

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究(A)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19689012  
 研究課題名（和文） 自己免疫疾患の遺伝的再構築に基づいた多段階発症制御システムの解明  
 研究課題名（英文） Genetic reconstitution of autoimmune diseases in mice.  
 研究代表者  
 岡崎 拓 (OKAZAKI TAKU)  
 徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
 研究者番号：00362468

研究成果の概要（和文）：独自に作製した I 型糖尿病、末梢神経炎および心筋炎自然発症モデルマウスを用いて連鎖解析を行うことにより、各自己免疫疾患の発症に関与する遺伝子座を同定することに成功した。また、I 型糖尿病モデルについては、得られた遺伝子座を疾患抵抗性系統に導入することにより、I 型糖尿病を遺伝的に再構築することに成功した。その他の疾患についても、遺伝子座の疾患抵抗性系統への導入が順調に進展した。

研究成果の概要（英文）：We have identified several autoimmune susceptible loci by genetic linkage analyses on animal models of type I diabetes, peripheral neuropathy, and myocarditis. We have also succeeded in reconstituting type I diabetes on the disease-resistant strain by introducing diabetes susceptible loci.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：遺伝子・細胞・実験動物・自己免疫疾患・連鎖解析・I型糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

PD-1は細胞死刺激により発現が誘導される遺伝子として1992年に京都大学の本庶佑博士らによって単離同定された遺伝子であり、I型の膜蛋白質をコードする。我々は、PD-1リガンドの同定、シグナル伝達機構の解析、PD-1欠損マウスに発症する自己免疫疾患の解析等により、PD-1が自己に対する不適切な免疫反応を抑制し、自己免疫

疾患の発症を制御していることを明らかにしてきた。さらにPD-1欠損マウスが、マウスの系統により異なる種類の自己免疫疾患を発症すること、すなわちC57BL/6、BALB/c、NOD系統においてSLE様の腎炎・関節炎、拡張型心筋症、重度のI型糖尿病を発症することを示してきた。

自己免疫疾患は多くの遺伝子が関与する多遺伝子疾患であるが、複数の遺伝子によ

る相互作用については殆ど分かっていない。上述の通り、PD-1 欠損マウスに発症する自己免疫疾患はマウスの遺伝背景により、その病態、及び病状が大きく異なるため、マウスの自己免疫素因を解析するには絶好のモデルであると言える。

そこで、NOD-PD-1 欠損マウスを用いて連鎖解析を行い、疾患発症に関わる遺伝子を網羅的に探索したところ、PD-1 欠損マウスを用いることにより、疾患発症に関与する遺伝子座を大幅に絞り込むことができることが明らかとなった。特に NOD マウスにおける I 型糖尿病では、これまでは劣性に働く遺伝子座しか解析できていなかったが、PD-1 欠損マウスを用いることにより優性に働く新規感受性遺伝子座を 2 個同定することに成功した。また、これまでに 20 個以上もの糖尿病感受性遺伝子座が報告されており、実際にどれが重要なのかははっきりしない状況であったが、PD-1 欠損を用いることにより、糖尿病発症と連鎖を示す遺伝子座が上記優性遺伝子座とあわせて、わずか 4 個に絞り込まれた。PD-1 欠損と同種の影響を有する遺伝子座が不要となったために、疾患の発症に必要な遺伝子座が減り、各々の貢献度が相対的に大きくなったためと考えられる。

自己免疫疾患をはじめとした多遺伝子疾患の原因を解明する上で、モデル動物を用いた連鎖解析は極めて魅力的な方法である。しかし多くの連鎖解析は、疾患の発症と連鎖を示す遺伝子座の報告にとどまっており、遺伝子座を組み合わせることにより疾患が再構築された例はほとんど無い。疾患の再構築ができないということは、疾患の発症に必要な遺伝子座の全てを網羅できていないということの意味するため、注目する遺伝子や遺伝子座をどれほど深く解析しても、疾患発症過程の全貌を解明することは基本的に不可能である。連鎖解析の結果を基にした疾患の再構築が上手くいかない理由としては、遺伝子座の数が多すぎるため、全てを組み合わせることが非常に困難であること、および疾患発症に必要な遺伝子座の全てが同定できていないことが主な原因と考えられる。

