

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19453

研究課題名（和文）自己免疫性心筋炎の原因遺伝子同定による多段階発症制御システムの解明

研究課題名（英文）Genetic analysis of autoimmune myocarditis

研究代表者

岡崎 一美（OKAZAKI, Ii-mi）

徳島大学・先端酵素学研究所（プロテオ）・非常勤講師

研究者番号：50452339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）： MRL系統のPD-1欠損マウスが発症する自己免疫性心筋炎に着目し、連鎖解析によって同定した心筋炎感受性遺伝子座を様々な組み合わせ及び個数で導入することにより、疾患耐性であるBALB/c系統において心筋炎を再構築することに成功した。また、これにより疾患の再構築に必要な個々の遺伝子座を同定し、各遺伝子座が心筋炎の発症に相加的に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口の5%が何らかの自己免疫疾患に罹患していると言われていたが、効果的な根治療法は無く、対症療法による治療が中心となっている。また、近年開発されたがんの免疫チェックポイント阻害療法においても、自己免疫関連副作用が大きな問題となっている。本研究成果は、自己免疫性心筋炎の責任遺伝子の同定、ひいては自己免疫疾患の発症機序の解明に繋がるため、自己免疫疾患の根治療法及び効果的な診断法の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）： PD-1 deficient mice develop fatal myocarditis on the MRL but not on the BALB/c background. To identify causal genes of autoimmune myocarditis in MRL-PD-1 deficient mice, we have performed genetic linkage analysis and identified 6 myocarditis-susceptible loci. We have introduced these loci into disease-resistant BALB/c background and succeeded in reconstituting myocarditis. Myocarditis could be reconstituted by various numbers of the susceptible loci in various combinations, indicating that some of these loci are redundant and function additively in the development of myocarditis.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 PD-1 連鎖解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口の5%が何らかの自己免疫疾患に罹患していると言われているが、効果的な根治療法は無く、対症療法による治療が中心となっている。根治療法及び効果的な診断法の開発には、疾患の発症機序を解明することが不可欠であるが、自己免疫疾患は複数の遺伝子及び多様な環境因子が発症や病態に関与する多因子疾患であるため、個々の遺伝要因と環境要因の同定が極めて困難であり、思うように進んでいない。我々は、近年、独自に開発した自己免疫性心筋炎モデルマウスを用いた連鎖解析の結果をもとに、わずか3遺伝子座を疾患感受性系統から耐性系統に導入するだけで、自己免疫性心筋炎を疾患耐性系統において遺伝的に再構築し得ることを見出した。

PD-1は京都大学の本庶佑博士らによって単離同定された抑制性免疫補助受容体であり、自己に対する不適切な免疫反応、病原微生物に対する過剰な免疫応答、がん免疫応答などを抑制することが、PD-1欠損マウスを用いた解析から明らかにされている。近年、ヒトの複数のがんに対してPD-1阻害抗体が劇的な治療効果を示したことから、世界中で大きな注目を集めている。一方、PD-1阻害抗体の副作用として自己免疫性心筋炎を含む様々な自己免疫疾患の発症が認められることから、PD-1がヒトにおいても自己免疫疾患の発症を積極的に抑制していることが明らかとなっている。自己免疫性心筋炎は、これらの副作用の中でも特に致死率が高いことから、その病態制御機構の解明が重要な課題となっている。

PD-1欠損マウスは、C57BL/6、BALB/c、NOD、及びMRL系統において、それぞれ異なる自己免疫疾患、すなわち、SLE様の腎炎・関節炎、拡張型心筋症・胃炎、劇症型1型糖尿病、及び致死性心筋炎を発症する。マウスの各系統の自己免疫素因がPD-1欠損により増強され、系統特異的な自己免疫疾患が惹起されると考えられるため、PD-1欠損マウスは、各系統が遺伝的に有する自己免疫素因を解析するには絶好のモデルと言える。我々はこれまでに、これらのマウスを用いた連鎖解析により、糖尿病、心筋炎、末梢神経炎等の疾患感受性遺伝子座を同定してきた。さらに、本研究で着目する心筋炎については、心筋炎耐性系統であるBALB/c-PD-1欠損マウスにMRL由来疾患感受性遺伝子座を導入したコンジェニックマウスを作製することにより、心筋炎の発症を再現することに成功している。疾患が遺伝学的に再構築できたことから、疾患発症を指標として候補遺伝子を検証することが可能となり、責任遺伝子の同定が飛躍的に進むと期待される。また、疾患の発症に十分な遺伝要因が揃っていることを意味するため、各責任遺伝子を同定することにより、自己免疫疾患制御ネットワークシステムの全貌を解明できると期待される。

