

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790952

研究課題名(和文)

AIRE 発現細胞株を用いた自己抗原遺伝子の制御機構の解析

研究課題名(英文)

Analysis of ectopic expression of autoantigen genes using Aire⁺ cell lines

研究代表者

山口 良考 (YAMAGUCHI YOSHITAKA)

慶應義塾大学・先端研究センター・助教

研究者番号：50365433

研究成果の概要(和文):自己免疫性多腺性内分泌不全症Ⅰ型(APS1,別名APECED)は、AIRE(自己免疫調節遺伝子)の突然変異により発症する。申請者が樹立したAireを発現している細胞株を用いて、AIREのはたらきを探求し、自己免疫疾患のメカニズムの解明・治療法の確立を目指した。Aireを発現している細胞の状態により、Aireの発現量や、自己抗原となりうる様々な遺伝子、それを分解するプロテアソームの発現が変動している事を見いだした。

研究成果の概要(英文):Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS1, called also APECED) is caused by mutations in AIRE (Autoimmune Regulator) gene. We used our established Aire-expressing cell lines for following up AIRE functions and aimed for elucidation of the pathogenic mechanism and establishment of therapy for autoimmune diseases. In this study, we found that gene expression level of Aire, various self-antigens and subunits of proteasomes that process the antigens varies depending on conditions of Aire-expressing cells.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：胸腺、免疫学的寛容、自己免疫疾患、AIRE、末梢組織特異的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性多腺性内分泌不全症Ⅰ型(APECED)は、自己免疫疾患による内分泌臓器の障害と慢性皮膚粘膜カンジダ症を高率に合併する症候群であり、常染色体劣性遺伝の単一遺伝子疾患である。所属研究室は1997年にAPECEDの原因遺伝子をクローニングしAIRE(autoimmune regulator)と命名した。AIRE遺伝子は、胸腺髄質上皮細胞や樹状細胞など免疫系組織の極めて限られたごく一部の細胞でのみ特異的に発現している。正常の胸腺髄質上皮細胞で末梢組織特異的遺伝子が異所性に発現していること、またノック

アウトマウスを用いた実験からAIRE遺伝子はその異所性発現を支配しており、免疫寛容の成立に関与している事が明らかになっているが、AIREが一群の末梢組織特異的遺伝子の異所性発現を転写段階で調節するメカニズムは全く判っていない。AIRE遺伝子は最も発現が高い胸腺においてさえ、ごく一部の胸腺髄質上皮細胞でしか発現しておらず、胸腺全体を用いて生化学的手段によりAIREの作用機構を解析することは困難であった。

申請者は、Aire遺伝子プロモーターDNA断片の下流にSV40ラージ抗原遺伝子(動物細胞を

不死化させる特質を持つ)を融合させたトランスジーンを用いてトランスジェニックマウスを作製することに数年がかりで成功した。このマウスにおいては、*Aire*遺伝子プロモーター支配下で*Aire*遺伝子発現細胞においてのみ特異的にラージ抗原が発現し、その細胞が不死化することが期待された。実際、得られたトランスジェニックマウスにおいては、胸腺においてのみラージ抗原の発現が観察された。この胸腺由来の細胞から、ラージ抗原および*Aire*遺伝子を発現し、同時に胸腺髄質上皮細胞のいくつかの表面マーカーを発現している*Aire*発現細胞株(以下*Aire*⁺細胞-TEC1, TEC2株)とさらに樹状細胞のマーカーであるCd11cも発現している*Aire*発現細胞株(以下*Aire*⁺細胞-DC株)を樹立することに成功した。

これらの*Aire*⁺細胞株は、*Aire*ノックアウトマウスにおいて発現の低下した末梢組織特異的遺伝子(Preproinsulin II, Fatty acid binding protein など)やAPECED患者血清中の自己抗体の標的となる末梢組織特異的自己抗原遺伝子(Calcium sensing receptor, Glutamic acid decarboxylase 2 など)も発現しており、正常マウス由来の未成熟な胸腺細胞と混合すると互いに結合した。さらに*Aire*⁺細胞に結合した全ての胸腺細胞がアポトーシスに陥っている事を突き止めた。

このように*Aire*⁺細胞株は、本来の胸腺髄質上皮細胞の特質を保持している事が示唆され、現在まで不可能であった胸腺内における*Aire*を発現する髄質上皮細胞内での*Aire*の生化学的解析を行うのに最も優れた研究材料である。この*Aire*⁺細胞株を用いる事で、胸腺髄質上皮細胞における末梢組織特異的自己抗原遺伝子の異所性発現に関わる*Aire*の真の機能解析が可能となった。

2. 研究の目的

申請者が樹立した*Aire*⁺細胞株を用いて胸腺髄質上皮細胞における末梢組織特異的自己抗原遺伝子の異所性発現に関わる*Aire*の真の機能を追究する。

Aire⁺細胞株は上述のように自己反応性胸腺細胞の除去を担う胸腺髄質上皮細胞の特質を示すため、純化された培養細胞として独創的な研究材料であり、これを有効利用してノックアウトマウス研究では知り得ない以下の事を明らかにする。

(1) AIRE タンパクと特異的に結合するタンパク質の同定: *Aire* がどのように機能して、胸腺髄質上皮細胞における末梢組織特異的遺伝子の異所性発現制御機構に関与してい

るか明らかにする。

(2) AIRE が転写調節を行う遺伝子群の同定: *Aire* がコントロールしている遺伝子群を同定する。さらにそれらの遺伝子が*Aire*によって直接的にあるいは間接的に調節を受けているか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AIRE タンパクと特異的に結合するタンパク質の同定

所属研究チームでは既に AIRE タンパクが、転写のコアクチベーター CBP (CREB 結合タンパク) と結合し、転写を活性化することを見出したが、それ以外の未知の因子については、実際に AIRE が発現して機能している胸腺髄質上皮細胞を生化学的解析に用いられるほど大量に純化することが困難であったため、解析が進んでいない (Pitkanen et al., J. Biol. Chem., 275: 16802-9, 2000)。

AIRE は核内でドット状に点在するが、染色体上の転写不活性領域の活性化に関する AIRE の機能を知るためには、AIRE と結合しているタンパク質を同定することが必須である。申請者の樹立した *Aire*⁺細胞には、末梢組織特異的遺伝子の発現に必要なファクターはすべて揃っているため、この目的のために非常に優れた実験材料である。

Aire⁺細胞株に FLAG タグで標識した AIRE タンパクを強制発現させた後、抗 FLAG 抗体を用い共免疫沈降を行い、AIRE タンパク複合体を回収し、電気泳動で分離した後、微量タンパクを質量分析し、データベースと照合してタンパク質を同定する。

(2) AIRE が転写調節を行う遺伝子群の同定

Aire ノックアウトマウスの研究より *Aire* の欠損により、胸腺髄質上皮細胞における様々な末梢組織特異的自己抗原遺伝子の転写レベルが低下していることが報告されている (Anderson et al., Science, 298: 1395-1401, 2002)。しかし、この報告は *Aire* が直接これらの末梢組織特異的自己抗原遺伝子群の転写を調節しているという証拠にはならない。

申請者が樹立した *Aire*⁺細胞株は胸腺髄質上皮細胞由来の純化された細胞株であり、これらの研究を行うのに優れた材料である。

4. 研究成果

(1) AIRE タンパクと特異的に結合するタンパク質の同定

免疫原に、マウス *Aire* のエキソン 3 と 14 内のアミノ酸配列 (PPRPPTKRKALEEPR, SRPLAETPPFSS) に対応する合成ペプチドを用い、*Aire* タンパクを特異的・高感度に検出

できる抗 Aire 抗体を作製した。この抗体を用いて Aire⁺細胞株における endogenous に発現する Aire タンパクを、ウェスタンブロット法にて検出した (図1の矢印頭)。検出されたバンドは、免疫前血清では検出されず、合成ペプチドによる吸収反応では消失した (データ非表示)。コントロールには、Aire⁺細胞に FLAG+Aire 融合タンパクを強制発現させたタンパク溶液を用いた。

Aire の Coding Sequence (CDS) の N 末端側に FLAG タグが連結されているプラスミド DNA (pFLAG/FLAG+Aire) を *Hind*III と *Eco*RI で消化し、Aire CDS を含む DNA 断片を精製し、我々の研究室で作製した V5 と 3xHA タグを有するプラスミド DNA (pV5-N と p3xHA-N、*Hind*III と *Eco*RI 消化済) にクローニングした (pV5/V5+Aire と p3xHA/3xHA+Aire)。3種類のプラスミド DNA をトランスフェクション後、48 時間培養した Aire⁺細胞のタンパクに、抗タグ抗体と同じ免疫動物 IgG を反応させた。プレクリアーされた Aire⁺細胞タンパクに対し、抗タグ抗体を反応させ、磁気ビーズにより共免疫沈降を行った。各免疫沈降物を Wash 後、各タグ用の合成ペプチドにて Tag+Aire タンパク複合体を溶出し、SDS-PAGE 電気泳動後、銀染色を行ったところ、3種類のタグで同じ様な泳動像が確認された (図2)。

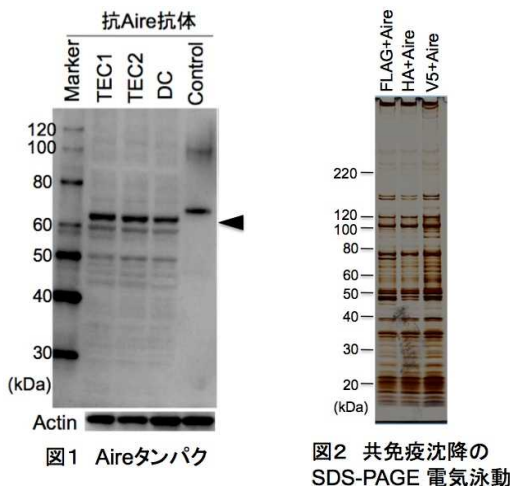


図1 Aireタンパク

図2 共免疫沈降の SDS-PAGE 電気泳動

(2) AIRE が転写調節を行う遺伝子群の同定

Aire⁺細胞における Aire の発現量に変動があるかを調べるために、細胞密度が低い Semi-confluent Condition (SC) と細胞密度が高い Confluent Condition (C) における Aire の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。Aire の発現量を解析する方法は、10cm² Dish に、Aire⁺細胞 0.35x10⁷ cells (TEC1 と TEC2)、1.4x10⁷ cells (DC) を播種し、2 日間培養した。冷 PBS で Wash 後、Trizol (Invitrogen) にて Total RNA を精製し、FastTrack MAG mRNA Isolation Kit

(Invitrogen) にて mRNA を精製した。精製した mRNA に DNase I を反応させ、コンタミしているゲノム由来の増幅を防いだ。各 mRNA に対し、ランダムプライマーとオリゴ dT₂₀、Super Script III (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、1st cDNA を合成した。これら 1st cDNA をテンプレートとして、Aire に特異的に設計したプライマー、Universal Probe Library (Roche) をプローブとして用いた TaqMan 法によりリアルタイム RT-PCR 解析を行った。測定された Aire の発現量を Actin β の発現量により補正する事で、Aire の相対的な発現量を求めた。また実験を 4 回繰り返し、測定された発現量の平均値と標準誤差をグラフに示した。

SC と比較して、C における Aire mRNA に発現量の増加が認められ、Aire⁺TEC1 cell においては 150 倍、Aire⁺TEC2 cell は 100 倍、Aire⁺DC cell においては 60 倍と、非常に高い Aire の発現変動が確認された (図3 と 4)。

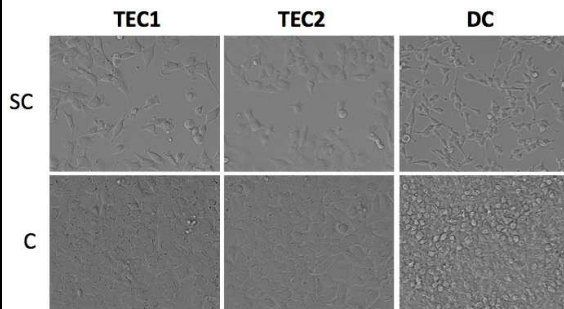


図3 Aire⁺細胞の状態

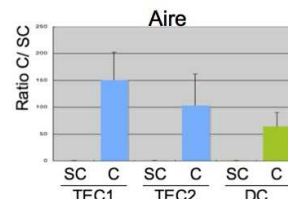


図4 Aire の発現量

現在の所、Aire 陽性または陰性の胸腺髄質上皮細胞 (medullary Thymic Epithelial Cells: mTECs) は分化に伴い、様々な TSA 遺伝子の発現が変動する "Terminal Differentiation Model" が知られている (Villasenor et al., Proc Natl Acad Sci USA, 105, 15854-15859, 2008)。

Aire の発現量に差がある細胞密度の異なる Aire⁺細胞株間における、末梢組織特異的自己抗原 (Tissue Specific Antigen: TSA) 遺伝子 (Casein alpha: Csna, Cytochrome P450 17: Cyp17, Fatty Acid Protein 2: Fabp2, Insulin II: InsII, Thyroglobulin: Tgn) の発現パターンをリアルタイム RT-PCR 法により解析した (図5)。各遺伝子に特異的なプライマーを設計し、解析方法は前記 Aire

の方法と同様に行った。

全ての TSA は、Aire の発現が低い SC に比べ Aire の発現が高い C において、発現量の増加が認められた。Csna は、TEC1, TEC2 で 10~40 倍量、DC では 900 倍高く、Cyp17 は、TEC1, TEC2 とともに殆ど変動が認められなかったが、DC においては 3 倍上がった。逆に Fabp2 は TEC1, TEC2 で 1.5~2 倍上がり DC では変動が認められなかった。InsII は TEC1 のみ 40 倍上がり、Tgn は DC においてのみ 30 倍上がった。このように TSA 遺伝子の変動は、Aire の発現が高い Aire⁺細胞において高く、また Aire⁺細胞の種類により様々な変動が認められた。

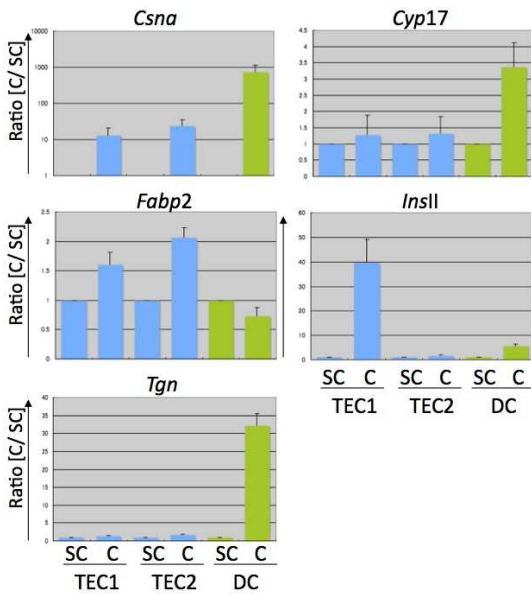


図5 TSA遺伝子の発現

PSM と IPSM 特異的サブユニットは、ペプチドの消化に關するタンパク質分解酵素活性を持ち、抗原提示機構に深く關与しており、特に IPSM は胸腺ネガティブセレクションに關与している事が知られている。

Aire⁺細胞株における Proteasome (PSM) と Immunoproteasome (IPSM) 特異的サブユニットの発現量の変動をリアルタイム RT-PCR 法により解析した (図 6)。各遺伝子に特異的なプライマーを設計し、解析方法は前記 Aire の方法と同様に行った。

全ての細胞に恒常的に発現している PSM 特異的サブユニット ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) の発現変動は、3つの Aire⁺細胞株において最高 2 倍と大きな変動は認められなかった。これに対し、IPSM 特異的サブユニット ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) のうちの、 $\beta 1i$ は 6 倍 (TEC1), 50 倍 (TEC2), 40 倍 (DC)、 $\beta 5i$ は 4 倍 (TEC1), 10 倍 (TEC2), 7 倍 (DC) の発現増加が認められた。また、PSM や IPSM へのペプチド移動に關する調節ユニットである PA28 サブユニット (α ,

β , γ) の発現増加変動も解析したところ、PA28 α は 4 倍 (TEC2), 2 倍 (DC)、PA28 β は 5 倍 (TEC2), 3 倍 (DC) で発現増加が認められたが (図 4) PA28 γ においては大きな差が認められなかった (データ非表示)。TSA と同様に、IPSM 特異的サブユニットの変動が、Aire の発現が高い Aire⁺細胞において認められた。

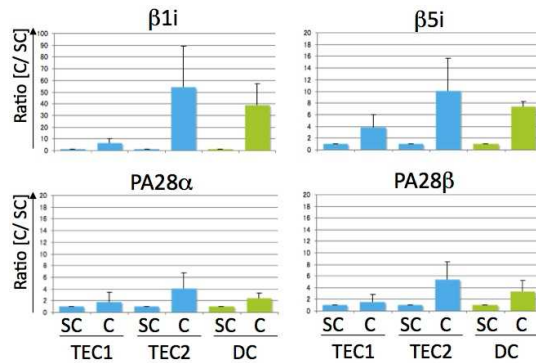


図6 プロテアソーム遺伝子の発現

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 1 件)

1. Yoshitaka Yamaguchi, Atsushi Takayanagi, Jiabing Chen, Kosuke Sakai, Jun Kudoh and Nobuyoshi Shimizu, Mouse Thymic Epithelial Cell Lines Expressing "Aire" and Peripheral Tissue-specific Antigens Reproduce In Vitro Negative Selection of T Cells, Experimental Cell Research, 印刷中

[学会発表](計 5 件)

1. 細野克博、大石健太郎、山口良考、工藤純、清水信義、堀田喜裕、蓑島伸生、視細胞特異的プロモーターと SV40 LargeT 抗原によるマウス培養細胞株の樹立、第 115 回日本眼科学会総会、2011 年 5 月 12~15 日、東京
2. 山口良考、ゲノムワイドな自己抗原遺伝子の異所性発現制御：自己免疫制御因子 AIRE の場合、BMB2010 (第 33 回日本分子生化学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 7 日~10 日、神戸
3. Yoshitaka YAMAGUCHI、Analysis of Ectopic Gene Expression of Self Antigen Genes Using AIRE-Expressing Thymic Epithelial Cell Lines、第 32 回日本分子生化学会年会、2009 年 12 月 9 日~12 日、横浜

4. 細野克博、大石健太郎、山口良考、工藤純、清水信義、堀田喜裕、葦島伸生、視細胞特異的遺伝子プロモーターとSV40LargeT 抗原遺伝子によるマウス培養細胞株の樹立と性状解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜
5. 葦島伸生、細野克博、大石健太郎、山口良考、工藤純、清水信義、堀田喜裕、特異的遺伝子を発現するマウス培養細胞株の樹立、第 16 回日本遺伝子診療学会大会、2009 年 7 月 30 日～8 月 1 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良考 (YAMAGUCHI YOSHITAKA)
慶應義塾大学・先導研究センター・助教
研究者番号：50365433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし