

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390148

研究課題名（和文） 自己免疫寛容に必須な微小環境を形成する遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名（英文） Identification of mechanism underlying transcriptional regulation in microenvironment formation essential for immunological self-tolerance

研究代表者

秋山 泰身（AKIYAMA TAISHIN）

東京大学 医科学研究所・准教授

研究者番号：50327665

研究成果の概要（和文）：免疫応答に重要な T 細胞が胸腺で分化成熟する際、自己抗原を認識する T 細胞が除去されることで、自己に対する免疫寛容が成立し、結果として自己免疫疾患の発症は抑制される。胸腺髄質上皮細胞は、通常は組織特異的に発現する抗原を胸腺で異所的に発現することで、それらを認識する T 細胞の除去に寄与する。本研究課題で、髄質上皮細胞の遺伝子発現の制御し、それを介して髄質上皮細胞の分化を制御する転写因子が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： T cells play critical roles in immune responses. During the development of T cells in the thymus, T cells recognizing self-antigens are eliminated, thereby preventing the onset of autoimmune diseases. Medullary thymic epithelial cells (mTECs) ectopically express self-antigen that are normally expressed in tissue specific manner. Our study identified transcription factors regulating gene expressions in mTEC, thereby modulating the differentiation of mTECs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
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：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫寛容・自己免疫・胸腺

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺で T 細胞が分化する途中で、自己抗原に応答する T 細胞は負の選択により除かれる。負の選択機構に、胸腺髄質の微小環境を形成する上皮細胞（髄質上皮細胞）が関与することが明らかとなっている。すなわち髄質上皮細胞は、通常は特定組織にだけ発現する抗原（組織特異的抗原）を異所的に発現し、それを認識する胸腺細胞を負の選択機構により

除去する。この機構はヒト自己免疫疾患の原因遺伝子産物 AIRE により制御されることから、自己免疫疾患の発症抑制に重要と考えられている。

研究代表者らは髄質上皮細胞の分化を制御する分子機構の解明を行ってきた。これまでに、TNF レセプターファミリーの RANK と CD40 が、TRAF6 や NIK などのシグナル伝達因子を介して転写因子 NF-κB を活性化

することで、髄質上皮細胞の分化を誘導することを明らかとした。しかしながら、Aire や組織特異的抗原の遺伝子発現を制御する機構については不明である。

## 2. 研究の目的

RANKL シグナルで活性化される NF- $\kappa$ B は Aire や組織特異的抗原の遺伝子発現を直接誘導できない。そのため NF- $\kappa$ B で発現誘導され、活性化することで、髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する転写因子の存在を予想した。本研究課題の目的は、RANKL シグナル依存的に誘導される転写因子を同定し、胸腺髄質上皮細胞内での遺伝子発現や、胸腺髄質上皮細胞の分化・機能の制御における役割を決定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでに胸腺ストローマ器官培養実験系へ組み替え RANKL タンパク質を加えることで、成熟した髄質上皮細胞へ分化する実験系を確立してきた。この実験系を利用して RANKL 刺激依存的な分化に伴い、発現誘導される転写因子候補として Spi-B を同定した。ついで RANKL 刺激依存的な発現誘導を定量的 RT-PCR 法を用いて確認した。さらに野生型マウスより胸腺髄質上皮細胞、皮質上皮細胞、他の胸腺ストローマ細胞を分画し、各々の画分で発現する Spi-B を定量的 PCR 法で決定した。

つぎに、Spi-B 欠損マウスから胸腺髄質上皮細胞を分取し、組織特異的抗原、Aire および髄質上皮細胞の分化を制御する因子などの遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法で決定した。さらに Spi-B 欠損マウスにおいて、胸腺髄質上皮細胞の分化状態をフローサイトメーターにより決定した。

また RANKL と同じサイトカインファミリーに属するリンホトキシンにより、髄質上皮細胞で誘導される遺伝子も同時に探索した。

## 4. 研究成果

Spi-B は胸腺ストローマへの RANKL 刺激により、早い段階から誘導された。さらに Spi-B 遺伝子上流部分のゲノム DNA を単離して、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを構築し、NF- $\kappa$ B に対する応答性を検討したところ、NF- $\kappa$ B や NF- $\kappa$ B 活性化を誘導するシグナル伝達因子 NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK) の過剰発現により効率よく応答することが判明した。このことは Spi-B が NF- $\kappa$ B の応答遺伝子であることを示唆している。

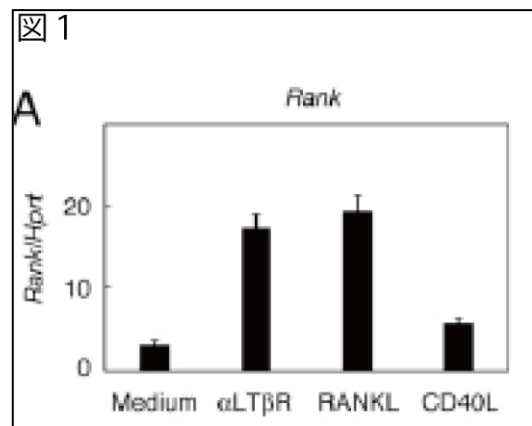
また分画した胸腺ストローマ細胞における発現を検討したところ、Spi-B は、胸腺皮質上皮細胞や他の胸腺ストローマ細胞と比較して、胸腺髄質上皮細胞で高く発現してい

た。

ついで Spi-B 欠損マウスの髄質上皮細胞における遺伝子発現を調べたところ、Aire の遺伝子発現は全く変化がないものの、一部の組織特異的抗原の遺伝子発現や胸腺髄質上皮細胞の機能因子の発現が減少していた。この結果は、Spi-B が胸腺髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御していることを示している。

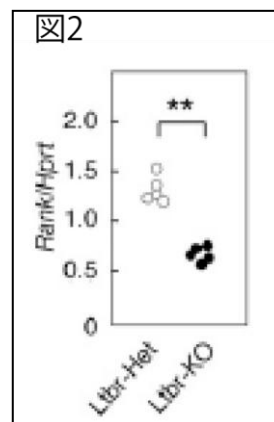
また Spi-B 欠損マウスの胸腺髄質上皮細胞の分化状態をフローサイトメーターで解析したところ、Spi-B 欠損マウスでは髄質上皮細胞の分化が亢進していた。この結果は、Spi-B が遺伝子発現を制御することで、胸腺髄質上皮細胞の分化を負に制御していることを示唆している。

一方で、リンホトキシンシグナルにより誘導される遺伝子として RANK を同定した(図 1)。



さらにリンホトキシン b レセプター欠損マウスの胎仔胸腺では、ヘテロマウスに比べて RANK の遺伝子発現が低かった(図 2)。この結果は、リンホトキシンシグナルにより RANK が発現することで、胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導していることを示唆する。

現在、この結果に基づき、胸腺髄質上皮細胞の分化段階について詳細な検討を行っている。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 13 件)

- ① Wu G, Hirabayashi K, Sato S., Akiyama N., Akiyama T., Shiota K., and Yagi S. DNA methylation profile of Aire-deficient mouse medullary thymic epithelial cells **BMC Immunol.** 13, 58 (2012). doi: 10.1186/1471-2172-13-58.
- ② Akiyama T\*, Shinzawa M and Akiyama N RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems **World J. Orthop.** 3:142-150 (2012) doi: 10.5312/wjo.v3.i9.142.
- ③ Akiyama T\*, Shinzawa M and Akiyama N TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. **Front. Immunol.** 3:278 (2012) doi: 10.3389/fimmu.2012.00278
- ④ Shinzawa M., Maruyama Y., Qin J., Akiyama N., Miyauchi M., Yanai H., Takami M., Inoue J., and Akiyama T\*(corresponding author). Splenic extramedullary hemopoiesis caused by a dysfunctional mutation in the NF- $\kappa$ B-inducing kinase gene **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 414, 773-778 (2011) DOI:10.1016/j.bbrc.2011.10.001
- ⑤ Ohshima D., Qin J., Konno H., Hirose A., Shiraishi T., Yanai H., Shimo Y., Shinzawa M., Akiyama N., Yamashita R., Nakai K., Akiyama T\*(corresponding author), and Inoue J. RANK signaling induces interferon-stimulated genes in the fetal thymic stroma **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 408, 530-536 (2011) DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.049
- ⑥ Ohno T., Oboki K., Kajiwara N., Tanaka S., Ikeda M., Iikura M., Akiyama T., Inoue J., Matsumoto K., Sudo K., Azuma M., Okumura K., Kamradt T., Saito H., Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation **Plos One**, 6, e18404 (2011) DOI:10.1371/journal.pone.0018404
- ⑦ Mouri Y., Yano M., Shinzawa M., Shimo Y., Hirota F., Nishikawa Y, Nii T., Kiyonari H., Abe T., Uehara H., Izumi K., Tamada K., Chen L., Penninger JM., Inoue J., Akiyama T\*(corresponding author), and Matsumoto M. Lymphotoxin Signal Promotes Thymic Organogenesis by Eliciting RANK Expression in the Embryonic Thymic Stroma **J. Immunol.**, 186, 5047-57 (2011) DOI: 10.4049/jimmunol.1003533
- ⑧ Shimo Y., Yanai H., Ohshima D., Qin J., Motegi H., Maruyama Y., Hori S., Inoue J., and Akiyama T\*(corresponding author). TRAF6 directs commitment to regulatory T cells in thymocytes **Genes Cells.**, 16, 437-447 (2011) DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01500.x
- ⑨ Shinzawa M., and Akiyama T. Regulation of central tolerance by RANKL signaling **Clin Calcium** 21., 1193-1199 (2011) DOI: CliCa110811931199
- ⑩ Motegi H., Shimo Y., Akiyama T. and Inoue J. TRAF6 negatively regulates the Jak1-Erk pathway in interleukin-2 signaling **Genes Cells.**, 16, 179-89 (2011) DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01474.x
- ⑪ Ishiguro A, Akiyama T., Inoue J., and Nakamura Y Therapeutic Potential of Anti-Interleukin-17A Aptamer: Suppression of Interleukin-17A signaling and Attenuation of autoimmunity in mouse models. **Arth. Rheu.**, 63, 455-66 (2011) DOI: 10.1002/art.30108
- ⑫ Tando T, Ishizaka A, Watanabe H, Ito T, Iida S, Haraguchi T, Mizutani T, Izumi T, Isobe T, Akiyama T., Inoue J and Iba H. Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a non-canonical NF- $\kappa$ B pathway. **J. Biol. Chem.**, 285, 21951-60 (2010) DOI: 10.1074/jbc.M109.087783
- ⑬ Ando K, Hasegawa K, Shindo K, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, Nakano H, Takeuchi O, Akira S, Akiyama T., Gohda J, Inoue J., Hayakawa M. Human lactoferrin activates NF- $\kappa$ B through Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling **FEBS J.** 277, 2051-2066 (2010) DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07620.x

[学会発表] (計 15 件)

- ① 関 崇生  
Oscillation of non-canonical NF- $\kappa$ B activation pathway、  
第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜、パシフィコ横浜
- ② Taishin Akiyama  
Molecular mechanisms to establish the thymic microenvironment essential for central tolerance

- 6th Chiba University G-COE Symposium、  
2011年11月30日、千葉、ホテルニュー  
オータニ幕張
- ③ 新澤 美穂  
A novel regulatory mechanism of NF-kB  
inducing kinase (NIK) activation in the  
immune system  
第40回日本免疫学会学術集会、2011年11  
月29日、千葉 幕張メッセ
- ④ 秋山 伸子  
Roles of TNF family signals in establishing  
thymic microenvironment  
第40回日本免疫学会学術集会、2011年11  
月29日、千葉 幕張メッセ
- ⑤ 秋山 泰身  
胸腺髄質上皮細胞の遺伝子発現制御機構  
京都 T cell conference、2011年6月10日、  
京都 芝蘭会館
- ⑥ Taishin Akiyama  
Regulation of gene expressions in the  
development of medullary thymic epithelial  
cells  
EUThyme-Rolduc Meeting、2011年5月21  
日  
オランダ、Leeuvenhorst
- ⑦ Taishin Akiyama  
RANK signaling induces  
interferon-stimulated genes in the fetal thymic  
stroma  
TNF conference 2011、2011年5月16日、  
淡路島、夢舞台国際会議場
- ⑧ Taishin Akiyama  
Roles of TNF receptor family members on  
development of thymic microenvironment  
required for immunological self-tolerance  
TNF conference 2011、2011年5月16日、  
淡路島、夢舞台国際会議場
- ⑨ 秋山 泰身  
Molecular mechanisms underlying the  
development of thymic environment essential  
for immunological self-tolerance  
第33回日本分子生物学会・第83回生化学  
会大会、2010年12月6日、神戸 神戸ポ  
ートピア
- ⑩ 秋山 泰身  
REGULATION OF GENE EXPRESSIONS  
IN MEDULLARY THYMIC EPITHELIAL  
CELLS  
The Second Workshop of Synthetic  
Immunology、  
2010年12月16日、京都 芝蘭会館
- ⑪ Taishin Akiyama  
Development of thymic niches essential for  
preventing autoimmunity  
The 1st International Conference on Frontiers  
of Regenerative Medicine & Biomedical  
Science

- 2010年5月14日、中国、広州
- ⑫ Yusuke Shimo  
TRAF6 controls commitment to regulatory  
T-cell lineage and T-cell receptor signals in  
thymocytes  
14th International congress in Immunology、  
2010年8月24日、神戸 神戸ポートピア
- ⑬ Taishin Akiyama  
A negative feedback regulation of medullary  
thymic epithelial cell development by RANK  
signal-dependent expression of  
osteoprotegerin  
2010年8月23日、神戸 神戸ポートピア
- ⑭ Taishin Akiyama  
RANKL-RANK-OPG system in  
establishment of immunological tolerance  
3rd International Conference on  
Osteoimmunology、2010年6月24日、ギ  
リシャ、サントリーニ
- ⑮ 下茂佑輔  
胸腺発生型の制御性 T 細胞分化を制御す  
る TRAF6 シグナルの解析  
京都 T cell conference、2010年6月4日、  
京都 芝蘭会館

[産業財産権]  
○出願状況 (計1件)

名称：RANKL アンタゴニストを含む癌免疫増  
強  
発明者：秋山泰身、箭内洋見、秋山伸子、保  
田尚孝  
権利者：オリエンタル酵母工業  
種類：特許  
番号：2011-079167  
出願年月日：平成23年3月31日  
国内外の別：国内

[その他]  
アウトリーチ活動  
免疫ふしぎ未来2011 実行委員  
2011年8月21日、日本科学未来館

ホームページ  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/BunshiHatsugan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 泰身 (AKIYAMA TAISHIN)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：50327665

### (2) 連携研究者

井上 純一郎 (INOUE JUN-ICHIRO)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：70176428

### (3) 研究協力者

下茂 佑輔 (SHIMO YUSUKE)  
東京大学・新領域創成科学科・大学院生

大島 大輔 (OHSHIMA DAISUKE)  
東京大学・新領域創成科学科・大学院生

新澤 未穂 (SHINZAWA MIHO)  
東京大学・新領域創成科学科・大学院生

秋山 伸子 (AKIYAMA NOUBUKO)  
東京大学医科学研究所・客員研究員