

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 4 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592392

研究課題名（和文） AIRE 核内輸送阻害解析による新たな口腔免疫疾患発症論理の提示

研究課題名（英文） Development of oral disease by inhibition of nuclear transport of Aire

研究代表者

柴田 恭明（SHIBATA YASUAKI）

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80253673

研究成果の概要（和文）：

デキサメタゾン(Dex)は、マウス胎児胸腺器官培養系(FTOC)において、AIREの局在を胸腺上皮細胞(TEC)核内から細胞質へと移動させるだけでなく、AIRE mRNAの発現量を減少させ、TECの分化を抑制し、かつ組織特異的抗原の発現を減少させることが明らかになった。一方、TEC培養系やin vivoではこれらの所見は観察されなかったことから、これらの現象がFTOC特異的であることが示された。シェーグレン症候群(SS)マウスモデル顎下リンパ節におけるAireの発現を検索したところ、Aire発現が減少していたことから、Aireの発現減少がマウスSS発症に關与する可能性が示差された。しかしながらAireの発現はリンパ節による差が大きく、今後の検討課題である。

研究成果の概要（英文）：

Dexamethasone (Dex) induced trans-location of AIRE protein from nucleus to cytoplasm, and reduced expression of *Aire*, *CD80* and *Ins1* mRNA in thymus epithelial cells (TEC) of Fatal Thymus Organ culture (FTOC). The trans-location and reduced expression of these mRNAs were detected neither in mouse TEC culture system nor mouse thymus in vivo. These results indicated that translocation of nuclear Aire to cytoplasm inhibit differentiation of TEC, although the phenomenon were specific event in TEC of FTOC. In Sjogren's syndrome (SS) mouse model, expression of *Aire* mRNA was totally reduced, however, the expression intensity depends on each lymph node. This result suggested that reduction of AIRE associated with mouse SS developing mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：胸腺、AIRE

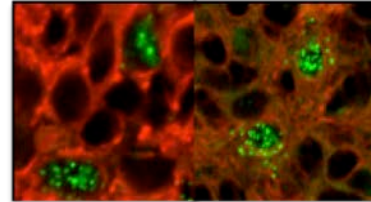
1. 研究開始当初の背景

自己寛容の確立・維持とその破綻（自己免疫疾患）についての知見はこの10年で大きく進捗した。その原動力のひとつは、主として胸腺髄質上皮細胞で発現し、組織特異的抗原（Tissue specific antigen: TSA）の発現を正に制御する転写制御因子Autoimmune Regulator（AIRE）の発見である。ヒトAIRE 遺伝子（*Aire*）の変異は、口腔内カンジダ症を伴い複数の内分泌臓器を標的とする自己免疫疾患Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dys trophy（APECED）を発症する。APECEDでは、機能的AIRE が減少しているためにTSA発現が抑制され、自己免疫疾患を惹起すると考えられている。

われわれは骨代謝を解析していたことから、破骨細胞分化に必須なRANKL/TRAF6 経路が胸腺髄質上皮における*Aire* 発現にも不可欠であったことに興味を持ち、胸腺皮質/髄質上皮細胞株、さらに胸腺細胞を除去した胎仔胸腺器官培養系（Fetal Thymus Organ Culture:FTOC）を用いてRANKL および、RANKL同様破骨細胞を分化させるデキサメタゾン（Dex）や活性型ビタミンD3 が*Aire* 発現に及ぼす影響を詳細に検索してきた（第17回Kyoto T Cell Conference（KTCC）（2007）、第37回日本免疫学会（2007）、第18回KTCC（2008））。その過程でFTOCにおいて、通常髄質上皮細胞核内に局在するAIREが、Dex 刺激により細胞質にも局在する所見を見出し、Dex がAIRE の核内輸送を阻害する可能性を示した（上図）。

