

研 究 報 告 書

「胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：秋山 泰身

1. 研究のねらい

難治性自己免疫疾患やアレルギー疾患は、自己の組織あるいは個体に有害でない外来抗原に対して免疫系が過剰に応答した状態である。これらの免疫系疾患は日本社会で急速に増加しつつあり、放置できない重要な問題となっている。健康な個体の免疫系において、自己の組織や有害でない非自己に対する過剰な応答を抑制し、恒常性を維持する機構が免疫寛容である。

健康な個体は複数の免疫寛容機構を有している。その一つが T リンパ球を産生する器官である胸腺における免疫寛容である。胸腺での免疫寛容機構はさらに 2 つに分類される。一つはアポトーシスによる自己反応性 T 細胞クローンの除去であり、もう一つは免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の産生である。これらの免疫寛容の誘導において、胸腺ストローマ細胞の一部である髄質上皮細胞が重要であると考えられている。胸腺髄質上皮細胞は、本来は末梢組織にのみ発現する様々な自己由来タンパク質（以下、組織特異的抗原と略）を、ごく微量であるが異所的に発現するというユニークな特色を持つ。さらにヒト自己免疫疾患の原因遺伝子産物として同定された Autoimmune regulator (Aire) はこれら組織特異的抗原の異所的発現を制御することが判明している。胸腺はこの異所的な発現により、末梢組織の自己タンパク質に応答する T リンパ球の除去や、自己抗原を認識し免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の産生を行っていると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。

本研究課題は、胸腺髄質上皮細胞の分化、組織特異的抗原の発現、自己免疫寛容機構を分子レベルで解明し、さらに得られた知見を利用して、免疫寛容機構を制御する技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 胸腺髄質上皮細胞の分化を制御するサイトカインレセプターの同定

胸腺髄質上皮細胞の分化を制御する因子として転写因子 NF- κ B やその活性化を誘導するシグナル伝達因子 TRAF6 などが知られていたが、それらをシグナル伝達因子や転写因子を活性化するサイトカインが不明であった。これらの因子が TNF レセプターファミリーにより活性化することに着目し、その関与を探索した。その結果、

(A) TNF レセプターファミリーである Receptor Activator of NF- κ B (RANK) と CD40 の2つのシグナルが欠損するマウスでは成熟した胸腺髄質上皮細胞がほぼ完全に欠損していた。

(B) さらに、RANK と CD40 からのシグナルが欠損するマウスでは自己臓器に応答するリンパ球が産生していた。

(C) また RANK リガンドと CD40 リガンドの組み換えタンパク質は、胎仔胸腺ストローマにおいて成熟した胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導した。

以上の事実から、TNF レセプターファミリーである Receptor Activator of NF- κ B (RANK) と CD40 の2つのシグナルが協調して働くことで胸腺髄質上皮細胞分化増殖させ、自己免疫寛容を誘導していると結論した。

(2) 胸腺髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する転写因子候補の探索

胸腺髄質上皮細胞で他の細胞にない特徴は、組織特異的抗原の異所的な発現である。この発現には核タンパク質である Aire が関与することが知られている。しかしながら、Aire 欠損マウスでは、一部の組織特異的抗原の発現しか不全にならないこと、さらに Aire による発現制御機構が未だ不明なことから、他の転写制御機構の関与が示唆される。

そこで(1)で得られた知見を基に RANK シグナルで活性化される転写因子候補の同定を目指し、以下の知見を得た。

- (A) 胎仔胸腺ストローマに組み換え RANK リガンドタンパク質を処理した際に誘導される mRNA をマイクロアレイ法で解析した。ついで誘導される遺伝子のプロモーター領域について *in silico* 解析を行い、誘導遺伝子の発現を制御している転写因子候補として STAT1 を得た。
- (B) RANK リガンドを処理した胎仔胸腺ストローマでは STAT1 のリン酸化が亢進しており、STAT1 の転写活性化が誘導されていた。
- (C) RANK リガンドを処理した胎仔胸腺ストローマでは、STAT1 結合配列をプロモーター領域に持つインターフェロン誘導遺伝子が多量発現していた。

以上の事実から、RANK シグナルは胸腺髄質上皮細胞において、STAT1 の活性化を介してインターフェロン誘導遺伝子の発現を制御していると予想される。

3. 今後の展開

本研究によって、髄質上皮細胞の分化や増殖を誘導させる因子、および機能を制御する転写因子候補が同定された。この結果は、自己免疫疾患発症のメカニズム解明につながる可能性がある。また胸腺髄質上皮細胞の機能を誘導する分子メカニズムをさらに詳細に解明し利用することで、自己免疫疾患の原因解明やアレルギー・癌などの治療方法の開発へと展開する可能性がある。

4. 自己評価

本研究課題は、(1)胸腺髄質上皮細胞の分化および機能発現の分子メカニズム解明 および (2) 免疫寛容を人為的に制御する基盤技術の開発 の2つをテーマとして研究を行った。(1) に関しては胸腺髄質上皮細胞の分化を制御するサイトカインの発見、および分化や機能を制御する転写因子候補の探索により、多くの有用な知見が得られた。(2)に関しては現在検証中であるものの、将来的にさらに発展させる上で、重要な知見が得られた。

5. 研究総括の見解

胸腺髄質上皮細胞の分化誘導と機能発現のプロセスを、複数の遺伝子操作マウスを利用し、システムとしての細胞内情報系を明らかにしたこと、また、免疫寛容の誘導機能解明に向けた基盤形成に貢献したことは高く評価出来る。細胞生物学的な研究も進展することを期待している。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. <u>Akiyama T*</u> Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohsima, D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, & Inoue J. “The Tumor necrosis family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance” <i>Immunity</i> , 29, 423-437 (2008).
2. Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, Yano K, Ishimaru N, Hayashi Y, Matsumoto M, Matsuo K, Penninger JM, Takayanagi H, Yokota Y, Yamada H, Yosikai Y, Inoue J, <u>Akiyama T</u> , & Takahama Y. “The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator” <i>Immunity</i> , 29, 438-450 (2008).
3. Shimo Y., Yanai H., Ohshima D., Qin J., Motegi H., Maruyama Y., Hori S., Inoue J., and <u>Akiyama T*</u> . “TRAF6 directs commitment to regulatory T cells in thymocytes” <i>Genes Cells</i> , in press
4. Mouri Y., Yano M., Shinzawa M., Shimo Y., Hirota H., Nishikawa Y., Nii T., Kiyonari H., Abe T., Uehara H., Izumi K., Tamada K., Chen L., Penninger JM., Inoue J., <u>Akiyama T*</u> , and Matsumoto M., “Lymphotoxin Signal Promotes Thymic Organogenesis by Eliciting RANK Expression in the Embryonic Thymic Stroma” <i>J. Immunol.</i> , in press

(2)特許出願

出願1件 予定(H23.3) (非公開)

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

第 29 回日本炎症・再生医学会 2008 年 東京 (招待講演)

第 27 回日本骨代謝学会 2009 年 大阪 (招待講演)

第 32 回日本分子生物学会 2009 年、横浜（招待講演）
第 33 回日本分子生物学会年会／第 83 回日本生化学会大会 2010 年、神戸（招待講演）