

令和元年5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05342

研究課題名(和文) AIREの機能解析による自己免疫病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of autoimmune disease through the functional study of AIRE

研究代表者

松本 満 (MATSUMOTO, Mitsuru)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・教授

研究者番号：60221595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：AIRE欠損症は比較的稀な自己免疫疾患であるが、AIREという単一遺伝子の異常による自己免疫病態を示すため、疾患モデルマウスを作製して病気のメカニズムを研究できるメリットがある。AIREの真の機能を明らかにするためには、転写調節因子であるAIREの標的遺伝子が何であるかを明らかにする必要がある。本申請ではAIREの標的遺伝子を同定するための遺伝子改変マウスを樹立し、Transcriptome解析を行い、AIRE機能の解明に取り組んだ。その結果、過剰なAIRE発現が逆説的に組織特異的な自己免疫病態を誘導するという意外な結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の原因は未だに不明だが、免疫システムが自分自身の身体を攻撃することによって惹起される難病である。自己免疫疾患には様々なタイプが存在するが、AIRE欠損症はAIREという単一遺伝子の機能異常によって引き起こされるため、他の自己免疫疾患に比べ、遺伝子改変マウスを用いて病態や新規治療法の開発などの研究に取り組むことが可能である。本研究では様々なタイプのAire遺伝子改変マウスを樹立し、AIRE遺伝子の機能障害によって、どのようなメカニズムによって自己免疫病態が発症するのかについて解析を試みた。また、AIRE遺伝子の働きを利用して、自己免疫病態を是正することも試みた。

研究成果の概要(英文)：Although AIRE deficiency is a rather rare autoimmune disease, it has an advantage where we can study the pathogenesis through creating the Aire-deficient mice. In order to reveal the bona fide pathogenesis of AIRE-dependent autoimmunity, elucidation of the target genes controlled by AIRE is essential. For this, we have established novel Aire-modified strains of mice. With the use of state-of-the-art technologies, we have studied the immunological function of AIRE. During this study, we unexpectedly found that over-expression of AIRE in antigen-presenting cells with the use of MHC-II promoter paradoxically induced the muscle-specific autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 Aire 遺伝子改変マウス

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

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、未だに原因不明の難病である。この最重要課題の突破口となる素材が、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、フィンランドに存在する家系を用いて1997年に、遺伝性の自己免疫疾患であ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positional cloningによって同定された(Nature Genet, 1997)。重要な点は、APECEDではわずか1遺伝子の異常によって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点である。しかもAIRE遺伝子の発現は、自己抗原(self-antigen)の提示によって自己反応性T細胞の除去にはたらく胸腺髄質上皮細胞(medullary thymic epithelial cell: mTEC)で最も強い。そのため、AIREの機能異常に基づく疾患病態の解明は、APECEDのみならず、他の自己免疫疾患の原因究明にも大きく貢献するものと考えられている。さらに重要な点は、AIRE欠損症(APECED)は単一遺伝子の異常による病気であるため、マウスAIRE遺伝子の改変操作によってヒトの病気と同じ病態をもつ疾患モデルマウスを樹立できることである。事実、私どもが作製したAIRE欠損マウスはヒトの場合と同様に例外なく自己免疫病態を発症する(*J. Immunol.* 174: 1862-1870, 2005)。このように、AIREは実際のヒトの病気の原因遺伝子であり、かつヒトと同じ病態モデルマウスを作製・利用できることから、自己免疫疾患の原因究明のための理想的な研究対象である。すなわち、AIREの出現によって自己免疫疾患においても真の実験医学が初めて可能となった。

本研究課題では、こうしたAire遺伝子改変マウスを駆使して、胸腺における自己寛容の成立機構を明らかにし、自己免疫疾患の発症過程を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

