

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09891

研究課題名(和文)自己免疫病の新規原因遺伝子ホスホリパーゼD4の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of phospholipase D4 for autoimmune diseases

研究代表者

秋月 修治 (Shuji, Akizuki)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：50626637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼD4は関節リウマチ(RA)の疾患感受性遺伝子の一つであるが、詳細な機能は未知である。申請者はPLD4欠損型変異マウスがBリンパ球数の異常や胚中心の過形成を来し、高ガンマグロブリン血症、抗DNA抗体等の自己抗体、糸球体腎炎など、ヒト全身性エリテマトーデス(SLE)に類似する免疫異常を呈することを見出した。また、ヒトSLEの全ゲノム関連解析の結果、RAと同一のPLD4遺伝子多型を高頻度に有することを示した。これらの結果より、PLD4が(1)免疫システムの中でB細胞の恒常性、免疫寛容の維持に重要な働きを持ち、(2)生物種を超え普遍的に全身性自己免疫病に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は多因子疾患である膠原病の発病原因となる遺伝要因を全ゲノム関連解析で特定し、特に機能未知な遺伝子に着目し解析することで新規の病態理解の手掛かりを探索した。本研究の結果、ホスホリパーゼD4がB細胞免疫の免疫寛容に関わることが明らかとなり、将来の治療標的の可能性も含め、臨床応用への基盤構築が達成されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase D4 is one of the disease susceptibility genes of rheumatoid arthritis (RA), but its detailed function is unknown. Applicants have shown that PLD4 deficient mutant mice develop B lymphocyte count abnormalities and germinal center hyperplasia, hypergammaglobulinemia, autoantibodies such as anti-DNA antibodies, glomerulonephritis. In addition, whole genome association analysis of SLE showed that it has a high frequency of PLD4 gene polymorphisms identical to RA. These results indicate that PLD4 plays an important role in maintaining B cell homeostasis and immune tolerance in the immune system, and is universally involved in systemic autoimmune diseases beyond biological species.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：ホスホリパーゼD4 関節リウマチ 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE) に代表される膠原病は、免疫システムの異常により多臓器障害を来す全身性自己免疫病である。近年の分子標的薬の発展は疾患予後を劇的に改善したが、既存治療は発症後の患者検体を用いた観察研究を基礎とするため、根治的ではない。

膠原病は複数の遺伝的要因、環境要因を背景とした複雑な多因子疾患と推定され、長らく原因の同定が困難であった。申請者の所属する研究室、協同研究者は全ゲノム関連解析 (GWAS) により、RA、SLE、全身性強皮症 (SSc)、高安動脈炎など多種の膠原病で新規の遺伝因子 (疾患感受性遺伝子) を同定した。これらの遺伝因子には機能既知と機能未知が含まれる。申請者は膠原病のあらたな病態理解の探索を目的に、RA の疾患感受性遺伝子で機能未知のホスホリパーゼ D4 (PLD4) に着目した。

PLD4 は、HKD 配列 (His-x-Lys-x-x-x-Asp) を共有するホスホリパーゼ D ファミリーに分類される。申請者が実施したヒト細胞を用いた予備実験、および既存の遺伝子発現・タンパク質発現データベースの参照により、PLD4 が免疫細胞、特にマクロファージ、樹状細胞、B 細胞に偏在して発現することから、特定の免疫機能を有する可能性が推測された。また、共同研究者による遺伝的解析により、RA のみならず SSc の発病に関連することが判明し、PLD4 が広くヒト自己免疫疾患の発病に関与する可能性が示された。

しかしながら、その機能については、脳内ミクログリアで貪食機能との関与が報告されるにとどまり、生化学的な性質や自己免疫疾患における詳細な役割は未知である。

2. 研究の目的

本研究では PLD4 の生体内での免疫系における機能、および、関節リウマチ、全身性強皮症を含む膠原病の病態形成における役割を明らかとし、将来における診断、治療応用への基盤確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) PLD4 変異マウスの解析

PLD4 は既知のホスホリパーゼ D 活性を有さず、生化学的活性を含め機能の詳細は未知である。本研究では *PLD4* と自己免疫疾患関連を精査するため、生体内における PLD4 の免疫学的役割について検討を行うため、Jackson Laboratory が過去に報告した *Pld4* 変異マウスの解析を行った。

同変異マウスは Balb/cJ マウスコロニーに自然発生した小体・薄毛の形質を示す変異体であり、後の遺伝解析により、*Pld4* 遺伝子に単一ヌクレオチド変異をもたらし、503 アミノ酸タンパク質の残基 46 番目の相当部に停止コドンを導入する。

本研究では同 *Pld4* 欠損型変異ホモ接合マウス、ヘテロ接合マウスを用い、脾臓・リンパ節の免疫担当細胞の数的解析を、フローサイトメトリーを用いて行った。また、脾臓、腎臓等を含む諸臓器の微視的構造を H&E 染色、免疫染色により組織学的な対比を行った。液性免疫の解析として、末梢血中の免疫グロブリン濃度、抗核抗体、抗 DNA 抗体の測定を行った。

(2) SLE 患者の GWAS 解析

PLD4 は RA、SSc の疾患感受性遺伝子である。更に他の膠原病でも発病要因であるか検討を行うため、SLE 患者 474 人と健常対象 2162 人を対象に全ゲノム関連解析 (GWAS) を行い、既報の研究 (SLE 患者: 889 人、健常者: 3374 人) と組み合わせてメタ解析を実施した。

4. 研究成果

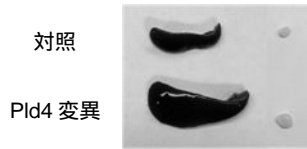
(1) 遺伝子改変マウスを用いた PLD4 の免疫学的機能

Pld4 欠損型変異マウスは Balb/cJ 系統の自然発生変異体であり、PLD4 の 46 番目のアミノ酸相当部の塩基配列が停止コドンに置換されており、ホモ接合体マウスで体毛の減少と体格の小型化が報告されている。申請者の解析により、ホモ接合体は成体で脾腫、リンパ節腫大腫大を示し (図 1)、組織学的に胚中心の過形成を示した。フローサイトメトリー解析では、変異マウスで、活性型 T 細胞、濾胞性/辺縁帯 B 細胞、マクロファージ、形質細胞様樹状細胞、及び、胚中心 B 細胞、濾胞性ヘルパー T 細胞の増加を認めた。また、ホモ接合体では幼体より血清 BAFF が高値を示し、成体になるに従い B 細胞の急速な数量的増加を示した。

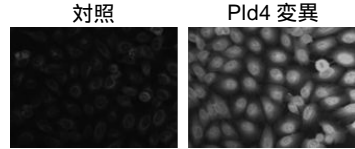
更に、ホモ変異マウスは高ガンマグロブリン血症、抗核抗体 (図 2)、抗 dsDNA 抗体を有し、一部の個体で肝内門脈域に炎症細胞浸潤を認める他、ヒト SLE の糸球体腎炎に類似した腎糸球体の免疫複合体沈着 (図 3) 及び I 型インターフェロン関連遺伝子の高発現を認めた。

以上の結果より、*Pld4* 変異マウスは B 細胞系譜の免疫細胞を中心に、数量的・質的恒常性の異常を有し、かつヒト SLE に類似した液性免疫系の寛容破綻の存在が示唆された。

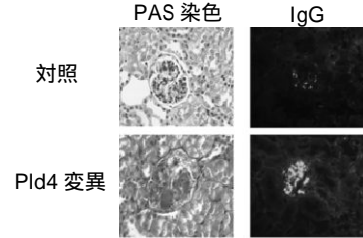
(図 1) 脾腫・リンパ節腫大



(図 2) 抗核抗体の産生



(図 3) 腎の免疫複合体沈着

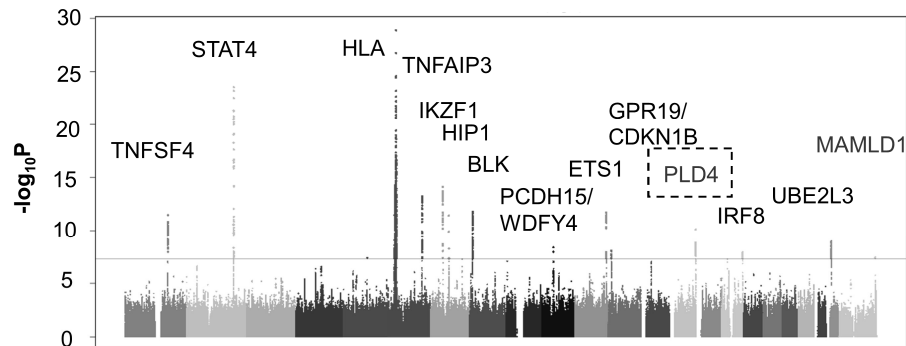


(2) SLE を対象とした全ゲノム関連解析 (GWAS)

GWAS メタ解析の結果、SLE 患者と遺伝統計学的に有意な相関を示す一塩基多型は、HLA 領域で最も強いシグナル (rs796780915、 $p = 1.3 \times 10^{-29}$) を示した。また、GWAS 有意水準を満たす 14 の非 HLA 遺伝子座が本研究により同定された (図 4)。

その中で、第 14 番染色体の *AHNAK2/PLD4* (rs2582511、 $p = 7.9 \times 10^{-11}$)、X 染色体の *MAMLD1* (rs143181706、 $p = 3.7 \times 10^{-8}$) は過去に報告がない新規の SLE 疾患感受性遺伝子座であった (図 4)。また、GWAS 有意水準に至らないものの、示唆的関連性 ($p \leq 1.0 \times 10^{-6}$) を示す 2 遺伝子座 (*BMP2K*、*PTGER4*) が同定された。また、臨床情報と対比の結果、rs2582511 のリスク対立遺伝子座は抗 dsDNA 抗体の陽性率と相関 ($p = 0.0073$) を示した。

(図 4) SLE の全ゲノム関連解析のマンハントンプロット



本研究の結果より、PLD4 が (1) 免疫システムにおいて特に液性免疫で重要な働きをもつ B 細胞の生体内恒常性維持や自己免疫寛容の形成に重要な働きを持ち、(2) 生物種を超え普遍的に複数の全身性自己免疫病に関与することが示された。

他方で、本研究で用いた変異体の *Pld4* の早期終止コドンが、PLD4 タンパクの欠損か、切断型 PLD4 を発現するかは未確認である。我々は、切断型 *Pld4* タンパク質または正常な *Pld4* 自体の欠如が、免疫機能不全をもたらした過程に関して詳細なメカニズムを同定することには至っていない。さらに、同変異マウスは全身の遺伝子変異を抱えているため、本研究では遺伝子変異が免疫系に直接影響を与えるのか、あるいは変異型非造血細胞の間接的な結果であるか、明らかにされていない。骨髄内の B 細胞前駆体ではなく末梢 B 細胞の亜集団が変異マウスで変化したことを考慮すると、上記の制限にもかかわらず、*Pld4* は末梢成熟または B 細胞の生存に影響を与える点が示唆される。現在、我々は *Pld4* の発現異常が免疫担当細胞の異常に起因することを確認する目的に、細胞系統特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析を継続している。これらのアプローチにより、表現型へ寄与する細胞集団を明らかとする。

加えて、PLD4 の生化学的な機能、触媒経路の精査、ヒト患者検体を用いた PLD4 の解析を通じ、新規の治療標的を含めた臨床応用への発展に期待がもたれる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

PLD4 is a genetic determinant to systemic lupus erythematosus and involved in murine autoimmune phenotypes.

Annals of the Rheumatic Diseases 2019 Apr;78(4):509-518.

Akizuki S, Ishigaki K, Kochi Y, Law SM, Matsuo K, Ohmura K, Suzuki A, Nakayama M, Iizuka Y, Koseki H, Ohara O, Hirata J, Kamatani Y, Matsuda F, Sumida T, Yamamoto K, Okada Y, Mimori T, Terao C

〔学会発表〕(計 1件)

「Genetic mutation of phospholipase D4 disturbs the homeostasis and immunological tolerance of B cells in mice.」

平成28年 The 13th International Workshop of Autoantibodies and Autoimmunity.

Akizuki S, Terao C, Omura K, Okabe N, Matsuo T, Murakami K, Sasai N, Hashimoto M, Imura Y, Yoshifuji H, Tanaka M, Mimori T.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 寺尾 知可史

ローマ字氏名: TERAO Chikashi

所属研究機関名: 理化学研究所 生命医科学研究センター

部局名: 統計解析研究チーム

職名: チームリーダー

研究者番号(8桁): 60610459

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。