

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461464

研究課題名(和文)疾患モデルマウスを用いた自己免疫疾患の病態解明

研究課題名(英文)Studies on the mechanisms for autoimmune phenotype in disease model mouse

研究代表者

西嶋 仁(NISHIJIMA, Hitoshi)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：60425410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺は、T細胞が自己寛容性と非自己への応答性を確立するのに重要な器官であり、胸腺髄質と皮質から構成されている。我々は、胸腺髄質上皮細胞(mTECs)で発現しているAireを胸腺皮質上皮細胞(cTECs)に発現させたマウスを作出して、Aireの機能がcTECsにおいても発揮されるかどうかを検討した。その結果、mTECsで観察される組織特異的遺伝子群の発現は、Aireを発現させたcTECsでは認めなかった。また、内在性Aireを欠失させて免疫学的機能を検討したところ、Aire欠失マウス同様に自己免疫病態が観察されたため、Aireの機能的な場としての胸腺髄質の独自性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cortical thymic epithelial cells (cTECs) and medullary thymic epithelial cells (mTECs) play essential roles in the positive and negative selection of developing thymocytes, respectively. Aire in mTECs plays an essential role in the latter process through expression of tissue-restricted Ags. To determine whether the location of Aire within the medulla is essential or whether Aire could also function within the cortex for establishment of self-tolerance, we established a semi-knockin mice (b5t/Aire-Tg) expressing Aire under control of the promoter of b5t, a thymoproteasome expressed exclusively in the cortex. cTECs expressing Aire ectopically did not confer transcriptional expression of either Aire-dependent or Aire-independent tissue-restricted Ag genes. We then crossed b5t/Aire-Tg mice with Aire-deficient mice, generating a strain in which Aire expression was confined to cTECs. Despite the presence of Aire in cTECs, these mice succumbed to autoimmunity, as did Aire-deficient mice.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 Aire

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系は自己と非自己を識別し、非自己のみを攻撃する生体防御システムであり、中心的役割を担うリンパ球が T 細胞である。自己と非自己を識別するための T 細胞抗原受容体 (TCR) のレパトアは、胸腺皮質における正の選択と、それに続く胸腺髄質における負の選択によって形成される。

自己組織に対して免疫担当細胞が攻撃しないシステムが自己寛容であり、その破綻は自己免疫疾患をもたらす。胸腺では遺伝子再編成により様々な TCR を持つ T 細胞が作出されるが、自己組織と反応する TCR を持つ T 細胞の大部分は胸腺における負の選択で除去されるか、制御性 T 細胞に分化誘導されると考えられている (中枢性自己寛容)。中枢性自己寛容が成立するメカニズムは、胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cells: mTECs) が様々な末梢組織に特異的なタンパク質群を発現することによって可能となる。これらの組織特異的自己抗原が、mTECs や樹状細胞の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子によって提示され、それを抗原として認識する T 細胞が除去される。mTECs において組織特異的遺伝子群の発現を制御している中心的な転写調節因子が Aire (autoimmune regulator) である。Aire 遺伝子はヒトの遺伝性自己免疫疾患である自己免疫性多腺性内分泌疾患 I 型の原因遺伝子として同定された。Aire 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、組織特異的遺伝子群の胸腺内の発現低下と自己免疫疾患の病態が観察される。これまでの報告から、Aire の免疫学的機能は種を超えて保存されており、自己寛容成立における重要性が示唆されている。

2. 研究の目的

分化途上の未成熟 T 細胞は、胸腺ストロマ細胞から様々なシグナルを受取ってその運命が決定される。胸腺皮質領域において、胸腺皮質上皮細胞 (cortical thymic epithelial cells: cTECs) によって自己抗原ペプチドと MHC 複合体が提示され、適度に反応する TCR をもつ T 細胞だけが正の選択を受けて生存する。その後、胸腺髄質領域に移行した T 細胞は、mTECs によって提示された自己抗原ペプチドと MHC 複合体によって「負の選択」を受けて、自己に反応性を持つ T 細胞は除去される。

「負の選択」を担う Aire が機能する場合は「髄質上皮細胞: mTECs」でなければならないのだろうか? 逆の言い方をすると、「皮質上皮細胞: cTECs」では、Aire はその機能を発揮し得ないのであるだろうか? この問題にアプローチするため、mTECs に特異的に発現する Aire を、皮質領域に発現させるための遺伝子改変マウスを作製して、免疫学的機能を解析した。

3. 研究の方法

mTECs と cTECs は共通の前駆細胞から分化するが、cTECs に特異的に発現する因子として beta5t があり、胸腺皮質における正の選択に寄与している。我々は、大腸菌人工染色体 (BAC) 上の beta5t 遺伝子の開始コドンのメチオニンをマウス Aire コーディング領域に組換えた BAC ベクターを作製し、NOD マウス受精卵に導入して beta5t/Aire セミノックイントランスジェニックマウスを作出した。本ノックインマウスの皮質領域では、mTECs の場合と同じく nuclear dot の形態を示す AIRE 発現細胞が存在することを、免疫組織染色によって確認した。さらに、このマウスと内在性 Aire ノックアウトマウスと交配する事によって、Aire の発現細胞がそれぞれ異なる 4 種類のマウスを樹立した

4. 研究成果

(1) Aire を cTECs で異所性に発現させる

beta5t/Aire セミノックインマウスと Aire ノックアウトマウスとを交配する事によって、Aire の発現細胞がそれぞれ異なる 4 種類のマウスを樹立した: mTECs で Aire が発現する野生型マウス、Aire ノックアウトマウス、mTECs と cTECs の両方で Aire が発現するマウス、cTECs のみで発現するマウス。それぞれの胸腺を摘出・酵素処理して、mTECs および cTECs の Aire 発現をフローサイトメーターによって定量的に解析した結果 (図 1)、期待した通りの Aire 発現を確認した。しかし、Aire 発現 cTECs は 10%程度であったため、一部の cTECs にのみ Aire タンパク質を維持できる機構が備わっているか、あるいは Aire タンパク質を積極的に排除する機構が備わっていると考えられる。現在 Aire を発現する細胞の特定を試みており、Aire 発現のメカニズムの解明につながることを期待している。

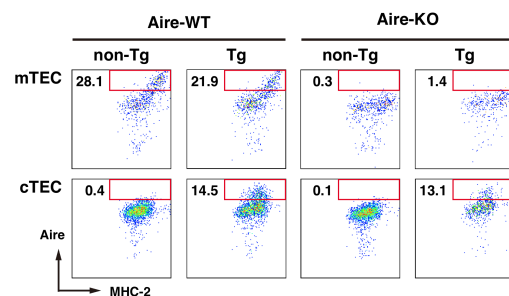


図 1: mTECs、cTECs における Aire 発現

(2) Aire 依存的遺伝子は細胞種によって異なる

Aire は mTECs において組織特異的遺伝子群の発現を制御しており、Aire ノックアウトマウスではそれら遺伝子群の発現低下が観察される。Aire を発現させた cTECs においても組織特異的遺伝子群の発現が誘導されるかどうかを検討した。胸腺を酵素処理をして分離した細胞から、cTECs および mTECs

分画を単離して、各細胞集団の遺伝子発現を RT-qPCR 法によって検討した。mTECs では Aire ノックアウトにより *Ins2* と *Sap1* の発現が低下するが (Aire 依存性の遺伝子) Aire 発現 cTECs において両遺伝子の発現は誘導されなかった。また、Aire 依存性を示さずに mTECs で発現する CRP についても、Aire 発現 cTECs ではその発現が誘導されなかった。さらに、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析 (図 2) においても、Aire 依存性の遺伝子群の発現は Aire 発現 cTECs では観察されなかった。

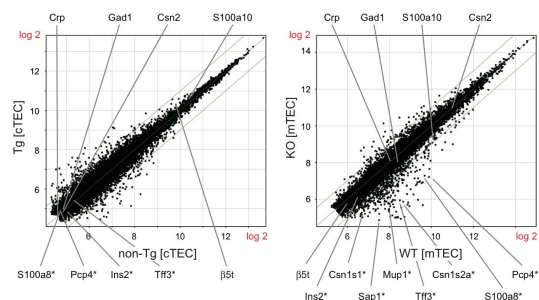


図 2 : mTECs、cTECs の遺伝子発現解析

この事実は、組織特異的遺伝子群の発現が Aire のみによって決定する物ではない事、また、発現が誘導される遺伝子は細胞種によって異なることを示唆している。すなわち、Aire が mTECs に特有な組織特異的遺伝子群の発現を誘導するためには、mTECs 自身が Aire 機能を発揮させるのに有効な場を提供していることが示唆された。mTECs で Aire 依存性を示す 2,738 遺伝子 (Aire ノックアウトで発現低下) と、cTECs で Aire 依存性を示す 3,090 遺伝子 (トランスジェニックで発現上昇) を選別した結果、そのうち 443 遺伝子が mTEC と cTEC の両方で Aire のターゲットとなりうることが示唆された (図 3)。しかし、有為に濃縮されている生物学的機能は観察されなかった。

