

「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

H24 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

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

Aire 遺伝子改変マウスを用いた自己免疫疾患の病態解析

慢性炎症のプロトタイプである自己免疫疾患の病態を明らかにするためには、胸腺における自己寛容成立機構の解明が必須である。遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 *Aire* は胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) に特異的に発現し、多彩な組織特異的自己抗原 (tissue-restricted antigen: TRA) の発現に重要な役割を担うが、そのメカニズムは不明である。私どもは *Aire* を、多彩な TRA を発現しうる段階にまで mTEC を成熟化させるためにはたらく分化促進因子であるとするモデル (maturation model) を提唱している。このモデルは、従来の *Aire* が成熟 mTEC において直接、TRA 遺伝子を標的として、その発現を転写レベルで制御するというモデル (transcription model) と大きく異なる。こうした mTEC における *Aire* のはたらきを理解することは、胸腺における自己寛容成立機構の解明に必須である。そこで、*Aire* 遺伝子改変マウスを用いて、以下の研究を行った。

①mTEC の成熟化における *Aire* の役割

mTEC の分化プロセスにおける *Aire* のはたらきを明らかにする目的で、*Aire* のプロモーター下に Cre recombinase とエストロゲン受容体リガンド結合領域変異体との融合タンパク質 (CreER) を挿入したノックインマウス (*Aire*/CreER-KI) を樹立した。次いで、GFP あるいは RFP レポーターマウスと交配後の成体に、4-水酸化タモキシフェン (tamoxifen: TMX) を投与することで *Aire* 発現細胞をマーキングする、いわゆる時期特異的 fate-mapping を行った (図1)。それによって、以下の事実が明らかとなった。

- 1) mTEC の成熟化に伴う *Aire* の発現時期から、最終的に *Aire*⁺ mTEC が胸腺から消失するまでの期間は約3週間で、半減期は7~8日であった。
- 2) *Aire*⁺ mTEC の寿命は *Aire* の欠損によって変化しなかった。
- 3) *Aire* 欠損マウスの胸腺では、CD80^{high} mTEC の増加を認めるが、その原因は *Aire* 発現後 (post-*Aire* stage) における CD80 の down-regulation が起きないためと考えられた。

まず、1)の知見より、*Aire*⁺ mTEC の寿命が、抗 *Aire* 抗体を用いて行われた従来の実験結果のおよそ倍であることが判明した。それは、*Aire*⁺ mTEC が *Aire* の発現とともに死滅するのではなく、*Aire* 発現消失後の、より成熟した時期 (post-*Aire* stage) が存在するという、私どものモデルを支持する結果である。また、*Aire* が成熟 mTEC において TRA 遺伝子を正に制御するとともに、apoptosis を誘導することで cross presentation を促進するというモデルがあるが、2)の結果は、そうした *Aire* の proapoptotic 活性を否定するものであった。さらに、*Aire* 欠損マウスにおける CD80^{high} mTEC (成熟 mTEC) の増加については、従来、*Aire* 欠損に伴う *Aire*⁺ mTEC の寿命延長によるものと解釈されていたが、時期特異的 fate-mapping を *Aire* 遺伝子の発現をリアルタイムに解析できる *Aire*/GFP ノックインマウス (*Aire*/GFP-KI) と組み合わせた実験によって (図2)、*Aire* 欠損マウスで

は生理的に認められる post-Aire stage での CD80 の down-regulation が起きないための見かけ上の増加であることが判明した。post-Aire stage における CD80 down-regulation の欠如は、Aire が mTEC の分化プロセスに重要な役割を担うことを改めて示唆する成績である。

②負の選択における Aire の役割

モデル自己抗原 ovalbumin (OVA)を Aire⁺ mTEC に限局発現させるための Aire/OVA ノックインマウス(Aire/OVA-KI)を樹立し、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス(OT2-TCR Tg)と交配した。それによって、以下の事実が明らかとなった(図3・上段)。

- 1) Aire⁺ mTEC の発現する OVA は OT2-T 細胞に負の選択を誘導した。
- 2) Aire/OVA-KI と OT2-TCR Tg との交配によって観察される OT2-T 細胞の負の選択は、Aire 欠損によって障害されなかった。
- 3) Aire/OVA-KI と OT2-TCR Tg との交配実験では負の選択が優勢的に起こり、制御性 T 細胞 (Treg) の産生は、ほとんど認めなかった(データ省略)。

2)の結果から、Aire⁺ mTEC による OT2-T 細胞の負の選択が、インスリンプロモーター下に OVA を発現させた RIP-OVA Tg と OT2-TCR Tg を交配した場合の結果とは異なり(図3・下段)、Aire を必要としないことが判明した。すなわち、Aire/OVA-KI では負の選択は Aire 非依存的であった。今後は、Aire/OVA-KI と RIP-OVA Tg の負の選択における Aire 依存性の違いが、どのような理由によって生ずるかを探求し、それによって負の選択における Aire の役割を明らかにしたい。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Yoshihiro Ueda, Koko Katagiri, Takashi Tomiyama, Kaneki Yasuda, Katsuyoshi Habiro, Tomoya Katakai, Susumu Ikehara, Mitsuru Matsumoto and Tatsuo Kinashi.

Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus.

Nat. Commun. 3: Article number 1098, 2012. (DOI:10.1038/ncomms2105)

(3-2) 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)