

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

松本 満

徳島大学疾患酵素学研究センター・教授

臓器特異的自己免疫疾患の病態解明による慢性炎症制御法の開発

§1. 研究実施体制

(1)「松本」グループ

① 研究代表者:松本 満 (徳島大学疾患酵素学研究センター、教授)

② 研究項目

- ・ Aire 発現細胞の動態解析
- ・ Aire の機能解析

§2. 研究実施内容

Aire 遺伝子改変マウスを用いた自己免疫疾患の病態解析

自己免疫疾患は慢性炎症の病像を示す疾患のプロトタイプであり、その原因究明には胸腺における自己寛容成立機構の解明が必須である。胸腺における自己反応性 T 細胞の除去 (negative selection) には胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) によって多様な組織特異的自己抗原 (tissue specific self-antigen: TSA) が T 細胞に適切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 *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が、そのメカニズムの詳細は不明である。*Aire* による TSA の発現制御機構については現在のところ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)。これに対して私どもは、*Aire* は最終成熟段階の mTEC が発揮する多様な TSA 発現を獲得する段階にまで mTEC を分化させる役割を担うとするモデル (maturation model) を提唱している。すなわち、*Aire* のはたらきによって成熟した mTEC が、二次的に TSA 発現能を獲得するものと考えている (図1・参照)。これら二つのモデルを *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 *Aire* の役割を明らかにしたいと考え研究を進めている。

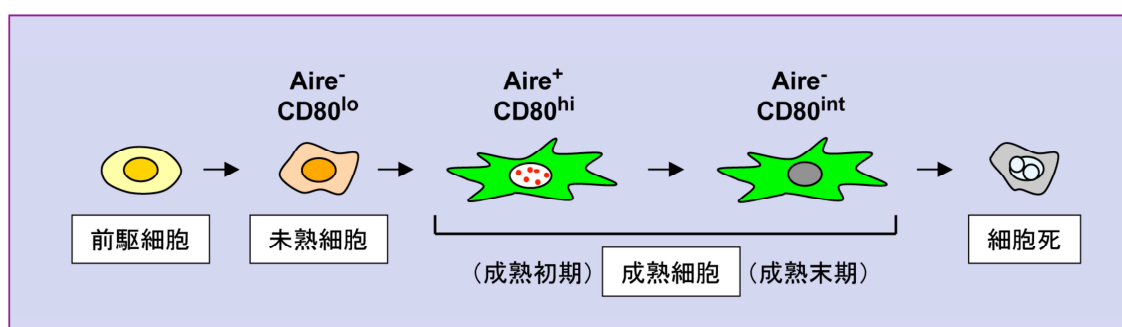


図1 Aire を発現する胸腺髄質上皮細胞の分化モデル

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 mTEC の分化やその細胞構築化に対して重要なはたらきを持つことが示唆されているが、この点をより明確する目的で *Aire* 発現細胞の系譜を解析するための fate-mapping の実験系の構築に取り組んだ。通常 *fate-mapping* マウス (*Aire*/Cre-KI) を用いた実験から、*Aire* が発生初期と mTEC という二相性発現を示すことを既に報告した。そこで新たに、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の作製を試みている。すなわち、Cre-ER は内在性のエストラ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にタモキシフェンを投与する

ことで Aire 発現細胞を特異的にマーキングできる(図2)。

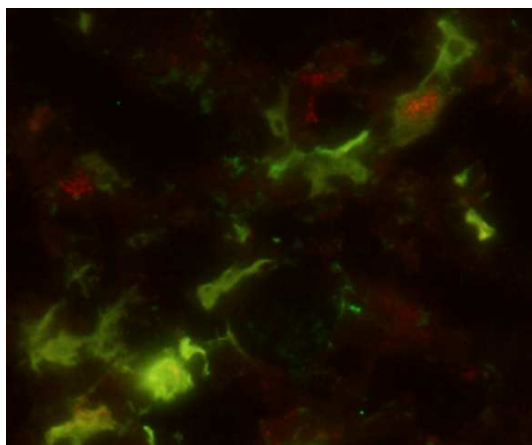


図2 Aire 発現細胞の fate-mapping

(タモキシフェン投与後に GFP (緑) によってマーキングされた Aire 発現細胞 (赤) を認める)

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。さらに、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) で行うことで、Aire 欠損にともなう Aire 発現細胞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 発現細胞は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た後に最終的に胸腺から消え去るのかを検討したい。Preliminary な実験結果からは、Aire 発現細胞はただちに死滅するのではなく、Aire^{CD80^{intermediate}} の段階 (成熟末期) を経て寿命を終えるものと考えている (図1)。こうした一連の実験から、Aire のはたらきが mTEC の分化誘導にあると考える maturation model の妥当性を検証したい。

他方、モデル自己抗原である ovalbumin (OVA) を Aire 発現細胞に target させるための Aire/OVA ノックインマウス (Aire/OVA-KI) を既に樹立しており (図3)、Aire 発現細胞によって呈示される自己抗原が胸腺における自己寛容の成立機構にどのように寄与するかについても検討を開始している。

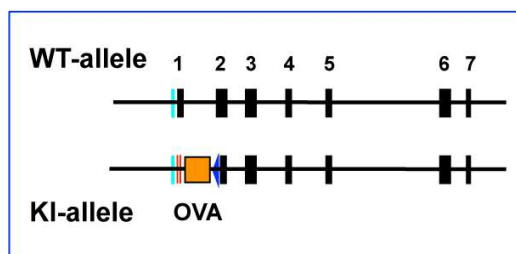


図3 Aire 発現依存的にモデル自己抗原 OVA を発現する Aire/OVA ノックインマウスの樹立

これまでのところ、Aire 発現細胞に target させた OVA によって OVA 特異的 TCR トランスジェニック

クマウス T 細胞 (OT-II T 細胞) が負の選択を受けることを確認した。今後は、この過程が Aire 依存
的であるか否かを検討し、負の選択機構における Aire の役割を解析したい。