

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16287

研究課題名(和文) AIRE発現樹状細胞が担う胸腺及びリンパ節T細胞の分化成熟機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the differentiation and maturation mechanisms of T cells in thymus and lymph node mediated by AIRE-expressing dendritic cells

研究代表者

宮澤 龍一郎 (MIYAZAWA, Ryuichiro)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：70848374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：AIREは胸腺髄質上皮細胞に強く発現する転写調節因子であるが、末梢組織における微弱なAIRE発現細胞の存在がわかりつつある。本研究では、免疫制御に重要な樹状細胞におけるAIREの機能に着目し、カンジダ感染症に重要なTh17誘導能や遺伝子発現変動解析を実施した。本解析において、AIRE発現運命にある樹状細胞はAIRE欠損状態においても、局在、免疫応答(Th17)、遺伝子発現に大きな変動を認めなかった。以上の研究成果により、AIREはDCにおいて胸腺髄質上皮細胞とは異なる機能を持ち、その機能は胸腺と比較すると限定的であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺髄質上皮細胞で発現するAIREは、免疫システムの根幹である自己・非自己の教育を行う重要な遺伝子であり、その機能の全容解明が求められている。本研究において樹状細胞におけるAIREの機能を示したことは、AIREに関する知見の拡充に繋がると考えられる。更に、AIRE欠損症を始め多くの免疫疾患では、カンジダを始めとする常在細菌への感染が認められるが、AIRE欠損症における口腔カンジダ症に対する新たな治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：AIRE is a transcriptional regulator that is strongly expressed in the medullary epithelial cells of the thymus. However, there is growing evidence of weak AIRE expression in peripheral tissues. In this study, we focused on the function of AIRE in dendritic cells, which are important for immune regulation, and conducted analyses of Th17 induction capacity and gene expression changes during Candida infection. We found that AIRE-expressing dendritic cells did not show significant alterations in localization, immune response (Th17), or gene expression even in the absence of AIRE. These research findings suggest that AIRE has distinct functions in dendritic cells compared to thymic medullary epithelial cells and that its functionality is relatively limited compared to its role in the thymic epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：AIRE 自己免疫疾患 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己組織と病原体を識別する自己寛容(self tolerance)の成立は、免疫機構の根底であり、自己免疫疾患の発症を防ぐ上で欠かすことはできない(引用文献)。AIRE 遺伝子は、T 細胞成熟の場である胸腺、特に胸腺髄質上皮細胞(mTEC)に強く発現する転写調節因子であり、AIRE 遺伝子欠損状態では組織特異的自己抗原(Tissue-restricted antigens:TRAs)の発現が著しく低下し、自己反応性 T 細胞の出現による自己免疫疾患を発症する。そのため、AIRE が TRAs の発現に関与し、自己反応性 T 細胞の除去(負の選択)に寄与すると考えられてきた(引用文献)。

AIRE 遺伝子を欠損した Aire 欠損患者は北欧に比較的多く存在し、粘膜皮膚カンジダ症、副甲状腺機能低下症、副腎不全(アジソン病)、外胚葉形成異常などを示す。その特徴的な症状の頭文字をとり、APECED(Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal syndrome)と呼ばれる。一方、Aire 欠損患者では、自己免疫疾患発症以前より口腔カンジダ症を発症することや(引用文献)、外胚葉形成異常などを発症するため、自己反応性 T 細胞の出現だけでは説明ができず、胸腺における自己反応性 T 細胞の除去以外にも、AIRE が重要な機能を担うことが考えられる。

近年、末梢リンパ節において Aire を発現する樹状細胞(dendritic cell: DC)が同定された(引用文献)。DC は免疫システムを活性化する免疫系の司令塔であり、ナイーブ T 細胞を Th1 や Th2、Th17 へと誘導する。そのため、Th17 誘導不全に伴う口腔カンジダ症の原因に、Aire 欠損に伴う Aire 発現 DC の機能不全が考えられる。一方、研究代表者のこれまでの解析により、Aire 発現 DC は胸腺にも存在することが明らかになった。胸腺内 DC は mTEC と共に、自己反応性 T 細胞の除去・Treg 誘導において重要な役割を持ち、リンパ節の DC とは異なった機能を持つことが予想される。従って、リンパ節と胸腺という異なる環境における Aire 発現 DC の機能を、Aire 発現状態と Aire 欠損状態で解析することで、Aire が担う新たな機能が明らかになると考えられる。