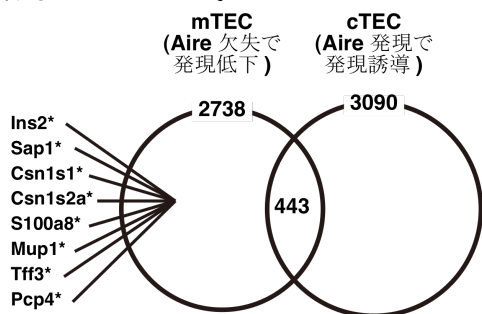


図 3 : mTECs、cTECs において Aire 発現で変動する遺伝子群の比較

(3) 正の選択への影響

Aire を cTECs で発現させることにより cTECs における遺伝子発現に変化が認められたため、我々は Aire セミノックイントランスジェニックマウスの正の選択への影響を調べた。CD4 及び CD8 T 細胞ともに、TCR V 鎖及び V 鎖のサブファミリー使用頻度

に有為な差は観察されなかった。同様に、T 細胞においても cTEC における Aire 発現の影響は観察されなかった。

H-Y 抗原 (Y 染色体上のオス特異的分子由来のペプチド) を認識する HY-TCR トランスジェニックマウスを用いた解析でも、H-2Db を発現するメスの HY-TCR トランスジェニック T 細胞は cTEC における Aire 発現の有無にかかわらず、正の選択を受けて成熟 T 細胞に分化した。

(4) 自己免疫病態への影響

1 型糖尿病は、T 細胞がインシュリン産生細胞を攻撃することによって起こる自己免疫疾患である。MHC class II の変異がリスクアレルであり、主要な遺伝的要因である。NOD マウスは、ヒトの 1 型糖尿病関連遺伝的多型 MHC class II と類似した変異を持ち、30 週程度で高頻度に糖尿病を発症する。我々は cTECs に Aire を発現させることによって糖尿病発症を軽減できるかを検討したが、改善を認めなかった。

Aire ノックアウト NOD マウスは重篤な自己免疫疾患症状を示し、著明な生育障害を認め、20 週を超えて生存するマウスはほとんどいない。病理学的解析では、NOD マウス本来の病原部位である膵臓ラ氏島炎に替わり腺房への免疫細胞浸潤が認められる。我々は cTECs に Aire を発現させる事によって Aire 欠損の表現型を改善することができるかを検討したが、Aire ノックアウト NOD 同様、膵臓腺房、肺、胃、甲状腺等に免疫細胞の浸潤が観察され、mTECs における内在性 Aire の機能相補は観察されなかった。

(5) これらの結果より、Aire の機能的な場として、胸腺髄質の独自性・重要性が明らかとなった。mTECs と cTECs は類縁な細胞であるが、本研究により自己寛容性に関わる Aire の機能を発揮できるのは mTECs においてのみであることが判明した。その理由として 2 つの可能性が考えられる。一つは、mTECs と cTECs ではゲノムにマーキングされたエピジェネティクスが異なっている可能性であり、もう一つは、組織特異的遺伝子群の発現などの自己寛容性に関わる機能を Aire に付随させる因子が cTECs では欠失している可能性である。後者に関しては、我々は Aire が mTECs の分化状態を制御している可能性を指摘しているが、最近 Aire と協調的に機能する分子候補として mTECs に特異的に発現する *Sirt1* が報告されており、Aire の翻訳後修飾の重要性が示唆されている。Aire 機能の全貌を理解するためには結合因子群を同定することが必須であり、また、mTECs と cTECs とのエピジェネティクスの違いを明らかにすることも必要と思われる。

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5件)

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

Aire Expression Is Inherent to Most Medullary Thymic Epithelial Cells during Their Differentiation Program.

J Immunol., 査読有, 195: 5149-5158, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1501000

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 the Thymic Cortex Reveals Inherent Properties of Aire as a Tolerogenic Factor within the Medulla.

J Immunol., 査読有, 195: 4641-4649, 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1501026

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., 査読有, 193: 4356-4367, 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1400389

Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Kurumizaka H, Harata M.

DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair.

PLoS One., 査読有, 9: e108354, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0108354

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

〔学会発表〕(計17件)

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

Expression of Ly6C/6G defines a novel Aire-dependent subset of medullary thymic epithelial cells with tolerogenic function.

12th International Congress on SLE, 2017, 3, 27. Melbourne (Australia)

Nishijima H, Mouri Y, Morimoto J,

Matsumoto M.

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of AIRE.

7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, 2017, 3, 17. 芝蘭会館 (京都府・京都市)

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

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of human AIRE in mice.

Controversies in Rheumatology and Autoimmunity 2017, 2017, 3, 9. Bologna (Italy)

西嶋 仁, 松岡 慶樹, 毛利 安宏, 森本 純子, 松本 満

ヒト AIRE トランスジェニックマウスに誘導される多発性筋炎病態の解析

第36回日本胸腺研究会, 2017, 2, 4. 芝蘭会館 (京都府・京都市)

Nishijima H, Matsuoka Y, Mouri Y, Morimoto J, Matsumoto M

Possible defect in the Treg production in mice overexpressing Aire/Aire which exhibit muscle-specific autoimmunity.

第45回日本免疫学会学術集, 2016, 12, 6. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

Nishijima H, Matsumoto M.

Massive infiltration of macrophages and eosinophils in the muscle of mice overexpressing Aire in thymic and peripheral antigen-presenting cells.

Cell Symposia - 100 Years of Phagocytosis, 2016, 9, 20. Sicily (Italy)

Nishijima H, Matsumoto M.

Augmented expression of the autoimmune regulator (AIRE) induces paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity, Immunology 2016, 2016, 5, 16. Seattle (USA)

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

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity by the additive expression of AIRE.

第44回日本免疫学会学術集, 2015, 11, 19. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

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

A novel Aire-dependent subset of medullary thymic epithelial cells that express Ly6 family protein.

第44回日本免疫学会学術集, 2015, 11, 19. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

札幌市)

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

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

The 4th European Congress of Immunology, 2015, 9, 7. Vienna (Austria)

西嶋 仁, 梶本 達也, 松岡 慶樹, 毛利 安宏, 森本 純子, 河野 弘, 松本 満

NOD 系統特異的に多発性筋炎様症状をもたらすゲノム領域の解析

第 14 回四国免疫フォーラム, 2015, 6, 19. 愛媛大学 40 周年記念講堂 (愛媛県・東温市)

Matsumoto M, Kawano H, Nishijima H, Morimoto J, Mouri Y, Nishioka Y

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

Venice Thymus Meeting 2015, 2015, 4, 11. Venice (Italy)

Nishijima H, Morimoto J, Mouri Y, Kawano H, Ikuta K, Matsumoto M.

Approaches to identify Aire-regulated non-tissue-restricted antigen genes by the ectopic expression of Aire in thymic cortex.

第 43 回日本免疫学会学術集, 2014, 12, 10. 京都国際会議場 (京都府・京都市)

Kawano H, Morimoto J, Mouri Y, Nishijima H, Nishioka Y, Matsumoto M.

Unexpected disturbance of the development of medullary thymic epithelial cells at immature stages by the long-term ablation of mature Aire-expressing cells.

第 43 回日本免疫学会学術集, 2014, 12, 10. 京都国際会議場 (京都府・京都市)

Nishijima H, Matsumoto M.

Ectopic Aire expression in thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a medullary stromal factor.

European Society for Immunodeficiencies, 2014, 10, 30. Prague (Czech Republic)

西嶋 仁, 生田 宏一, 松本 満

胸腺皮質上皮細胞への異所性発現による Aire の機能解析

24 Kyoto T cell Conference (KTCC), 2014, 5, 16. 京都平安ホテル (京都府・京都市)

Nishijima H, Morimoto J, Kawano H, Mouri Y, Ikuta K, Matsumoto M.

Ectopic Aire expression in thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a stromal factor for medullary thymic microenvironment.

ThymOz 7, 2014, 4, 3. Heron Island (Australia)

ホームページ等

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

BioMed サーカス.com

「胸腺髄質、それは Aire の機能的な場を提供する」

http://biomedcircus.com/paper_03_51.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西嶋 仁 (NISHIJIMA, Hitoshi)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号 : 60425410

(2) 研究分担者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号 : 60221595

{ その他 }