上述の通り、PD-1 欠損マウスを用いた連鎖解析で得られた遺伝子座は、疾患の発症に必要な十分な遺伝子座である可能性が高いため、疾患の再構築も効率的に行えると期待される。

## 2. 研究の目的

PD-1 欠損マウスを用いた連鎖解析をもとに自己免疫疾患を抵抗性系統に再構築し、自己免疫疾患の発症に必要な十分な遺伝子座を決定するとともに、各々が免疫応答に与える

影響を検討し、自己免疫疾患の発症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する。

自己免疫疾患が再構築できれば、各遺伝子座から原因遺伝子を同定することも比較的容易に行えるようになると期待されるので、自己免疫疾患発症制御システムの分子レベルでの解明、さらにはそれらの分子を標的とした新規治療法、診断法の開発につながると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) I 型糖尿病の再構築

これまでの解析から、NOD-PD-1 欠損マウスにおける I 型糖尿病の発症には、4 個の遺伝子座が関与していることを明らかとしている。そこで、これらの遺伝子座を疾患抵抗性系統である C57BL/6-PD-1 欠損マウスに導入し、I 型糖尿病の再構築を試みた。再構築に成功したため、導入する染色体領域を狭めることにより、責任遺伝子が存在する領域の絞り込みを試みた。

遺伝子座の導入は、疾患感受性系統を疾患抵抗性系統に戻し交配することにより行った。注目する遺伝子座以外の染色体領域が疾患抵抗性系統に確実に置き換わるには 10 世代以上の戻し交配が必要であるが、これまでに報告されている I 型糖尿病感受性遺伝子座の置換をモニターすることにより、5 世代に短縮した。例えば 50cM の染色体 4 領域全てを一度の交配でホモ化できる確率は 65, 536 分の 1 と極めて低い。本マウスにおけるホモ化の期待値も同様に極めて低く、実際、ホモ化だけで数回の交配が必要であった。マウスの 1 世代が最短で 3 ヶ月であるため、戻し交配とホモ化の交配だけで 2 年近くの期間を要した。

### (2) 末梢神経炎の再構築

NOD マウスは g7 と呼ばれる特殊な MHC ハプロタイプを有しているが、C57BL/6 マウスと同じ b ハプロタイプに置き換えた NOD. H2b-PD-1 欠損マウスは、糖尿病を発症せず、末梢神経炎、唾液腺炎、胃炎等を発症することを見出している。そこで、NOD. H2b-PD-1 欠損マウスと C57BL/6-PD-1 欠損マウスの交雑マウスを 415 匹作製し、そのうちの 376 匹について 138 個のマーカーを用いて遺伝子型を決定して連鎖解析を行い、末梢神経炎、唾液腺炎、胃炎等の発症に関与する遺伝子座の同定を試みた。同定された遺伝子座の C57BL/6-PD-1 欠損マウスへの導入を開始した。

### (3) 心筋炎の再構築

SLE のモデルマウスとして知られる MRL マウスに PD-1 欠損マウスを戻し交配した

ところ、MRL-PD-1 欠損マウスの約 80%が 15 週齢までに心筋炎を発症して死亡することを見出した。そこで、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 321 匹作製し、91 個のマーカについて遺伝子型を決定して連鎖解析を行い、心筋炎の発症に関与する遺伝子座の同定を試みた。同定された遺伝子座の BALB/c-PD-1 欠損マウスへの導入を開始した。

#### 4. 研究成果

##### (1) I 型糖尿病の再構築

着目する 4 個の遺伝子座を C57BL/6 系統に 5 世代に渡り戻し交配した後、全ての遺伝子座についてホモ化を行った。本コンジェニックマウスは、PD-1 遺伝子座が野生型の場合には I 型糖尿病を全く発症しなかったが、PD-1 遺伝子座が欠損型の場合には、ほぼ全てのマウスが I 型糖尿病を自然発症した。このことから、C57BL/6 系統に、NOD 系統由来の 4 遺伝子座と PD-1 欠損を導入することにより、I 型糖尿病を遺伝的に再構築できることが明らかとなった。

