

令和元年6月22日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09907

研究課題名(和文) Fc RIIB欠損マウスを用いたRAとSLEの疾患特異性におけるIL-10の役割

研究課題名(英文) Role of IL-10 on phenotypical change from RA to SLE using FcgRIIB-deficient mice

研究代表者

天野 浩文 (Amano, Hirofumi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50318474

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)：関節リウマチ(RA)を発症するFc レセプターIIIB(Fc RIIB)欠損(B6.Fc RIIB-/-)マウスに、Toll様受容体7(TLR7)の重複であるYaa遺伝子を導入し、SLEの病態を発症するFc RIIB-/-Yaaマウスを作製し、さらにIL-10欠損マウスと交配させることにより、IL-10欠損Fc RIIB-/-Yaaマウスを作製した。これらのマウスは生後まもなく死亡する結果となった。Fc RIIB-/-Yaaマウスに対し、抗IL-10抗体投与を行った結果、蛋白尿減少効果は認めず、死亡率減少効果も認めなかった。このSLE疾患モデルにおいてはIL-10抑制の治療効果は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性エリテマトーデス(SLE)は原因不明の全身性自己免疫疾患であり、多彩な免疫異常がその発症に関与する。関節リウマチ(RA)も類似する自己免疫疾患であり、その両疾患の遺伝的背景因子は重複するものの、自然経過や障害される臓器は大きく異なる。われわれは、その自己免疫疾患を代表する2つの疾患モデルマウスを用いてその原因となる鍵としてIL-10に注目した。SLEを自然発症するFc RIIB欠損Yaaマウスを用いて、IL-10を遺伝的に欠くマウスの作製に着手した。このマウスは早期に死亡する結果であったため、抗IL-10抗体投与による治療効果について検討したが、明らかな治療効果を示すことはなかった。

研究成果の概要(英文)：By introducing TLR7 duplicated Yaa gene into Rheumatoid Arthritis (RA)-developing Fc receptorIIIB(Fc RIIB)deficient (B6.Fc RIIB-/-)mice, we produced lupus model(Fc RIIB-/-Yaa) mice. From the experimental results, we confirmed the importance of IL-10 in the phenotypical change of the model. We crossed Fc RIIB-/-Yaa mice with IL-10 deficient mice and tried to develop IL-10-deficient Fc RIIB-/-Yaa mice. Since these mice died early, next we used IL-10 blocking antibody. The intra-peritoneal injection of IL-10 blocking antibody did not show any therapeutic effect on Fc RIIB-/-Yaa mice concerning proteinuria and survival rate. We did not confirm the therapeutic effect the anti-IL-10 antibody on this lupus model.

研究分野：膠原病リウマチ性疾患

キーワード：SLE モデルマウス IL-10 Fcレセプター RA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE: systemic lupus erythematosus)は、自己の DNA あるいは RNA に対する自己抗体の産生と免疫複合体形成によって引き起こされる糸球体腎炎の発症が疾患の大きな特徴である。一方関節リウマチ(RA:rheumatoid arthritis)は、リウマトイド因子(RF)や抗 CCP 抗体の出現と関節滑膜の増殖に続く関節破壊を特徴とする。どちらも自己抗体の産生はあるものの、臨床病態は大きく異なっている。

近年解析が進んだヒトゲノムワイド関連解析結果では、この2つの疾患に共通の遺伝子異常が見出されつつあり注目を浴びている。中でも IgG 型免疫グロブリンの Fc 部分を認識する受容体である Fc 受容体に関連した遺伝子群は、SLE と RA に共通した疾患感受性遺伝子として知られている。ほとんどの Fc 受容体は、免疫応答を活性化させる方向に働くが、Fc RIIB は、唯一抑制性のシグナルを伝える Fc 受容体である。この Fc RIIB を野生型マウスである C57BL/6(B6)マウスで欠損した B6.Fc RIIB<sup>-/-</sup>マウスでは、SLE に類似した腎炎を発症すると報告されている(Ravetch ら Immunity2000)。しかし、彼らが Fc RIIB を遺伝子欠損する際に用いた ES 細胞は、自己免疫に感受性をもつ 129 ストレインマウス由来であることから、Fc RIIB 遺伝子近傍に存在する 129 由来の SLE 感受性遺伝子、SLAM を含んだ他の遺伝子異常が Fc RIIB 遺伝子の欠損とともに存在することで SLE を発症したと考えられる。

連携研究者である広瀬らは 129 型の ES 細胞を用いて 2 種類の B6.Fc RIIB<sup>-/-</sup>マウスを作製した。一つは前述の SLAM を含んだ領域が 129 型であるマウス(KO1)で、もう一つは SLAM の部分を B6 型としたマウス(KO2)である。これら 2 つの Fc RIIB<sup>-/-</sup>マウスでは、どちらも SLE の病態を発症することはない。KO1 マウスでは関節破壊と変形を伴う関節炎を発症した。さらにこのマウスの血清中ではリウマトイド因子(RF)や II 型コラーゲン抗体(CII)、抗 CCP 抗体の出現を認め、RA の自然発症を認めた(Sato-Hayashizaki ら Arthritis Rheum 2011)。KO2 マウスではこのような関節炎もループスの病態も生じなかったことから、この疾患モデルにおいては、少なくとも SLE と RA の発症に第 1 染色体上にある Fc RIIB 遺伝子と SLAM ファミリーを含む領域の遺伝子が重要な鍵を握っていると考えられる。

SLE の自然発症モデルである BXSb マウスにおいて疾患を促進させる *Yaa*(Y-linked autoimmune acceleration)遺伝子は、本来 X 染色体上に存在する Toll-like receptor(TLR)7 が Y 染色体上に転座していること明らかとなった(Pisitkun ら Science 2006)。この *Yaa* 遺伝子により自己免疫応答を促進させる現象は、B6.*Yaa* マウスでは認めず、MRL や NZB などの自己免疫応答を惹起する遺伝的背景に加わることに認めることが明らかになっている(出井ら J Exp Med.1981)。

我々は RA を自然発症する KO1 マウスに *Yaa* 遺伝子を導入した KO1.*Yaa* マウスを作製し解析したところ、KO1 マウスで生じた RA の病態は呈さず、SLE に類似した糸球体腎炎を発症した(Kawano ら Eur J Immunol 2013)。同じ自己免疫疾患において RA から SLE へと特異性が変化したメカニズムを調べるために、我々は脾臓におけるサイトカインの発現を mRNA で調べた。その発現の比を KO1.*Yaa* と KO1 で調べた結果、KO1.*Yaa* マウスで IL-10 と IL-21 が有意に増加していることが判明し、特に IL-10 において顕著であった。

### 2. 研究の目的

自己免疫疾患という共通背景があるものの、その病態は大きく異なり、その両者の合併は少ない RA と SLE という 2 つの疾患において RA から SLE へと特異性が変化したメカニズムを調べるために、もともと IL-10 は過剰な免疫応答による炎症を制御する役割を果たす重要なサイトカインであることが知られていることから、このサイトカインが果たす役割をこの 2 つの疾患モデルマウスで解析することは、極めて重要であると考えた。そこで我々は、SLE 発症 KO1.*Yaa* マウスにおいて IL-10 を欠損させることにより、このマウスで生じていた SLE の病態がどのように変化するかを解析することを計画した。これにより RA および SLE の発症と疾患特異性が生じるメカニズムの一端が明らかになると考えた。

### 3. 研究の方法

KO1.*Yaa* マウスで IL-10 を欠損する KO1.*Yaa*.IL10<sup>-/-</sup>マウスを作製し、分子細胞学的に解析する。まず、RA を自然発症する KO1 マウスと B6.*Yaa* マウスを交配し、KO1.*Yaa* マウスを作製する。同様に B6.IL10<sup>-/-</sup>マウスとの交配で KO1.*Yaa*.IL10<sup>+/-</sup>マウスを作製し、さらにこれらのマウスを交配させ、KO1.*Yaa*.IL10<sup>-/-</sup>マウスを作製する。作製したそれぞれのマウスについて月齢毎の血清、尿を採取し RA と SLE、その他の病態の有無について評価する。また月齢毎の末梢血単核球サブセットをフローサイトメトリーで解析する。さらに病理解剖では各臓器の免疫病理組織学的検討を行うのと同時に免疫担当細胞のフェノタイプ、サイトカインの発現を解析する。月齢毎の血清について、RA 関連と SLE 関連、その他の自己抗体を ELISA 法で解析し、サイトカインの発現を real time PCR 法、ELISA 法、フローサイトメトリーで解析する。

#### B6.Fc RIIB<sup>-/-</sup>(KO1).*Yaa* マウスの作製・管理・維持

RA を自然発症する C57BL/6.Fc RIIB 欠損(KO1)マウスのメスと当教室で飼育管理する C57BL/6.*Yaa* マウスのオスを交配させる。KO1.*Yaa* マウス誕生の後、それらを飼育管理し関節炎の発症の有無について評価する。そのほか、定期的な採血、採尿、末梢血単核球のフロー

サイトメトリー解析、血清中の自己抗体について解析する。これらのマウスについては、既にデータは蓄積されているものの、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウスの経過を観察する上での対照として重要であり適切に管理・維持する。

#### KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスの作製・管理・維持・解析

桐蔭横浜大学広瀬幸子博士との連携研究により B6.IL-10<sup>-/-</sup>マウスと当教室の KO1. *Yaa* マウスを交配させ KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスを作製・管理・維持する。KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスと KO1.IL-10<sup>+/-</sup>マウスについては、当教室で交配を既に進めており作製されている。作製された KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスの交配により KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウスを作製する。KO1. *Yaa* マウス管理と同様に定期的管理、関節評価、採血、採尿、末梢血単核球のフローサイトメトリー解析、血清中の RA 関連、SLE 関連の自己抗体について解析する。またサイトカインプロファイルについて ELISA およびフローサイトメトリーによる解析さらに脾臓細胞における mRNA の発現を解析する。KO1. (*Yaa*) マウスとの比較を行いサイトカインプロファイルの変化と疾患特異性の変化について解析する。B6.IL-10<sup>-/-</sup>マウスについては、過去に炎症性腸疾患を起こすことが報告されており、腸管粘膜についても病理組織学的な解析を行うための標本作製する。さらに生存曲線を調べ、病理学的な評価により死因を特定する。

#### KO2. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO2. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスの作製・管理・維持・解析

KO1 マウスに存在している 129 系の SLE 感受性 SLAM 領域を野生型の B6 型に置換した。B6.Fc RIIB 欠損(KO2)マウスを用いて KO2. *Yaa* を作製する。KO2 マウスは RA の病態は呈さないものの、KO2. *Yaa* マウスは、SLE の病態を呈することが判っており、このマウスと B6.IL-10<sup>-/-</sup>マウスとの交配により KO2. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスを作製する。KO2. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスの交配により KO2. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウスを作製・管理・維持する。上記と同様に定期的管理、関節評価、採血、採尿、末梢血単核球のフローサイトメトリー解析、血清中の RA 関連、SLE 関連の自己抗体について解析する。KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウスと同様に腸管粘膜についても病理組織学的な解析を行うための標本作製する。さらに生存曲線を調べ、病理学的な評価により死因を特定する。

#### 末梢血での単球増加(Monocytosis)と単球サブセットの解析

BXSB マウスでは、加齢に伴い末梢血中の単球が増加するのが特徴で、BXSB の背景に *Yaa* 遺伝子の作用が加わることで生じる。また BXSB マウスで増加する単球は Gr1+CD11b+ と Gr1-CD11b+ 2 つの単球サブセットの内、Gr1-CD11b+サブセットが有意に増加しこのサブセットで骨髄由来樹状細胞(mDC)のマーカーである CD11c が発現していることをつきとめている(天野ら Arthritis Rheum 2005)。このことから、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスにおいてこのサブセットの変化があるかをフローサイトメトリーで解析する。

#### 脾臓におけるマージナルゾーン(MZ)B 細胞と B 細胞の成熟に関わる細胞の解析

B6. *Yaa* マウスでは、2 ヶ月齢という生後の早い段階で脾臓における MZ B 細胞の著明な減少が認められる(天野ら J Immunol 2003)。その原因として *Yaa* 遺伝子を有する B 細胞が抗原刺激に対して高反応性を示す結果として減少すると考えられる。今回特に本研究で用いる KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスについて B6. *Yaa* マウスと同様のフェノタイプを示すかを解析する。さらに B 細胞の成熟・分化の過程である Transitional B 細胞 1 (T1)、Transitional B 細胞 2 (T2)、MZ 前駆細胞、濾胞 B 細胞、形質細胞についても解析し、KO1. (*Yaa*) マウスや B6 マウス、B6. *Yaa* マウスと比較する。

#### 免疫病理組織学的解析

本研究に用いる KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスの腎臓、脾臓、関節、リンパ節、腸管粘膜について標本作製し、各臓器における病態の変化を病理組織学的に解析しさらに局所における免疫担当細胞の表面マーカーを用いて免疫組織化学的解析を行う。

#### T 細胞の活性化に関わる分子の解析

自己免疫疾患の病態におけるリンパ節内の濾胞内ヘルパーT(TFH)細胞の役割が示されており、本研究に用いる KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスにおいて、CXCR5+PD1+ICOS+ TFH 細胞の存在と細胞内のサイトカインの発現についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

#### B 細胞の活性化に関わる分子の解析

自己免疫疾患の病態形成に関わる各成熟段階の B 細胞サブセットについて活性化 B 細胞のマーカーである CD69, CD80, CD86 の発現を KO1. *Yaa*.IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. *Yaa*.IL-10<sup>+/-</sup>マウスにおいて、フローサイトメトリーを用いて解析する。In vivo における TLR の刺激遺伝的要因に加わる環境要因(自然免疫系の刺激)の影響を調べるため KO1. (*Yaa*) マウス、KO1. (*Yaa*).IL-10<sup>-/-</sup>マウス、KO1. (*Yaa*).IL-10<sup>+/-</sup>マウスに対して *Yaa* 遺伝子に含まれる TLR7 を刺激するアゴニスト(R848, R837)を投与することによる疾患特異性・病態の変化を解析する。

さらに TLR7 以外の TLR の影響を調べるために、TLR9, TLR4, TLR3 を刺激するアゴニスト(TLR9:CpG, TLR4:LPS, TLR3:Poly(I:C))を投与することによる疾患特異性・病態の変化を解析する。

#### KO1. *Yaa* マウスに対する抗 IL-10 抗体による病態・疾患特異性変化の解析

KO1. *Yaa* マウス脾臓において発現亢進を認めた IL-10 について、阻害抗体である抗 IL-10 抗体を KO1. *Yaa* マウスに対して、in vivo で投与することにより SLE の病態・自己抗体の変化が生じるかを解析する。これによって疾患特異性と病態の改善を含めた変化の有無を解析する。

#### 4. 研究成果

関節リウマチ(RA)を発症する KO1 マウスに、*Yaa* 遺伝子を導入し、SLE の病態を発症する KO1. *Yaa* マウスを作製し、さらに IL-10 欠損マウスと交配させることにより、IL-10 欠損 KO1. *Yaa* マウスを作製した。それらのマウスは胎児期もしくは、生後まもなく死亡する結果となった。KO1. *Yaa* マウスに対し、抗 IL-10 抗体投与を行った結果、蛋白尿減少効果を認めることはなく、早期に死亡に至る結果となった。原因のひとつとして、IL-10 が生体内における恒常性維持に必須であり、KO1. *Yaa* マウスの病態においては、疾患制御のためにこの免疫抑制性サイトカインの上昇がしている可能性があるとともに、病態の進展にも関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Hachiya Y, Kawasaki A, Oka S, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Suda A, Setoguchi K, Nagai T, Shimada K, Sugii S, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Ohno S, Katayama M, Kono H, Hirohata S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Nagaoka S, Tohma S, Furukawa H, Tsuchiya N. Association of HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population: A Case-Control Association Study. PLoS One. 22;11(6), 2016
- 2) Minowa K, Amano H, Ando S, Watanabe T, Ogasawara M, Kawano S, Kaneko T, Morimoto S, Yamaji K, Tamura N, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. Disease flare patterns and predictors of systemic lupus erythematosus in a monocentric cohort of 423 Japanese patients during a long-term follow-up: The JUDE study. Mod Rheumatol. 27:72-6, 2017
- 3) Ohtsuji M, Lin Q, Okazaki H, Takahashi K, Amano H, Yagita H, Nishimura H, Hirose S. Anti-CD11b antibody treatment suppresses the osteoclast generation, inflammatory cell infiltration, and autoantibody production in arthritis-prone FcγRIIB-deficient mice. Arthritis Res Ther. 20:25,2018
- 4) Lin Q, Ohtsuji M, Amano H, Tsurui H, Tada N, Sato R, Fukuyama H, Nishimura H, Verbeek JS, Hirose S. FcγRIIb on B Cells and Myeloid Cells Modulates B Cell Activation and Autoantibody Responses via Different but Synergistic Pathways in Lupus-Prone *Yaa* Mice. J Immunol. 201:3199-3210,2018

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Qingshun Lin, Hiromichi Tsurui, Hirofumi Amano, Keiko Nishikawa, Mareki Otsuji, Hiroyuki Nishimura, J.Sjef Verbeek, Sachiko Hirose. Inhibitory IgG Fc Receptor IIB on B cells and monocytes independently controls *Yaa*-induced murine lupus. 第 45 回日本免疫学会学術集会.2016.12.5-7.

2. Mareki Otsuji, Qingshun Lin, Hideki Okazaki, Shuri Ikeda, Hinako Sasaki, Hirofumi Amano, Hideo Yagita, Hiroyuki Nishimura, Sachiko Hirose. Blocking of CD11b+ cell-migration ameliorates rheumatoid arthritis-like disease spontaneously occurring in a unique FcRIIB-deficient mouse model. 第45回日本免疫学会学術集会.2016.12.5-7.
3. 天野浩文, 西川桂子, 小城敬, 林青順, 河野晋也, 山路健, 田村直人, 広瀬幸子 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. 日本リウマチ学会総会・学術集会.2017.4-20-22.
4. 天野浩文, 免疫アレルギー疾患の病態と分子標的療法ー全身性エリテマトーデス. 第47回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会・第41回皮膚脈管・膠原病研究会. シンポジウム 2017.12.9-10.
5. 天野浩文. 全身性エリテマトーデス. 第33回臨床リウマチ学会スポンサードシンポジウム 2018.11.24.

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 広瀬 幸子

ローマ字氏名： (HIROSE, Sachiko)

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。