた。マイクロインジェクションによって樹立した4ラインのAIRE-Tg/NODのうち、導入ヒトAIRE遺伝子の発現レベルがもっとも高かった1ラインにおいて、糖尿病の発症が阻止された。AIRE過剰発現による糖尿病抵抗性獲得機構の解明によって、自己寛容の成立機構におけるAIREの役割が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Because AIRE deficiency results in the development of organ-specific autoimmune disease, we attempted to prevent the development of autoimmune diseases by the overexpression of AIRE gene. For this purpose, we introduced human AIRE gene into the oocytes obtained from NOD mice, a strain that spontaneously develops type I diabetes. One line, which showed highest expression of human AIRE, out of four, showed resistance to the development of diabetes. It might be possible to unravel the roles of AIRE in the establishment of self tolerance by studying the mechanisms how overexpressed AIRE could prevent the autoimmunity in this experimental system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：糖尿病 自己免疫 NOD AIRE

1. 研究開始当初の背景

免疫学における最重要課題の一つである「自己免疫疾患の原因究明」のための大きな糸口となる素材が、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、北欧に多数の疾患家系が存在す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。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 遺伝子の発現は成熟過程にある T 細胞との直接の接触によって自己寛容 (self tolerance) の成立機構に関わる胸腺髄質上皮細胞 (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により自己免疫疾患の基本概念を検証できるのみならず、免疫システムの根幹をなす「自己・非自己の識別機構」の根本原理を一挙に解明できる可能性がある。

2. 研究の目的

遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE の機能解明は自己免疫疾患の原因究明に大きく貢献すると考えられるが、胸腺上皮細胞に発現する AIRE が、一体どのような作用によって自己寛容の成立に働くかについては依然不明な点が多い。本研究ではヒト AIRE cDNA を NOD マウス受精卵に導入して作製した AIRE-Tg/NOD における糖尿病発症阻止作用のメカニズムを解明する。さらに分子生物学的アプローチによって AIRE の標的遺伝子を同定し、AIRE 機能の全貌解明を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

AIRE 欠損が自己免疫疾患の発症をもたらすことから、AIRE の過剰発現が自己免疫疾患の病態修復に働く可能性が考えられる。そこで申請者らは 1 型糖尿病のモデルマウスである NOD マウス受精卵にヒト AIRE 遺伝子を導入し、AIRE の過剰発現によって糖尿病の発症が阻止できるか否かを検討した。AIRE 遺伝子導入にあたっては、AIRE 本来の発現組織である胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) で十分な発現が得られることを企図して MHC class II プロモーターを選択した。こうしてヒト AIRE cDNA を NOD マウス受精卵に導入することによって 4 ラインの AIRE-Tg/NOD を樹立した。

4. 研究成果

(1) AIRE トランスジェニック NOD マウスにおける糖尿病抵抗性獲得機構の検討

ヒト AIRE cDNA を NOD マウス受精卵に導入することによって 4 ラインの

AIRE-Tg/NOD を樹立した。大変興味深いことに、導入ヒト AIRE 遺伝子の発現レベルがもっとも高かった 1 ラインにおいて、糖尿病の発症が完全に阻止された (図 1: AIRE-Tg/NOD; 対照 non-Tg/NOD)。

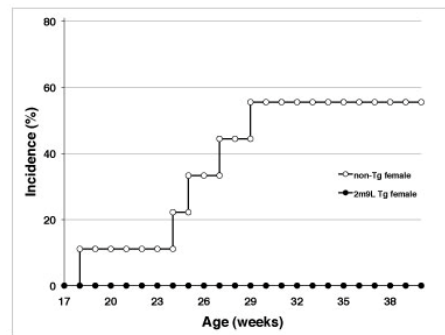


図 1. AIRE-Tg における糖尿病発症率

この糖尿病阻止作用が、導入遺伝子による内在ゲノム遺伝子の破壊 (insertional mutagenesis) によるものでないことは、本ラインにおける導入遺伝子のゲノム挿入点の決定によって確認した。すなわち、導入遺伝子は片側のアレルにのみ存在し、かつ遺伝子挿入点には明らかな遺伝子は存在しなかった。

他方、AIRE 欠損 NOD マウスでは臓器特異性の変化から膵ラ氏島病変にかわり膵腺房細胞の完全破壊を認めるが、AIRE-Tg/NOD を AIRE 欠損 NOD マウスと交配して樹立した AIRE-Tg/AIRE 欠損 NOD マウスでは膵腺房炎が消退することを確認した。すなわち、AIRE 欠損 NOD マウスでは激しい自己免疫病態によって生後 20 週齢を超えて生存する個体は存在しないが、AIRE-Tg/NOD との交配によって、いわゆる AIRE を transgenic back させた AIRE-Tg/AIRE 欠損 NOD マウスの生存期間は通常の NOD マウスと同等であった (図 2: AIRE-Tg/AIRE 欠損 NOD; AIRE 欠損 NOD)。

