

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790361

研究課題名（和文） オートファジー依存的免疫応答機構の解明

研究課題名（英文） Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation

研究代表者

堀家 牧子（HORIKE MAKIKO）

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・博士研究員

研究者番号：50448312

研究成果の概要：平成 19 年度は、Atg-7 のノックアウトマウスの胎仔胸腺をヌードマウスに移植する実験を行ったが、自己免疫疾患の発症は観察されなかった。そこで、平成 20 年度は Atg-7, Atg-5 さらに Atg-3, Atg-8 をそれぞれあるいは複数同時に RNAi により発現抑制を行い、CD4 陽性 T 細胞クローンによる認識効率の低下の有無を検証するため、RNAi のコンストラクションを作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自己寛容、胸腺、オートファジー、Atg7

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺が自己免疫疾患の病態に深く関わる「場」であることは既に明白であるが、自己反応性 T 細胞の除去に働く胸腺乾湿組織 (thymic stroma) の役割については、依然、不明な点が多い。胸腺で負の選択 (negative selection) を起こすためには胸腺間質組織、特に胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cell) には全身のありとあらゆる自己抗原 (self-antigen) が存在すると考えるのが自

然であり、事実、徳島大学松本満研究室では NF- $\kappa$ B-inducin kines (NIK)、TRAF (TNF receptor-associated factor) 6 および AIRE (autoimmune regulator) の遺伝子変異・改変マウスの TEC では自己抗原の発現に障害があり、それによって自己免疫病態が生ずることを示してきた。これらの実験から、NIK 変異マウスおよび TRAF6 欠損マウスでは自己抗原を発現する TEC、特に髄質上皮細胞 (mTEC) の発生異常が自己寛容破綻の主な原因である

のに対して、AIRE 欠損マウスでは TEC の分化や増殖には明らかな異常はなく、AIRE は未同定のメカニズムによって mTEC による自己抗原の発現を制御していると考えられた。これら異なる病態によって central tolerance の確立に異常をきたすマウス解析を通じて明らかになった点は、自己寛容の成立機構に働く自己抗原の発現機構は多様であるという事実である。すなわち、新たな自己抗原発現のメカニズムを解明することは、自己免疫疾患の成立機構を知る上で、きわめて重要な研究課題である。

オートファジーは、主として栄養飢餓状態に誘導される大規模な細胞蛋白分解・処理機構であるが、非常に興味深いことに細胞内に侵入してきた細菌の分解にも利用されていることがわかった。A 群溶血連鎖球菌や赤痢菌はエンドサイトーシスによって細胞内に侵入した後に、一部はエンドソーム膜を破壊してサイトゾルに脱出することが知られている。しかしながら、これらの細菌もやがてオートファゴソーム様構造によって再び取り囲まれ、リソソームと融合の後に分解されることが示された。このように、オートファジーは免疫システムにおいても重要な働きをしていることが報告され、これまで非選択的で大雑把（バルク）と考えられてきたオートファジーにも選択性が存在することを示唆するという点においても非常に重要である。一般的に細胞内抗原は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解された後、小胞体を経由して MHC クラス I 分子によって提示される。しかし、細胞内のある種の内在性タンパク質は MHC クラス II によっても提示されることが知られていた。2005 年 Munz らは、内在性抗原である Epstein-Barr virus (EBV) 由来の EBNA1 タンパク質にグリシンとアラニンの繰り返しからなる領域が存在し、この部分がプロテアソ-

ムによる分解を抑制するため、EBNA1 に対しては CD8 陽性 killer T 細胞は誘導されず、CD4 陽性 killer T 細胞のみが誘導される。その際のメカニズムとして、細胞質に存在する EBNA1 がオートファジーによってリソソームへ輸送され、そこで processing を受けた後に MHC class II と結合し、細胞表面へと輸送されることが報告された。このことから、オートファジーは MHC class II 経路を介する内在性自己抗原の提示に関わっている可能性がある。事実、水島らは、mTEC は恒常的にオートファゴソームの形成がみられる特殊な細胞であることを報告している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、オートファジーによる MHC class II 経路を介した内在性自己抗原の提示が、自己寛容の成立に関与しているかを明らかにすることにある。