これまで報告されている*Aire* の40カ所近くの変異の中には核内輸送を阻害する変異も含まれており、われわれの結果は、遺伝的要因だけでなく外因までも

がAIRE 機能低下を誘導し、自己免疫疾患を惹起しうる可能性を示した初めての所見である。



RANKL刺激 Dex 刺激

さらに最近、胸腺のみならず二次リンパ器官（リンパ節、脾、パイエル板）の樹状細胞に似た細胞群（CD45⁻/MHCII⁺/EpCAM⁺）も機能的AIRE を発現し、これらが発現するTSAと、胸腺髄質で発現するそれはほとんどオーバーラップしないことが示された（Science 321, 843-7, 2008）。これまでも末梢における*Aire* 発現についての報告はあったが、胸腺によるネガティブセレクションを免れた自己反応性T 細胞を末梢にて抑制する、いわゆるセーフティネットとしての機能が提唱されていた。今回の報告は、免疫中枢と末梢のAIREが相補的に機能することにより免疫寛容を確立・維持する可能性を示した点で非常に画期的である。同時にこの所見は末梢における*Aire* 発現不全や AIRE 機能不全も自己免疫疾患発症の原因たり得る可能性を示している。

これらを勘案すると、内因・外因を含めた様々な病因が、二次リンパ器官における*Aire* の発現量やAIRE 機能を変化させ、結果的に全身的自己免疫疾患や免疫不全のみならず、局所における免疫機構の破綻を惹起する可能性を示している

2. 研究の目的

本研究では以上を背景に、

①Dex/FTOC 系のAIRE 核内輸送阻害機序を分子レベルで明らかにするとともに、口腔

内の代表的自己免疫疾患であるシェーグレン症候群(SS)にフォーカスし、②SSモデルマウスにおける二次リンパ器官や病変部における*Aire* 発現やAIRE 局在の変化を検証する。合わせて③Dex や閉経に伴って減少するEstrogenが二次リンパ器官のCD45⁻/MHCII⁺/EpCAM⁺細胞の*Aire* 発現とAIRE 局在に与える影響を*in vitro* で検索することにより、①②を細胞生物学的に検証する。

3. 研究の方法

I. Dex/FTOC 系の AIRE 核内輸送阻害機序の解明

- ① マウス胸腺上皮細胞に *Aire* を一過性にトランスフェクションし、Dex の効果を検索する。
- ② Dex 刺激時の Importin ファミリー遺伝子発現量を検索する。
- ③ Dex 刺激時の AIRE と Importin ファミリー結合能の変化を免疫沈降で確認する。

II. SS 発症と進行に伴う *Aire* 発現量と局在の変化の検討

- ④ SS 発症と進行に伴う二次リンパ器官での *Aire* 発現量と AIRE 局在の変化を検索する。
- ⑤ SS 進行に伴い病変部（唾液腺・涙腺）でのリンパ球浸潤が高度になるが、病変部での *Aire* 発現量と AIRE 局在を検索する。
- ⑥ IQI/Jic に胸腺除去術・卵巣除去術を施し、病変部および二次リンパ器官での *Aire* 発現と AIRE 局在の変化を検索する。

III RANKL、Estrogen、Dex が二次リンパ器官の *Aire* 発現量と局在に与える影響

- ⑦ 磁気ビーズを用いて二次リンパ器官からCD45⁻/MHCII⁺/EpCAM⁺細胞を単離し、RANKLやDex、閉経とともに減少する

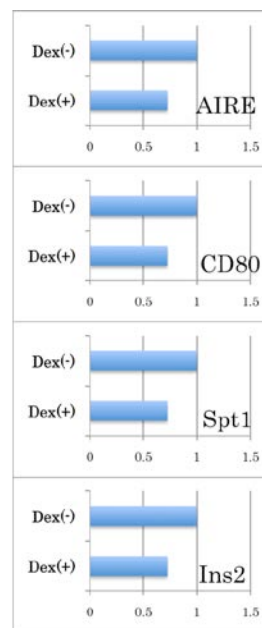
Estrogenが当細胞の*Aire* 発現量やAIRE 局在に与える影響を検索する。

4. 研究成果

I. Dex/FTOC 系の AIRE 核内輸送阻害機序の解明

FTOC に Dex を作用させたところ、AIRE の発現量に変化はみられなかったが、胸腺分化マーカーである CD80、代表的 TSA である *Ins2*、*Spt1* の発現は減少した(右図)。

Dex は、FTOC における AIRE の局在を変化させるだけでなく、AIRE の発現量を減少させ、かつ胸腺上皮細胞の分化を抑制し、かつ TSA 発現を減少させることが明らかになった。一方、AIRE を核内に安定発現した HeLa/AIRE 株、AIRE を安定発現させた TEC 株ならびに



RANKL を添加した TEC 細胞に Dex を添加し、AIRE 局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で検索したが、核内から細胞質への移行はみられなかった。また、*AIRE*、*CD80*、*Spt1*、*Ins2* の発現にも変化はみられなかった。C57BL/6 腹腔に Dex を作用させ、摘出した胸

腺における AIRE の局在と、*AIRE*、*CD80*、*Spt1*、*Ins2* の発現を検索したが、培養細胞同様、変化は検出されなかった。これらの結果は、Dex における AIRE 局在の変化は FTOC 特異的な現象であることを示した。

II. SS 発症と進行に伴う *Aire* 発現量と局在の変化の検討

SS マウスモデル (IQI/Jic) 生後三日目に胸

腺を除去し、三ヶ月後に顎下リンパ節における Aire 発現と局在を検討した。

対照として用いた ICR マウスでは、顎下リンパ節における Aire 発現は、トータルとして上昇していたが、個体およびリンパ節によって差があり、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Gonda Y, Ioku K, Shibata Y, Okuda T, Kawachi G, Kamitakahara M, Murayama H, Hideshima K, Kamihira S, Yonezawa I, Kurosawa H, Ikeda T. Stimulatory effect of hydrothermally synthesized biodegradable hydroxyapatite granules on osteogenesis and direct association with osteoclasts. *Biomaterials* 30:4390-400. 2009
- 2) Hishikawa Y, An S, Yamamoto-Fukuda T, Shibata Y, Koji T. Improvement of in situ PCR by optimization of PCR cycle number and proteinase k concentration: localization of x chromosome-linked phosphoglycerate kinase-1 gene in mouse reproductive organs. *Acta Histochem Cytochem.* 28:15-21. 2009
- 3) Gonda Y, Ioku K, Okuda T, Shibata Y, Kamitakahara M, Kawachi G, Yonezawa I, Kurosawa H, Ikeda T. Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. *Key*

Eng. Mater. 396-398:253-256. 2009

- 4) Yamamoto-Fukuda T, Hishikawa Y, Shibata Y, Kobayashi T, Takahashi H, Koji T. Pathogenesis of middle ear cholesteatoma: a new model of experimentally induced cholesteatoma in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 176: 2602-2606, 2010 (5. 673)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 平川祐子, 柴田恭明, 尾立哲郎, 神保良, 池田 通, 澤瀬 隆, 親水性チタン表面への血清タンパクの吸着, 第 26 回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会, 沖縄, 2 月, 2009. {プログラム・抄録集, p52, 2009}
- 2) 平川祐子, 小野大輔, 柴田恭明, 池田通, 澤瀬 隆, イヌ顎骨モデルにおける光触媒超親水性インプラントの骨形成促進効果, 第 39 回日本口腔インプラント学会学術大会, 大阪, 9 月, 2009. {日本口腔インプラント学会誌, 22 特別号, p133, 2009}
- 3) 中島和慶, 柴田恭明, 尾立哲郎, 澤瀬隆: 生体材料としてのカスタムアバットメントの清浄化に関する研究, 第 41 回日本口腔インプラント学会学術大会, 名古屋, 9 月, 2011. {日本口腔インプラント学会誌, 24 特別号, p175, 2011}

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 恭明 (SHIBATA YASUAKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 80253673

(2) 研究分担者

なし

(3) 連研研究者

なし