

疾患モデルマウスを用いた自己免疫疾患の病態解析

1. はじめに

我々の身体には細菌やウイルスといった外敵の侵入から身を守る手段として免疫システムが備わっている。ところが、何らかの原因によって免疫系が自分自身の組織に攻撃をしかけるようになり、自己免疫疾患という難治性の病態が発生する。原因不明の難病である自己免疫疾患の病態を明らかにすることは、免疫システムの根幹をなす「自己・非自己の識別機構」の作動原理を理解することに他ならない。免疫システムは様々な病原微生物に対応できる多様なT細胞を産生しつつ、一体どのようにして自己の組織と反応するT細胞を作り出さずにいれるのだろうか。言い換えると、自己反応性T細胞の産生をどのように制御しながら多様なT細胞の集合体（レパトア）を形成するのだろうか。ノーベル賞を受賞した免疫学者 Burnet 卿が提唱したクローン選択説に基づくと、自己反応性T細胞は自己の組織（自己抗原）と反応することによって胸腺で取り除かれ [負の選択 (negative selection) による自己寛容 (self-tolerance) の成立]、自己反応性T細胞が存在しないT細胞レパトアが形成されると考えられる。このモデルに従うと、負の選択の障害は自己免疫疾患発症の要因となるが、はたしてヒトの自己免疫疾患において負の選択の障害が本当に本症の原因となっているのだろうか¹⁾。

こうした問題を研究するにあたり、負の選択機構に障害をもつ遺伝子改変マウスは重要な研究材料になると考えられる。とりわけ自己抗原を提示するプロセスに障害をもつマウスは、この問題に取り組むための格好の疾患モデル動物になる。本稿では筆者らが研究対象としている Aire (autoimmune regulator) の遺伝子改変マウスが、自己免疫疾患の研究にどのようなアプローチを可能にしているかを概説するとともに、自己免疫疾患の研究においても生化学的解析が重要となっている現状を紹介する。

2. 単一遺伝子の異常によってもたらされる自己免疫疾患：Aire 欠損症

メンデル型遺伝を示す Aire 欠損症は比較的まれな疾患であるにもかかわらず、自己免疫疾患の病態解明に重要な役割をはたすと考えられる^{2,3)}。Aire 欠損症は自己免疫性

多腺性内分泌疾患I型 (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy : APECED) と呼ばれ、副甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症 (Addison 病)、皮膚粘膜カンジダ症を3主徴とする。ポジショナルクローニングによって同定された Aire 遺伝子は胸腺の間質 (stroma) を構成する髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell : mTEC) に発現する転写因子である⁴⁾。mTEC は多様な自己抗原を発現する間質細胞の主体であるため、Aire の機能障害は自己抗原の提示過程に障害をもたらし、負の選択に障害が起こりうる。その結果、自己免疫疾患を発症するというモデルが成り立つ。この仮説を検証するにあたり、Aire 欠損症が単一遺伝子による劣性遺伝病であることからノックアウトマウスの作製によってヒトの病態をマウスに再現できる点はきわめて重要である。実際に Aire 欠損マウスは自己免疫疾患の病態を呈し⁵⁻⁷⁾、Aire が胸腺における自己寛容の成立に必須の役割をはたすことがわかったが、そのメカニズムを明らかにする必要がある。

Aire 依存的自己寛容の実体がどのようなものかを知るにあたり、これまでに明らかとなっている最も重要な知見の一つは、Aire 欠損マウスの mTEC では様々な自己抗原遺伝子の発現が低下していることである⁵⁾。先のクローン選択説によれば、自己寛容を成立させるためには mTEC が組織特異的自己抗原 (tissue-restricted self-antigen : TRA, 例：膵臓ランゲルハンス島のインスリンや肝臓の C 反応性タンパク質など) を網羅的かつ適切に発現していなければならないが、Aire 欠損マウスの mTEC から調製した RNA を調べると多種類の TRA 遺伝子の発現低下が観察された⁵⁾。この現象によって、Aire の一義的な役割が自己抗原遺伝子の転写制御にあるとする仮説 [仮に、転写モデル (transcription model) と呼ぶ] が提唱され、現在のところ有力である^{2,3)}。しかしながら、Aire 欠損マウスの mTEC における自己抗原遺伝子の発現低下が必ずしも負の選択機構の障害の主因とはなっていない例も見つかり、筆者らは別のメカニズムによって自己寛容の破綻がもたらされている可能性を指摘している^{6,7)}。その場合、自己抗原遺伝子の発現低下は病因の主体ではなく、二次的なものである可能性がある。すなわち、多様な自己抗原を発現するのは細胞表面分子の CD80 や MHC (major histocompatibility complex) クラス II の発現が高い段階の成熟 mTEC の特性であるが、Aire 欠損にともなう mTEC の分化障害が結果的に自己抗原遺伝子の発現低下をもたらしている可能性がある [仮に、成熟化モデル (maturation model) と呼ぶ]⁸⁾。したがって、mTEC の分化障害にともなって起こる自己抗

原の発現低下以外のメカニズムが負の選択の障害、ひいては自己免疫病態をもたらしている可能性がある。次項では *Aire* 遺伝子改変マウス、特に *Aire* 発現細胞の可視化を可能にした遺伝子改変マウスを用いて、mTEC 分化プロセスにおける *Aire* 発現の意義について解析した筆者らのアプローチを紹介する。

3. ノックインマウスを用いた *Aire* 発現細胞のイメージング

1) *Aire*/GFP ノックインマウス

胸腺内の *Aire* 発現細胞を同定 (可視化) するには、抗 *Aire* 抗体を用いた免疫組織染色が常法である。しかしながら、この方法では *Aire* 欠損マウスのように *Aire* タンパク質が存在しない状況で *Aire* 発現系列 (*Aire*-expressing lineage) の細胞を観察することはできない。この問題をクリアするためには、*Aire* の発現を *Aire* タンパク質の有無に依存しない方法で検出する必要があり、その例として蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) を用いたノックインマウスの作製がある。すなわち *Aire* 遺伝子座に *GFP* 遺伝子を挿入し、*Aire* 遺伝子プロモーター制御下に発現する GFP 蛍光を観察する (図 1)。特に *Aire* 遺伝子が破壊されるように *GFP* 遺伝子を挿入した場合には、挿入遺伝子 (*Aire*/GFP アリル) をホモでもつ個体は *Aire* 欠損状態となるが、その場合にも、*Aire* 発現系列の細胞を GFP 発現によって捉えることができる⁹⁾。その結果、*Aire*/GFP アリルをヘテロでもつ個体の mTEC (*Aire* タンパク質が存在) と *Aire*/GFP アリルをホモでもつ個体の mTEC (*Aire* タンパク質を欠損) を比較すると、GFP 陽性細胞の形態に違いがみられた⁹⁾。すなわち、*Aire* 欠損 mTEC (*Aire*/GFP アリルをホモでもつ個体由来) は *Aire* 保有 mTEC (*Aire*/GFP アリルをヘテロでもつ個体由来) に比べて未熟な形態 (樹状突起の形成に乏しく、丸みを帯びる) を呈し、*Aire* 欠損 mTEC では正常な分化プロセスがとれていない可能性が示唆された。多様な TRA 遺伝子の発現が成熟 mTEC でみられることをふまえ、*Aire* 欠損 mTEC における TRA 遺伝子の発現障害が mTEC の分化障害による可能性がある⁹⁾。

2) *Aire*/Cre ノックインマウス: fate mapping

Aire/GFP ノックインマウスでは *Aire* プロモーターによって GFP の転写が制御されるため、GFP の発現は *Aire* の発現をリアルタイムに反映する。これに対して fate mapping (運命写像) は *Aire* の発現履歴を知るための可視化方法である。fate mapping では *Aire* プロモーター下に

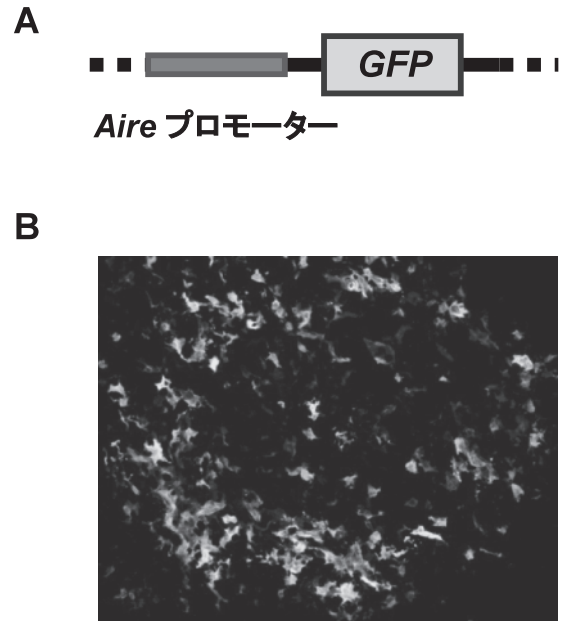


図 1 *Aire*/GFP ノックインマウスによる *Aire* 発現 mTEC の可視化

Aire 遺伝子座に *GFP* 遺伝子を挿入し、*Aire* 遺伝子プロモーター制御下に発現する GFP シグナルを蛍光顕微鏡下に観察する (A)。胸腺髄質領域に存在する *Aire* 発現 mTEC (B)。GFP タンパク質は細胞質に存在するので、個々の *Aire* 発現細胞の形状がわかる。GFP 蛍光 (発現) は *Aire* の発現状態をリアルタイムに反映する。

Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入する (図 2)。次に、*Aire*/Cre アリルをもつマウスを GFP レポーターマウスと交配する。GFP レポーターマウスからの GFP 発現は、*Aire* 発現にともなう Cre リコンビナーゼの発現により *loxP* 配列が取り除かれた場合に起こる。しかも、ひとたび *loxP* 配列が取り除かれると *GFP* 遺伝子はユビキタスプロモーターによってドライブされるため、もはや *Aire* 遺伝子の発現状態に依存しない。そのため、*Aire* (Cre リコンビナーゼ) を一度でも発現した細胞は、その細胞が死滅するまで *Aire* の発現状態とは無関係に GFP を発現し続ける。

実際に *Aire*/Cre ノックインマウスを *Aire* 遺伝子を保有する細菌人工染色体 (BAC) を用いたトランスジェネシスによって樹立し (セミ・ノックインマウスと呼ぶこともある)、GFP レポーターマウスと交配して *Aire* 発現細胞の fate mapping を行ったところ、全身のあらゆる細胞から GFP 発現が観察された¹⁰⁾。このことは全身すべての細胞が、*Aire* を発現した履歴をもつことを意味する。事実、野生型マウスの 2 細胞期胚や胚盤胞、ES 細胞などの初期胚を用いて RT-PCR 法を行うと *Aire* の発現が検出された。

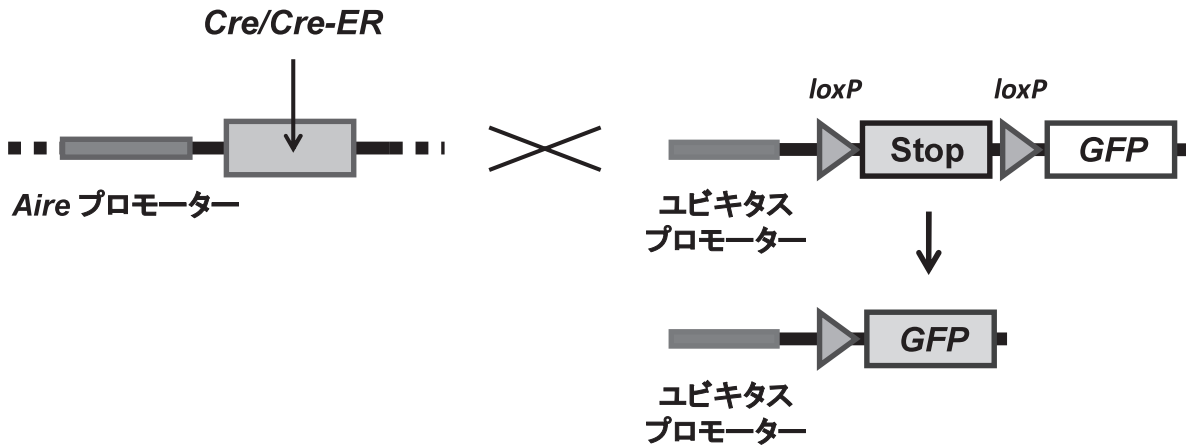


図2 Aire 発現 mTEC の fate mapping

Aire/Cre ノックインマウス, あるいは Aire/Cre-ER ノックインマウスによる Aire 発現 mTEC 可視化の仕組みを示す。fate mapping では *Aire* プロモーター下に *Cre* リコンビナーゼ遺伝子, あるいはタモキシフェン誘導型 *Cre* リコンビナーゼ遺伝子 (*Cre-ER*) を挿入する。これらのマウスを GFP レポーターマウスと交配すると, *Aire* 発現にともなう *Cre* リコンビナーゼの発現により, GFP レポーターマウスの *loxP* 配列が取り除かれて GFP が発現する。fate mapping マウスでは, ひとたび *loxP* 配列が取り除かれると *GFP* 遺伝子がユビキタスプロモーターによってドライブされるため, *Aire* 遺伝子の発現状態に依存せず GFP 蛍光を発する。それによって, mTEC の *Aire* 発現履歴を知ることができる。

すなわち, *Aire* は初期胚で発現し, その後いったん発現が消えるが, 胸腺形成期 (胎齢 10 日目頃) に続く胎齢 14 日目頃の mTEC で再び発現する。つまり, *Aire* は初期胚と mTEC という 2 相性 (biphasic) の発現パターンをとる¹⁰⁾。

3) Aire/Cre-ER ノックインマウス: 時期特異的 fate mapping

初期胚で *Aire* が発現するため, 通常の fate mapping では胸腺形成期以降に絞って *Aire* 発現 mTEC の動態をモニターすることはできない。そこで, *Cre* リコンビナーゼに代わり *Cre* リコンビナーゼとヒト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 (*Cre-ER*) を挿入したノックインマウスの作製を試みている。*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-ヒドロキシタモキシフェン (4-hydroxytamoxifen) の投与によって核内移行し *Cre* リコンビナーゼ活性を発揮する。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して得た成体マウスにタモキシフェンを投与することで, *Aire* 発現 mTEC のみ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り, *Aire* 発現 mTEC が胸腺内に存在する期間を計測することができる。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, *Aire* を発現した後, mTEC はただちに死滅するのではなく, *Aire* 発現が停止した時期を経て最終的に胸腺から消えることが判明した。転写モデルでは, *Aire* が mTEC にアポトーシスを誘導することで mTEC が樹状細胞 (dendritic cell: DC) に取り込まれ, それによって自己抗原の提示効率を高めるという可能性が指摘されている¹¹⁾。 *Aire* が mTEC にアポトーシスを誘導する作用をもつか否かについては, 時期特異的 fate mapping による解析結果が待たれる。

4. Aire の生化学

転写因子 *Aire* の標的遺伝子を同定できれば, *Aire* がどのようなメカニズムによって胸腺における自己寛容の成立にかかわっているかの決定的手がかりになるが, 現時点では特定するに至っていない。他方, *Aire* の N 末端側にある PHD1 がクロマチン (chromatin) を構成するヒストンタンパク質 (histone) の H3 に H3 の 4 番目のリシン (H3K4) のメチル化状態に依存して特異的に結合することが示されたことは, *Aire* が何らかのエピジェネティックな機構を介して機能を担うことを示唆する¹²⁾。 *Aire* 依存的な自己抗原遺伝子群がゲノム上でクラスターを形成する傾向が認められることとも合わせ¹⁾, 転写モデルでは *Aire* 依存的な自己抗原遺伝子 (*Aire* 欠損 mTEC でその発現が低下している

遺伝子群)の発現制御にエピジェネティックスの関与が強く推測されている。一般に非メチル化H3 (H3K4me0)の近傍遺伝子は不活性状態にあることが多く、Aireはそのプロモーター領域がH3K4me0状態(低発現状態)にある自己抗原遺伝子を選択的に発現誘導するというモデルが提唱されている^{2,3,12)}。また、Aireのパートナータンパク質の網羅的な解析からは、1) DNA-PK (DNA-dependent protein kinase)やTOP2a (topoisomerase II α)などと協調したDNA損傷反応(DNA-damage response)、2) RNA プロセッシング、3) 核輸送といったプロセスにAireがはたらくことで、膨大な数の自己抗原遺伝子発現を制御する可能性も報告されている¹³⁾。さらに、AireがP-TEFb (positive transcription elongation factor b)をプロモーター領域にリクルートすることによって自己抗原遺伝子の転写伸長反応(transcriptional elongation)を促進するという報告もある¹⁴⁾。このように転写モデルを中心に、Aireの多彩な遺伝子発現調節作用が提唱されている。ただし、こうした一連の実験はAire遺伝子導入細胞株を用いて行われているため、生体におけるmTECでのAire機能を真に反映しているか否かについては疑問が残る。

5. おわりに

T細胞分化はT細胞に組み込まれた内的プログラムのみに従って進行するのではなく、mTECなどの間質から供給される細胞外シグナルによって、そのプロセスが制御されている。mTECは胸腺内T細胞分化を支えるという重要な役割を担うにもかかわらず、純化した細胞を大量に単離することが困難であることからその生化学的解析は立ち遅れている。Aire遺伝子改変マウスを切り口としてmTECの生化学的研究を推進できれば、自己免疫疾患の病態解明に大きな進展がもたらされるものと期待される。Aireの標的遺伝子が何であるかという本質的な問いかけに答えるためには、新たな視点や解析技術を取り入れた生化学的アプローチも必要である。

- 1) Kyewski, B. & Klein, L. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 571-606.
- 2) Peterson, P., Org, T., & Rebane, A. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 948-957.
- 3) Mathis, D. & Benoist, C. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 287-312.
- 4) Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., & Shimizu, N. (1997) *Nat. Genet.*, 17, 393-398.

- 5) Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., & Mathis, D. (2002) *Science*, 298, 1395-1401.
- 6) Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., Ueno, T., Takahama, Y., Uchida, D., Sun, S., Kajura, F., Mouri, Y., Han, H., Matsushima, A., Yamada, G., & Matsumoto, M. (2005) *J. Immunol.*, 174, 1862-1870.
- 7) Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F., Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, N., & Matsumoto, M. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 1292-1301.
- 8) Matsumoto, M. (2011) *Eur. J. Immunol.*, 41, 12-17.
- 9) Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., & Matsumoto, M. (2008) *J. Exp. Med.*, 205, 2827-2838.
- 10) Nishikawa, Y., Hirota, F., Yano, M., Kitajima, H., Miyazaki, J., Kawamoto, H., Mouri, Y., & Matsumoto, M. (2010) *J. Exp. Med.*, 207, 963-971.
- 11) Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., & Mathis, D. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 2521-2528.
- 12) Org, T., Rebane, A., Kisand, K., Laan, M., Haljasorg, U., Andreson, R., & Peterson, P. (2009) *Hum. Mol. Genet.*, 18, 4699-4710.
- 13) Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., & Mathis, D. (2010) *Cell*, 140, 123-135.
- 14) Oven, I., Brdickova, N., Kohoutek, J., Vaupotic, T., Narat, M., & Peterlin, B.M. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 8815-8823.

松本 満, 新居 卓朗
(徳島大学疾患酵素学研究中心
免疫病態研究部門)

Transgenic approaches to the pathogenesis of autoimmune disease with mouse models of the human disease
Mitsuru Matsumoto and Takuro Nii (Division of Molecular Immunology, Institute for Enzyme Research, University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan)

細胞骨格によるスカベンジャー受容体 CD36 重合体形成とシグナル制御機構

1. はじめに

自然免疫細胞の一つマクロファージは、感染防御以外にも、様々な病気の原因から我々の体を守っている。食事として摂取した動物タンパク質を原料とするリポタンパク質が過剰に血液中を循環することで高脂血症となり、結果と