

平成30年 5月18日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08432

研究課題名(和文) FcRIIBによるリンパ濾胞胚中心および濾胞外領域形成と自己抗体産生の統御機構

研究課題名(英文) Role of FcγRIIB for autoantibody production inside and outside of germinal centers

研究代表者

広瀬 幸子 (Hirose, Sachiko)

桐蔭横浜大学・医用工学部・客員研究員

研究者番号：00127127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：FcRIIB^{-/-}.Yaaマウスは、自己抗体産生を伴うループス腎炎を発症する。B細胞特異的FcRIIB欠損マウスCD19Cre.Yaaおよびmyeloid系細胞特異的FcRIIB欠損マウスC/EBP^βCre.Yaaを作成し、FcRIIBのループス腎炎における役割を細胞特異的に解析した。その結果、前者ではFcRIIB欠損B細胞の自発活性化によりリンパ濾胞胚中心(GC)およびGC外領域に活性化B細胞が存在した。一方、後者ではGCにのみ活性化B細胞が存在した。この原因は、単球上のFcRIIB欠損により、B細胞活性化サイトカイン産生能の高い活性化型Gr-1⁺単球が増加するためと考えられた。

研究成果の概要(英文)：FcRIIB^{-/-}.Yaa mice develop severe lupus nephritis with high serum levels of autoantibodies. To determine cell type-specific role of FcRIIB for autoantibody production, we established B cell-specific FcRIIB-deficient CD19Cre.Yaa and myeloid cell-specific FcRIIB-deficient C/EBP^βCre.Yaa mice. In CD19Cre.Yaa mice, FcRIIB-deficient B cells were spontaneously activated in both inside and outside of germinal centers (GCs). In contrast, in C/EBP^βCre.Yaa mice, activated B cells were located typically in GCs but not outside GCs. RNA sequencing analysis revealed that B cell activation in C/EBP^βCre.Yaa mice was due to the increased production of B cell-stimulating cytokines by activated Gr-1⁺ monocytes, because FcRIIB-deficient monocytes were activated and differentiated from Gr-1⁺ into Gr-1⁺ phenotype subset, the latter showed high potential to produce B cell-stimulating cytokines.

研究分野：免疫学、病理学

キーワード：FcRIIB Yaa 自己抗体 ループス腎炎 細胞特異的遺伝子欠損 単球 RNA sequencing

1. 研究開始当初の背景

(1) B6.FcγRIIB^{-/-}.Yaa マウスにおけるループス腎炎の発症

全身性エリテマトーデス(SLE)は、自己抗体産生により血中に IgG 免疫複合体が形成され、その結果、全身臓器の炎症をきたす難治性の疾患で、中でもループス腎炎は死因につながる重篤な病態である。我々は、抑制型 IgG Fc 受容体である FcγRIIB の発現を欠損した C57BL/6 (B6).Yaa マウスに、高力価の自己抗体産生を伴う重篤なループス腎炎が発症することを見出した。B6.Yaa マウスにも B6.FcγRIIB^{-/-} マウスにも病態は発症しないので、B6.FcγRIIB^{-/-}.Yaa マウスのループス腎炎発症は、FcγRIIB 発現欠損と TLR7 の重複を伴う自己免疫促進遺伝子 Yaa の相加効果によると考えられる。

(2) 細胞特異的 FcγRIIB 発現欠損 Yaa マウス系の樹立

FcγRIIB は代表的な B 細胞活性化抑制分子であるが、B 細胞のみでなく、様々な免疫細胞にも発現し、その機能を負に制御している。従って、どの免疫細胞上での FcγRIIB 発現欠損が、ループス腎炎の発症にどのように関わっているかは不明である。この点を解明するために、細胞特異的に FcγRIIB 発現を欠損する B6.Yaa マウス系を樹立して、各々の細胞上での FcγRIIB 分子の自己抗体産生およびループス腎炎発症に及ぼす影響の解析を試みた。予備実験の結果では、B 細胞特異的に FcγRIIB 発現を欠損するマウス系(CD19^{Cre}.Yaa)では予想通り、自己抗体産生を伴うループス腎炎の発症が認められたが、myeloid 系細胞特異的に FcγRIIB 発現を欠損するマウス系(C/EBPα^{Cre}.Yaa)でも、B 細胞上に FcγRIIB が発現しているにも関わらず、CD19^{Cre}.Yaa マウスと同程度の自己抗体産生とループス腎炎の発症が認められた。一方、樹状細胞特異的に FcγRIIB 発現を欠損するマウス系(CD11c^{Cre}.Yaa)では自己抗体産生もループス腎炎発症も認められなかった。

