

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860363

研究課題名(和文) 胸腺髄質上皮細胞による負の選択制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of negative selection regulated by medullary thymic epithelial cells

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺上皮細胞に発現するAire遺伝子の負の選択(自己反応性T細胞の除去)における役割を2種類の抗原モデルマウスを用いて検討した。胸腺上皮細胞が発現する抗原は、(1)上皮細胞自身によって自己反応性T細胞に提示される、もしくは(2)骨髄由来の抗原提示細胞(樹状細胞など)によって提示され、自己反応性T細胞を除去すると考えられている。今回の研究によって(1)の負の選択にはAireが必要なく、(2)の負の選択にAireが必要であることが示唆された。つまり、Aireは胸腺上皮細胞自体の抗原提示能には影響せず、抗原の受け渡し等のメカニズムを介して骨髄由来細胞の抗原提示を制御していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated a role of Aire, expressed in medullary thymic epithelial cells, in negative selection using neo self-antigen Tg models. Self-antigens expressed in thymic epithelial cells are (1)directly presented by thymic epithelial cells or (2)indirectly presented by BM-derived antigen presenting cells (BM-APC) such as dendritic cells. Our results suggested Aire is needed in (2)indirect presentation by BM-APC but not (1)direct presentation by thymic epithelial cells. It is thought that Aire regulates antigen presentation by BM-APCs but not thymic epithelial cells in negative selection.

研究分野：免疫学

キーワード：Aire 負の選択 胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

胸腺における負の選択(自己反応性 T 細胞の除去)は、樹状細胞や胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell : mTEC) などの抗原提示細胞による自己抗原の提示によって行われていると考えられている。しかし、なぜ複数種の抗原提示細胞が必要なのか、また各抗原提示細胞種に固有の役割とは何かなど不明な点が多い。本研究では mTEC 特異的な転写調節因子でありヒト自己免疫疾患の原因遺伝子である *AIRE* (AutoImmune Regulator) の欠損によって引き起こされる負の選択障害を切り口として、負の選択の制御機構を明らかにしたいと考えている。また *AIRE* による負の選択制御機構の解明は、ヒト *AIRE* 欠損症の発症機序を理解する上でも重要であり、免疫学的・臨床的に価値のある知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

これまで複数のグループが T 細胞受容体 (T-cell receptor : TCR) とその対応抗原のダブルトランスジェニック (Tg) マウスを用いた負の選択モデルの研究を行い、*Aire* 欠損マウスでは負の選択が障害されることを報告している。しかし、負の選択における *Aire* の機能については、mTEC における抗原の転写制御、mTEC における抗原のプロセッシング・提示の制御、mTEC から樹状細胞への抗原の受け渡しの制御、など様々な結論が導かれている。これらの研究では、Rat insulin promoter (RIP) の制御でモデル自己抗原を発現する Tg マウスが用いられているが、抗原発現細胞種・抗原提示細胞種が不明確である。そこで我々は RIP に加え、*Aire* promoter 下でモデル自己抗原である膜結合型 Ovalbumin (mOVA) を発現する KI マウスを作製し、(1) mTEC 由来の抗原は負の選択においてどの細胞によって提示されるのか？ (上皮細胞 vs. 樹上細胞) (2) 負の選択において mTEC 自体の抗原提示を *Aire* は制御するか？ (3) 骨髄由来抗原提示細胞 (BM-derived antigen presenting cell : BM-APC) の抗原提示を *Aire* は制御するか？ またその制御機構は？ という点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 負の選択において mTEC 由来抗原を提示する細胞種の評価

この目的のために骨髄移植実験と胎仔胸腺移植の実験を用いた。

骨髄移植実験

MHC class II (MHCII) が欠損した OVA 特異的 TCR Tg (OT2 Tg) の骨髄を RIP-OVA Tg もしくは *Aire*/OVA-KI マウスに移植すると骨髄由来の細胞は抗原提示ができないため、胸腺内ではレシピエント由来の上皮細胞のみが抗原提示できる。また、ドナー由来の骨