2. 研究の目的

MRL系統のPD-1欠損マウスが発症する自己免疫性心筋炎に着目し、これまでに連鎖解析により同定した心筋炎感受性遺伝子座が、疾患の発症に与える影響を解析することにより、疾患の発症及び病態成立のメカニズムを段階的、かつ包括的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コンジェニックマウスの作製

BALB/c-PD-1欠損マウスにMRL由来疾患感受性遺伝子座を導入することにより心筋炎を再構築したコンジェニックマウスをBALB/c-PD-1欠損マウス、あるいは疾患感受性遺伝子座を別の組み合わせで有するコンジェニックマウスと交配し、目的の疾患感受性遺伝子座を有するコンジェニックマウスを作製した。さらに、得られたマウスを交配することにより、目的の疾患感受性遺伝子座をホモ化した。注目する疾患感受性遺伝子座の由来染色体は、マウスの尾よりゲノムDNAを抽出し、BALB/c系統とMRL系統を識別可能なSNPマーカーについて、デュアルラベルプローブを用いたPCRを行なうことにより調べた。

(2) 心筋炎発症頻度の解析

注目する疾患感受性遺伝子座をホモで有するPD-1欠損個体について、最長24週間に渡って心筋炎発症の有無を観察し、生存率を検討した。

4. 研究成果

MRL-PD-1欠損マウスが発症する自己免疫性心筋炎について、これまでに心筋炎を発症しないBALB/c-PD-1欠損マウスとの交雑マウスを作製して連鎖解析を行い、MRL染色体上に5個、BALB/c染色体上に1個、心筋炎感受性遺伝子座を同定している(*Mcp* (Myocarditis under PD-1 deficiency) 1~6)。また、MRL由来5遺伝子座(*Mcp*1~5)をBALB/c系統に導入したコンジェニックマウスを作製することにより、心筋炎の遺伝学的な再構築を試みたところ、*Mcp*1・3・4・6、*Mcp*2・4・5・6の組み合わせで有するコンジェニックマウスが心筋炎により死亡することを見出した。そこで、マウスの数を増やして発症頻度と発症時期を詳細に検討したところ、両コンジェニックマウスともに、5週齢までに全てのマウスが心筋炎により死亡することが確認さ

れた。MRL-PD-1 欠損マウスにおける心筋炎の発症頻度が 10 週齢の時点で約 70%であることから、MRL-PD-1 欠損マウスと比較して心筋炎が悪化しているが、これは、BALB/c 系統が有する心筋炎感受性遺伝子座 *Mcp6* による影響と考えられる。

疾患を再構築したマウスと疾患を発症しないマウスを用いて連鎖解析を行う目的で、心筋炎感受性 6 遺伝子座のうちの 3 個を有するコンジェニックマウスを作製し、心筋炎の発症頻度を検討したところ、*Mcp1*・4・6、*Mcp2*・3・6、*Mcp2*・5・6でも、時期や頻度に差はあるものの心筋炎を発症することが明らかとなった。当初、疾患の再構築に必要な 4 遺伝子座のうちの 3 個を有し、心筋炎を発症しないコンジェニックマウスを対照系統として連鎖解析を行うことで、注目する 1 遺伝子座における責任遺伝子を同定する予定であったが、3 遺伝子座を有するコンジェニックマウスが心筋炎を発症したことから、連鎖解析に用いるコンジェニックマウス系統の組み合わせを再検討することにした。