(3) リンパ濾胞胚中心と濾胞外領域

興味深いことに、CD19^{Cre}.Yaa マウスではリンパ濾胞胚中心 germinal center (GC)のみでなく濾胞外領域にも活性化 B 細胞の存在が認められたのに対して、C/EBPα^{Cre}.Yaa マウスでは、GC 内にも活性化 B 細胞が認められる傾向にあった。これらの所見から、B 細胞上の FcγRIIB 分子と myeloid 系細胞上の FcγRIIB 分子は各々異なる機序で B 細胞活性化の抑制に寄与していることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 細胞特異的 FcγRIIB 欠損 Yaa マウスの病態を比較し、各細胞における FcγRIIB 欠損の自己抗体産生およびループス腎炎発症に対する役割を明らかにする。

(2) 細胞特異的 FcγRIIB 欠損 Yaa マウスにおける T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球などの免疫細胞の変化を解析して、各細胞における FcγRIIB 欠損の、これら免疫細胞に対する効果を明らかにする。

(3) C/EBPα^{Cre}.Yaa マウスにおける B 細胞活性化の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞特異的 FcγRIIB 欠損 Yaa マウス系の作成

CD19, C/EBPα および CD11c 遺伝子プロモーター領域に Cre を導入した B6 マウスと、B6 マウス由来 ES 細胞を用いて作成した FcγRIIB^{lox/lox} マウスを交配して、各々 B 細胞、myeloid 系細胞、樹状細胞特異的 FcγRIIB 欠損マウス系を作成した。さらにこれらを B6.Yaa と交配して Yaa 変異遺伝子を導入した。各々のマウス系を仮に CD19^{Cre}.Yaa, C/EBPα^{Cre}.Yaa および CD11c^{Cre}.Yaa マウスと命名した。

(2) 血中自己抗体価の測定

抗二重鎖 DNA(dsDNA)抗体価、抗 RNP 抗体価は ELISA 法で測定した。

(3) 蛋白尿の測定

尿中アルブミン/クレアチニン比(ACR)を、シーメンスの DCA vantage を用いて測定した。

(4) 腎臓および脾臓の組織学的解析

腎臓のホルマリン固定切片を PAS 染色し、糸球体の細胞増殖の程度に応じて、病態の程度を 0 から 4 までスコア化し、各マウス群で比較解析した。脾臓の凍結切片は B220/CD4&8/PNA の組み合わせで蛍光染色を行い、PNA 陽性活性化 B 細胞の存在部位を解析した。

(5) 脾臓細胞および末梢血白血球の変化の解析

脾臓細胞、末梢血白血球を蛍光標識した各種の抗体で染色し、flow cytometer を用いて解析した。

(6) 末梢 Gr-1⁺および Gr-1⁻単球の遺伝子発現の比較解析

末梢の Gr-1⁺および Gr-1⁻単球を flow cytometer を用いて分離し、各細胞群から RNA を抽出し、RNA sequencing 解析にて、両細胞群の遺伝子転写レベルを比較解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞特異的 FcγRIIB 欠損 Yaa マウスの病態比較

各マウスの 8 ヶ月齢における血中自己抗体価を図 1 に比較して示した。CD19^{Cre}.Yaa および C/EBPα^{Cre}.Yaa マウスは、いずれの抗体価も CD11c^{Cre}.Yaa マウスおよび FcγRIIB

を欠損しない $Fc\gamma RIIB^{flx/flx}$, *Yaa* マウスと比較して有意に高かった。抗 dsDNA 抗体価に関しては、 $CD19^{Cre}$, *Yaa* マウスで $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスと比較して高い傾向が見られたが、統計学的有意差は認められなかった。