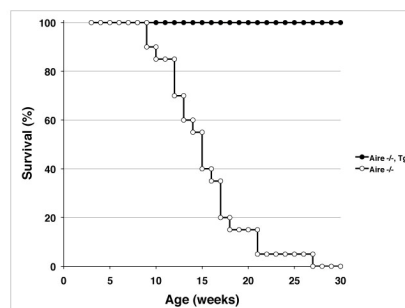


図 2. AIRE-Tg との交配による AIRE 欠損マウスの致死性の回避 (生存率)

このことから、AIRE トランスジェニック

NOD マウスにおける糖尿病抵抗性の獲得機構が導入 AIRE 遺伝子産物の直接の効果である可能性が高い。

糖尿病抵抗性獲得機構に、T 細胞レパトアの変化が関わっているか否かを検証する目的で、AIRE-Tg、および対照マウス由来の末梢 T 細胞を免疫不全マウス (NOD.scid) に移入する実験を行った。その結果、対照マウス由来の末梢 T 細胞の移入によって全ての NOD.scid が糖尿病を発症したのに対して、AIRE-Tg ス由来の末梢 T 細胞の移入では、糖尿病の発症を全く認めなかった。したがって、本トランスジェニックマウスにおいては、AIRE 発現血球細胞が糖尿病誘発性 T 細胞レパトアを糖尿病抵抗性 T 細胞レパトアへとシフトさせた可能性が示唆される。

(2) 糖尿病発症阻止に働く細胞種の特定とそのメカニズムの解明

本研究で用いた AIRE-Tg/NOD では MHC class II プロモーターによって AIRE を発現させているため、本来の AIRE 発現細胞である mTEC に加え、B 細胞においても AIRE の発現が観察された。そこで、mTEC で発現するヒト AIRE、あるいは B 細胞を主体とする血球細胞で発現するヒト AIRE のいずれが糖尿病発症阻止作用を発揮しているかを明らかにする目的で、骨髄移植実験および胸腺移植実験を行った。その結果、mTEC を含む非骨髄細胞と、B 細胞を含む骨髄細胞のいずれもが糖尿病発症阻止に関わっているという結果を得た。

他方、AIRE-Tg/NOD マウス由来の血球細胞による糖尿病阻止作用に関連して、AIRE-Tg/NOD の B 細胞においては分化障害が存在することを見出している。この結果は、AIRE が mTEC において細胞分化に作用することと呼応して、B 細胞においても AIRE が何らかの分化誘導作用を発揮した結果と思われる。今後は、過剰な AIRE 発現によって引き起こされた B 細胞分化障害を手掛かりに、AIRE の標的遺伝子(群)を同定し、AIRE の分子生物学的機能の詳細を明らかにする必要がある。現在、AIRE-Tg/NOD マウス B 細胞を材料として、抗ヒト AIRE 抗体を用いて AIRE 蛋白を免疫沈降し、共沈してくる AIRE 結合蛋白をプロテオミクス的手法を用いて網羅的に同定する作業に取り組んでいる。さらに、AIRE 蛋白が結合する遺伝子プロモーター領域を Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP) 法を用いてゲノムワイドに検索し、AIRE の標的遺伝子(群)を明らかにし、それによって分化誘導因子としての AIRE の機能を明確にする実験にも着手する必要がある。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計2件)

Nishikawa, Y., Nishijima, H., Matsumoto, M., Morimoto, J., Hirota, F., Takahashi, S., Luche, H., Fehling, H.J., Mouri, Y., Matsumoto, M.

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

J. Immunol., 査読有, 192: 2585-2592, 2014.
doi: 10.4049/jimmunol.1302786

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

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

Front. Immunol., 査読有, 4: Article number 210, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00210

〔学会発表〕(計11件)

Nishijima, H., Morimoto, J., Mouri, Y., Nishikawa, 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、2013.12.11、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Matsumoto, 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, 2013.8.27、MiCo Milano Congressi (Italy)

Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Nishijima, H., Matsumoto, M., Hirota, F., Takahashi, S., Luche, H., Fehling, H.S., 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, 2013.6.3、Shiran-Kaikan (Kyoto)

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、
2013.5.31、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.
IMMUNOLOGY 2013-AAI Annual Meeting,
2013.5.3、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, 2013.4.4, Hotel Novotel Budapest City (Hungary)

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

Temporal fate- mapping reveals essential roles of Aire in the maturation program of mTECs.

ThymUS 2012, 2012.11.4, Trump International Beach Resort (USA)

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

Aire controls organization of thymic microenvironment for the establishment of self tolerance.

European Congress of Immunology 2012, 2012.9.5, Scottish Exhibition & Conference Center (Scotland)

西嶋 仁、松本 満

遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE を導入した HeLa 細胞における細胞周期依存的 AIRE タンパク質のリン酸化

第 35 回日本分子生物学会年会、2011.12.12、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

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 40 回日本免疫学会総会、2011.11.27、幕張メッセ（千葉県千葉市）

毛利安宏、西川裕美子、西嶋 仁、松本 満

Negative selection における Aire 発現細胞由来自己抗原の役割

第 40 回日本免疫学会総会、2011.11.27、幕張メッセ（千葉県千葉市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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