心筋炎感受性 6 遺伝子座のうちの 2 個を有するコンジェニックマウスを作製し、心筋炎の発症頻度を検討した。その結果、*Mcp2*・6 は心筋炎を低頻度に発症し、*Mcp5*・6 は心筋炎を発症しないことを明らかとした。以上の結果から、*Mcp2*・5・6 と *Mcp5*・6 の比較により、*Mcp2* の責任遺伝子を効率的に同定できると考えられた。また、2 遺伝子を同時に解析する組み合わせになるが、*Mcp2*・4・5・6 と *Mcp5*・6、*Mcp1*・4・6 と *Mcp6*、*Mcp2*・3・6 と *Mcp6* の比較によっても、責任遺伝子を効率的に同定できると判断した。そこで、*Mcp2*・5・6 と *Mcp5*・6、*Mcp2*・4・5・6 と *Mcp5*・6、*Mcp1*・4・6 と *Mcp6*、*Mcp2*・3・6 と *Mcp6* の各コンジェニックマウス間で F2 交雑マウスを作製して連鎖解析を行い、各疾患感受性遺伝子座について責任領域の絞り込みを行なった。

以上から、本研究では MRL-PD-1 欠損マウスが発症する自己免疫性心筋炎について、これまでに連鎖解析によって同定している心筋炎感受性遺伝子座 6 個のうち、疾患の再構築に必要な個々の遺伝子座を同定し、各遺伝子座が心筋炎の発症に相加的に働くことを明らかにした。さらに、心筋炎を発症するコンジェニックマウスと心筋炎を発症しないコンジェニックマウスの間で連鎖解析を行うことにより、各疾患感受性遺伝子座について責任領域の絞り込みを行うことができた。今後、さらに責任領域を絞り込むことによって、心筋炎の原因遺伝子を同定できると考えられる。同定した遺伝子について、心筋炎再構築マウスにおいて MRL 型から BALB/c 型に置換したノックインマウス、あるいは心筋炎を発症しない BLAB/c マウスにおいて BLAB/c 型から MRL 型に置換したノックインマウスを、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製し、原因遺伝子であることを証明することを計画している。さらに、個々の遺伝子座のみを導入したマウスを用いて、各々が与える免疫学的な特性を解析し、各遺伝子座と PD-1 欠損がどのような階層性のもとに、どのように相互作用することによって自己免疫疾患の発症を誘導するかを解明することにより、疾患の発症及び病態成立のメカニズムを段階的、かつ包括的に解明できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Maruhashi Takumi, Okazaki II-mi, Sugiura Daisuke, Takahashi Suzuka, Maeda Takeo K., Shimizu Kenji, Okazaki Taku	4. 巻 19
2. 論文標題 LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1415 ~ 1426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0217-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Reina, Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Maruhashi Takumi, Watada Mizuki, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Reina, Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Watada Mizuki, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 511
2. 論文標題 PD-1 efficiently inhibits T cell activation even in the presence of co-stimulation through CD27 and GITR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 491 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Takeo K., Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maruhashi Takumi, Okazaki Taku	4. 巻 294
2. 論文標題 Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6017 ~ 6026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岡崎 拓、岡崎 一美	4. 巻 36
2. 論文標題 免疫寛容を標的とした抗体医薬によるがん免疫療法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1836 ~ 1840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Kenji, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maruhashi Takumi, Takegami Yujiro, Cheng Chaoyang, Ozaki Soichi, Okazaki Taku	4. 巻 77
2. 論文標題 PD-1 Imposes Qualitative Control of Cellular Transcriptomes in Response to T Cell Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 937 ~ 950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okazaki Taku, Okazaki II-mi	4. 巻 1189
2. 論文標題 Stimulatory and Inhibitory Co-signals in Autoimmunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 213 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-32-9717-3_8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Natsumi, Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 294
2. 論文標題 Glucocorticoids potentiate the inhibitory capacity of programmed cell death 1 by up-regulating its expression on T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19896 ~ 19906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Hikari, Okazaki II-mi, Shimizu Kenji, Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Mizuno Reina, Okazaki Taku	4. 巻 105
2. 論文標題 PD-1 aborts the activation trajectory of autoreactive CD8+ T cells to prohibit their acquisition of effector functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102296 ~ 102296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2019.06.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugiura Daisuke, Maruhashi Takumi, Okazaki II-mi, Shimizu Kenji, Maeda Takeo K., Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 364
2. 論文標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 558 ~ 566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aav7062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計19件(うち招待講演 6件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 水野玲奈, 杉浦大祐, 清水謙次, 丸橋拓海, 綿田水月, 岡崎一美, 岡崎 拓
2. 発表標題 PD-1によるT細胞機能制御における標的分子の解析
3. 学会等名 第17回四国免疫フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taku Okazaki, Takumi Maruhashi, II-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Kenji Shimizu
2. 発表標題 LAG-3 regulates immunodominance and autoimmunity by its conformation-dependent recognition of MHCII
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Kenji Shimizu, Taku Okazaki
2. 発表標題 LAG-3 preferentially inhibits activation of CD4 T cells recognizing stable pMHCII by its conformation-dependent recognition of MHCII
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikari Okamura, Il-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Mizuno Reina, Taku Okazaki
2. 発表標題 Single-cell analysis of autoreactive T cells under the control of PD-1
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reina Mizuno, Daisuke Sugiura, Kenji Shimizu, Takumi Maruhashi, Il-mi Okazaki, Taku Okazaki
2. 発表標題 PD-1 primarily targets TCR-signal in the inhibition of functional T cell activation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okazaki T, Sugiura D, Maruhashi T, Shimizu K, Okazaki IM.
2. 発表標題 Restriction of PD-1 function for optimal T cell activation
3. 学会等名 2019 International Symposium of Korean Autoimmunity - Synovitis Study Group (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Okazaki T, Sugiura D, Maruhashi T, Shimizu K, Okazaki IM.
2 . 発表標題 Restriction of PD-1 function for optimal T cell responses
3 . 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (招待講演)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Maruhashi T, Ikubo J, Sugiura D, Okazaki IM, Okazaki T.
2 . 発表標題 Binding properties between LAG-3 and two potential ligands, stable pMHCII and FGL1
3 . 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sugiura D, Maruhashi T, Shimizu K, Okazaki IM, Okazaki T.
2 . 発表標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses
3 . 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shimizu K, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Takegami Y, Cheng C, Ozaki S, Okazaki T.
2 . 発表標題 PD-1 imposes qualitative control of cellular transcriptomes in response to T cell activation
3 . 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Okazaki T, Sugiura D, Maruhashi T, Shimizu K, Okazaki IM.
2 . 発表標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses
3 . 学会等名 7th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (Cytokines 2019) (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T.
2 . 発表標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses
3 . 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, Takahashi S, Maeda TK, Shimizu K, Okazaki T
2 . 発表標題 LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII
3 . 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T.
2 . 発表標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses
3 . 学会等名 The RIKEN-IMS International Symposium on Immunology 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 拓, 杉浦大祐, 丸橋拓海, 清水謙次, 岡崎一美
2. 発表標題 抑制性免疫補助受容体PD-1の機能制御機構
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 拓, 丸橋拓海, 杉浦大祐, 清水謙次, 岡崎一美
2. 発表標題 抑制性免疫補助受容体によるがん免疫と自己免疫の制御
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 拓, 岡村陽香里, 清水謙次, 丸橋拓海, 杉浦大祐, 岡崎一美
2. 発表標題 シンギュラリティ生物学による自己免疫疾患制御機構の解明
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of the 71st Japan Society for Cell Biology and the 19th Protein Science Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦大祐, 丸橋拓海, 岡崎一美, 清水謙次, 竹本龍也, 岡崎 拓
2. 発表標題 シスPD-L1/CD80結合がT細胞活性化段階におけるPD-1の抑制機能を制限する
3. 学会等名 第18回四国免疫フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水謙次, 杉浦大祐, 岡崎一美, 丸橋拓海, 岡崎 拓
2. 発表標題 T細胞の抗原刺激による遺伝子発現変動にPD-1が与える影響の網羅的解析
3. 学会等名 第18回四国免疫フォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>徳島大学先端酵素学研究所免疫制御学分野ホームページ http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dir/ 東京大学定量生命科学研究所分子免疫学研究分野ホームページ http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/okazaki lab/</p>
--

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考