

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：H19～H22

課題番号：19209037

研究課題名(和文)

自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症の感染防御障害機構

研究課題名(英文)

The mechanisms for the deterioration of infection control in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)

研究代表者

永淵 正法 (NAGAFUCHI SEIHO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00150441

研究成果の概要(和文)：

我々は、カンジダ感染防御を担う自己免疫調節遺伝子(AIRE)の意義を明らかにする目的で、Aire ノックアウト(KO)マウスを用いた実験研究および末梢免疫細胞における AIRE 遺伝子、AIRE 蛋白の発現とその制御、機能解析を行ってきた。その結果、まず、末梢樹状細胞、B細胞、活性化Tに強く発現し、MAPK 経路がその発現を誘導する知見を報告してきた。一方、高いレベルで AIRE を発現している活性化T細胞では、蛋白の発現がほとんど認められず、遺伝子発現と蛋白表出に著しい乖離があることが判明した。そのメカニズムとして、特定の microRNA(仮称: has-miR-anti-AIRE)が活性化T細胞に限定して高く発現していることが明らかとなり、AIRE の発現制御機構に重要な要素を同定した可能性があるため、その意義を検証する必要があると考えられる。

さらに、AIRE 蛋白の表出について、Western blot を安定して施行する技術を確立し、その結果、AIRE 発現細胞ではその種類によって、58kDa の AIRE 全蛋白と 45kDa の AIRE-2 のスプライズバリエーションの2種類の分子量が異なる蛋白を表出していることを見いだした。

一方、マウスを用いた感染実験研究において、カンジダ症に感受性を示す実験条件を確定し、さらにT細胞欠損ヌードマウス、Bリンパ球欠損マウス、T細胞、Bリンパ球両方欠損 Rag-1 マウス、で検討したところ、Rag-1 欠損マウスのみが Aire 欠損マウスと同じレベルの感受性亢進を示した。このことは、カンジダ感染防御に働く Aire は T細胞、Bリンパ球、ともに独立して重要であると推測されるがその詳細なメカニズムについては、さらに検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：

In order to clarify the role of AIRE gene in resist against Candida infection, we used Aire knockout mice and studied the expression of AIRE gene and protein in human peripheral immune cells. Interestingly, AIRE gene was expressed distinctively in CD4+ T cells, B cells and dendritic cells. Although AIRE gene was expressed in CD4+ T cells, AIRE protein was absent in those cells. We found that hsa-miR-anti-AIRE microRNA (tentative name) was highly expressed in CD4+ T cells, but lower in EB virus transformed B (EBV-B) cells expressing both AIRE gene and protein, indicating the microRNA may play an important role in regulating the translation of AIRE gene. We also found that both 58kDa and 45kDa AIRE related protein was expressed in dendritic cells, while EBV-B cells only expressed only 45 kDa AIRE protein, indicating multiple AIRE protein function dependent on cells expressing AIRE protein.

Experimentally, Aire knockout mice were susceptible to intravenous candida infection as worse as Rag-1 KO mice, whereas T cell deficient nu/nu mice or B cell deficient mu/mu mice could resist against candida infection, suggesting that either intact T cells or B cells are sufficient to protect against candida infection.

Whether any interactive protein or gene associate with AIRE protein remain uncertain and

exact functions of AIRE gene require further study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	15800000	4740000	20540000
2008年度	7400000	2220000	9620000
2009年度	7400000	2220000	9620000
2010年度	7400000	2220000	9620000
年度			
総計	38000000	11400000	49400000

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・感染症内科学

キーワード：感染防御、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症、自己免疫調節遺伝子(AIRE)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉性ジストロフィー

(APECED)は、単一の遺伝子異常によって発症する自己免疫疾患で、内分泌臓器特異的自己免疫病に加えて、ほぼ全例にカンジダ症を合併する。自己免疫調節遺伝子(AIRE)は、この疾患の原因遺伝子として1997年に、慶應大学清水信義教授、フィンランドのPeltonen教授(Nature Genet. 1997a,b)らによって発見された。AIREは、自己免疫の標的臓器には発現されず、胸腺および末梢リンパ節に発現することから、AIREは、中枢および末梢の免疫制御に関わっていることが推測された。

その後、臓器特異的自己免疫発症に関わるAIREの機能については、組織特異的自己抗原を胸腺上皮に異所性に発現させ、中枢性に自己反応性T細胞排除を誘導するとする報告が相次ぎ(Science 2002, Nat Immunol 2003, Cell 2010)、胸腺におけるAIREの機能解析が進みつつあるが、未だそのメカニズムの詳細は不明であり、特に、感染防御におけるAIREの機能の解析は進行していなかった。我々は、AIRE遺伝子変異を有し、カンジダ症を合併した症例を同定し、末梢免疫細胞における遺伝子発現について検討した結果、AIRE遺伝子が末梢樹状細胞、B細胞、活性化Tに強く発現し、MAPK経路が少なくとも一部はその発現を誘導する知見を得たため、さらに発現制御メカニズム、AIREの機能解析を目指し、

細胞レベルの検討、および、ノックアウトマウスを用いた感染実験を施行した。

2. 研究の目的

自己免疫調節遺伝子(AIRE)が関与する感染防御メカニズムの詳細を解明する。

3. 研究の方法

- (1)免疫細胞の分離、試験管内培養
- (2)PCRによる遺伝子検定
- (3)PCR, RT-PCR, 定量PCRによる遺伝子発現の評価
- (4)免疫蛍光抗体法
- (5)Fluorescent activated cell scanningによる細胞表面抗原発現の評価
- (6)Western blotによる蛋白の同定

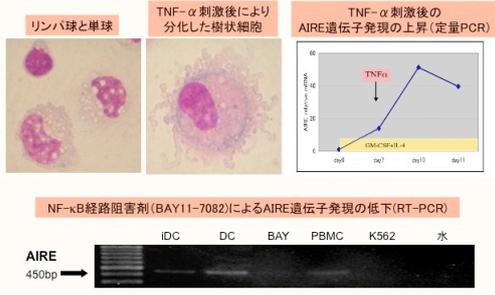
4. 研究成果

I. AIREの発現制御機構

(1)TNF受容体以下のシグナルによる制御

AIRE遺伝子の発現にはMAPK経路が促進的に働いていることは既に報告したが、試験管内で単球を樹状細胞に分化させる過程で、左図に示すようにTNF α を作用させることによりAIRE遺伝子の発現が著しく上昇した。そこで、TNF受容体以下のシグナルIkB阻害剤(BAY11-7082)を添加して検討したところ、AIREの発現が低下した。以上のことから、AIRE遺伝子の発現にはMAPK経路よりもTNF受容体以下のシグナルによる促進が重要であると考えられる。(次図)

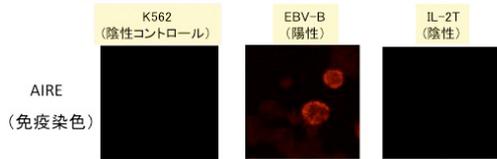
TNF- α 刺激によるAIRE遺伝子発現の増加とNF- κ B経路阻害剤の影響



(2)microRNAによる制御

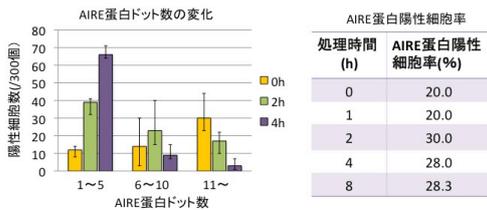
前述のように、RT-PCR、定量PCRで遺伝子発現を検討したところ、CD4⁺T細胞やIL-2活性化T細胞で高いレベルの発現が認められたため免疫染色により、AIRE蛋白の表出を検討したところ、下図のように蛋白は表出しておらず、遺伝子発現と蛋白表出に乖離があることが明らかとなってきた。そこで、AIREの遺伝

IL-2活性化T細胞におけるAIRE遺伝子発現とAIRE蛋白表出の乖離



子発現と蛋白表出乖離の原因として細胞周期、蛋白分解の影響を、それぞれ、増殖因子との関連、蛋白分解の影響を検討したところ、蛋白分解に関するプロテアソーム阻害剤を用いた場合に核におけるAIRE蛋白の局在の増加が認められた(図)が、

プロテアソーム阻害剤(MG132)による影響



プロテアソーム阻害剤2,4,8時間処理後、核内に偏在し蓄積するAIRE蛋白染色像を確認した。さらに、AIRE蛋白陽性細胞率は約10%増加した。

増殖も含め、全体としての影響は軽微であった。

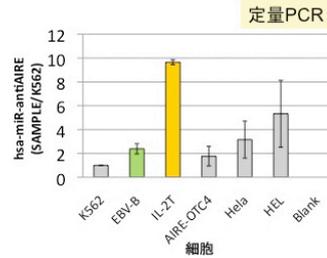
そこで、最近、翻訳調節因子として注目されているmicroRNAに着目し、IL-2刺激T細胞に高く発現するmicroRNAを網羅的Arrayを用いてスクリーニングした。その結果、IL-2刺激T細胞に高く発現する27個のmicroRNAが検出された。miRBaseによる検索を行ったところ、AIRE遺伝子のmRNAと相補的に結合可能性のある特定のmicroRNA(仮称:

hsa-miR-anti-AIRE)を同定し、定量PCRでもこの知見を確認した。(下図)

IL-2T細胞に高発現しているmicroRNA (hsa-miR-anti-AIRE)の同定

マイクロアレイ

microRNA	IL-2T/EBV-B	IL-2T/K562
hsa-miR-anti-AIRE	2.06	1.34

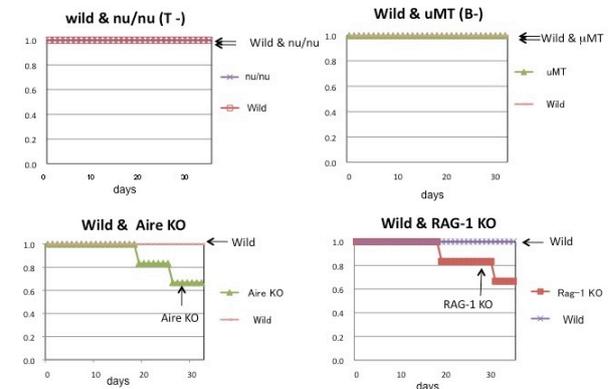


既に、MAPK経路に加えてTNF経路の重要性は明らかにしてきたが、前述のように、CD4⁺T細胞に強く発現し、AIRE蛋白制御に関与していることが推定されるmiRNAを同定した。このmiRNAの意義についてさらに検討を進める必要があると考えられる。

II. カンジダ症の感染防御と Aire

これまでの検討により、BALB/c背景Aire KOマウスは 4×10^4 CFU/mouseを経静脈的に投与すると、明らかに感染感受性の増加が認められた。さらに、T細胞欠損(nu/nu)、B細胞欠損(mMT)、T細胞およびB細胞両方欠損(Rag-1 KO)マウスで検討したところ、Rag-1 KOマウスでのみ、感受性亢進が認められた(図)。このことは、カンジダ感染防御にはT細胞あるいはB細胞、いずれかが正常であれば、感染防御が可能であることを示唆している。

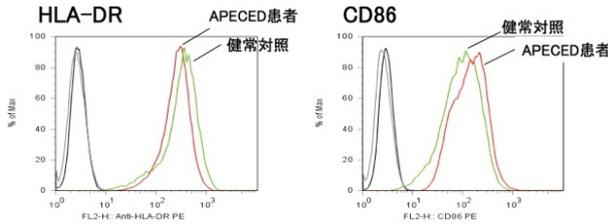
T- (nu/nu), B- (μ MT), Aire KO, Rag-1 KO, マウスにおけるカンジダ感染(4.0×10^4 CFU/0.2ml i.v.)に対する感受性



III. AIRE の機能

AIRE の機能については、AIRE 変異を有する APECED 患者および健康人由来の EB ウイルストランスフォーム B 細胞、および単球を用いたアレイ解析で、抗原提示に関する HLA DR、CD86 副刺激分子、ケモカイン/ケモカイン受容体遺伝子とその標的遺伝子候補として挙げられたので、定量 PCR、FACS 解析 (下図) で、さ

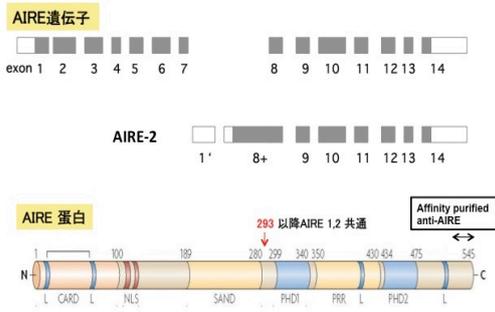
AIRE 遺伝子変異を有する APECED 患者と健康対照における EBV-B 細胞の抗原提示関連分子の発現 (FACS 解析)



らに検討を進める必要がある。今後、前述の microRNA あるいは人工的に作製した siRNA によるノックダウンや AIRE 導入により、AIRE が関与する機能解析研究をさらに推進する必要がある。

IV. AIRE が会合する蛋白・標的遺伝子の探索と同定

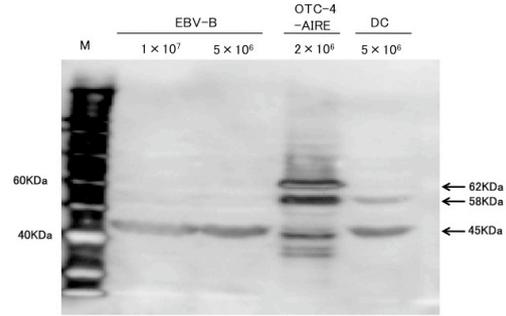
AIRE 遺伝子と AIRE 蛋白の構造



AIRE に対する抗体は、C-末端 12 ペプチドで免疫し、アフィニティ純化した精製抗体を用いて、非特異反応を抑えることが可能となった。AIRE を導入した OTC-4 細胞、EBV-B 細胞、樹状細胞で検討したところ、樹状細胞では、58kDa の AIRE 全蛋白と 45kDa の AIRE-2 のスプライスバリエント (上図) と思われる蛋白を検出したのに対し、EBV-B 細胞では、45kDa のフラグメント蛋白のみを検出した (右上図)。

従って、AIRE 蛋白はその発現細胞によって、サイズが異なり、機能も多様である可能性が高い。このことは自己免疫調節の中心臓器である胸腺において、どのサイズの蛋白が発現しているかの検討が重要であることを

アフィニティ純化 AIRE-C 末端抗ペプチド抗体を用いた Western Blot

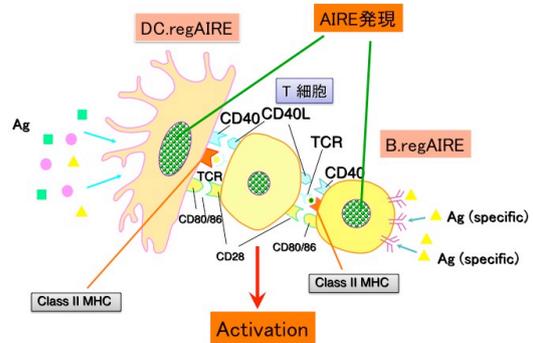


強く示唆している。さらに、フラグメントが C-末端蛋白であるのかも含め、全 AIRE 蛋白に対する抗体の作製による検討、N-末端蛋白に対する抗体を用いた検討も必要である。

