

論 文 内 容 要 旨

題目 Aire Expression Is Inherent to Most Medullary Thymic Epithelial Cells during Their Differentiation Program

(ほとんどの胸腺髄質上皮細胞が成熟過程で Aire を発現する機能を備えている)

著者 Hiroshi Kawano, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Fumiko Hirota, Ryoko Morita, Yasuhiro Mouri, Yasuhiko Nishioka and Mitsuru Matsumoto

平成 27 年 12 月 1 日発行 The Journal of Immunology
第 195 巻第 11 号 5149 ページから 5158 ページに発表済

内容要旨

胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) は多様な組織特異的的自己抗原 (tissue restricted antigen: TRA) を異所性に発現し、胸腺における自己反応性 T 細胞の除去、すなわち負の選択に中心的な役割を果たす細胞である。Autoimmune regulator (Aire) は mTEC に発現する転写調節因子であり、中枢性自己寛容の成立に必須であるが、その詳細な機能については明らかとはなっていない。

mTEC は二分化能を有する前駆細胞より分化し、成熟する過程でいくつかの機能的分子を発現するようになる。MHC class II 分子や T 細胞に対する副刺激分子である CD80/CD86 を高発現する mTEC (mTEC^{high}) は、その発現レベルが低い mTEC (mTEC^{low}) に比べ、より多様な TRA を発現する。mTEC^{low} が mTEC^{high} へと分化成熟し、Aire は成熟した mTEC^{high} にのみ発現する。

従来の抗 Aire モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる解析では、mTEC の 30-40% が Aire を発現し、mTEC^{high} の 40-50% が Aire を発現すると捉える。それゆえに、Aire 陽性 mTEC は TRA を発現する mTEC サブセットであると一般的には考えられてきた。しかしながら、この限られた mTEC サブセットにおける Aire の欠損が、なぜ mTEC 全体からの多様な TRA の発現低下をもたらすのかについては明らかとはなっていなかった。

本研究では、Aire は特定の mTEC の細胞系列にのみ発現するのか、あるいは、本来 mTEC において特定の条件を満たした場合に Aire を発現する機能が備わっているのかを明らかにすることを目的とした。

様式(8)

mTEC における Aire の発現様式を詳細に解析するために、新規レポーターマウスとして Aire 遺伝子座に human AIRE-GFP-Flag tag 融合遺伝子を導入した Aire/hAGF ノックインマウスを樹立した。同マウスにおいて内在性 Aire は hAGF 融合蛋白に置換されるため、胸腺の免疫染色を行うと hAGF レポーター蛋白は内在性 Aire と同様に核内に点状蛋白として検出され、モノクローナル抗体を用いて検出した内在性 Aire のシグナルとほぼ完全に一致した。また、Aire/hAGF ヘテロノックインマウス由来の mTEC をフローサイトメトリーにて解析した結果、モノクローナル抗体で検出される Aire 陽性 mTEC の割合は野生型マウスとほぼ同等であったが、mTEC^{high} の 80% において hAGF レポーター蛋白が検出された。さらに、Aire/hAGF ホモノックインマウスを同様に解析すると、mTEC^{high} の 95% が hAGF レポーター蛋白陽性であった。Aire/hAGF ヘテロノックインマウスに対して抗 RANKL 抗体を投与すると、同抗体による mTEC の分化阻害作用を反映して hAGF レポーター蛋白陽性 mTEC が経時的に減少したことから、このレポーター蛋白は内在性 Aire 蛋白に類似した細胞特性を持つと考えられた。

次に、Aire 遺伝子座に diphtheria toxin receptor-GFP (DTR-GFP) 融合遺伝子を挿入した Aire/DTR-GFP ノックインマウスを用い、diphtheria toxin (DT) を長期間連続投与することによって Aire 陽性 mTEC を消去し続けたところ、ほとんどすべての mTEC^{high} が消失した。同様に、Aire/DTR-GFP ノックインマウス由来の胎仔胸腺を RANKL と DT の存在下に培養すると、RANKL の刺激によって分化が促進された結果生じる mTEC^{high} のほとんどが消失した。

hAGF レポーター蛋白は、その検出感度が高いために、従来のモノクローナル抗体よりも多くの Aire 陽性 mTEC を検出可能であったと考えられる。本研究の結果から、Aire 陽性 mTEC は特定の mTEC の細胞系列に属するのではなく、ほとんどの mTEC^{high} は、Aire を発現していることが示唆された。このことは、mTEC という限られた細胞集団において、Aire という単一分子が非常に多種多様な TRA の発現を制御しうることを説明する知見であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1282号	氏名	河野 弘
審査委員	主査 安友康二 副査 高濱洋介 副査 齊藤達哉		

題目 Aire Expression Is Inherent to Most Medullary Thymic Epithelial Cells during Their Differentiation Program

(ほとんどの胸腺髄質上皮細胞が成熟過程で Aire を発現する機能を備えている)

著者 Hiroshi Kawano, Hitoshi Nishijima, Junko Morimoto, Fumiko Hirota, Ryoko Morita, Yasuhiro Mouri, Yasuhiko Nishioka and Mitsuru Matsumoto

平成 27 年 12 月 1 日発行 The Journal of Immunology
 第 195 巻第 11 号 5149 ページから 5158 ページに発表済
 (主任教授 西岡安彦)

要旨 胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) は多様な組織特異的自己抗原 (tissue restricted antigen: TRA) を異所性に発現し、胸腺における自己反応性 T 細胞の除去、すなわち負の選択に中心的な役割を果たす細胞である。mTEC は前駆細胞より分化し、MHC class II 分子や CD80/CD86 の発現レベルが低い mTEC^{low} から、高発現する mTEC^{high} へと分化成熟する。Autoimmune regulator (Aire) は mTEC に発現する転写調節因子であり、mTEC^{high} の 40-50% が Aire を発現すると考えられてきたが、Aire の欠損がなぜ mTEC 全体からの多様な TRA の発現低下をもたらすのかについては明らかではなかった。

そこで本研究では Aire 遺伝子座に human AIRE-GFP-Flag tag

(hAGF) 融合遺伝子を導入した Aire/hAGF ノックインマウスおよび diphtheria toxin receptor-GFP (DTR-GFP) 融合遺伝子を挿入した Aire/DTR-GFP ノックインマウスを用いて解析した。得られた結果は以下のとおりである。

1. Aire/hAGF ヘテロノックインマウス由来の mTEC をフローサイトメトリーにて解析した結果、モノクローナル抗体で検出される Aire 陽性 mTEC の割合は野生型マウスとほぼ同等であったが、mTEC^{high} の 80% において hAGF レポーター蛋白が検出された。さらに、Aire/hAGF ホモノックインマウスを同様に解析すると、mTEC^{high} の 95% が hAGF レポーター蛋白陽性であった。
2. Aire/DTR-GFP ノックインマウスを用い、diphtheria toxin (DT) を長期間連続投与することによって Aire 陽性 mTEC を消去し続けたところ、ほとんどすべての mTEC^{high} が消失した。
3. Aire/DTR-GFP ノックインマウス由来の胎仔胸腺を receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) と DT の存在下に培養すると、RANKL の刺激によって分化が促進された結果生じる mTEC^{high} のほとんどが消失した。

以上の結果より、Aire 陽性 mTEC は特定の mTEC の細胞系列に属するのではなく、ほとんどの mTEC^{high} は Aire を発現していることが示唆された。本研究は、Aire という単一分子が mTEC の細胞集団において広く TRA の発現を制御していることを説明する新たな知見を示しており、中枢性自己寛容機構の解明における免疫学的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。