

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25年4月22日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790931

研究課題名（和文） 遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the gene responsible for the hereditary type of human autoimmune disease

研究代表者

西川 裕美子 (NISHIKAWA YUMIKO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・学術研究員

研究者番号：60448214

研究成果の概要（和文）：Aire は遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子であり、その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に大きく寄与することが期待される。Aire がどのような機序によって自己寛容の成立機構に作用しているかを検討する目的で、Aire 発現細胞の胸腺内での動態を解析するための実験系を構築した。その結果、Aire が胸腺髄質上皮細胞での発現に先立って、初期胚に発現することを見出した。さらに、Aire を発現する胸腺髄質上皮細胞の寿命が約1週間と、従来考えられていたよりも長いことが判明した。

研究成果の概要（英文）：Aire is a gene responsible for the hereditary type of human autoimmune disease. Elucidation of the mechanisms underlying the Aire-deficient autoimmune pathogenesis would contribute to unveiling the pathogenesis of autoimmune disease. In order to know how the Aire establishes the immune tolerance, we constructed the experimental system where we get the information on the cellular dynamics of Aire-expressing cells. Unexpectedly, we found that Aire is expressed by early embryos prior to the thymic organogenesis. Furthermore, we demonstrated that half-life of Aire-expressing cells is about 1 week, which turned out to be much longer than previously thought.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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、自己免疫疾患、AIRE

1. 研究開始当初の背景

胸腺における自己反応性 T 細胞の除去には髄質上皮細胞（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である 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。しかしながら、そのメカニズムの詳細は不明である。この点について、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る（transcription model）。これに対してもう一つのモデルは多様な TSA 発現の転写制御機構に Aire が直接

関与するのではなく、Aire が mTEC を分化させる作用を持ち、それによって 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 の分化を促進すると捉える (maturation model)。

2. 研究の目的

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 の役割を明らかにすることを目的とした。そのためには、Aire 発現 mTEC の細胞学的な解析が必須である。このようにして得られた、Aire 機能の詳細な解析によって、原因不明の難病である自己免疫疾患の原因究明を探索することを主目的とする。

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。特に、Aire が初期胚でも発現していることから、mTEC に特異的な fate-mapping を構築する必要があった。

4. 研究成果

上記の理由から、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した。Cre-ER は内在性のエストロジオールでは核内移行せず、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。事実、それによって Aire 発現 mTEC の半減期を算定したところ、およそ 1 週間と、これまでに想定されていたよりも長いことが判明した。今後は、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 mTEC 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 mTEC 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。

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 3 件)

① Sakane, A., Abdallah, A. A., Nakano, K., Honda, K., Ikeda, W., Nishikawa, Y., Matsumoto, M., Matsushita, N., Kitamura, T., and Sasaki, T.

Rab13 small G protein and Junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development. J. Biol. Chem. (査読有り) 287: 2012, 42455-42468. doi: 10.1074/jbc.M112.383653.

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. doi: 10.4049/jimmunol.1003533.

③ 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. doi: 10.1084/jem.20092144.

〔学会発表〕(計 11 件)

① Nishikawa, Y., Mouri, Y., Nishijima, H, and Matsumoto, M.

Timing-controlled fate-mapping study reveals essential roles of Aire in the maturation program of Aire-expressing cell lineage.

第41回日本免疫学会総会、2012. 12. 5、神戸国際会議場 (神戸市)

② Nishikawa, Y., and Matsumoto, M.

Temporal fate-mapping approach reveals a requirement of Aire for the full maturation program of thymic epithelial cells in the medulla.

International Symposium on Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate, November 6-7, 2012, Kyoto Grand Prince Hotel (京都市)

③ 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)

④ 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)

⑤ 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.

⑥ 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.

⑦ 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 (淡路市)

⑧ 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 Beyer, Hulshout, The Netherlands.

⑨ 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 (神戸市)

⑩ 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 (神戸市)

⑪ Matsumoto, M., Nishikawa, Y., Hirota, F. and Mouri, Y.

AIRE and autoimmune disease.

The 19th International Rheumatology Symposium, April 23, 2010, Kobe Portopia Hotel (神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 裕美子 (NISHIKAWA YUMIKO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・学術
研究員

研究者番号：60448214

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：