

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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390298

研究課題名（和文） 疾患モデルマウスを用いた遺伝性自己免疫疾患の病態解析

研究課題名（英文） Transgenic mouse approaches to the pathogenesis of hereditary type of human 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（和文）：原因不明の難病である自己免疫疾患の原因究明を目指して遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 *Aire* の遺伝子改変マウスを作製・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 Cre recombinase を発現するノックインマウス (*Aire*/Cre-KI) を作製し、胸腺上皮細胞の分化プログラムにおける *Aire* の役割を検討した。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示唆された。

研究成果の概要（英文）：We sought to monitor the production and maintenance of *Aire*-expressing medullary thymic epithelial cells (mTECs) by a fate-mapping strategy in which bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of the *Aire* regulatory element were crossed with a GFP reporter strain. We found that, in addition to its well recognized expression within mature mTECs, *Aire* was expressed in the early embryo before emergence of the three germ cell layers. With the use of one transgenic line in which Cre recombinase expression was confined to mTECs, we found that *Aire*⁺CD80^{high} mTECs further progressed to an *Aire*⁻CD80^{intermediate} stage, suggesting that *Aire* expression is not constitutive from after its induction until cell death but instead is down-regulated at the beginning of terminal differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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(transcription 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(maturation model)。

2. 研究の目的

本研究では上記の二つのモデルをAire遺伝子改変マウスを用いて検証し、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ことを最大の目的とする。

3. 研究の方法

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)を用いた解析から、Aireが胸腺髄質上皮細胞の分化やその細胞構築化に対しても重要なはたらきを持つことが明らかになっている。この点をより明確する目的でAire発現細胞の系譜を解析できるfate-mappingの実験系の構築に新たに取り組んだ。

4. 研究成果

通常のfate-mappingマウス(Aire/Cre-KI)を用いた実験から、意外にもAireが初期胚にも発現していることを見出した。すなわち、Aireは発生初期と胸腺髄質上皮細胞という二相性発現を示すことが明らかになった。そこで、Cre recombinaseに代わりCre recombinaseとヒトエストロゲン受容体リガンド結合領域の変異体との融合タンパク質(Cre-ER)を挿入したノックインマウスを作製する試みに現在取り組んでいる。Cre-ERは内在性のエストロゲンでは核内移行せず、合成エストロゲン製剤である4-水酸化タモキシフェン(tamoxifen)の投与によって核内移行しCre recombinase活性を発揮する。そのため、Aire/Cre-ERノックインマウスをGFPレポーターマウスと交配後の成体マウスにタモキシフェンを投与することでAire発現胸腺髄質上皮細胞を特異的に可視化できる。タモキシフェン投与後に異なるタイミングでGFP陽性細胞を検出することによって、Aire発現胸腺髄質上皮細胞が胸腺内に存在する時間を計測することも可能である。さら

に、この実験をAire欠損状態(Aire欠損マウスとの交配によって樹立)で行うことによって、Aire欠損にともなうAire発現胸腺髄質上皮細胞の動態変化を調べることもできる。こうしたイメージング解析の結果をもとに、Aireを発現した後、Aire発現胸腺髄質上皮細胞がただちに死滅するのか、あるいはAire発現が停止した時期を経て最終的に胸腺から消え去るのかを検討したい。それによって、最終的にAireのはたらきがmTECの分化誘導にあると考えるmaturation modelの妥当性を検証したい。他方、モデル自己抗原であるovalbumin(OVA)をAire発現細胞にtargetさせるためのAire/OVAノックインマウス(Aire/OVA-KI)も樹立しており、Aire発現細胞によって呈示される自己抗原が胸腺における自己寛容の成立機構にどのように寄与しているかについても検討する予定である。

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6件)

① Fukui, R., Saitoh, S.-I., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshida, N., and Miyake, K.

Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking.

Immunity (査読有り) 35: 2011, 69-81.

② 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, J.M., Inoue, J., Akiyama, T., and Matsumoto, M.

Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma.

J. Immunol. (査読有り) 186: 2011, 5047-5057.

③ Matsumoto, M.

Contrasting models for the roles of Aire in the differentiation program of epithelial cells in the thymic medulla. *Eur. J. Immunol.* (査読有り) 41: 2011, 12-17.

④ Wada, N., Nishifuji, K., Yamada, T., Kudoh, J., Shimizu, N., Matsumoto, M., Peltonen, L., Nagafuchi, S., and Amagai, M.

Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T cell tolerance.

J. Invest. Dermatol. (査読有り) 131: 2011, 410-417.

⑤ Nishikawa, Y., Hirota, F., Yano, M., Kitajima, H., Miyazaki, J-i., Kawamoto, H., Mouri, Y., and Matsumoto, M.

Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation.

J. Exp. Med. (査読有り) 207: 2010, 963-971.

⑥ Matsumoto, M.

The role of autoimmune regulator (Aire) in the development of the immune system.

Microbes Infect. (査読有り) 11: 2009, 928-934.

[学会発表] (計 14 件)

① 西嶋 仁、毛利安宏、西川裕美子、松本満

AIRE遺伝子を導入したHeLa細胞における細胞周期依存的なAIREタンパク質のリン酸化
第40回日本免疫学会総会、2011. 11. 27、幕張メッセ (千葉市)

② 毛利安宏、西川裕美子、西嶋 仁、松本満

Negative selectionにおけるAire発現細胞由来自己抗原の役割

第40回日本免疫学会総会、2011. 11. 27、幕張メッセ (千葉市)

③ Matsumoto, M., Mouri, Y., Nishikawa, Y., and Nishijima, H.

Role of self-antigen expressed by Aire-expressing cells in the negative selection process.

5th International Conference on Autoimmunity: Mechanisms and Novel Treatments, September 23-28, 2011, Knossos Royal Village Conference Center, Hersonissos, Crete, Greece.

④ Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Mouri, Y., and Nishijima, H.

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

EUThyme-Rolduc Meeting, May 21-24, 2011, NH Conference Center, Leeuwenhorst, The Netherlands.

⑤ Mouri, Y., Yano, M., Shinzawa, M., Shimo, Y., Nishikawa, Y., Tamada, K., Chen, L., Penninger, J.M., Inoue, J., Akiyama, T., and Matsumoto, M.

Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting

RANK expression in the embryonic thymic stroma.

13th International TNF Conference, TNF 2011, May 15-18, 2011, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan.

⑥ Nishikawa, Y., Mouri, Y., Nishijima, H., and Matsumoto, M.

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

ESF-JSPS Frontier Science Conference Series for Young Researchers

「Cutting Edge Immunology and its Clinical Application」

March 1-6, 2011, Apollo Hotel de Beyaerd, Hulshort, The Netherlands.

⑦ Matsumoto, M.

Roles of thymic epithelial cells for the establishment of self-tolerance.

14th International Congress of Immunology August 26, 2010, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan.

⑧ Mouri, Y., Nishikawa, Y., and Matsumoto, M.

Aire in thymic epithelial cells in the medulla controls developmental process of thymocytes.

14th International Congress of Immunology August 24, 2010, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan.

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

Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells prior to end-stage terminal differentiation.

14th International Congress of Immunology August 23, 2010, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan.

⑩ Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Hirota, F. and Mouri, Y.

AIRE and autoimmune disease.

The 19th International Rheumatology Symposium, April 23, 2010, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan.

⑪ Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Hirota, F., Yano, M., Kawamoto, H. and Mouri, Y. Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells prior to end-stage terminal differentiation.

ThymOz VI, March 17-21, 2010, Gladstone, Australia.

⑫ Mouri, Y., and Matsumoto, M.

Aire in thymic epithelial cells in the medulla controls developmental process of thymocytes.

第39回日本免疫学会総会、2009.12.2、大阪国際会議場（大阪市）

⑬ Matsumoto, M.

Aire-dependent organization of thymic microenvironment.

第39回日本免疫学会総会、2009.12.2、大阪国際会議場（大阪市）

⑭ Mouri, Y., Yano, M., and Matsumoto, M.

Roles of NIK in thymic epithelial cells for the establishment of central tolerance.

12th International TNF Conference, April 26-29, 2009, San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/autoimmunity/>

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

西川裕美子 (NISHIKAWA YUMIKO)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号：60448214

毛利安宏 (MOURI YASUHIRO)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号：80464353