その後、NOD 系統由来の染色体領域を狭めたサブコンジェニックマウスを 10 ライン作製し、4 染色体領域の内の 2 領域が I 型糖尿病の発症には必ずしも必要では無いことを見出した。また、残りの 2 領域について、責任遺伝子が存在する染色体領域をこれまでと比べて半分以下に狭めることに成功した。

##### (2) 末梢神経炎の再構築

NOD.H2b-PD-1 欠損マウスと C57BL/6-PD-1 欠損マウスとの交雑 BC1 マウスを 415 匹作製したところ、約 20%のマウスが末梢神経炎を自然発症した。そのうちの 376 匹を用いて連鎖解析を行ったところ、神経症・末梢神経炎、ランゲルハンス島炎、胃炎、唾液腺炎、および血管炎に連鎖を示す染色体領域を 7 個、1 個、4 個、2 個、および 7 個同定し、*Annp* 遺伝子座と命名した。

各々の疾患について、疾患の再構築および発症の回避が期待されるコンジェニックマウスの作製を開始し、戻し交配を 3 世代完了した。

##### (3) 心筋炎の再構築

MRL-PD-1 欠損マウスと BALB/c-PD-1 欠損マウスを交配し、交雑マウスを 324 匹作製して連鎖解析を行った。その結果、MRL 染色体上に 5 個、BALB/c 染色体上に 1 個の心筋炎感受性遺伝子座を同定することに成功した。

MRL 染色体上の 5 遺伝子座について、BALB/c 系統への戻し交配を 6 世代完了し、ホモ化を開始した。

#### 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 12 件)

- ① Wang J, Okazaki IM, Yoshida T, Chikuma S, Kato Y, Nakaki F, Hiai H, Honjo T, Okazaki T. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int. Immunol.* 22(6):443-452(2010) 査読あり
- ② Hino S, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, Okazaki T, Tokura Y. Tumor cell expression of programmed cell death 1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 116(7):1757-1766 (2010) 査読あり
- ③ Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani S, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-PD-1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J. Immunol.* 184(5):2337-2347 (2010) 査読あり
- ④ Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida Y, Shibayama S, Okazaki T, Honjo T. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J. Immunol.* 182(11):6682-6689(2009) 査読あり
- ⑤ Jiang F, Yoshida T, Nakaki F, Terawaki S, Chikuma S, Kato Y, Okazaki IM, Honjo T, Okazaki T. Identification of QTLs that modify peripheral neuropathy in NOD.H2<sup>b</sup>-*Pdcd1*<sup>-/-</sup> mice. *Int. Immunol.* 21(5):499-509(2009) 査読あり
- ⑥ Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Aburatani H, Okazaki T, Honjo T, Takeuchi M, Mochizuki M. T cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(6):2862-2870(2009) 査読あり
- ⑦ Kido M, Wa tanabe N, Okazaki T, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Nishio A, Honjo T, Chiba T. Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. *Gastroenterology.* 135(4):1333-43. (2008) 査読あり
- ⑧ Yoshida T, Jiang F, Honjo T, Okazaki T. PD-1 deficiency reveals various

- tissue-specific autoimmunity by H-2<sup>b</sup> and dose-dependent requirement of H-2<sup>s7</sup> for diabetes on NOD background. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(9):3533-3538 (2008) 査読あり
- ⑨ Lin DY, Tanaka Y, Iwasaki M, Gittis AG, Su HP, Mikami B, Okazaki T, Honjo T, Minato N, and Garboczi DN. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105 3011-3016 (2008) 査読あり
- ⑩ Green KA, Okazaki T, Honjo T, Cook WJ, and Green WR. The programmed death-1 and interleukin-10 pathways play a down-modulatory role in LP -BM5 retrovirus-induced murine immunodeficiency syndrome. J. Virol. 82 2456-2469 (2008) 査読あり
- ⑪ Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int. Immunol. 19, 813-824 (2007) 査読あり
- ⑫ Terawaki S, Tanaka Y, Nagakura T, Hayashi T, Shibayama S, Muroi K, Okazaki T, Mikami B, Garboczi DN, Honjo T, Minato N. Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1-expressing cells: possible application to enhance T cell function. Int. Immunol. 19, 881-890 (2007) 査読あり
- [学会発表] (計 19 件)
- ① Sakai S, Kawamura I, Tsuchiya K, Okazaki T, Mitsuyama M. The PD-1:PD-L co-inhibitory pathway is a critical determinant of host resistance to pulmonary tuberculosis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, vol. 39, p. 243 (2009 年 12 月 4 日、大阪)
- ② Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-PD-1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, vol. 39, p. 160 (2009 年 12 月 3 日、大阪)
- ③ Okazaki T: PD-1 signal and immunological tolerance. Annual Symposium of the Korean Association of Immunologists. (2009 年 11 月 10 日、ソウル)
- ④ Okazaki T: Negative regulation of T cells by inhibitory co-receptors. Symposium on recent advances in transplantation immunology (2009 年 11 月 10 日、ソウル)
- ⑤ 岡崎 拓: PD-1 の腫瘍免疫における役割と免疫療法への展開、中国・四国広域がんプロ養成コンソーシアムセミナー「がん免疫療法」(2009 年 10 月 16 日、徳島)
- ⑥ 岡崎 拓: 自己免疫疾患のゲノム解析、若手生命科学シンポジウム 2009 徳島 (2009 年 8 月 17 日、徳島)
- ⑦ 岡崎 拓: 自己免疫疾患のゲノム解析、日本免疫学会 免疫サマースクール 2009 (2009 年 7 月 17 日、淡路)
- ⑧ Okazaki T: Genetic dissection and reconstitution of autoimmune diseases. Annual International Workshop on Mucosal Immunology and Vaccine for Young Investigators. (2009 年 4 月 18 日、箱根)
- ⑨ Okazaki T, Honjo T: Genetic dissection and reconstitution of autoimmune diseases using PD-1 deficient mice., BMB2008 (2008 年 12 月 10 日、神戸)
- ⑩ Terawaki S, Chikuma S, Okazaki T, Honjo T: Transcriptional mechanisms of mouse PD-1 gene., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 234 (2008 年 12 月 3 日、京都)
- ⑪ Chikuma S, Terawaki S, Okazaki T, Honjo T: PD-1 induces T cell anergy by limiting autonomous IL-2 production., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 234 (2008 年 12 月 3 日、京都)
- ⑫ Kasagi S, Kawano S, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Okazaki T, Honjo T, Kumagai S: Involvement of IFN-g producing CD4+PD-1+ T cells in lupus-prone NZB/W F1 mice., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 233 (2008 年 12 月 3 日、京都)
- ⑬ Sakai S, Kawamura I, Uchiyama R, Okazaki T, Mitsuyama M: The PD-1:PD-L1 pathway inhibits the protective immunity and contributes to the bacterial persistence in mycobacterial infection., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 159 (2008 年 12 月 2 日、京都)
- ⑭ Usui Y, Takeuchi M, Okunuki Y, Kezuka T, Hattori T, Ma J, Nishiyama C, Okazaki T, Honjo T, Yagita H, Sugita S, Akiba H, Goto H: Roles of programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligands pathway in the development of murine experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)., 第

- 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 94 (2008年12月1日、京都)
- ⑮ Kido M, Watanabe N, Okazaki T, Tanaka J, Nishio A, Honjo T, Chiba T: Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling., 第38回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 92 (2008年12月1日、京都)
- ⑯ 岡崎 拓: PD-1欠損マウスを用いた自己免疫疾患の遺伝解析, 第5回HBS公開シンポジウム (2008年11月19日、徳島)
- ⑰ Kasagi S, Kawano S, Hatachi S, Morinobu A, Tanaka Y, Okazaki T, Minato N, Honjo T, Kumagai S: Expression of PD-1/PD-L1 in the development of lupus-like nephritis in NZB/W mice. 第37回日本免疫学会 (2007年11月20日、東京)
- ⑱ 岡崎 拓、本庶 佑: 抗トロポニンI抗体と拡張型心筋症。第28回日本アフェレーシス学会 (2007年11月17日、久留米市)
- ⑲ Okazaki T: Genetic dissection of autoimmunity using PD-1 deficient mice. COE International Symposium 2007 (2007年6月2日、京都)

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dir/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡崎 拓 (OKAZAKI TAKU)  
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
研究者番号: 00362468

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし