

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16613

研究課題名（和文）AIREによる糖尿病抵抗性獲得機構の実験病理学的解析

研究課題名（英文）Pathological analysis of the mechanism underlying resistance to diabetes controlled by AIRE

研究代表者

松本 穰（MATSUMOTO, Minoru）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：30836250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：I型糖尿病患者は世界的に増加の一途を辿っているが、その発生機序は未だに不明である。他方、AIREは胸腺の髄質上皮細胞に発現し、その機能欠損に伴い種々の内分泌臓器を標的とする遺伝性自己免疫疾患を呈する。興味深いことに、ヒトI型糖尿病のモデルマウスであるNODマウスにヒトAIREを付加的に発現させたところ、糖尿病の発症を完全に抑えることが出来た。骨髄移植を用いた実験により、この糖尿病抵抗性はAIREを付加的に発現する骨髄由来抗原提示細胞が原因であり、さらに膵臓 細胞関連抗原の提示に重要な役割を担うXcr1陽性樹状細胞がAIREの発現レベルに応じて減少していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型糖尿病の原因究明は、近年の患者数の増加をふまえると、緊急性の高い重要研究課題である。さらに、AIREは単一遺伝子の異常により遺伝性の自己免疫を発症するが、AIREの詳細な機能は未だ完全に解明されたとは言い難い。本研究では、ヒトAIREの付加的な発現に伴って、特定のモデルにおいて糖尿病抵抗性を示すメカニズムを明らかにした。本研究はI型糖尿病の発症およびAIREによる自己寛容成立のメカニズムの双方に焦点を当てた、非常に独自性をもった内容である。さらに、AIREの機能異常に基づく疾患病態の解明は、AIRE欠損症のみならず、他の自己免疫疾患の原因究明にもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The number of patients with type I diabetes mellitus is increasing worldwide, but its pathogenesis is still unclear. On the other hand, AIRE is expressed in the medullary epithelial cells of the thymus, and its loss of function results in hereditary autoimmune diseases that target various endocrine organs. Interestingly, additional expression of human AIRE in NOD mice, a mouse model of human type I diabetes, showed complete resistance to the development of diabetes. Experiments utilizing bone marrow transplantation revealed that this diabetic resistance was acquired by bone marrow-derived antigen presenting cells that additionally express AIRE. Furthermore, Xcr1 positive dendritic cells, which play an important role in the presentation of pancreatic beta cell-associated antigens, were revealed to be reduced in response to the level of AIRE expression.

研究分野：実験病理学

キーワード：AIRE I型糖尿病 Xcr1陽性樹状細胞 NOD

### 1. 研究開始当初の背景

I型糖尿病の原因究明は、近年の患者数の増加をふまえると、緊急性の高い重要研究課題である。残念ながらI型糖尿病の原因は未だに不明であるが、その原因究明にヒトと極めて類似した病態を示すNOD (non-obese diabetic) マウスが利用できる。他方、APS-1 (Autoimmune polyglandular syndrome type 1) は副甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、皮膚粘膜カンジダ症を3主徴とするが、本症がメンデル型遺伝を示す自己免疫疾患であることが原因遺伝子のクローニングによって明らかになった (Nature Genet. 1997)。APS-1の原因遺伝子であるAIREは、自己抗原の提示によって自己反応性T細胞の除去や制御性T細胞 (Treg) の産生にはたらく胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) に発現し、自己寛容の成立に必須の役割を担うと考えられている。したがって、AIREの機能異常に基づく疾患病態の解明は、APS-1のみならず、他の自己免疫疾患の原因究明にもつながると期待されているが、AIRE遺伝子のクローニングから既に20年以上が経った今日でも、そのメカニズムは統一見解には至っていない。

これら2つの事実から、研究代表者は、mTECや樹状細胞 (dendritic cell: DC) といった抗原提示細胞においてAIREを付加的 (過剰) に発現させれば、自己免疫病態、とりわけNODにおけるI型糖尿病を阻止できるのではないかと考えた。そこで、本来のAIRE発現細胞であるmTECに加え、骨髄由来のAIRE発現細胞 (胸腺外AIRE発現細胞) の両方でAIREを過剰発現させるために、MHC class IIプロモーター下にAIRE cDNAを配置した導入遺伝子を構築した。NOD受精卵にマイクロインジェクション法によって遺伝子導入を行いAIRE-Tgを樹立した (J. Autoimmun. 2008) ところ、期待した通り、高いAIRE発現レベルを示した独立した2ラインにおいて、I型糖尿病の発症が完全に阻止された。組織学的な解析でも、AIRE-Tgでは生後30週齢に達してもラ氏島炎の発生を全く認めなかった。

### 2. 研究の目的

I型糖尿病は多因子疾患とされ、事実、ヒトのI型糖尿病モデルマウスであるNODでは、20以上の遺伝子座が糖尿病の発症に関わることが明らかになっている。一方、AIRE欠損症は単一遺伝子の異常により生じる病気であるため、遺伝子改変マウスを用いてヒトの病気と同じ病態をもつ疾患モデルマウスを作製・解析できるという利点がある。事実、AIRE欠損マウスはヒトの場合と同じく、例外なく自己免疫病態を発症するという結果が申請者の研究室から報告されている (J. Immunol. 2005; J. Clin. Invest. 2006; J. Exp. Med. 2008; J. Exp. Med. 2010)。

