

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 16日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659230

研究課題名（和文） AIRE 研究を基盤にした B 細胞による 1 型糖尿病発症制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms of type 1 diabetes by B cells, based on the AIRE research

研究代表者

永淵正法 (NAGAFUCHI SEIHO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00150441

研究成果の概要（和文）：

自己免疫糖尿病発症に関するBリンパ球とAire遺伝子の意義について、Balb/cマウス、NODマウスにおける検討を行った。我々のグループからの既報のように(Int Immunol 1997) Bリンパ球欠損(KO)NODマウスでは、1型糖尿病の発症が抑制された。Aire遺伝子は、末梢のBリンパ球にマウスの系統に関らず発現していることが確認できた。さらに、Aire KO Balb/cマウスでは、膵島炎のみならず、むしろ膵臓炎の病態を呈することが明らかとなったため、自己抗体の産生を探索したところ、70kDの自己抗体を同定した。

一方、ヒトBリンパ球におけるAIREの意義については、AIRE蛋白が相互作用する蛋白あるいは標的遺伝子を同定するために、まず、アフィニティ純化C-末端ペプチド抗体を用いて、AIRE遺伝子を発現しているB細胞で、Western blotを行ったところ、目的の分子量に一致したバンドとそれより短いバンドが検出された。このことはB細胞においては、AIRE蛋白の全長とともにそのフラグメントに何らかの意義があることが示唆される。そこで、今後は、免疫沈降法を用いて、相互作用する蛋白の同定を行うとともに、クロマチン免疫沈降法を用いた、転写因子としての標的遺伝子探索を行う方向で研究が展開している。

研究成果の概要（英文）：

Since we have already reported that B cells are essential to the progression of insulinitis and diabetes in NOD mice (Int Immunol 1997), the exact mechanisms and the role of B cells and aire gene have been studied in Balb/c mice as well as NOD mice. It was found that aire gene was highly expressed in B cells irrespective of the mouse strains. In addition, we found the 64kd novel autoantibody in aire gene knockout Balb/c mice with autoimmune pancreatitis.

On the other hand, in human B cells, accumulating data have shown that expressed AIRE proteins in B cells had two different sizes, indicating the expressed AIRE proteins in B cells might have multiple functions, possibly due to different splicing patterns. We further intend to analyze the role of AIRE proteins expressed in B cells using immunoprecipitation assay and also chromatin-immunoprecipitation method to identify the interacting proteins and/or genetic regions which may play transcriptional regulation of autoimmune-associated target genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：自己免疫調節(AIRE)遺伝子、B細胞、自己免疫膵炎、1型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

- (1) 1型糖尿病の発症制御にはB細胞が重要な役割を果たしていることは我々が世界に先んじて報告(Int Immunol 1997)したが、そのメカニズムの詳細は不明であった。
- (2) 一方、自己免疫調節遺伝子(AIRE)は1型糖尿病を含むさまざまな臓器特異的自己免疫疾患を制御することが報告され、われわれが日本ではきわめて稀なAIRE遺伝子変異を有し、1型糖尿病を合併した症例について詳細に報告した。(Clin Immunol 2002)
- (3) そこで、B細胞におけるAIRE遺伝子発現が重要ではないかとの仮説から、動物モデル、ヒトでの検討を行う研究計画を立案した。

2. 研究の目的

- (1) マウスモデルでAire欠損マウスの表現型、自己免疫、自己抗体、B細胞におけるAire遺伝子発現とその意義を検討する。
- (2) ヒト末梢血B細胞におけるAIRE遺伝子・蛋白の発現とその意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス・ラット

Aire KOマウスはDr. L. Peltonenから分与されたAire KOマウスを日本チャールズ・リバーのBALB/cAnNCr1Crlj(以下BALB/cAnN)に13回戻し交配したAire KO/BALB/cAnN N13を用いた。ラットおよびマウスは九州大学医学部附属実験動物飼育施設においてSPF(specific pathogen free)環境で飼育した。

