

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659097

研究課題名（和文） 初期発生における AIRE の役割と自己寛容

研究課題名（英文） Roles of AIRE in the development of early embryos and in the establishment of immunological self-tolerance

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）：初期胚における AIRE 発現の意義を解析する目的で、AIRE/GFP-KI (+/gfp) から樹立した ES 細胞を用いて、GFP (AIRE) 発現機構を検討した。すなわち、AIRE/GFP-KI (+/gfp) 由来の ES 細胞には GFP 発現集団と GFP 陰性集団とが混在するため、両細胞集団を cell sorter を用いて分取した後に培養を継続し、GFP (AIRE) シグナルの変動をモニターした。その結果、GFP 陰性集団からも数日後には GFP 陽性シグナルが検出されるようになるとともに、GFP 陽性集団からも GFP 陰性集団の出現が認められた。このことから、ES 細胞における AIRE 発現は確率的もしくは振動的な性質をもつことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We sought to investigate the mechanisms underlying the AIRE expression in ES cells, hoping that the results would give us a better clue for the understanding of the tolerogenic roles of Aire in medullary thymic epithelial cells. We first confirmed Aire expression from ES cells by the flow cytometric analysis, with ES cells used for the establishment of Aire^{+/gfp} mice. Aire expression from ES cells was also confirmed from ES cells derived from Aire^{gfp/gfp} mice. Interestingly, Aire/GFP expression was observed only from a half population of the Aire^{+/gfp} ES cells. We then sorted out GFP⁺ and GFP⁻ cell populations, and cultured them separately for a couple of days. We found the appearance of GFP⁺ cells from GFP⁻ cell population. We also found the appearance of GFP⁻ cells from GFP⁺ cell population, suggesting a possible stochastic and/or oscillating nature of Aire gene expression in ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

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：AIRE、自己免疫疾患、ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

「自己免疫疾患の原因究明」のための突破口となる素材が、メンデル型遺伝（常染色体

劣性)を示す自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE の同定によってもたらされた。すなわち、AIRE 欠損にともない自己免疫性多腺性内分

泌疾患 I 型 (APECED) の発症に至る。AIRE の発現は成熟過程にある T 細胞との相互作用によって自己寛容の成立に直接関わる胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) にほぼ限局することから、AIRE の機能異常に基づく疾患病態の解明により、「自己・非自己の識別機構」についての基本原理を一挙に解決できる可能性がある。現在のところ、AIRE は mTEC における多数の組織特異的自己抗原 (tissue-specific self-antigen: TSA) 遺伝子の転写制御に関わると考えられているが、その検証が十分に成されているとは言い難い。私どもは mTEC における AIRE の役割を明らかにする目的で、AIRE 遺伝子座に Cre recombinase を挿入した AIRE/Cre knockin mouse (AIRE/Cre-KI) を樹立し GFP reporter mouse との交配によって AIRE 発現 mTEC の fate mapping (運命写像) を試みたところ、驚くべきことに胸腺での発現に先立ち、AIRE が 3 胚葉 (外・中・内胚葉) 分離以前の初期胚に発現する事実を見出した。すなわち、AIRE は初期胚と mTEC という 2 相性発現を示すことが判明した。他方、AIRE ヘテロ欠損マウスの交配によって AIRE ホモ欠損個体がメンデル則に従って得られることから、少なくともマウスでは AIRE は初期発生において必須ではない。しかしながら、ヒトの AIRE 欠損症の主要症候の一つに歯芽や爪の形成異常といった外胚葉異形成 (ectodermal dystrophy) が存在することから、AIRE が自己寛容の形成機構のみならず初期発生においても何らかの重要な機能をもつことが強く推測される。とりわけ、初期発生の本質とも言える「多能性維持からの脱却と多様な細胞・組織への分化」という現象と、mTEC の「多様な免疫学的自己の表出」という役割との間には共通原理が存在することは十分にありうる。それどころか、AIRE 本来の機能は初期発生におけるものであり、mTEC における AIRE の役割は、免疫系が進化の過程でそれを借用した可能性すらある。

2. 研究の目的

mTEC における AIRE の役割を従来のマウスモデルを用いて解析するのみでは、自己寛容成立機構についての既成概念にとらわれ、「自己・非自己の識別機構」に新たな視点を持ち込むことは容易ではない。こうした理由から、本研究課題では AIRE の本質的機能の解明をあえて初期発生における機能解析に絞って展開することにした。

3. 研究の方法

初期胚における AIRE 発現の意義を解析する目的で、AIRE/GFP-KI (+/gfp) から樹立した ES 細胞を用いて、GFP (AIRE) 発現機構を検討した。すなわち、AIRE/GFP-KI (+/gfp)

由来の ES 細胞には GFP 発現集団と GFP 陰性集団とが混在するため、両細胞集団を cell sorter を用いて分取した後に培養を継続し、GFP (AIRE) シグナルの変動をモニターした。

4. 研究成果

上記の通り、AIRE/GFP-KI 樹立時に取得した ES 細胞を用いて FACS により GFP (AIRE) 発現細胞を解析したところ、AIRE を発現する細胞集団と発現しない細胞集団の 2 つの population が存在した。ヘテロ (+/gfp) に限らず、同様の所見はホモ (gfp/gfp) AIRE/GFP-KI 由来の ES 細胞においても観察された。そこで、ヘテロ (+/gfp) 由来の ES 細胞から FACS を用いて GFP 発現集団と GFP 非発現集団を sorting し、それぞれの細胞集団について別個に培養を継続し、GFP (AIRE) シグナルの変動をモニターした。その結果、GFP 陰性集団からも数日後には GFP 陽性シグナルが検出されるようになるとともに、GFP 陽性集団からも GFP 陰性集団の出現が認められた。このことから、ES 細胞における AIRE 発現は確率論的もしくは振動性をもつことが示唆された。今後はヘテロ (+/gfp) およびホモ (gfp/gfp) AIRE/GFP-KI 由来の ES 細胞から FACS を用いて GFP 発現集団と GFP 非発現集団を sorting し、計 4 つの細胞集団の間で発現の異なる遺伝子を microarray によって同定し、ES 細胞における AIRE の標的遺伝子を明らかにする予定である。さらに、ES 細胞における周期的 AIRE 発現の意義とメカニズムについては、近年進展が著しい RNA 生物学やエピジェネティクの視点を取り入れて研究を進めるべく取り組んでいる。すなわち、AIRE 発現 ES 細胞から AIRE 蛋白を免疫沈降した後、共沈してくる遺伝子を次世代高速シーケンサーにより徹底分析し (ChIP-seq 法)、ES 細胞において AIRE が構築する遺伝子発現ネットワークの全貌解明を図りたい。

以上のように、本研究においては初期発生における AIRE の役割こそが AIRE の本質的意義をもち、mTEC における AIRE は、その機能を免疫システムが借用したとの大胆な仮説のもとに研究を進めている。しかしながら、得られた知見は mTEC における自己寛容成立機構の全貌解明にも必ずや資するものと期待している。

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 5 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.

[学会発表] (計 10 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.

〔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