NODマウスにおいてAIREを付加的 (過剰) に発現させれば、I型糖尿病を阻止できるのではないかという予測は極めて素朴なアイデアであるが、実際にどのようなメカニズムによって糖尿病の発症が阻止されたかを明らかにすることは、それほど容易ではない。その最大の理由は、AIREの欠損によって、なぜ胸腺におけるトレランスが破綻するかという最重要課題が未だに明らかになっていないことに起因する。すなわち、AIREの欠損によって、なぜ負の選択やTregの産生が障害されるのかは、AIRE遺伝子のクローニングから既に20年以上が経った今日でも統一見解には至っていない。本研究では、AIREによる自己免疫病態修復のメカニズムを解析することによって、原因不明の難病であるI型糖尿病の発症機構を探るとともに、AIREがどのようなメカニズムによって自己寛容の成立機構にはたらいっているかを免疫病理学的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

AIRE-Tgの作製には、mTECとB細胞や樹状細胞 (DC) で発現するMHC class IIプロモーターを使っているため、まず、糖尿病抵抗性の獲得がmTEC (間質細胞由来) の作用によるものか、あるいはB細胞やDCといったAIRE発現血球細胞 (骨髄由来の抗原提示細胞) によるものを明らかにする目的で、骨髄移植実験を行った。その結果、糖尿病抵抗性の獲得には、AIRE発現血球細胞が寄与していることが判明した。次に、糖尿病抵抗性の獲得におけるB細胞の関与を検討するために、AIRE-TgをB細胞欠損マウス (Ighm-KO) と交配したが、B細胞欠損状態でも糖尿病抵抗性は維持され、AIRE-Tgにおける糖尿病抵抗性にはB細胞が寄与していないことが判明した。

以上の実験結果から、AIRE-Tgにおける糖尿病抵抗性獲得にはAIREを発現するDCが関与している可能性が高いと考えられた。さらに、膵ラ氏島特異的トレランス獲得のメカニズムとして、(1) AIRE発現DCが糖尿病の発症を積極的に抑制している可能性 (dominant mechanism) と、(2) AIRE発現DCが糖尿病の発症を誘導出来ないという可能性 (recessive mechanism) の2つが考えられた。そこで、AIREを過剰に発現するDCが糖尿病誘発性T細胞 (diabetogenic T cell) を活性化できるか否かを検討した。すなわち、膵臓ラ氏島由来の自己抗原を認識するTCR-TgのT細胞 (NY8.3 TCR-Tg由来CD8+ T細胞) をCFSE色素で標識し、静脈内に投与して

膵臓リンパ節における導入細胞の活性化(増殖)を FACS で調べた。その結果、対照となる non-Tg の膵臓リンパ節内では DC によって膵臓ラ氏島由来の自己抗原が提示され、それに反応して NY8.3 CD8+ T 細胞の増殖が観察されたのに対し(注:膵臓ラ氏島由来の自己抗原が提示されない鼠径リンパ節では NY8.3 CD8+ T 細胞の増殖はない)、AIRE-Tg では膵臓リンパ節内の DC による膵臓ラ氏島抗原の提示が行われなため、NY8.3 T 細胞の増殖反応が見られなかった。この結果によると、AIRE-Tg においても AIRE 非発現 DC (正常 DC) が存在すれば、糖尿病を発症するようになると推測された。この仮説を検証するため、B 細胞欠損 AIRE-Tg 由来の骨髓細胞と NOD.scid 由来の骨髓細胞 (AIRE 非発現 DC の供給源) を同時に non-Tg NOD に骨髓移植を行ったところ、AIRE 非発現 DC に存在に伴い、糖尿病の発症を認めた。これらの実験結果より、AIRE を過剰に発現する DC では自己免疫反応を誘導出来ない可能性が高いと考えられた。ちょうどその折、膵臓のラ氏島に存在する、Xcr1 というケモカインレセプターを発現する樹状細胞 (Xcr1+ DC) が、NOD マウスの糖尿病発症に重要である、という米国の Emil Unanue 教授らの研究室からの報告が目にとまった。そこで、同じように糖尿病に抵抗性を示す AIRE-Tg の Xcr1+ DC を解析したところ、膵周囲リンパ節、胸腺、脾臓において著明な減少を認めた。このことから、AIRE-Tg では Xcr1+ DC の減少が、末梢における膵臓細胞抗原の提示障害、およびそれに伴う糖尿病抵抗性の原因と考えた。一方で、まだ糖尿病発症プロセスが始まる前の、3 週齢の NOD マウスの膵臓からラ氏島を分離し(本手技を学ぶため、Emil Unanue 教授の研究室に 3 ヶ月滞在)、糖尿病発症のイニシエーションを担う F4/80 陽性のマクロファージについても解析したが、野生型と AIRE-Tg の間に違いは認めなかった。また、AIRE の過剰発現に伴う Xcr1+ DC への影響を vitro での骨髓細胞の培養でも確認した。野生型および AIRE-Tg の骨髓細胞を Flt3 ligand を添加して 8 日間培養を行い、plasmacytoid DC (pDC)、CD11b+ DC、Xcr1+ DC の 3 つのサブセットにわけて解析したところ、AIRE-Tg では Xcr1+ DC への分化が障害されていることがわかった。また、それぞれのサブセットでヒト AIRE の発現を確認したところ、AIRE-Tg の Xcr1+ DC および CD11b+ DC でヒト AIRE の発現を認めたが、pDC での発現は見られなかった。AIRE-Tg のなかに残存する Xcr1+ DC の遺伝子発現の変化についても確認するため、野生型および AIRE-Tg の Xcr1+ DC を用いて RNA-seq を行った。膵周囲リンパ節では解析のために十分な数の Xcr1+ DC が回収できなかったため、骨髓細胞より vitro で誘導した Xcr1+ DC を利用した。その結果、AIRE-Tg の Xcr1+ DC では CD207 や CD209a といった C-type lectin の発現低下を認めた。これらの分子には関しては 1 型糖尿病発症との関連を示唆する報告もあり、AIRE-Tg にわずかに残存する Xcr1+ DC にも野生型との違いを認めた。

