

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18300139

研究課題名(和文)

NCマウスを用いた感染症とアレルギー疾患に共通する分子基盤の解析

研究課題名(英文)

Analysis of Common Genetic Factors for Allergy and Infectious Disease in NC Mice

研究代表者

大野 民生 (Tamio Ohno)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620

研究成果の概要(和文)：

マウスにおけるマラリア原虫の増殖性は、マウス Chr.9 の *Pymr* 領域内に存在する赤血球因子に規定されている可能性が高く、有力な候補遺伝子を特定することができた。しかし、この遺伝子は脳マラリアやマラリア腎症には間接的に関与するが、皮膚炎発症には関与しないことが判明した。一方、脳マラリア抵抗性遺伝子座 *Cmr1* と *Cmr2*、原虫排除に関与する遺伝子座 *Pymr2* については、いずれも皮膚炎発症への関与が示唆された。特に Chr.8 の *Pymr2* 領域には免疫系に重要な役割を果たす *Il12rb*, *Il127ra* 等の遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が見出され、感染症とアレルギー疾患に共通する原因遺伝子である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Proliferation of malaria parasites in the host is mainly controlled by an erythrocytic factor that maps to the *Pymr* region on mouse Chr.9. We found a convincing candidate gene, which was indirectly related to cerebral malaria and malaria nephrosis, but had no effect on dermatitis. Other genetic loci concerning cerebral malaria (*Cmr1*, *Cmr2*) and parasite exclusion (*Pymr2*) had an influence on dermatitis. A few key genes of the immune system, such as *Il12rb* and *Il127ra*, are present in the *Pymr2* region on Chr.8, and there were some nonsynonymous mutations in these genes in the NC mice. They may have function as common genetic factors in the susceptibility to allergy and infectious diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：NCマウス、マラリア原虫、脳マラリア、マラリア腎症、アトピー性皮膚炎、原因遺伝子群

## 1. 研究開始当初の背景

マウス NC 系統は日本で開発育成された系統であり、そのアトピー性皮膚炎の疾患モデルとしての評価・応用は日本国内のグループが先導的役割を担っている。最近、この NC 系統がマウス系統のなかでもマラリア原虫感染に対して特に高い感受性を示し、マウスへの実験的感染に用いられる代表的な 3 種 (*Plasmodium yoelii*, *P. berghei*, *P. chabaudi*) のマラリア感染において、以下に示すそれぞれ特異な病態を呈する事が判明した。*P. yoelii* 17XL 株の感染においては極端に高い原虫の増殖性を示し、*P. berghei* ANKA 株の感染においては、感染赤血球等が脳血管に栓塞することに起因する重篤な脳障害(脳マラリア)を呈す。更に、*P. chabaudi* AS 株の感染においては全身の浮腫を伴う重度の腎不全を呈する。*P. berghei* ANKA 株の感染マウスにおいては、C57BL/6 と CBA 系統が脳マラリアを発症することが知られているが、NC 系統より発症頻度が低い。更に、マラリア原虫感染マウスで重度の腎不全を呈するマウス系統は全く知られていない。脳マラリアや腎不全はヒトマラリアの代表的な合併症であることから、NC 系統はマラリア合併症における宿主の遺伝的要因を解析するための格好のモデルであると考えられる。以前より、マラリア原虫の宿主体内での増殖性のみならず、脳マラリア等のマラリア合併症の発症にも宿主の免疫が強く関与していることが知られている。また、アトピー性皮膚炎の発症にも免疫異常が深く関与していることが知られている。更に、これまでの解析から NC 系統の高い原虫増殖性や、皮膚炎発症については多数の遺伝子が関与していることが判明している。以上より、NC 系統のマラリア原虫の高増殖性、特徴的な合併症の発症とアトピー性皮膚炎の発症の間には、各病態独特の発症因子に加え、何らかの共通する遺伝的要因(分子基盤)が存在すると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では NC 系統をモデルとして、各病態に関与する原因遺伝子を解析することに

より、感染症とアレルギー疾患に共通して存在する遺伝的要因(分子基盤)を解析する。特に、感染症としてはマラリア原虫感染系を、アレルギー疾患としてはアトピー性皮膚炎を指標として下記の解析を行い、各病態に共通する遺伝的基盤を探索する事を目的とした。(1)マラリア原虫の増殖・排除に関与する遺伝子の解析 (2)脳マラリア発症に関与する遺伝子の解析 (3)マラリア腎症に関与する遺伝子の解析 (4)アトピー性皮膚炎発症に関与する遺伝子群の解析

## 3. 研究の方法

### (1) 原虫の増殖・排除に関与する遺伝子

#### ① *Pymr* 領域内の原虫増殖性遺伝子

マウス第9番染色体(Chr.9)のテロメア側の約 1.7Mb の *Pymr* (*Plasmodium yoelii* malaria resistance) 領域内には、*P.yoelii* 17XL 株感染初期の原虫増殖性に関与する強力な遺伝子が存在することが判明している。この領域は C3H/He や A/J 等の他の感受性(高増殖性)系統でも同様の作用を持つため、ここには感受性系統群に共通する変異があると推定し、候補となる SNP 変異をデータベースを用いてリストアップし、それらについて塩基配列を解析した。

#### ② *Pymr* 領域外の原虫の増殖・排除に関与する遺伝子座

*Pymr* 領域の作用を除外してこの領域以外の原虫の増殖や排除に関与する遺伝子座を解析するために、NC 系統に抵抗性の 129X1 系統由来の *Pymr* 領域を導入したコンジェニック系統(NC.129X1-*Pymr*)と 129X1 系統の F2 交配群に *P.yoelii* 17XL 株を感染させ、各個体の遺伝子型と感染5日後と14日後の血虫率との連鎖解析(QTL 解析)を実施した。候補遺伝子については、遺伝子発現量や塩基配列を解析した。

### (2) 脳マラリアの発症に関与する遺伝子

#### ① *Pymr* 領域の脳マラリア発症への関与

上述の NC.129X1-*Pymr* 系統に *P.berghei* ANKA 株を感染させ NC 系統と発症率等を比較した。

#### ② *Pymr* 領域外の脳マラリア感受性遺伝子座

*Pymr* 領域の作用を除外してこの領域以外の領域に存在する脳マラリア感受性遺伝子座を解析するために、NC.129X1-*Pymr* 系統と 129X1 系統の F2 交配群に *P.berghei* ANKA 株を感染させ、各個体の遺伝子型と感染後の生存日数との連鎖解析 (QTL 解析) を実施した。

(3) マラリア腎症に関与する遺伝子の解析

① 病態解析

NC 系統に *P.chabaudi* AS 株を感染させ腎組織を採取し PAS 染色と IgG と C3 での蛍光染色を行い病理所見を観察した。

② 腎症発症とマラリア抵抗性遺伝子座

これまでの解析で作製した各種コンジュニック系統 (NC.129X1-*Pymr*, NC.129X1-*Pymr*, *Pymr2*, NC.129X1-*Pymr*, *Cmr1*, NC.129X1-*Pymr*, *Cmr2*) に *P.chabaudi* AS 株を感染させ、腎病変やネフローゼ症の発症頻度を解析した。

(4) 皮膚炎発症に関与する遺伝子の解析

① Chr.9 の皮膚炎発症遺伝子

皮膚炎の自然発症には長期間の観察が必要となるため、耳介へのダニ抗原連続塗布による皮膚炎誘発法を用いて交配群による連鎖解析を行った。

② マラリア抵抗性遺伝子座と皮膚炎発症の関係

ダニ抗原の耳介投与法を用いて、これまでに作製した各種コンジュニック系統 (NC.129X1-*Pymr*, *Pymr2*, NC.129X1-*Pymr*, *Cmr1*, NC.129X1-*Pymr*, *Cmr2*) と NC 系統の皮膚炎を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 原虫の増殖・排除に関与する遺伝子

① *Pymr* 領域内の原虫増殖性遺伝子

2 種の遺伝子に感受性系統群で完全に共通するアミノ酸置換を伴う SNP 変異を見出したが、これらの遺伝子の発現組織や推定される機能から、この遺伝子が原虫の増殖性に関与するとは考えにくかった。そこで、NC 系統をはじめとする各種マウス系統の *P.yoelii* 17XL 株感染時の表現型の再評価を行い、感染初期の原虫の増殖性には免疫不全マウスと NC 系統に差がないこと、他の感受性系統も NC 系統と同様に赤血球 GTP 濃度が低い事 (抵抗性系統は赤血球 GTP 濃度が高い)、感受性系統は赤血球への分化やその機能に重要な遺伝子

群が共通して高発現している事が判明した。したがって、原虫の増殖性には免疫系ではなく赤血球因子が有力な候補遺伝子であると考えられた。そこで、*Pymr* 領域内に存在する約 50 個の遺伝子のうち、プロテオーム解析により遺伝子産物が赤血球内に存在することが判明している遺伝子や赤芽球で高発現している遺伝子を検索し、機能が知られていない 1 種の遺伝子に着目した。NC 系統のこの遺伝子には多数のアミノ酸置換を伴う SNP 変異が存在するため、原虫増殖性に関与する極めて有力な候補遺伝子であり、更に解析を行っている。

② *Pymr* 領域外の原虫の増殖・排除に関与する遺伝子座

QTL 解析の結果、感染 5 日後の血虫率については Chr.1 のセントロメア側に suggestive レベルの遺伝子座 (*Pymr3*) が見出されたのみであった。したがって、感染 5 日後の血虫率には複数の遺伝子座に関与しているが、*Pymr* 領域内の遺伝子が主遺伝子として機能していると考えられた。一方、感染 14 日後の血虫率については Chr.8 の中央部に LOD 値が 5 を越える significant レベルの遺伝子座 (*Pymr2*) が見出され、原虫の排除に *Pymr2* が主要な役割を果たしていると考えられた。NC.129X1-*Pymr* 系統に 129X1 系統由来の *Pymr2* 領域を導入したコンジュニック系統 (NC.129X1-*Pymr*, *Pymr2*) への *P.yoelii* 17XL 株感染は、この結果を支持していた。以前より、原虫の排除には抗体の発現や Th2 優位の免疫状態が極めて重要であることが証明されている。そこで、*Pymr2* 領域内に存在し感染免疫に関与する候補遺伝子の塩基配列や遺伝子発現解析を行った。*Il15* については KO マウスでマラリア原虫の排除が遅延することが報告されており最有力候補遺伝子であったが、NC 系統の塩基配列や遺伝子発現に変異は認められなかった。その他の候補遺伝子として *Il27ra*, *Il12rb1* が存在し、両遺伝子とも NC 系統にはアミノ酸置換を伴う変異が見出されたが、これらの遺伝子の機能に重要な役割を持つドメイン内の変異ではなかった。これらの遺伝子に加え Th2 誘導に関与する他の候補遺伝子についても解析中である。

(2) 脳マラリアの発症に関与する遺伝子

① *Pymr* 領域の脳マラリア発症への関与

*P.berghei* ANKA 株に感染した NC 系統は全個体が脳マラリアを発症したが、NC.129X1-*Pymr* 系統では発症率が約 2/3 となり、*Pymr* 領域が脳マラリアに関与している事が判明した。なお、NC.129X1-*Pymr* 系統では、*P.berghei* ANKA 株感染においても原虫の増殖性が顕著に抑制されていた。したがって、*Pymr* 領域が感染初期の原虫の増殖性を抑制することが、脳マラリアの発症率の低下を導く可能性が高いと考えられた。

#### ② *Pymr* 領域外の脳マラリア感受性遺伝子座

QTL 解析の結果、LOD 値が 3 を越える suggestive レベルの遺伝子座が Chr.17 (*Cmr1*) と Chr.1 の中央部 (*Cmr2*) の 2 箇所に見出された。なお、*Cmr1* (cerebral malaria resistance 1) はマウスの主要組織適合性抗原遺伝子が存在する領域 (*H2*) と一致した。NC.129X1-*Pymr* 系統に脳マラリア抵抗性の 129X1 系統由来の *Cmr1* と *Cmr2* を導入したコンジェニック系統 (NC.129X1-*Pymr*, *Cmr1*, NC.129X1-*Pymr*, *Cmr2*) を作製し脳マラリア感受性を調査したが、脳マラリアの発症は僅かに抑制された程度であった。したがって、これらの遺伝子座 (*Cmr1*, *Cmr2*) の脳マラリア発症への効果は *Pymr* に比べて小さいものと考えられ、NC 系統の脳マラリア発症には単独では効果の小さい多数の遺伝子座により支配されていることが判明した。

#### (3) マラリア腎症に関与する遺伝子の解析

##### ① 病態解析

*P.chabaudi* AS 株を感染させた NC 系統では全個体が感染 10~14 日後より浮腫・蛋白尿・乳び血漿・貧血を伴うネフローゼ症を呈した。ネフローゼ個体の腎には、間質・尿細管障害を伴う糸球体の瀰漫性増殖性腎炎が認められた。また、糸球体の一部の癒着やメサンギウム基質の硬化所見も散見された。蛍光染色像では、糸球体を中心に尿細管基底膜にも多量の免疫複合体が沈着している事が確認され、膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) である事が判明した。これらの病変は感染 4 日後から認められ、血中の原虫の増加とともに重篤化した。また、この腎病変はネフローゼを呈さなかった個体でも観察された。NC 系統では *P.chabaudi* AS 株以外の原虫株の感染ではこの様な病態を呈しないことから、*P.chabaudi*

AS 株特異的に産生された免疫複合体が腎に異常沈着する何らかの原因が存在すると推定された。

#### ② 腎症発症とマラリア抵抗性遺伝子座

*P.chabaudi* AS 株を感染させた NC.129X1-*Pymr* 系統では、ネフローゼ症の発症個体は約半数であり NC 系統と比較して明らかに発症率が低下したが、全個体の腎で MPGN 病変が認められた。一方、NC.129X1-*Pymr* 系統の感染後の血虫率は NC 系統より顕著に低値であり、*Pymr* 領域は *P.chabaudi* AS 株感染でも原虫の増殖抑制作用が大きい事を示していた。そこで、NC.129X1-*Pymr* 系統への *P.chabaudi* AS 株の感染原虫数を増加させたところ、ネフローゼ症の発症頻度は顕著に増加した。したがって、*Pymr* 領域は原虫の増殖を抑制することでネフローゼ症の発症頻度を抑制するが、MPGN 病変の発症には直接関与しないと考えられた。更に、これまでに作製した各種コンジェニック系統は、いずれも *P.chabaudi* AS 株感染において NC.129X1-*Pymr* 系統と同様に腎病変やネフローゼ症の発症した。したがって、マラリア感染時の血虫率や脳マラリア発症に関与する遺伝子座は、少なくとも MPGN の発症には直接的に関与していないと考えられた。

#### (4) 皮膚炎発症に関与する遺伝子の解析

##### ① Chr.9 の皮膚炎発症遺伝子

NC 系統に多数存在する皮膚炎発症遺伝子の 1 つが Chr.9 に存在することが報告されている。しかし、本解析の結果、この皮膚炎遺伝子は *Pymr* 領域ではなく、Chr.9 の中央部付近に存在することが判明した。そこで、交配群による連鎖解析で原因遺伝子の位置の特定を試みたが上手くいかなかった。検討の結果、ダニ抗原の連続塗布による皮膚炎の誘発が安定していないことが原因と推測されたため別の皮膚炎誘発方法を模索し、ダニ抗原を耳介に直接投与する方法に至った。

##### ② マラリア抵抗性遺伝子座と皮膚炎発症の関係

全てのコンジェニック系統でダニ抗原の耳介投与後の耳介肥厚の程度、皮膚炎の程度、発症率が NC 系統より顕著に低下した。したがって、*Pymr2*, *Cmr1*, *Cmr2* の何れの領域内にも皮膚炎発症遺伝子が存在することが判明

した。更に、これらの全領域を導入したコンジェニック系統での予備的な解析では、皮膚炎が劇的に抑制される傾向があった。しかし、129X1 系統とは異なり僅かに耳介の肥厚と皮膚炎発症が認められた。したがって、これらの領域以外にも皮膚炎発症に関与する遺伝子が存在すると考えられた。

#### (5) まとめ

マラリア原虫の感染初期における増殖性は、主に Chr.9 の *Pymr* 領域内の遺伝子に規定されている事が判明した。更に、この遺伝子が免疫系ではなく赤血球因子として重要な役割を持つ可能性が高い事が判明し、*Pymr* 領域内に極めて有力な候補遺伝子を特定することができた。なお、この *Pymr* 領域内の遺伝子は皮膚炎発症には関与していないことが判明したが、この事実はこの遺伝子が免疫系でなく赤血球因子と推定される事を間接的に支持すると考えられる。また、この遺伝子は原虫の増殖性を制御することで脳マラリアの発症やマラリア腎症の発症に寄与するが、合併症の発症に直接的に作用する遺伝子ではない事も判明した。

一方、脳マラリア抵抗性遺伝子座 *Cmr1* と *Cmr2*、原虫排除に関与する遺伝子座 *Pymr2* については、いずれも皮膚炎発症への関与が示唆された。現時点ではこれらの領域内に存在する同じ遺伝子が NC 系統のマラリア感受性と皮膚炎に関与するという証拠は得られておらず、同一領域内の別の遺伝子がそれぞれの病態に関与している可能性もあり、更に検証を進める必要がある。ただし、原虫排除には Th2 優位の免疫状態が重要である事から、Chr.8 の *Pymr2* 領域は皮膚炎発症においても特に重要な役割を持つ可能性があると考えられる。NC 系統のこの領域内には *Il12rb*、*Il127ra* 等の候補遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が見出された。この *Pymr2* 領域内には他にも免疫系に作用する候補遺伝子が複数存在するため、感染症(マラリア)とアレルギー疾患(アトピー性皮膚炎)に共通する候補遺伝子として、更に解析を進める予定である。NC 系統は日本で樹立された感染症やアレルギー疾患の貴重なモデルである。次世代シーケンサーを用いたゲノム解析やアレイなどによる網羅的な遺伝子発現解析を組み合わせること

で、更にその特性が解明されていく事が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 大野民生、ネズミに罹る寄生虫：マラリアに強いマウス弱いマウス、細胞工学、査読無、25 巻、No. 4、2006 年、422-425.

[学会発表] (計 13 件)

① 大野民生、マウスを用いたマラリア抵抗性遺伝子の解析、第 82 回日本遺伝学会、平成 22 年 9 月 23 日、札幌市.

② 大野民生、ネズミマラリア原虫感染マウスの原虫増殖性に関与する未知の赤血球因子、第 18 回分子寄生虫学ワークショップ、平成 22 年 8 月 4 日、草津町(群馬県).

③ 大野民生 他、マウス NC 系統の脳マラリア発症に関与する宿主遺伝子座の解析、第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日、京都市.

④ 大野民生 他、マウスのマラリア原虫感染抵抗性遺伝子座の解析、第 100 回関西実験動物研究会、平成 20 年 12 月 5 日、京都市.

⑤ 大野民生、マウスを用いた脳マラリア発症に関与する宿主遺伝子の解析、第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、平成 20 年 8 月 6 日、草津町(群馬県).

⑥ 大野民生 他、マラリア原虫の排除に関与するマウス遺伝子座の解析、第 55 回日本実験動物学会、平成 20 年 5 月 15 日、仙台市.

⑦ 大野民生 他、マウス NC 系統の脳マラリア発症に関与する宿主遺伝子座の解析、第 77 回日本寄生虫学会、平成 20 年 4 月 4 日、長崎市.

⑧ 大野民生、マウスを用いたマラリア研究の醍醐味、第 97 回関西実験動物研究会、平成 20 年 3 月 7 日、京都市.

⑨ 大野民生、マウス NC 系統のマラリア原虫感染モデルとしての特性とその解析、第 15 回分子寄生虫学ワークショップ、平成 19 年 7 月 27 日、草津町(群馬県).

⑩ 大野民生 他、ネズミマラリア原虫感染時の血虫率に影響を与えるマウス遺伝子座の解析、第 76 回日本寄生虫学会、平成 19 年 3

月 30 日、大阪市.

⑪ 大野民生、NC マウスを用いたネズミマラリア原虫感染感受性の遺伝的解析、第 14 回分子寄生虫学ワークショップ、平成 18 年 7 月 26 日、草津町(群馬県).

⑫ 大野民生 他、ネズミマラリア原虫感染により誘発される NC マウスの病態について、第 75 回日本寄生虫学会、平成 18 年 5 月 20 日、弘前市.

⑬ 大野民生 他、マラリア原虫感染の合併症モデルとしての NC マウス、第 53 回日本実験動物学会、平成 18 年 5 月 11 日、神戸市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大野民生 (OHNO TAMIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620

### (2) 研究分担者

米川博通 (YONEKAWA HIROMICHI)

(財)東京都医学研究機構・研究員

研究者番号：30142110

(H19 → H20：連携研究者)

### (3) 連携研究者