2. 研究の目的

Aire 欠損症では胸腺髄質上皮細胞(mTEC)における Aire 欠損に伴い、mTEC のポピュレーションに変化が生じ、自己抗原遺伝子の発現低下をきたす。一方、Aire 発現樹状細胞(DC)における Aire の役割はほとんど明らかになっていない。そこで、Aire 発現運命にある DC の Aire 欠損による影響を、ポピュレーション、機能、遺伝子発現変動に着目して解析することで、DC における Aire の役割が明らかになると考えた。さらに、リンパ節と胸腺という異なる環境における Aire 発現 DC の機能を、Aire 発現状態と Aire 欠損状態で解析することで、Aire 発現運命における Aire が担う機能を明らかにすることを目的とする。

- (1) リンパ節や胸腺における Aire 発現 DC 集団の形成における Aire の機能を明らかにする。
- (2) Th17 をはじめとする Aire 発現 DC の機能における Aire の役割を明らかにする。
- (3) Aire 発現運命にある DC の Aire 欠損における影響を、網羅的な遺伝子発現解析により解明する。

3. 研究の方法

human Aire-GFP-Flag tag ノックインマウス(AGF マウス)は、高感度 Aire レポーターマウスであり、抗体などでは検出が難しい微弱な Aire の発現を GFP のシグナルにより検出することが可能である。更に、野生型アリル(Aire+)と共に、AGF 融合遺伝子を持つ個体(+KI)では、GFP のシグナルとともに、内在性の Aire の発現を認める。一方、Aire 欠損アリル(Aire-)と

AGFを持つ-/KI 個体では、AIRE 遺伝子が AGF に置き換わり AIRE 欠損状態になるが、GFP のシグナルにより AIRE 発現運命にあった細胞の検出が可能である。つまり、+/KI 個体と-/KI 個体の AIRE 発現 DC の機能を比較することで、AIRE 発現運命にあった DC(リンパ節及び骨髄細胞より誘導した AIRE 発現 DC)の AIRE 欠損による影響を直接的に比較することが可能である。

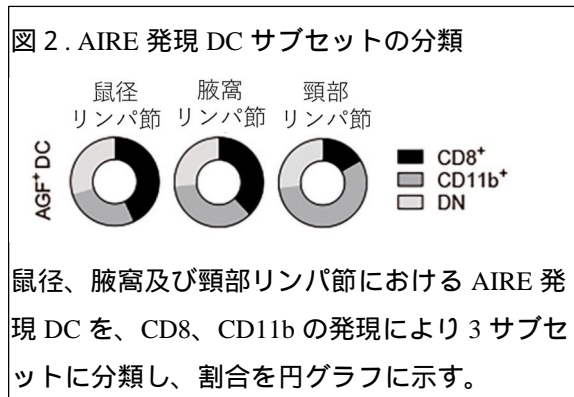
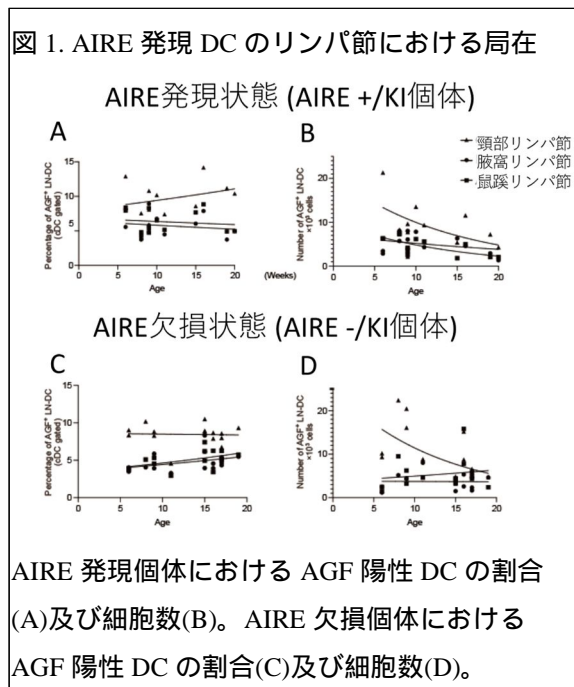
そこで本研究では AGF マウスをモデルに、以下の研究を遂行する。