徳島大学松本満研究室においても、オートファゴソームを特異的に染色することのできる抗 LC-3 抗体を用いて、マウスの胸腺の免疫組織染色を行い、胸腺では他の臓器に比較してオートファゴソームの形成が顕著であることを確認した。このことは、胸腺においてオートファジーが何らかの重要な生理機能を担っていることを強く示唆する。一方、この免疫組織染色では、オートファゴソームの形成が胸腺上皮細胞または T 細胞のいずれに存在するかを厳密に特定することはできない。すなわち、オートファジーは胸腺上皮細胞で重要な役割を担っている可能性に加えて、血球系細胞の中でも何らかの機能を果たしている可能性も考えられる。事実、すでに細胞内寄生体 (group A streptococcus, Mycobacterium tuberculosis) に対する innate immunity ではオートファジーが重要な役割を果たすことが示された。さらに、Th1 サイトカインであ

る IFN- $\gamma$  がオートファジーを促進し、逆に Th2 サイトカインである IL-13 がオートファジーを阻害する事実から、オートファジーは Th1/Th2 バランスの制御といった acquired immunity にも関与している可能性がある。こうした知見をふまえ、胎仔胸腺移植の実験に加え、骨髄（胎仔肝細胞）移植の実験も併せて行い、免疫システムにおけるオートファジーの意義に着いて、より包括的に検討したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) Atg7 欠損マウスを用いた胎仔胸腺移植実験

Atg7 欠損マウスはオートファゴソームの形成不全により、オートファジーを生じず、生後早期に死亡する。Atg7 ヘテロ欠損マウス(順天堂大学・小松雅明博士より供与)を交配後、胎齢 14.5 日目の胎仔を取り出す。取り出した胎仔胸腺を Nuclepore フィルター上にのせ、2-deoxyguanosine (DG) を含む培養液中に浮かべて CO2 インキュベーター内で 4 日間培養する。この間に、取り出した胎仔の身体の一部から DNA を抽出し、PCR によるジェノタイプングを行い、Atg7 欠損胎仔胸腺と対照胎仔胸腺とを識別する。この器官培養によって T 細胞が除去され、「器」のみになった胎仔胸腺を血流の豊富なヌードマウスの腎被膜下に移植する。腎被膜下に移植された胎仔胸腺は T 細胞の増殖・分化の「場」となって、ヌードマウス由来の T 前駆細胞の成熟を助ける。移植後 6 週目にヌードマウスにおける胸腺の再構築を FACS を用いて確認した後、全身諸臓器の病理学的な解析を行い、自己免疫病態の有無を検討する。

#### (2) Atg7 欠損マウスを用いた胎仔肝細胞移植実験

胎齢 14.5 日の胎仔肝をすりつぶして胎仔肝細胞を採取し、致死量の放射線照射を行っ

たレシピエントマウスに静脈注射し、Atg7 欠損マウス由来の骨髄細胞によって再構築されたマウスを作製する。移植後 6 週間目に、レシピエントマウスの全身臓器を取り出して病理学的な解析を行うとともに、細胞性免疫を中心とした T 細胞機能の評価を行い、T 細胞におけるオートファジーの役割を明確にする。

#### (3) CD4 陽性 T 細胞クローンにおける RNAi による Atg タンパク質群のノックダウン

オートファゴソームの形成には Atg-7 以外にも様々な Atg タンパク質群が関与している。そのため、単独のノックアウトでは互いの機能を補い合い、表現系が出ないことも予想される。そこで Atg-7、隔離膜の伸長で働く Atg-5 さらに Atg-7 と結合する Atg-3, Atg-7 と同じ E1 様酵素である Atg-8 を、CD4 陽性 T 細胞クローンにおいて、それぞれあるいは複数同時に RNAi によるノックダウン実験を行い、CD4 陽性 T 細胞クローンによる認識効率の低下が認められるか否かを検証し、オートファジーのどのプロセスが内在性自己抗原の提示に重要なのかを検討する。

### 4. 研究成果

Atg-7 欠損マウス胎齢 14.5 日目の胎仔より、胎仔胸腺を取り出し、Nuclepore フィルター上にのせ、2-deoxyguanosine (DG) を含む培養液中に浮かべて CO2 インキュベーター内で 4 日間培養した。この間に、取り出した胎仔の身体の一部から DNA を抽出し、PCR によるジェノタイプングを行い、Atg7 欠損胎仔胸腺と対照胎仔胸腺とを識別した。T 細胞が除去された Atg7 欠損胎仔胸腺をヌードマウスの腎被膜下に移植した。移植後 6 週目にヌードマウスにおける胸腺の再構築を FACS を用いて確認した後、全身諸臓器の病理学的な解析を行った。その結果、Atg-7 欠損マウス由来の胎仔胸腺の移植によって、いずれの臓器にお

いてもレシピエントマウスに自己免疫疾患の発症は観察されなかった。また、制御性 T 細胞の産生についても検討を行ったが、異常は認められなかった。このことから、少なくとも Atg-7 は胸腺上皮細胞において MHC class II 経路を介した内在性の自己抗原の提示においては重要な働きをしている可能性は低いと考えられた。本研究で着目した Atg7 は、Atg8, Atg12 両オートファゴソーム形成過程で共通のユビキチン E1 酵素として働く事が知られている。また、Atg3, Atg10 はユビキチン E2 酵素であり、E3 酵素は同定されていない。つまり、オートファジーによる内在性自己抗原の提示にユビキチン酵素がかかわっている可能性を検証する際、Atg7, Atg3, Atg10 を同時に欠損させる必要があるのではないかと思われる。

また、Atg-12 と複合体を形成し、隔離膜の伸長に関与している Atg-5 のノックアウトマウスを用いた同様の実験では、内在性自己抗原の提示に異常が認められている。さらに、Munz らにより、RNAi で Atg-12 の発現をノックダウンすると、CD4 陽性 T 細胞クローンによる認識効率が低下することが示され、オートファジーが内在性自己抗原の提示において何らかの役割を果たしていることが示唆された。つまり、これまでの研究でオートファゴソーム形成過程 Atg12 系が内在性自己抗原の提示にかかわっている事が明らかにされているが、もう 1 つの Atg8 系が内在性自己抗原の提示にかかわっているかは不明である。そこで、Atg8 系を構成する Atg-7, Atg-4, Atg-3, Atg-8 を、CD4 陽性 T 細胞クローンにおいて、RNAi によるノックダウン実験を行い、CD4 陽性 T 細胞クローンによる認識効率の低下が認められるか否かを検証し、オートファジーのどのプロセスが内在性自己抗原の提示に重要なかを明らかにするため、それぞれ RNAi を行う

ためのコンストラクションを作製した。さらに、各々のコンストラクションで実際ターゲット遺伝子がノックダウンされることを HeLa 細胞で確認した。今後、実際に CD4 陽性 T 細胞クローンによる認識効率の低下の有無を検証し、オートファジーのどのプロセスが内在性自己抗原の提示に重要なかを検討する。このように、オートファジーには非常に数多くの Atg ファミリー分子が関与して複雑なオートファゴソーム形成過程を構築している。つまり、オートファジーが内在性自己抗原の提示にどのように関与しているかを明らかにするには一遺伝子の欠損だけでは不十分であり、複数の遺伝子欠損マウスおよび細胞株を用いた実験が必要である。

## 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 1 件)

- ① 矢野雅司, 黒田範行, Hongwei Han, 堀家牧子 (他 11 名, 4 番目), “Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.”, *The Journal of Experimental Medicine* 誌, 205 巻, 2827-2838, 2008, 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀家 牧子 (HORIKE MAKIKO)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・  
博士研究員

研究者番号 : 50448312

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし