

平成 21 年 3 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390274

研究課題名 (和文) 遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE の機能解析

研究課題名 (英文) Studies on the function of AIRE, a gene responsible for the hereditary type of autoimmune disease

研究代表者

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

研究成果の概要：種々の自己免疫疾患は胸腺における自己寛容成立機構の破綻によって起こると考えられる。自己寛容成立機構における胸腺上皮細胞の役割を胸腺上皮細胞に特異的に発現する転写調節因子 AIRE の遺伝子改変マウスを用いて解析した。すなわち、AIRE 欠損マウス (AIRE-KO) に加え新たに AIRE 遺伝子の発現制御下に蛍光分子マーカー GFP を発現する AIRE/GFP ノックインマウス (AIRE/GFP-KI) を作製し、胸腺上皮細胞の分化プログラムにおける AIRE の役割を解析した。その結果、AIRE は胸腺上皮細胞が最終分化段階に成熟するために必要な分化因子として作用していることが明らかになった。すなわち、AIRE は多様な自己抗原が発現できる最終分化段階にまで胸腺上皮細胞を分化させるために必要であり、それによって自己寛容の成立に必要な胸腺微小環境形成に寄与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 2008 年度 | 7,000,000 | 2,100,000 | 9,100,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

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：自己免疫疾患、胸腺、AIRE

1. 研究開始当初の背景

胸腺における自己反応性 T 細胞の除去 (negative selection) には胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) によって多様な組織特異的自己抗原 (tissue-specific antigen: TSA) が T 細胞に提示されなければならない。遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE は mTEC に特異的に発現し、このプロセスに関わっていると考えられるが、そのメカニズムの詳細は不明であ

る。AIRE による TSA の発現制御機構については現在のところ 2 つの異なるモデルが提唱されている。一つは mTEC における多様な TSA 発現を AIRE 自身が転写レベルで直接制御しているという考え方であり、このモデルでは AIRE に mTEC に対する分化因子としての役割があるとは考えない (terminal differentiation model)。これに対してもう一つのモデルでは多様な TSA 発現の転写制御機構に AIRE は直接関与せず、AIRE の働きと

は独立に mTEC の最終分化段階において獲得される多様な TSA 発現状態にまで AIRE が mTEC を分化させると考える (developmental model)。

2. 研究の目的

本研究では上記の二つのモデルを検証し、自己寛容の成立機構における mTEC および AIRE の役割を明らかにしたいと考え実験を行った。すなわち、AIRE の詳細な機能解析によって、原因不明の難病である自己免疫疾患の原因究明を図る。

3. 研究の方法

AIRE 欠損マウス (AIRE-KO) に加え、AIRE 遺伝子の発現制御下に蛍光分子マーカー-GFP を発現する AIRE/GFP ノックインマウス (AIRE/GFP-KI) を新たに作製した。AIRE/GFP-KI では AIRE 発現細胞を GFP 発現細胞として同定でき、それによって AIRE 発現細胞と AIRE 非発現細胞とを明確に区別できる。AIRE/GFP-KI から FACS sorting によって AIRE 発現 mTEC および AIRE 非発現 mTEC を採取し、mTEC が発現する代表的な TSA である *insulin 2* や *CRP* の発現レベルを定量 PCR 法によって評価した。他方、AIRE/GFP-KI のうち両アレルに GFP 遺伝子を挿入し、それによって AIRE 遺伝子をホモで欠損する個体 (*gfp/gfp*)、あるいは AIRE-KO の胸腺組織標本を用いて AIRE 欠損に伴う AIRE 発現 mTEC と AIRE 非発現 mTEC の細胞構築化を評価した。terminal differentiation model が正しければ基本的に AIRE 欠損にともなう mTEC の細胞構築変化は認めないと考えられる。これに対し developmental model が正しければ、AIRE 欠損により mTEC の細胞構築は大きく変化することが予想される。なお、全ての実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理規則、および徳島大学動物実験指針を遵守して行った。また、遺伝子改変マウスは徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部附属動物実験施設内で高いグレードの SPF 環境下で飼育され、実験期間中、微生物モニター検査が定期的に行われた。

4. 研究成果

AIRE/GFP-KI では期待通り、AIRE 発現細胞が GFP によって標識された。興味深いことに、AIRE 遺伝子をホモで欠損する個体 (*gfp/gfp*) の胸腺でも GFP 陽性細胞が多数認められ、このことから AIRE 自体は AIRE を発現する mTEC の系列決定に関与しないことが明らかになった。次いで、AIRE/GFP-KI (*gfp/+*) および AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) の AIRE 発現細胞および AIRE 非発現細胞の各分画を FACS sorting し、*insulin 2* (AIRE 欠損マウス mTEC で発現が低下している、いわゆる

AIRE-independent TSA gene) の発現を定量 PCR 法により解析した。その結果、AIRE-dependent TSA gene である *insulin 2* の発現はもっぱら AIRE 発現細胞から正常 AIRE 蛋白質の存在に依存して認められるのに対し、AIRE-independent TSA gene である *CRP* の発現は AIRE 発現細胞と AIRE 非発現細胞の両方から、正常 AIRE 蛋白質の有無に関わらず検出された。次いで、AIRE 発現 mTEC を抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色によって可視化したところ、AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) の AIRE 発現細胞は形態変化 (樹状突起を欠く球状 mTEC) と分布異常 (皮質・髄質境界領域に密集せず、髄質の中心に集中する傾向) を示した。また、最終分化段階の mTEC において観察される involucrin 発現を抗 involucrin 抗体を用いた免疫組織染色によって検討したところ、AIRE-KO および AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) のいずれにおいても involucrin 陽性細胞の減少を認めた。さらに involucrin を強く発現する Hassall 小体の形成は、AIRE-KO および AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) において欠失していた。このことから AIRE は AIRE 発現 mTEC の分化を制御しており、それによって胸腺の mTEC の細胞構築化に対して重要な役割をもつことが明確になった。

以上の私達の AIRE/GFP-KI を用いた解析結果は terminal differentiation model に矛盾しないものであったが、AIRE 欠損にともない mTEC の細胞構築化が大きく変化することが明らかになったことから developmental model の考え方がより正しいと結論付けた。しかしながら、ごく最近、AIRE が非メチル化ヒストン H3K4 に特異的に結合するという報告が相次いでなされ、多様な TSA 発現を AIRE 自身が転写レベルで直接制御している可能性が示唆されている。developmental model を支持する私達の結論と terminal differentiation model を支持するこうした報告を検証する上で、AIRE の標的遺伝子が一体何であるかを明らかにすることが必要不可欠である。

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 7 件)

- ① Matsumoto, M., Zhou, Y., Matsuo, S., Nakanishi, H., Hirose, K., Oura, H., Arase, S., Ishida-Yamamoto, A., Bando, Y., Izumi, K., Kiyonari, H., Oshima, N., Nakayama, R., Matsushima, A., Hirota, F., Mouri, Y., Kuroda, N., Sano, S., and Chaplin, D.D.

Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 6720-6724, 2008.

② Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J-I., Akiyama, T., and Takahama, Y.

The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator.

Immunity 29: 438-450, 2008.

③ Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., and Inoue, J-I.

The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance.

Immunity 29: 423-437, 2008.

④ Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., and Matsumoto, M.

Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.

J. Exp. Med. 205: 2827-2838, 2008.

⑤ Matsumoto, M.

Autoimmune regulator functions in

autoimmunity control.

Expert Rev. Clin. Immunol. 3: 891-900, 2007.

⑥ Matsumoto, M.

Transcriptional regulation in thymic epithelial cells for the establishment of self tolerance.

Arch. Immunol. Ther. Exp. 55: 27-34, 2007.

⑦ Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, H.S., Matsumoto, M., and Minato, N.

Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin.

Nature Immunol. 8: 304-311, 2007.

[学会発表] (計 10 件)

① Masashi, Y., Mouri, Y., Nishikawa, Y., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., and Matsumoto, M.

Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.

第 38 回日本免疫学会総会、京都、2008. 12. 3

日本免疫学会総会・学術集会記録第 38 巻, p235, 2008.

② Matsumoto, M.

Aire-dependent organization of thymic microenvironment.

第 38 回日本免疫学会総会、京都、2008. 12. 2

日本免疫学会総会・学術集会記録第 38 巻, p8, 2008.

③ Yano, M., Nishikawa, Y., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y. and Matsumoto, M.

Aire controls the differentiation program

of medullary thymic epithelial cells.

ThymUS

San Juan, Puerto Rico, November 10, 2008.

Abstract p43.

④ Matsumoto, M., Sano, S.,
Ishida-Yamamoto, A., Zhou, Y., Matsuo, S.,
Nakanishi, H., Hirose, K., Oura, H., Arase,
S., and Chaplin, D.D.

Targeted deletion of the murine
corneodesmosin gene delineates its
essential role in skin and hair
physiology.

International Investigative Dermatology
2008, Kyoto, May 17, 2008.

⑤ Niki, S., Mouri, Y., and Matsumoto, M.
Target-organ specificity of autoimmunity
defined by Aire

第37回日本免疫学会総会、品川、2007. 11. 22.

⑥ Matsumoto, M.

Aire-dependent organization of thymic
microenvironment for the establishment of
self-tolerance

第37回日本免疫学会総会、品川、2007. 11. 21.

⑦ Matsumoto, M.

Transcriptional regulation in the thymus
for the establishment of self-tolerance
13th International Congress of Immunology
Rio de Janeiro, Brazil, August 21, 2007.

⑧ Matsumoto, M.

Thymic stromal factors that regulate
establishment and maintenance of
self-tolerance

RCAI-JSI International Symposium on
Immunology 2007

Development and Maintenance of Immune
System

Pacifico Yokohama, Yokohama, July 26, 2007.

⑨ Yano, M., Mouri, Y. and Matsumoto, M.

Thymic organogenesis controlled by NF- κ B
activating factors

FOCiS 2007

San Diego, USA, June 9, 2007.

⑩ Mouri, Y. and Matsumoto, M.

Aire in thymic stroma controls early
thymopoiesis

The Rolduc Workshop on Thymocyte and T cell
Biology

Kerkrade, Netherlands, May 20, 2007.

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

堀家慎一 (HORIKE SHINICHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号: 40448311

堀家牧子 (HORIKE MAKIKO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・COE
研究員
研究者番号: 50448312