#### 4. 研究成果

野生型の NOD マウスの胸腺では糖尿病誘発性の T 細胞が産生され、所属リンパ節である膵周囲リンパ節で Xcr1+ DC が膵臓細胞抗原を提示し、T 細胞を活性化することによって、糖尿病の発症に至る。これに対して、AIRE-Tg マウスでは、胸腺で糖尿病誘発性の T 細胞が産生されるにも関わらず、膵周囲リンパ節で Xcr1+ DC という特定サブセットの産生が障害されているため、T 細胞の活性化に至らず、糖尿病抵抗性を示すことが明らかとなった。興味深いことに、この AIRE-Tg では糖尿病抑制効果があった一方で、ホモ化によって AIRE の発現レベルを増強することにより、自己免疫性の心筋炎および骨格筋炎を発症することがわかった (J. Autoimmun. 2018)。つまり本来は自己寛容の成立に働くべき AIRE を過剰に発現させることで、同一個体内で膵臓細胞特異的な自己免疫の抑制と、筋組織特異的な自己免疫の発症という相反する現象、いわばアンビバレンス(両価性)を生じた。糖尿病抵抗性は、骨髓由来の抗原提示細胞における AIRE 発現が重要であったが、筋炎に関しては骨髓由来の抗原提示細胞における AIRE 発現と、胸腺 mTEC における AIRE 発現の両方が必要であることが骨髓移植の実験から明らかとなった。すなわち、AIRE-Tg では自己免疫の標的臓器や病態の増悪・寛解が、ヒト AIRE を発現する免疫組織の種類や組み合わせにより決定された。以上の研究結果より、胸腺および末梢トレランスは、自己寛容の成立において個別の役割を担っており、自己免疫疾患の臓器特異性にはそれらの相互作用や組み合わせが関与していることが確認された。また、それらのトレランス機構は、AIRE/Aire の付加的な発現によってコントロールできる可能性があり、本研究成果により I 型糖尿病の病態、および AIRE の新たな機能が明らかとなり、I 型糖尿病の治療戦略に繋がること期待される。本研究内容の成果は研究実績報告書に記載のとおり、International Immunology 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumoto Minoru, Tsuneyama Koichi, Morimoto Junko, Hosomichi Kazuyoshi, Matsumoto Mitsuru, Nishijima Hitoshi | 4. 巻<br>32              |
| 2. 論文標題<br>Tissue-specific autoimmunity controlled by Aire in thymic and peripheral tolerance mechanisms                | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>International Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>117 ~ 131 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/intimm/dxz066  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumoto Minoru, Nishijima Hitoshi, Morimoto Junko, Tsuneyama Koichi, Matsumoto Mitsuru | 4. 巻<br>-           |
| 2. 論文標題<br>AIRE - The Autoimmune Regulator   | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>eLS  | 6. 最初と最後の頁<br>1 ~ 8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/9780470015902.a0027281  | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Minoru Matsumoto, Hitoshi Nishijima, Ryuichiro Miyazawa, Junko Morimoto, Koichi Tsuneyama and Mitsuru Matsumoto. |
| 2. 発表標題<br>Characterization of Aire-expressing DCs with high-sensitivity and high-fidelity Aire-reporter strain             |
| 3. 学会等名<br>第48回日本免疫学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計1件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Minoru Matsumoto, Pedro M. Rodrigues, Laura Sousa, Koichi Tsuneyama, Mitsuru Matsumoto, Nuno L. Alves | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>Springer International Publishing   | 5. 総ページ数<br>31  |
| 3. 書名<br>Thymus Transcriptome and Cell Biology.   |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|