(2) DNA抽出

ゲノムDNAは、実験に用いるマウスの尻尾片(約5mm)から抽出した。

(3) PCRによるAireの遺伝子型の判定

マウスAire遺伝子の遺伝子型の検定には、尻尾から抽出したゲノムDNAを用いてPCR反応により行った。

(4) 血糖値・体重測定

非絶食条件下でマウス尾静脈を手術用鉗

にて傷口をつくり、出血してきた血液を一部採血した。血糖値の測定には、電極測定法を原理とするグルテストPRO R(三和化学研究所)を使用し、各個体2回測定しその平均値を測定結果とした。また、体重測定にはHL-200i(A&D Company, Limited, Japan)を用いた。

(5) 病理組織

マウスをジエチルエーテル吸引により安楽死させ、速やかに膵臓、胃、肝臓を摘出し10%ホルマリン溶液(和光純薬)にて固定し、パラフィン包埋した。定法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

(6) インスリン染色

膵島のみが残存していたAire KOマウスの膵臓について、インスリン産生能を確認するためパラフィン包埋標本を用いてインスリン染色を行った。一次抗体としてMonoclonal Anti-human/bovine/mouse Insulin Antibody(Lot. IDM02, Clone:182410, R&D systems, Inc.)を用い、また染色キットはmouse ABC Staining System:sc-2017(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を使用した。

(7) 免疫蛍光染色による自己抗体の探索

免疫蛍光染色は、マウス及びラットの膵臓の新鮮凍結標本を用い、1次抗体に野生型Wtマウス血清またはAire KOマウス血清、2次抗体にDyLight 488™ Conjugated Affinity Purified anti-Mouse IgG(H&L)[Goat](Lot. 20308, Rockland)を用いた。

(8) Western blotting法による自己抗体の探索

Aire KOマウス血清中の自己抗体の探索のため、Western blottingを行った。サンプルとして、BALB/cAnN背景の野生型Wtマウスの膵臓、胃、肝臓、胸腺、腎臓、顎下腺、精巣、精巣上体、卵巣、心臓、脳、大腿部筋肉、脳下垂体を用いた。

各臓器は解剖後、氷冷滅菌PBS(-)にて洗浄し、付着した血液を取り除いた。その後、50倍希釈したプロテアーゼ阻害剤カクテル(動物細胞抽出物用)(Lot No. L4T4258, nacalai tesque)中で、ホモジナイザーを用いて20,000rpm, 30秒間を2分間隔で2回ホモジナイズした。その後、超音波破碎

装置 (BIORUPTOR, COSMO BIO) を用いて run 30 秒間, stop 90 秒間で合計 15 分間, 超音波破碎した. その後, 12,000rpm, 15 分間, 4°C で遠心し, 上清を回収し, 組織溶解液とし, 4°C で保存した.

(9) ヒト末梢血 B 細胞の分離、EB ウイルストランスフォーム B 細胞の準備

健康人より EDTA 採血を行い, 末梢血と等量の BSA buffer を加えた. そして, LSM 3.5mL に BSA buffer を加えた末梢血 8mL を静かに重層し, 2,000rpm, 30 分間遠心した. その後, PBMC (peripheral blood mononuclear cells: 末梢血単核球) 層を回収し, BSA buffer を加え, 1,200rpm, 5 分間遠心した. 遠心後, 上清を除去し, BSA buffer を 5mL 加えた. Pre-Separation Filters (MACS, Miltenyi Biotech) に 1mL の BSA buffer を通した後, BSA buffer に浮遊させた PBMC 全量を通すことで PBMC の分離を行った. また, 樹立細胞としては, 陰性コントロールとして, K562 (慢性骨髄性白血病株)、OTC-4 (単球白血病細胞株)、陽性コントロールとして OTC-4-AIRE (レンチウイルスベクターを用いて AIRE 遺伝子を導入した細胞株)、主たる対象の B 細胞株は, MDK-3 (健康人由来 B 細胞に対し, EB ウイルスを transform させ, 樹立した細胞株) を用いた.

(10) ヒト細胞の純化

健康人より EDTA 採血を行い, 末梢単核細胞を取得した. ソーティングは FACS Aria (BD) 及び EPICS ALTRA (BECMAN COULTER) を用いて行った.

(11) ヒト細胞における AIRE 遺伝子発現定法に従い, RT-PCR, および定量 PCR を用いて施行した.

4. 研究成果

(1) Aire KO BALB/cAnN マウスの病理組織学的観察

Aire KO マウスの胃, 肝臓, 膵臓について 10%ホルマリン固定した標本を, HE 染色し野生型 Wt マウスと比較し, 病理組織学的に観察を行った. 膵臓に関しては 4, 6, 12, 24 週齢で観察した. 12 週齢の野生型 Wt マウスでは膵臓, 胃, 肝臓いずれの臓器においてもリンパ球の浸潤は認められなかったのに対して, 同じ 12 週齢の Aire KO マウスでは 3 臓器いずれにおいてもリンパ球の浸潤が確認された. Aire KO マウスにおけるリンパ球浸潤は, 膵臓では主に血管周囲に

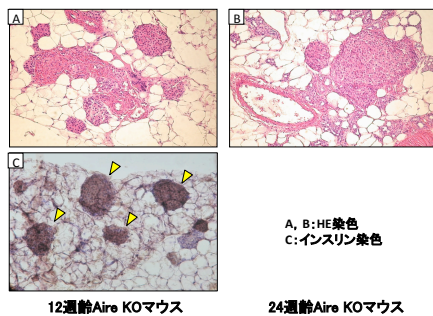
認められ, その他にも膵腺房組織実質へ浸潤している所見も確認された. 胃では, 浸潤リンパ球が血管周囲から粘膜筋板, 固有筋層へと広がっている所見が観察された

(Fig. 2E). また, 肝臓においては主に中心静脈辺縁にリンパ球の浸潤が認められ, 実質へと浸潤像が広がりを見せている個体も確認された. また, 4, 6, 24 週齢の Aire KO マウス膵臓においても 12 週齢 Aire KO マウスと同様に血管周囲から膵腺房組織実質へのリンパ球の浸潤を認めた. 4, 6 週齢と若い Aire KO マウスの膵臓においても, リンパ球浸潤が血管周囲に留まらず膵腺房組織実質への進行が顕著である個体も確認された.

また, 解剖時の膵臓の肉眼的観察で Aire KO マウスの一部の膵臓で他と比較して若干萎縮傾向がある印象を受けた. また, そのようなマウスの膵臓は白い斑点が散在性に認められた.

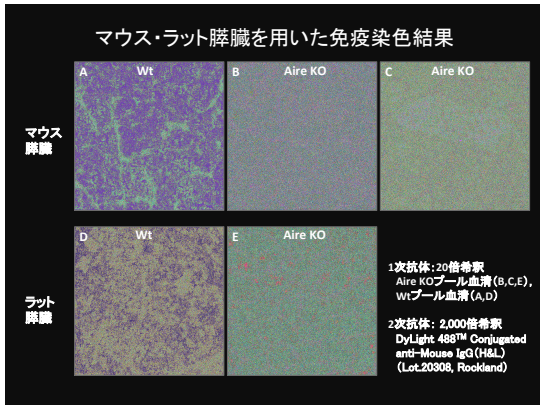
一部の個体ではリンパ球の浸潤により膵腺房組織実質が極度に崩壊し, 脂肪変性をきたしている個体が確認された. これらの Aire KO マウスの膵臓は, 一部の小葉が脂肪変性を起こしているものもあれば, 大半の膵小葉が脂肪変性をきたしているものもあったが, いずれの個体においても膵ランゲルハンス島は比較的良好に保持されていた (下図). そのため, 膵ランゲルハンス島のインスリン産生能が正常に機能しているか確認するため, 12 週齢 Aire KO マウスで膵腺房組織の崩壊および脂肪変性が顕著な個体 (ID 1422) のパラフィン包埋膵臓標本を用いて, インスリン染色を行った. その結果, 極度の膵腺房組織の崩壊にも関わらず, 膵ランゲルハンス島は DAB により濃い褐色の染色性を示したことから, 膵ランゲルハンス島は形態だけではなく機能的にも破綻しておらず, インスリン産生能は維持されていることが確認された. (下図)

12週齢,24週齢Aire KOマウスの膵臓病理所見



(2) 間接免疫染色による自己抗体の探索

これまでの病理組織学的所見から、Aire KO マウスの膵臓におけるリンパ球浸潤が自己免疫に起因するのではないかと考え、Aire KO マウス血清または野生型 Wt マウス血清を1次抗体として、膵臓新鮮凍結標本による間接免疫蛍光染色を行った (Fig. 7)。自己抗体の標的抗原は通常種を超えて共通であることが多く、2次抗体が anti-Mouse IgG (H&L) であるため、内因性の IgG による非特異的反応を極力抑制させる目的で、標本として野生型 Wt ラットの膵臓も同時に用いた。マウスおよびラット標本のいずれの場合も、野生型 Wt マウスプール血清を1次抗体として用いた場合 (Fig. 7A, D) でもわずかながら非特異的と考えられる蛍光が観察されたが、それと比較して Aire KO マウスプール血清を用いた場合では強い陽性蛍光像が確認された。このことから、Aire KO マウス血清中には膵臓組織抗原に対する自己抗体の存在が示唆された。また、その染色性が膵臓全体、特に膵腺房組織細胞に強い蛍光を認め、膵ランゲルハンス島にも若干弱い蛍光ではあるが観察された。また、腺房細胞中の核と思われる部分において、蛍光強度の減弱が確認できることから、Aire KO マウス血清中に存在する自己抗体の標的抗原は膵腺房細胞の細胞質中に豊富に存在することが示唆された。(次図)

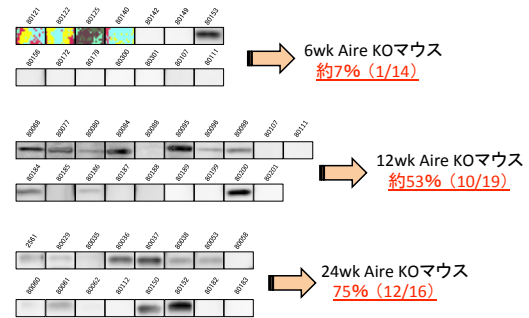


(2) Western blotting 法による Aire KO マウス血清中の自己抗体の標的抗原の探索

間接免疫蛍光染色の結果より、Aire KO マウス血清中には膵臓組織抗原に対する自己抗体の存在の可能性が非常に大きいことが示唆されたため、次に Western blotting 法を用いて標的抗原の探索を行った。まず、10%SDS-PAGE に膵臓組織タンパク溶解液を展開し Western blotting を行った際に、約

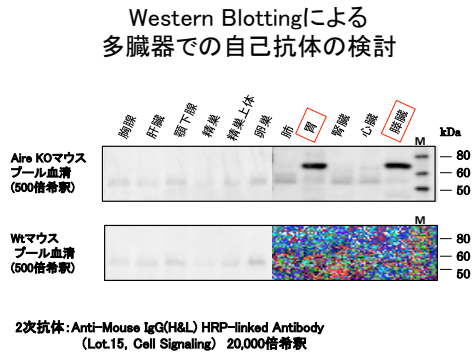
70kDa 付近にバンドが確認されたため (データは示していない)、60~80kDa 付近が良好に分離する 8.0%SDS-PAGE を用いて Western blotting を行うこととした。また、1次抗体として用いるマウス血清の濃度についても、10倍、100倍、500倍、1,000倍、2,000倍の希釈で検討したところ、500倍希釈で最も明瞭なバンドが検出された (データは示していない)。続いて、各々の個体の血清について、膵臓組織抗原に対する自己抗体の存在を検討した。用いた個体数は、6週齢 Aire KO マウス (n = 8)、12週齢 Aire KO マウス (n = 19) および野生型 Wt マウス (n = 2) である。その結果、6週齢 Aire KO マウスでは 1/8 (12.5%)、12週齢 Aire KO マウスでは 10/19 (52.6%) の割合で膵臓組織抗原に反応する自己抗体を有する Aire KO マウスが認められ、そのいずれの個体についても同様に約 70kDa の大きさの膵臓組織抗原に反応性を示した。また、6週齢 Aire KO マウス血清 (ID:80153) では、明瞭な約 70kDa 付近のバンド以外にも、約 45kDa 付近にも明瞭なバンドが確認された。さらに、12週齢 Aire KO マウス血清については他の Aire KO マウスで検出された約 70kDa 付近のバンドは検出されなかったのに対して、この個体でも約 45kDa 付近にやや薄くではあるがバンドが検出された。また、いずれの個体に対しても、約 55kDa 付近に非常に薄くではあるがバンドが確認できた。また、この自己抗体は、週令とともに高率に産生されることが明らかとなった (下図)

各週齢における自己抗体陽性率の比較



続いて、膵臓以外の他の臓器 (胸腺、肝臓、顎下腺、精巣、精巣上体、卵巣、肺、腎臓、心臓) に対して、Aire KO マウス血清中の自己抗体が反応性を示すか検討した。その結果、胃の組織抗原に対して約 70kDa

付近に、膵臓とほぼ同様の強い反応性を示した。(下図)

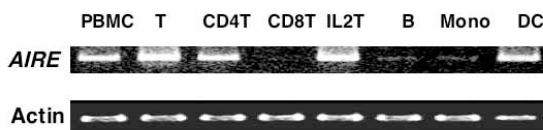


また、通常1次抗体・2次抗体ともに室温1時間で反応させているが、1次抗体・2次抗体ともに4℃、一晩で反応させると、胸腺・肝臓においても膵臓で検出された大きさ付近にバンドが認められ、また肝臓では120kDaより大きな肝臓組織抗原についてもバンドが確認され、膵臓組織抗原においても約45kDa付近に明瞭なバンドが確認された。

(3) ヒト末梢血における *AIRE* 遺伝子の発現パターン (永淵正法、勝田仁、栗崎宏憲)

既に、末梢血免疫系細胞における *AIRE* 遺伝子の発現パターンを、RT-PCRにより検討した。その結果、下図に示すように、CD4⁺T細胞、B細胞、樹状細胞、さらにIL-2活性化T(IL-2T)細胞に高い *AIRE* 遺伝子の発現が認められた。(Microbiol Immunol 2006)

末梢免疫細胞における *AIRE* 遺伝子の発現(RT-PCR)



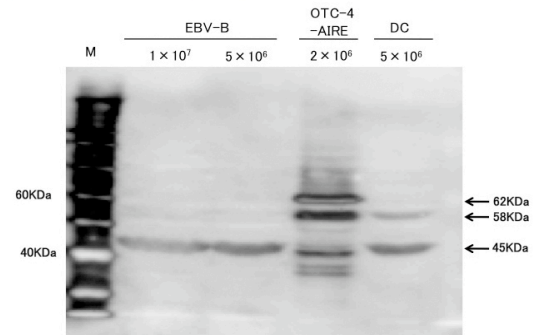
そこで、今回の研究計画では、それぞれの細胞分画における *AIRE* 遺伝子および蛋白発現の制御、その機能解析へと進展した。

(4) Western blot による *AIRE* 蛋白表出細胞の検討

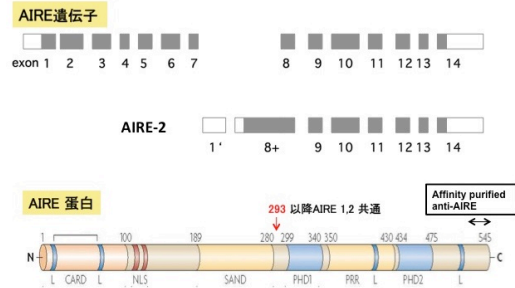
AIRE 蛋白に対する抗体は、C-末端12ペプチドで免疫し、アフィニティ純化した精製抗体を用いて、非特異反応を抑えることが可能となった。*AIRE* 遺伝子を導入した OTC-4 細胞、

EBV-B細胞、樹状細胞で検討したところ、樹状細胞では、58kDaの *AIRE* 全蛋白と45kDaの *AIRE*-2のスプライスバリエント(下図)と思われる蛋白を検出したのに対し、EBV-B細胞では、45kDaのフラグメント蛋白のみを検出した(下図)。

アフィニティ純化 *AIRE*-C末端抗ペプチド抗体を用いたWestern Blot



AIRE 遺伝子と *AIRE* 蛋白の構造



従って、*AIRE* 蛋白はその発現細胞によって、サイズが異なり、機能も多様である可能性が高い。このことは自己免疫調節の中心臓器である胸腺において、どの蛋白が発現しているかの検討も重要であることを示唆している。

さらに、フラグメントがC-末端蛋白であるのかも含め、全 *AIRE* 蛋白に対する抗体の作製による検討、N-末端蛋白に対する抗体を用いた検討が必須である。今後、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法、TOF-MASを駆使して、B細胞に表出している *AIRE* 蛋白が会合する蛋白・標的遺伝子を同定することによりその意義を明らかにすることが必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Wada N, Nishifuji K, Nagafuchi S, Amagai M, et al. Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T cell tolerance. J Invest Dermatol 131, 410-417, 2011.
2. Inada A, Inada O, Fujii H, Tomoyuki Akashi T, Sueishi K, Fukatsu A, Nagafuchi S. Different effects of islet transplantation and Detemir treatment on the reversal of streptozotocin induced diabetes associated with β cell regeneration. Diabetology International 1(1):49-59, 2010.
3. Nagafuchi S, Katsuta H, Anzai K. Rituximab, B-Lymphocyte depletion, and beta-cell function. N Engl J Med 362(8):761, 2010.
4. Nagafuchi S. The role of B cells in regulating the magnitude of immune response. Microbiol Immunol 54:487-490, 2010.
5. 永淵正法, 塚本浩, 新納宏昭, 小林隆志. 自己免疫疾患と炎症. 細胞工学 29(9):769-775, 2010.
6. 大澤進, 永淵正法. 1型糖尿病の成因: 環境因子. 月刊糖尿病 1(6):31-39, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

1. 松尾友仁, 進藤美恵子, 野口由樹子, 永尾幸大, 小田淑恵, 吉田英子, 栗崎宏憲, 勝田仁, 永淵正法. C末端12ペプチドアフィニティカラム精製抗AIRE抗体を用いたWestern Blotting法によるAIRE蛋白の発現解析. 第85回日本感染症学会総会学術講演会 2011. 4. 21. 東京.
2. 小田淑恵子, 松尾友仁, 野口由樹, 進藤美恵子, 永尾幸大, 栗崎宏憲, 勝田仁, 永淵正法. 樹状細胞におけるAIRE遺伝子の発現, AIRE遺伝子の表出の検討. 第85回日本感染症学会総会学術講演会 2011. 4. 21. 東京.
3. 永尾幸大, 栗崎宏憲, 松尾友仁, 諸石亜利沙, 近藤しおり, 安西慶三, 勝田仁, 永淵正法. 第54回日本糖尿病学会学術講演会. 2011. 5. 21. 札幌
4. 野口由樹子, 松尾友仁, 進藤美恵子, 小田淑恵, 栗崎宏憲, 永淵正法. 自己免疫

調節遺伝子(AIRE)遺伝子のAIRE遺伝子導入細胞とT細胞における発現制御とその意義. 第84回日本感染症学会総会学術講演会. 2010. 4. 26. 京都市.

[図書] (計 1 件)

1. 永淵正法. 編集代表 糖尿病治療ハンドブック 医学出版 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.shs.kyushu-u.ac.jp/nagafuchi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永淵正法 (NAGAFUCHI SEIHO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 00150441

(2) 研究分担者

栗崎宏憲 (KURISAKI HIRONORI)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 70403962