- (1) AIRE 発現運命にあった DC の AIRE 欠損による影響を、リンパ節や胸腺における DC の局在や各 DC(cDC1, cDC2)サブセットの変動から評価を行う。
- (2) AIRE 発現運命にあった DC の AIRE 欠損による影響を、OVA 特異的 T 細胞受容体を持つ OT-2 マウスを用い、CD4⁺T 細胞への抗原提示能の解析から明らかにする。更に、カンジダ抗原で免疫したマウスの CD4⁺T 細胞回収し、AIRE 発現 DC とカンジダ抗原存在下で共培養し、Th17 誘導能の解析を行う。
- (3) AIRE 発現運命にあった DC をそれぞれ+/KI 及び-/KI 個体から回収し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施する。胸腺における AIRE 依存的遺伝子との相関性を解析し、DC における AIRE の特徴を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 鼠径、腋窩及び頸部リンパ節における AIRE 発現 DC の局在を、AIRE 発現状態 (AIRE +/KI 個体)と AIRE 欠損状態(AIRE -/KI 個体)を用いて、フローサイトメトリーによる解析を実施した。まず、AIRE 発現状態では、AIRE 発現 DC は DC 分画 (CD45⁺CD11c⁺MHC-2⁺)において、5-10%程度存在し、その割合や細胞数は頸部リンパ節において比較的多く認められた(図 1 A,B)。また、AIRE 発現 DC は若齢個体から加齢個体まで認められた(図 1 A,B)。一方、AIRE 欠損状態においても、AIRE 発現運命にあった AGF⁺DC は、AIRE 発現状態とほぼ同じ割合や細胞数が各リンパ節に認められた(図 1 C,D)。この結果は胸腺 AIRE 発現 DC においても同様であった(データ非表示)。

更に、CD8 や CD11b の発現を元に、AIRE 発現 DC を 3 つのサブセットに分けると、鼠径及び頸部リンパ節では、各 DC サブセットに同等の割合で AIRE 発現 DC が認められた(図 2)。また、頸部リンパ節では CD11b⁺ AIRE 発現 DC の割合が多いことが明らかになった(図 2)。一方、各 AIRE 発現 DC サブセットの割合は、AIRE 欠損状態においても大きな



変化を示さなかった。このことから、AIRE は DC の分化や生存などには関与しないことが考えられた。

(2) AIRE 欠損による AIRE 発現 DC の機能への影響を明らかにするため、リンパ節より AGF 陽性 DC を回収し以下の実験を行った。

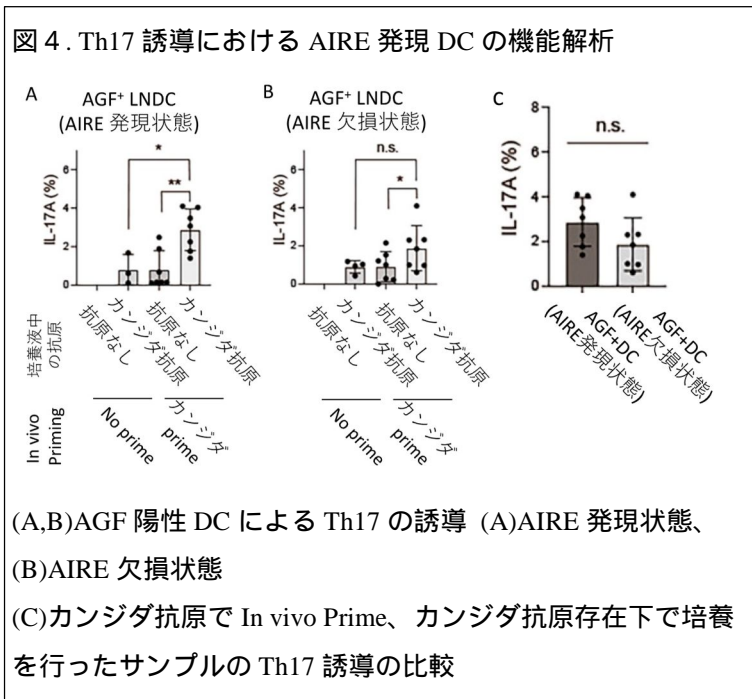
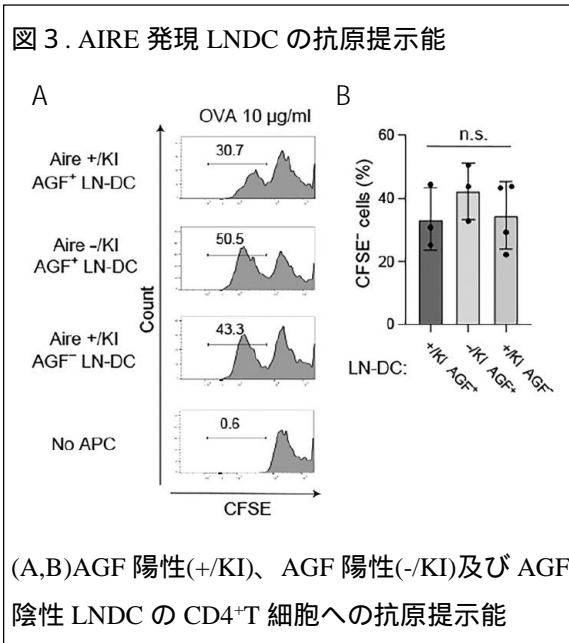
まず、OVA 特異的 T 細胞受容体を持つ OT-2 マウスの CD4⁺T 細胞と、AGF⁺DC(AIRE +/KI 個体)、AGF⁺DC(AIRE -/KI 個体)及び AGF⁻DC をそれぞれ、OVA 存在下で培養し、CD4⁺T 細胞への抗原提示能を比較した(図3)。

更に、AIRE 欠損症で頻発するカンジダ症と AIRE 発現 DC の関係を明らかにするため、カンジダ症において重要な Th17 誘導における AIRE 欠損の影響を解析した。予めカンジダ精製抗原で免疫したマウス(in vivo priming)

より CD4⁺T 細胞を回収し、カンジダ抗原存在下における AGF⁺DC との共培養を行った。その後 CD4⁺T 細胞を回収し、IL-17 産生 CD4⁺T 細胞(Th17)の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、AIRE 発現 DC による Th17 誘導能は AIRE 欠損状態において低下傾向を示すものの、統計学的に有意な変動を示さなかった(図4)。

これらの解析により、AIRE 欠損状態においても、AIRE 発現 DC の機能において大きな影響を与えないことが考えられる。

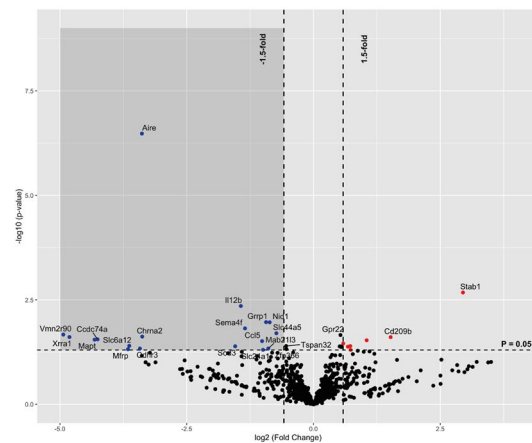
(3) AGF 陽性 DC を AIRE +/KI 個体及び AIRE -/KI 個体からそれぞれ回収し、RNA-seq による網羅的な解析を実施した。その結果、大きな発現変動(Fold change > 2, FDR < 0.05)を示した遺伝子は、AIRE と Fn1(フィブロネクチン 1)のみであり、AIRE 欠損状態においても AIRE 発現 DC ではほとんど遺伝子発現変動を認めなかった(データ非表示)。



更に、胸腺において AIRE 依存的に発現変動する組織特異的自己抗原遺伝子に着目し、遺伝子変動解析を実施した。その結果、胸腺の AIRE 発現細胞とは対照的に、リンパ節の DC では、AIRE 欠損状態においても、ほとんど自己抗原遺伝子の発現変動を示さなかった(図 5)。

以上の解析により、AIRE 欠損状態においても、AGF 陽性 DC では胸腺で生じるような顕著な遺伝子発現変動は起こらないことが明らかになった。

図 5 . AGF 陽性 DC における、AIRE 依存的組織特異的自己抗原遺伝子の発現変動解析



AIRE 欠損により発現低下する遺伝子(青)、AIRE 欠損により発現上昇する遺伝子(赤)を示す($P < 0.05$, $\text{Log}(\text{FC}) > 1.5$)。

<引用論文>

Anderson, Mark S., et al. "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." *Immunity* 23.2 (2005): 227-239.

Anderson, Mark S., et al. "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* 298.5597 (2002): 1395-1401.

Ramsey, Chris, Alex Bukrinsky, and Leena Peltonen. "Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting." *Human molecular genetics* 11.26 (2002): 3299-3308.

Kisand, Kai, and Pärt Peterson. "Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy: known and novel aspects of the syndrome." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1246.1 (2011): 77-91.

Fergusson, Joannah R., et al. "Maturing human CD127+ CCR7+ PDL1+ dendritic cells express AIRE in the absence of tissue restricted antigens." *Frontiers in immunology* 9 (2019): 2902.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Miyazawa Ryuichiro, Nagao Jun-ichi, Arita-Morioka Ken-ichi, Matsumoto Minoru, Morimoto Junko, Yoshida Masaki, Oya Takeshi, Tsuneyama Koichi, Yoshida Hideyuki, Tanaka Yoshihiko, Matsumoto Mitsuru	4. 巻 7
2. 論文標題 Dispensable Role of Aire in CD11c+ Conventional Dendritic Cells for Antigen Presentation and Shaping the Transcriptome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 140 ~ 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2200103	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田晃志 宮澤龍一郎 松本穰 松本満
2. 発表標題 AIRE発現樹状細胞の機能解析
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤龍一郎
2. 発表標題 Aire 発現樹状細胞の機能解析
3. 学会等名 第19回四国免疫フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuichiro Miyazawa Minoru Matsumoto2 Junko Morimoto Hideyuki Yoshida Koichi Tsuneyama Mitsuru Matsumoto
2. 発表標題 Functional analysis of Aire-expressing Dendritic cell
3. 学会等名 免疫学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------