上記のように、Aireはその機能異常によって、胸腺における負の選択の障害をもたらし、実際にヒトに自己免疫疾患を引き起こすことから、さまざまなAire遺伝子改変マウスを樹立し、それによって、マウスにヒトと同じ自己免疫病態を作り出し、そのメカニズムを詳細に解析する。特に本研究課題では、Aireを過剰に発現する遺伝子改変マウス(huAIRE-Tg)を作製し、それによって自己免疫病態を緩和できるか否かを検討し、Aireによる自己免疫病態の是正を試みる。一方、Aire遺伝子座に多種類のレポーター分子や機能分子を挿入したノックインマウスを作製し、mTECにおけるAireの役割を詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) 抗原提示細胞で付加的にヒトAire(huAIRE)を発現するマウス(huAIRE-Tg)の樹立: Aireを付加的(過剰)に発現するNODマウスを作製するにあたり、MHC-IIプロモーター下にhuAIRE cDNAをドライブさせる導入遺伝子を構築した。すなわち、内在性Aireとの識別を可能にするためにマウスAireではなく、ヒトAIREを導入遺伝子に選んだ。NODマウス受精卵への注入によって、発現レベルの異なる3ラインを樹立した。

(2) レポーター分子として、細胞膜抗原タンパク質(human CD2)を発現する新規ノックインマウス: Aireは核内タンパク質であるため、抗Aire抗体を用いてAire⁺mTECを回収することは出来ない。そこで、細胞表面上に発現されるタンパク質であるヒトCD2分子(human CD2: huCD2)をレポーター分子とする新規Aireレポーターマウス(Aire/huCD2ノックインマウス)を樹立した。それによって、生細胞としてAire⁺mTECを回収することが可能になった。その場合、huCD2の挿入はAire locusを破壊しない形で行うことで、ホモAire/huCD2ノックインマウスにおいてもAire欠損状態とならない設計を行った。

4. 研究成果

(1) Aireの過剰発現は逆説的に組織特異的自己免疫応答を誘導する

末梢血B細胞におけるhuAIREの発現をFACSによって調べたところ、ライン2m9L、1m4L、8Lの順に発現レベルが高いことが分かった。huAIREがマウス体内で機能をもつことは、huAIRE-Tgとの交配によって、Aire欠損マウスの形質を補完できることによって確認した。すなわち、NOD背景のAire欠損マウスは肺臓炎および膵臓の腺房炎によって早期の致死性を示すが、huAIRE-Tgと交配することによって、その致死性を回避することが出来た。また理由は不明であるが、Aire欠損マウス(NOD)はI型糖尿病に対して抵抗性を示すが、huAIRE-Tgとの交配によってI型糖尿病を発症することも確認した(ライン2m9Lを除く)。こうした遺伝学的な実験によって、huAIREがマウス体内で機能しうることを最初に確認した。

次いでhuAIREの発現量を高めるために、各Tgラインについてヘテロ個体同士を交配してホモ個体を作出したところ、ホモ化2m9L個体は生後10週前後から体重減少を示し、20週齢頃までに全個体が死亡した。病理学的解析では、骨格筋および心筋内に著明な炎症細胞浸潤を認めた。

こうした筋組織特異的自己免疫病態がヘテロ個体では見られず、ホモ個体でのみ観察されたことから、導入遺伝子による内在遺伝子破壊(insertional mutagenesis)の可能性が疑われたが、ADL-PCR法によって2m9L-Tgにおける遺伝子挿入部位を調べたところ、16番染色体上のSim2遺伝子とCldn14遺伝子の遺伝子間領域であり、何らかの遺伝子を破壊している可能性は否定的

であった。さらに、ホモ化 2m9L 個体と同様な筋組織特異的病変は、ホモ化 1m4L 個体の一部 (20%程度)においても認めた。2m9L-Tg と 1m4L-Tg が独立したラインであることは、1m4L-Tg における遺伝子挿入部位が 19 番染色体 19qB 領域であることを FISH 法によって確認した。最終的に、これらホモ化 huAIRE-Tg 個体で認めた筋組織特異的病変が内在遺伝子破壊によるものでないことは、2m9L-Tg と 1m4L-Tg とを交配して作出したコンパウンドヘテロ個体の全例が筋組織特異的病変を示すことから証明した。ちなみに、筋組織特異的病変が自己免疫病態によるものであることは、筋組織に対する自己抗体の産生、ならびに副腎皮質ステロイド投与によって致死性を回避出来ることから確認した。以上のように、MHC-II 陽性細胞において huAIRE を一定以上のレベルに発現させると筋組織特異的自己免疫病態を発症することが明らかになった。すなわち、その欠損によって臓器特異的自己免疫を発症する Aire が、過剰発現によって新たな臓器特異的自己免疫病態を誘導するというきわめて意外な (逆説的な) 結果を得た。

(2) Aire/huCD2 ノックインマウスを用いた Aire⁺ mTEC のトランスクリプトーム解析

従来、Aire 欠損に伴う Aire 発現細胞、およびその欠損に伴う mTEC のトランスクリプトーム解析は、CD80 を高発現する成熟 mTEC (mTEC^{high}) を回収して行われてきた。しかしながら、その場合、Aire を発現する細胞と発現しない細胞を厳密に分離することは不可能であった。そこで新規に樹立した Aire/huCD2 ノックインマウスを用いて Aire⁺ mTEC のトランスクリプトーム解析を行うこととした。それに先立ち、計画通り、ホモ Aire/huCD2 ノックインマウスにおいても Aire 欠損状態とならないことを確認した。さらに、huCD2 と内在性 Aire とが同一局在を示すことも免疫組織染色によって確認した。

ホモ Aire/huCD2 ノックインマウスから採取した huCD2⁺ mTEC をさらに私どもが新規に同定した mTEC marker である Gr-1 抗体との結合性によって huCD2⁺Gr-1⁻ mTEC と huCD2⁺Gr-1⁺ mTEC とに分離・回収し、両者のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、huCD2⁺Gr-1⁺ mTEC では huCD2⁺Gr-1⁻ mTEC と比較して、様々なケモカインや接着関連因子の発現増強を認めた。すなわち、Aire⁺ mTEC の中でも Gr-1 発現細胞は mTEC として、より重要な機能を担っていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

. Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama, and Mitsuru

Matsumoto

AIRE - The Autoimmune Regulator

eLS, 2019, 1-8

(doi: 10.1002/9780470015902.a0027281) (査読あり)

. Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Takumi Kakimoto, Kohei Furutani, Naoki Kihara, Minoru

Matsumoto, Koichi Tsuneyama, Yuko Kozono, Haruo Kozono, Katsuto Hozumi, Kazuyoshi Hosomichi,

Hitoshi Nishijima and Mitsuru Matsumoto

Aire Controls in Trans the Production of Medullary Thymic Epithelial Cells Expressing Ly-6C/Ly-6G

J. Immunol, 2018, 201, 3244-3257

(doi: 10.4049/jimmunol.1800950) (査読あり)

. Hitoshi Nishijima, Tatsuya Kajimoto, Yoshiki Matsuoka, Yasuhiro Mouri, Junko Morimoto, Minoru

Matsumoto, Hiroshi Kawano, Yasuhiko Nishioka, Hisanori Uehara, Keisuke Izumi, Koichi Tsuneyama,

Il-mi Okazaki, Taku Okazaki, Kazuyoshi Hosomichi, Ayako Shiraki, Makoto Shibutani, Kunitoshi

Mitsumori, Mitsuru Matsumoto

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of autoimmune regulator (AIRE)

J. Autoimmunity, 2018, 86, 75-92

(doi: 10.1016/j.jaut.2017.09.006) (査読あり)

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

Uehara H, Izumi K, Tsuneyama K, Okazaki IM, Okazaki T, Hosomichi K, Shiraki A, Shibutani M,

Mitsumori K, Matsumoto M.

Paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity through augmented expression of autoimmune regulator (AIRE)

J Autoimmun. 2018, 86, 75-92

(doi: 10.1016/j.jaut.2017.09.006) (査読あり)

. Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M.

Mode of tolerance induction and requirement for Aire are governed by the cell types that express self-antigen and those that present antigen

J Immunol. 2017, 199, 3959-3971

(doi: 10.4049/jimmunol.1700892) (査読あり)

. Akiyama N, Takizawa N, Miyauchi M, Yanai H, Tateishi R, Shinzawa M, Yoshinaga R, Kurihara M, Demizu Y, Yasuda H, Yagi S, Wu G, Matsumoto M., Sakamoto R, Yoshida N, Penninger JM, Kobayashi Y, Inoue J, Akiyama T.

Identification of embryonic precursor cells that differentiate into thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator

J. Exp. Med. 2016, 213, 1441-1458

(doi: 10.1084/jem.20151780) (査読あり)

[学会発表] (計 16 件)

Mitsuru Matsumoto

Amelioration of diabetes development in NOD by the transgenic human AIRE expression in DCs

第47回 日本免疫学会学術集会 (招待講演) 2018年

Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama and Mitsuru Matsumoto

Manipulation of thymic and peripheral tolerance by AIRE defines distinct tissue-specific autoimmunity

11th International Congress on Autoimmunity (国際学会) 2018年

Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Naoki Kihara, Kazuyoshi Hosomichi, Hitoshi Nishijima, Mitsuru Matsumoto

Expression of Ly6C/6G defines a novel subset of medullary thymic epithelial cells

Immunology 2018 - AAI Annual Meeting (国際学会) 2018年

Mitsuru Matsumoto, Junko Morimoto, Minoru Matsumoto, Koichi Tsuneyama, Hitoshi Nishijima

A novel Aire-dependent subset of mTECs with tolerogenic functions is defined by Ly6 family protein expression

ThymOz8 (国際学会) 2018年

Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama, Mitsuru Matsumoto

Acquisition of the resistance to autoimmune diabetes by the expression of human AIRE in BM-derived APCs in NOD

ThymOz8 (国際学会) 2018年

Mitsuru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Minoru Matsumoto
Transgenic human AIRE expression in peripheral antigen-presenting cells resulted in the acquisition of the resistance to the diabetes in NOD
20th Global Congress on Biotechnology (国際学会) 2018年

Mitsuru Matsumoto
Tissue-specific autoimmune response controlled by Aire
第46回日本免疫学会総会 (招待講演) 2017年

Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama and Mitsuru Matsumoto

"Transgenic human AIRE expression in NOD acquired resistance to T1D due to the impaired presentation of self-antigens"
第46回日本免疫学会総会、2017年

Junko Morimoto, Yumiko Nishikawa, Naoki Kihara, Kazuyoshi Hosomichi, Hitoshi Nishijima, Mitsuru Matsumoto

Expression of Ly6C/6G defines a novel subset of medullary thymic epithelial cells
第5回国際サイトカイン・インターフェロン学会年会 2017 (国際学会) 2017年

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 (国際学会)
2017年03月27日、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 (国際学会) 2017年03月17日
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 (国際学会)
2017年03月09日 ~ 2017年03月11日、Bologna (Italy)

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回日本免疫学会総会、2016年12月06日
沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

Matsumoto, M.
Immunological tolerance mediated by Aire
第39回日本分子生物学会年会 (招待講演)
2016年12月01日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

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 (国際学会)

2016年09月20日、Sicily (Italy)

Nishijima, H., Matsumoto, M.

Augmented expression of the autoimmune regulator (AIRE) induces paradoxical development of polymyositis-like autoimmunity

Immunology 2016 (国際学会)、2016年05月16日

Seattle (USA)

〔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〕

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

(免疫病態研究部門/国立大学法人徳島大学)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西嶋 仁

ローマ字氏名：(NISHIJIMA, Hitoshi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：先端酵素学研究所(次世代)

職名：助教

研究者番号(8桁)：60425410

(2)研究分担者

研究分担者氏名：毛利 安宏

ローマ字氏名：(MOURI, Yasuhiro)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学域)

職名：助教

研究者番号(8桁)：80464353

(3)研究分担者

研究分担者氏名：森本 純子

ローマ字氏名：(MORIMOTO, Junko)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：先端酵素学研究所(次世代)

職名：助教

研究者番号(8桁)：20451396

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。