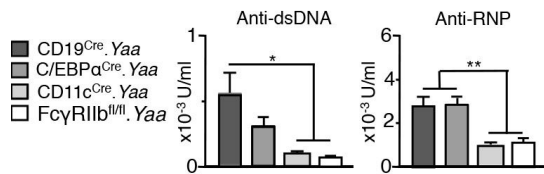


図1 8ヶ月齢における血中自己抗体価の比較。各マウス系の平均値と標準誤差および統計学的有意差を示した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

次に、12ヶ月齢におけるループス腎炎の程度を比較した。尿蛋白量を ACR で図2Aに、また炎症に伴う糸球体の細胞増殖の程度を図2Bにスコア化して示した。 $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスでは $CD19^{Cre}$, *Yaa* マウスと比較して程度は低い、明らかに腎炎の発症が認められた。一方、 $CD11c^{Cre}$, *Yaa* マウスでは蛋白尿の出現、ループス腎炎の発症は認められなかった。

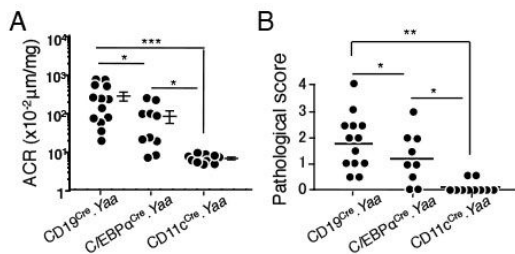


図2 12ヶ月齢における尿中ACR値(A)および腎炎スコア(B)の比較。Aでは各マウス系の平均値と標準誤差を、Bでは平均値を、統計学的有意差とともに示した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

(2) 細胞特異的 $Fc\gamma RIIB$ 欠損 *Yaa* マウスにおける脾臓免疫細胞の変化の解析

12ヶ月齢マウスの脾臓細胞分画を flow cytometer で解析した。その結果、ループス腎炎を発症する $CD19^{Cre}$, *Yaa* および $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスでは、発症しない $CD11c^{Cre}$, *Yaa* マウスと比較して、B細胞、T細胞の活性化および樹状細胞、マクロファージの比率の増加が認められた。

次に、活性化B細胞の存在部位を、脾臓の凍結切片を用いて解析した。B細胞マーカーB220、T細胞マーカーCD4/CD8および活性化B細胞のマーカーPNAで染色した結果、図3Aに示すように、 $CD19^{Cre}$, *Yaa* マウスでは赤色に染色されるPNA陽性活性化B細胞がB細胞領域のリンパ濾胞GC内のみでなく濾胞外領域にも認められたのに対して、 $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスでは、PNA陽性細胞がGC内にのみ存在することが明らかとなった。 $CD11c^{Cre}$, *Yaa* マウスでは、PNA陽性細胞はほとんど認められなかった。

Flow cytometer 解析の結果、 $CD11c^{Cre}$, *Yaa* マウスではPNA陽性活性化B細胞比率

および形質細胞比率は極めて低かった。これに対して、 $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスではB細胞上に $Fc\gamma RIIB$ が発現しているにもかかわらず、B細胞上に $Fc\gamma RIIB$ が発現していない $CD19^{Cre}$, *Yaa* マウスと比較して、PNA陽性活性化B細胞比率はむしろ高い傾向が見られた。また、抗体産生形質細胞への分化が $CD19^{Cre}$, *Yaa* マウスと同様に亢進していることが示された(図3B)。そこで、 $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスでB細胞が活性化する機序の解明を次の研究目的とした。

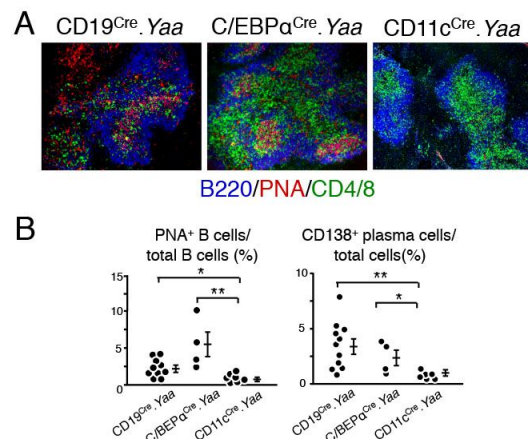


図3 12ヶ月齢マウスの脾臓の免疫組織学的解析(A)とflow cytometerによるPNA陽性活性化B細胞および形質細胞比率(B)の比較。Bでは各マウス系の平均値と標準誤差を、統計学的有意差とともに示した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