* まとめと今後の展開

Aire KO マウスがカンジダに感受性亢進であることを確認できたので、これから、その機能的な解析を特に TH17 応答に焦点を当てながら行うべきであると考えられる。特に、B リンパ球、樹状細胞には明らかな発現があるため、その詳細な機能とメカニズムの解明へと展開したい。

AIRE を発現し免疫応答調節に関する樹状細胞 (DC) と B 細胞



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 11 件)

1. Wada N, Nishifuji K, Yamada, Kudoh J, Shimizu N, Matsumoto M, Peltonen P, Nagafuchi S, Amagai M. Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T cell tolerance. *J Invest Dermatol* 131, 410-417, 2011.

2. 永淵正法. ウイルス糖尿病と自己免疫糖尿病. 臨床と微生物 38(1):57-61, 2011.
 3. Nagafuchi, S., Katsuta, H., Anzai, K. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and Beta-cell function. N Engl J Med 362, 761, 2010.
 4. Akari Inada, Oogi Inada, Hiroshi Fujii, Tomoyuki Akashi, Katsuo Sueishi, Atsushi Fukatsu, Seiho Nagafuchi. Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin induced diabetes associated with β cell regeneration. Diabetology International 1(1):49-59, 2010.
 5. 永淵正法, 近藤しおり. 自己免疫性1型糖尿病とウイルス感染. Diabetes Frontier 21 (3): 314-319, 2010.
 6. 永淵正法, 塚本浩, 新納宏昭, 小林隆志. 自己免疫疾患と炎症. 細胞工学 29(9):769-775, 2010.
 7. 永淵正法. 糖尿病発症に関するウイルス感染. 感染症 40(5):19-24, 2010.
 8. Nagafuchi S. The role of B cells in regulating the magnitude of immune response. Microbiol Immunol 54:487-490, 2010.
 9. 大澤進, 永淵正法. 1型糖尿病の成因: 環境因子. 月刊糖尿病 1(6):31-39, 2009.
 10. Nagafuchi S, Umene K, Yamanaka F, Oohashi S, Sinndo M, Kurisasi H Kudoh J, Shimizu N, Hara T, Harada M. Recurrent herpes simplex virus infection in a patient with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy associated with L29P and IVS9-1G>C compound heterozygous autoimmune regulator gene mutations J Intern Med 261:605-610, 2007.
 11. 永淵正法, 栗崎宏憲. 特異な自己免疫病 APECED (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis ectodermal dystrophy) の責任遺伝子 AIRE. 感染・炎症・免疫 37:88-91, 2007.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 松尾友仁, 進藤美恵子, 野口由樹子, 永尾幸大, 小田淑恵, 吉田英子, 藤田麻子, 栗崎宏憲, 勝田仁, 永淵正法. アフィニティカラム精製抗AIRE抗体を用いたWestern Blotting法によるAIRE蛋白の発現解析 第53回日本糖尿病学会学術講演会 平成22年5月29日. 岡山市
 2. 野口由樹子, 松尾友仁, 進藤美恵子, 小田淑恵, 栗崎宏憲, 永淵正法. 自己免疫調節(Autoimmune Regulator:AIRE)遺伝子のAIRE遺伝子導入細胞とT細胞における発現制御機構. 83回日本感染症学会総会. 平成22年4月26日. 京都市.
 3. 栗崎宏憲, 藤本秀士, 光山正雄, 永淵正法. Aire欠損マウスを用いた *Candida albicans* の感染防御機構の解析 第83回日本感染症学会総会. 東京都. 平成21年4月24日. 東京都.
 4. Matsuo T, Noguchi Y, Nagao Y, Shindo M, Kogawa K, Iwakiri R, Akashi 2, Hara T, Kudoh J, Shimizu N, Kurisasi H, Katsuta H, Anzai K, Nagafuchi S. The significance of B cells in the pathogenesis of type 1 diabetes and a possible role of AIRE gene. The 69th annual meeting of American Diabetes Association Scientific Sessions, 5-9, June, 2009. New Orleans.
 5. 野口由樹子, 松尾友仁, 進藤美恵子, 小田淑恵, 栗崎宏憲, 永淵正法. 自己免疫調節(Autoimmune Regulator:AIRE)遺伝子のAIRE遺伝子導入細胞とT細胞における発現制御機構とその意義. 第77回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 福岡市. 2009. 11. 19.
 6. 松尾友仁, 進藤美恵子, 小川秀一郎,

栗崎宏憲、永淵正法. 「自己調節遺伝子 AIRE (Autoimmune Regulator) の EBV transformed B cell における発現制御とその意義」. 第 82 回日本感染症学会総会. 平成 20 年 4 月 17-18 日. 松江市.

7. 栗崎宏憲、松尾友仁、進藤美恵子、小川秀一郎、藤本秀士、光山正雄、永淵正法. Aire 欠損マウスを用いた自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症の感染防御障害機構の解析. 第 82 回日本感染症学会総会. 平成 20 年 4 月 17-18 日. 松江市.

8. 松尾友仁、吉田英子、進藤美恵子、濱田寛子、河野弥季、小川秀一郎、内野由梨、栗崎宏憲、永淵正法. アフィニティカラム精製抗 AIRE ペプチド抗体をもちいた蛋白の発現解析. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会. 平成 20 年 5 月 22-24 日. 東京.

9. Seiho Nagafuchi, Hironori Kurisaki, Tomohito Matuso, Hiroko Hamada, Maya Iwanaga, Miki Kawano, Rimiko Koyanagi-Katsuta, Hitoshi Katsuta, Mieko Shindo, Eiko Yoshida, Kazuhiko Kogawa, Toshiro Hara, Mine Harada, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, The significance of Autoimmune Regulator (AIRE) Gene, Responsible for Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis Ectodermally Dystrophy (APECED), in Both Central and Peripheral Immune System. The 68th annual meeting of American Diabetes Association Scientific Sessions, 6-11, June, 2008. San Francisco.

10. 松尾友仁、進藤美恵子、松尾友仁、小川秀一郎、栗崎宏憲、原田実根、永淵正法. 自己調節遺伝子 AIRE (Autoimmune Regulator) の末梢 T 細胞系列における発現制御とその機能. 第 81 回日本感染症学会総会. 平成 19 年 4 月 10 日. 京都市.

11. 永淵正法、小川秀一郎. 単一の単純ヘルペスウイルス株により初感染から再発性口内炎を繰り返した L29P, IVS9-1G>C の AIRE 遺伝子変異を有する自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉性ジストロフィー (APECED) の一例. 第 48 回日本臨床ウイルス学会. 平成 19 年 6 月 3 日. 富山市.

12. 永淵正法、進藤美恵子、吉田英子、原田実根、小河一彦、安西慶三、赤司朋之. 再発性 HSV 感染症を併発した 1 型糖尿病を有する APECED 患者の 1 例. 第 45 回日本糖尿病学会九州地方会. 平成 19 年 10 月 12-13 日. 宮崎市.

13. 松尾友仁、進藤美恵子、小川秀一郎、栗崎宏憲、永淵正法. 末梢血免疫担当細胞における自己免疫調節 (Autoimmune regulator: AIRE) 遺伝子の発現制御機構とその機能. 第 77 回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 平成 19 年 11 月 15-16 日. 佐賀市.

〔図書〕 (計 1 件)
永淵正法、安西慶三、南昌江、滝井正人、樗木晶子、近藤しおり、久保千春. 糖尿病治療ハンドブック. 医学出版. pp. 1-317. 2010.

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.shs.kyushu-u.ac.jp/nagafuchi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永淵 正法 (NAGAFUCHI SEIHO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 00150441

(2) 研究分担者

栗崎 宏憲 (KURISAKI HIRONORI)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 70403962

(3) 研究分担者

光山 正雄 (MITSUYAMA MASAO)
九州大学・医学研究院・教授
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10117260