髄細胞は OVA を発現しないため、抗原ソースはレシピエント由来の細胞であり、胸腺内では上皮細胞であると考えられる。この実験によって負の選択において上皮細胞が自身の発現する抗原を提示するかどうかを判定することができる。

胎仔胸腺移植

抗原 Tg の胎仔胸腺を抗原特異的 TCR Tg に移植することで、mTEC 由来抗原による負の選択を評価した。つまり、RIP-OVA Tg もしくは *Aire*/OVA-KI マウスの胎齢 14.5 日胸腺を OVA 特異的な OT2 Tg に移植すると、OVA 抗原を発現するのは移植胸腺中の上皮細胞に限られる。このときレシピエントにも移植胸腺にも MHC class II (MHCII) が発現しており、mTEC 由来の抗原を mTEC 自身もしくは BM-APC が提示する。もしレシピエントに MHCII 欠損 OT2 Tg を用いると MHCII を発現しているのは移植胸腺中の上皮細胞のみとなり、mTEC 由来抗原を提示できるのは mTEC 自身のみとなる。このように抗原提示細胞が mTEC+BM-APC (レシピエント:OT2 Tg)、もしくは抗原提示細胞が mTEC のみ (レシピエント:MHCII 欠損 OT2 Tg)、それぞれの場合に OT2 T 細胞の負の選択が起きるかどうかを評価することで、mTEC 由来抗原を提示する細胞種が上皮細胞か骨髄由来細胞かを判定した。

(2) *Aire* 欠損 mTEC の抗原提示能の評価

研究方法 (1) の胎仔胸腺移植実験で *Aire*/OVA-KI の胎仔胸腺を用いた場合、mTEC の抗原提示のみで OT2 T 細胞の負の選択が起きることが明らかとなった。そこで *Aire* を欠損した *Aire*/OVA-KI の胎仔胸腺を MHCII 欠損 OT2 Tg に移植し、mTEC の抗原提示に *Aire* が必要かどうかを評価した。

4. 研究成果

Aire は mTEC における様々な組織特異抗原の発現を制御していることが報告されているので、我々が用いた RIP-OVA Tg、*Aire*/OVA-KI の mTEC における OVA 発現量が *Aire* 欠損下で変化するかどうかを検討したところ、両モデルにおける OVA 発現は *Aire* 欠損下でも正常であった。抗原発現が *Aire* の影響を受けないという前提の基に以下の実験を行った。

MHCII 欠損 OT2 Tg の骨髄移植実験を行った結果、RIP-OVA Tg、*Aire*/OVA-KI どちらがレシピエントの場合も正常に OT2 T 細胞の負の選択が起きた。特に RIP-OVA Tg の方は、すでに報告されている結果 (*J. Exp. Med.* 200:1039, 2004) と異なっており、我々の骨髄移植実験の結果はどちらの抗原モデルも mTEC の抗原提示のみで負の選択が起きることを示唆している。しかし、骨髄移植の実験系は X 線耐性の MHCII 発現 BM-APC がレシピエントに残存し、こ

れによって適正に抗原提示細胞種を判定できていない可能性がある。またどちらの抗原モデルにおいても末梢組織に OVA 発現細胞が存在している場合、末梢で抗原を取り込んだ樹状細胞が胸腺内の負の選択に寄与している可能性を排除できない。

そこで抗原ソースが胸腺上皮細胞に限定され、すべての BM-APC が MHCII 欠損となる胎仔胸腺移植を用いた解析を行った。

RIP-OVA Tg モデルの結果

RIP-OVA Tg の胎仔胸腺を OT2 Tg に移植した場合、移植胸腺中で正常に負の選択が観察された。このことからこのモデルでは mTEC が抗原ソースとしてはたらくことがわかる。この負の選択は Aire 欠損 RIP-OVA Tg の胸腺を移植した場合には障害された。次に MHCII 欠損 OT2 Tg に同様の胸腺移植を行ったところ、負の選択が起きなくなった。つまり抗原ソースは mTEC であるが、負の選択を起こすのに mTEC の抗原提示のみでは不十分であり、BM-APC の抗原提示が必要であることが示唆される。このモデルでは mTEC 由来の抗原を BM-APC が提示して負の選択が起き、その過程に Aire が関与している可能性が考えられる。

Aire/OVA-KI モデルの結果

RIP-OVA Tg の場合とは異なり、Aire/OVA-KI の胸腺を MHCII 欠損 OT2 Tg に移植すると移植胸腺中で正常に負の選択が観察された。こちらのモデルでは mTEC 由来の抗原を mTEC 自身が提示して負の選択が起きる。RIP-OVA と Aire/OVA の結果を併せて考えると、mTEC 由来の抗原は mTEC 自身が抗原提示できるが、それでは負の選択には不十分な場合があり、BM-APC も抗原提示に関わっている。mTEC の抗原提示で十分かどうかは抗原発現量、もしくはどの mTEC が抗原を発現しているかなどによって決定されていると考えられる。Aire/OVA のモデルは mTEC の抗原提示のみで負の選択が起きるので、Aire が欠損する胸腺を MHCII 欠損マウスに移植し、mTEC の抗原提示に Aire が必要かどうかを評価した。その結果、Aire が欠損していても mTEC の抗原提示による負の選択は正常であった。以前の報告 (*Immunity*, 23:227, 2005) で in vitro の実験から、Aire は mTEC の抗原プロセッシング・提示を制御していることが示唆されているが、我々の Aire/OVA-KI を用いた in vivo 実験では、mTEC の抗原プロセッシング・提示に Aire は必要ないことが示唆された。

研究目的のところで記述した3つの問いに対し、我々の研究から(1) mTEC 由来の抗原は mTEC 自身および BM-APC が提示する。(2) Aire は mTEC の抗原提示能に必要なことが示唆された。また RIP-OVA モデルを用いた実験から間接的ではあるが、(3) Aire

は BM-APC の抗原提示に関わることが示唆される。Aire は主に mTEC に発現しているが、mTEC の抗原提示ではなく BM-APC の抗原提示による負の選択に関わっているという結果が得られた。mTEC に発現する Aire がどのように BM-APC の抗原提示に関わっているかは不明である。また負の選択における mTEC と BM-APC の協調作用についての研究もまだ少ない。今後、負の選択における mTEC と BM-APC の固有の役割、協調作用、そして Aire がそこにどう関わっているかを明らかにしていきたい。

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 4件)

1) Kawano H, Nishijima H, Morimoto J, Hirota F, Morita R, Mouri Y, Nishioka Y, Matsumoto M.

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

J Immunol. (査読あり) 195:5149-5158, 2015.

2) Nishijima H, Kitano S, Miyachi H, Morimoto J, Kawano H, Hirota F, Morita R, Mouri Y, Masuda K, Imoto I, Ikuta K, Matsumoto M.

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

J Immunol. (査読あり) 195:4641-4649, 2015.

3) Mouri Y, Nishijima H, Kawano H, Hirota F, Sakaguchi N, Morimoto J, Matsumoto M.

NF- κ B-inducing kinase in thymic stroma establishes central tolerance by orchestrating cross-talk with not only thymocytes but also dendritic cells.

J Immunol. (査読あり) 193:4356-4367, 2014.

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

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

J Immunol. (査読あり) 192:2585-2592, 2014.

[学会発表](計 2件)

1) 毛利安宏, 松本満 「Aire 依存的負の選択機構の解析」 第 35 回日本胸腺研究会 2016 年 2 月 6 日 徳島大学藤井節郎記念医学科学センター (徳島県徳島市)

2) 毛利安宏, 松本満 「Aire 依存的負の選択機構の解析」 Kyoto T Cell Conference 第 25 回学術集会 2015 年 5 月 16 日 京都大学

紫蘭会館（京都府京都市）

6．研究組織

(1)研究代表者

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