(3) 細胞特異的 $Fc\gamma RIIB$ 欠損 *Yaa* マウスにおける末梢白血球の変化の解析

8ヶ月齢における末梢白血球分画を flow cytometer で解析した。その結果、図4に示すように、ループス腎炎を発症する $CD19^{Cre}$, *Yaa* および $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスでは、発症しない $CD11c^{Cre}$, *Yaa* マウスと比較して、単球比率が有意に高かった。また、興味深いことに、 $CD19^{Cre}$, *Yaa* マウスでは $Gr-1^{+}$ 単球比率が高いのに対して、 $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスでは $Gr-1^{+}$ 単球比率が高いことが判明した。 $Gr-1^{+}$ 単球は $Gr-1^{+}$ 単球へと分化成熟することが知られている。 $C/EBP\alpha^{Cre}$, *Yaa* マウスで見られる現象は、単球上に $Fc\gamma RIIB$ が発現していないため、単球の分化成熟が亢進するためと考えられる。

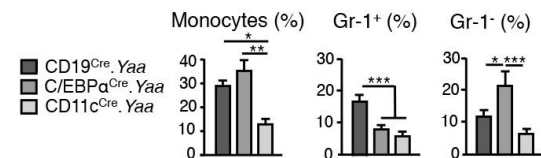


図4 8ヶ月齢における末梢血単球比率の比較。各マウス系の平均値と標準誤差を、統計学的有意差とともに示した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

(4) 末梢 $Gr-1^{+}$ および $Gr-1^{+}$ 単球の遺伝子発現の比較解析

我々は、従来からループス腎炎発症マウスにおいて、自己抗体価の上昇や腎炎発症に相

関して、末梢血での単球、ことに Gr-1 単球比率が増加することを見出している。この点を踏まえ、上記の解析結果を考察すると、C/EBP α ^{Cre}.Yaa マウスにおける B 細胞活性化の原因が、Gr-1 単球比率の増加に起因する可能性が示唆される。そこで、この点を明らかにする目的で、C/EBP α ^{Cre}.Yaa マウスの末梢 Gr-1⁺および Gr-1⁻単球を flow cytometer にて分離し、各々の細胞群から RNA を抽出して RNA sequencing 解析により、13322 個の遺伝子について転写発現レベルの比較解析を行った。その結果、図 5 に示すように、Gr-1⁻単球は Gr-1⁺単球に比較して、B 細胞活性化に働くサイトカイン IL-10、B cell stimulating factor 3 (BSF-3) および IL-10 の発現が極めて高く、また、アポトーシス抵抗性を示す Bcl2 および Bcl6 発現レベルの高いことが判明した。さらに、樹状細胞マーカーである CD11c、CD83 および Adamdec1 の発現レベルも高く、Gr-1⁻単球は Gr-1⁺単球に比較して、アポトーシス抵抗性でかつ樹状細胞への分化能が高いことが示された。

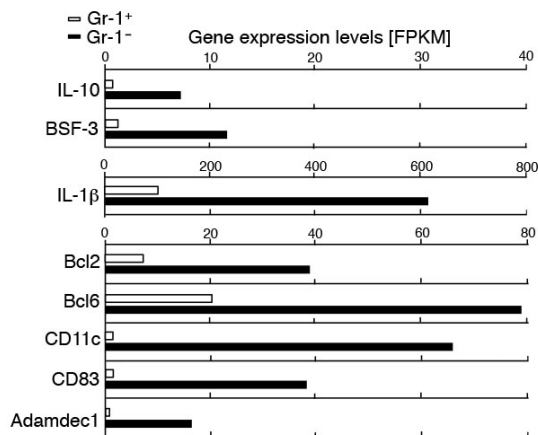


図 5 8 ヶ月齢 C/EBP α ^{Cre}.Yaa マウスの末梢血の Gr-1⁺および Gr-1⁻単球を分離し、各々の遺伝子転写レベルを比較した。

以上の結果から、CD19^{Cre}.Yaa マウスでは B 細胞上の Fc γ RIIB 発現欠損により、GC 内のみでなく、濾胞外領域においても B 細胞の自発活性化が起こり自己抗体産生をきたすのに対して、C/EBP α ^{Cre}.Yaa マウスでは、単球上の Fc γ RIIB 発現欠損により Gr-1 分化型単球比率が増加し、そのため、B 細胞活性化サイトカイン産生の増加と樹状細胞への分化亢進により GC 内での B 細胞活性化および自己抗体産生が生じると考えられた。ループス腎炎の程度は、C/EBP α ^{Cre}.Yaa マウスに比較して CD19^{Cre}.Yaa マウスでより高度であったが、その差は濾胞外領域でより病的な自己抗体が産生されるためと考えられた。細胞特異的 Fc γ RIIB 発現欠損マウス系の樹立による本解析から、ヒト SLE の治療ターゲット細胞として、B 細胞に加えて、単球の役割を考慮する必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Lin Q, Ohtsuji M, Amano H, Tsurui H, Tada N, Sato R, Fukuyama H, Nishimura H, Verbeek JS, and Hirose S. A novel pathway of peripheral B cell tolerance breakdown induced by inhibitory IgG Fc receptor IIB-deficient monocytes. *J. Immunol.* 査読有 2018 in press.

Fransen MF, Benonisson H, van Maren WW, Sow HS, Breukel C, Linsen MM, Claassens JWC, Brouwers C, van der Kaa J, Camps M, Kleinovink JW, Vonk KK, van Heiningen S, Klar N, van Beek L, Van Harmelen V, Daxinger L, Nandakumar KS, Holmdar R, Coward C, Lin Q, Hirose S, Salvatori D, van Hall T, van Kooten C, Mastroeni P, Ossendrop F, and Verbeek JS. A restricted role for Fc γ R in the regulation of adaptive immunity. *J. Immunol.* 査読有 200: 2615-2626, 2018. (doi: 10.4049/jimmunol.1700429)

Ohtsuji M, Lin Q, Okazaki H, Takahashi K, Amano H, Yagita H, Nishimura H, and Hirose S. Anti-CD11b antibody treatment suppresses the osteoclast generation, inflammatory cell infiltration, and autoantibody production in arthritis-prone Fc γ RIIB-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* 査読有 20:25, 2018 (doi: 10.1186/s13075-018-1523-1)

Ohtsuji M, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Okazaki H, Tsurui H, Amano H, Shirai T, Nishimoto N, Nishimura H, and Hirose S. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel Fc γ RIIB-deficient rheumatoid arthritis mouse model. *Mod. Rheumatol.* 査読有 25:270-277, 2015 (doi:10.3109/14397595.2014.950035)

〔学会発表〕(計 24 件)

Sachiko Hirose, et al. Independent effect of inhibitory IgG Fc receptor IIB on B cells and monocytes on Yaa-induced murine lupus. 第 46 回 日本免疫学会総会・学術集会 2017 年 12 月 12 日-14 日 仙台、仙台国際センター

Hiroyuki Nishimura, et al. Epistatic interaction between *Fcgr2b* and *Slam* family genes in susceptibility to defective foreign protein-induced tolerance. 第 46 回 日本免疫学会総会・学術集会 2017 年 12 月 12 日-14 日 仙台、仙台国際センター

Mareki Ohtsui, et al. Inhibitory effect of the blocking of monocyte recruitment from the blood on spontaneously occurring arthritis in arthritis-prone Fc γ RIIB-deficient mice. 第 46 回 日本免疫学会総会・学術集会 2017

年 12 月 12 日-14 日 仙台、仙台国際センター

Sachiko Hirose, et al. Role of inhibitory IgG Fc receptor IIB on B cells and monocytes in *Yaa*-related murine lupus. 2017 UELAR ヨーロッパリウマチ学会 2017 年 6 月 14 日-17 日 マドリッド

Hirofumi Amano, et al. Lupus-prone SLAM haplotype exerts monocytois and develops specific phenotype of autoimmune disease introduced by *Yaa* mutation. 2017 UELAR ヨーロッパリウマチ学会 2017 年 6 月 14 日-17 日 マドリッド

天野浩文、他 *Slam* 遺伝子異常マウスにおける末梢血中の単球増加と *Yaa* 遺伝子変異による自己免疫疾患の病態変化 第 61 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 4 月 20 日-22 日 福岡、福岡国際会議場

広瀬幸子、他 ループス腎炎の発症における IgG Fc receptor IIB 欠損の役割に関する細胞レベルの解析 第 61 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 4 月 20 日-22 日 福岡、福岡国際会議場

大辻希樹、他 抗 CD11b 抗体投与による FcγRIIB 欠損マウスに自然発症する関節炎の抑制効果 第 61 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 4 月 20 日-22 日 福岡、福岡国際会議場

Qingshun Lin, et al. Inhibitory IgG Fc receptor IIB on B cells and monocytes independently controls *Yaa*-induced murine lupus. 第 45 回 日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5 日-7 日 宜野湾市、沖縄コンベンションセンター

Mareki Ohtsuji, et al. Blocking of CD11b⁺ cell-migration ameliorates rheumatoid arthritis-like disease spontaneously occurring in a unique FcγRIIB-deficient mouse model. 第 45 回 日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5 日-7 日 宜野湾市、沖縄コンベンションセンター

Hiroyuki Nishimura, et al. Epistatic interaction between *Fcgr2b* and *Slam* family genes in susceptibility to defective foreign protein-induced tolerance. 第 45 回 日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月 5 日-7 日 宜野湾市、沖縄コンベンションセンター

Sachiko Hirose, et al. Mechanism for cell type-specific contribution of inhibitory IgG Fc receptor IIB in *Yaa*-induced murine lupus. 10th International Congress on Autoimmunity April 6th-10th, 2016, Leipzig, Germany

Keiko Nishikawa, et al. Role of inhibitory FcγRIIB and autoimmune-prone SLAM haplotype in autoimmune disease. 第 44 回 日本免疫学会総会・学術集会 2015 年 11 月 18 日-20 日 札幌、札幌コンベンション

センター

Qingshun Lin, et al. Cell type-specific inhibitory IgG Fc receptor IIB in *Yaa*-induced murine lupus. 第 44 回 日本免疫学会総会・学術集会 2015 年 11 月 18 日-20 日 札幌、札幌コンベンションセンター

Keiko Nishikawa, et al. Dichotomy in FcγRIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype reveals the role of SLAM haplotype in monocytois and the significant effect of FcγRIIB deficiency in *Yaa*-related lupus nephritis. Annual European Congress of Rheumatology Rome Italy, 10-13 June, 2015

Shinya Kawano, et al. Mechanism of phenotype conversion from rheumatoid arthritis to lupus in FcγRIIB-deficient C57BL/6.*Yaa* mice. Annual European Congress of Rheumatology Rome Italy, 10-13 June, 2015

林 青順、他 細胞特異的 FcγRIIB 発現欠損マウス系の樹立による *Yaa* 誘導ループス腎炎発症機序の解明 第 59 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2015 年 4 月 23 日-25 日 名古屋、名古屋国際会議場

大辻希樹、他 関節炎自然発症 FcγRIIB 欠損マウスにおける抗 IL-6R 抗体の予防および治療効果の解析 第 59 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2015 年 4 月 23 日-25 日 名古屋、名古屋国際会議場

西川桂子、他 SLE 発症に対する FcγRIIB 欠損、*Slam* 多型および *Yaa* 遺伝子の影響 第 59 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2015 年 4 月 23 日-25 日 名古屋、名古屋国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

広瀬幸子 SLE の発症機序 最新医学社別冊 診療と治療の ABC 最新医学 118, p44-52, 2016,

広瀬幸子 全身性エリテマトーデスにおける動物モデルの作製と解析手法 動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法 技術情報協会、211-222, 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 幸子(HIROSE, Sachiko)
桐蔭横浜大学・医用工学部・客員研究員
研究者番号：00127127

(2) 連携研究者

天野 浩文 (AMANO, Hirofumi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50318474

西村 裕之 (NISHIMURA, Hiroyuki)
桐蔭横浜大学・医用工学部・教授
研究者番号：60189313