

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390112

研究課題名（和文） 野生型マウスゲノムに由来する膠原病抑制遺伝子の同定

研究課題名（英文） Resistance genes to collagen disease in a wild mice-derived inbred strain MSM/Ms

研究代表者

能勢 真人 (NOSE MASATO)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授

研究者番号：70030913

研究成果の概要（和文）：膠原病モデルマウス MRL/lpr とは約 100 万年前に分岐したと考えられている野生型マウス MSM/Ms との交配実験を通じて、新たに糸球体腎炎感受性遺伝子座 3 座を同定し、いずれも MSM アレルが抑制遺伝子であることを見出した。このうち *Agnmr1* の位置的候補遺伝子として、補体の膜侵襲複合体を阻害する *Cd59a* を同定した。ついで MRL/lpr マウスの *Cd59a*<sup>MSM</sup> リコンビナントコンジェニックマウスを作製したところ、*Cd59a*<sup>MSM</sup> が糸球体腎炎のみならず血管炎にも抵抗性を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）： This study attempted to elucidate the polygenic genetic resistance of a wild mice-derived inbred strain MSM/Ms, having a larger gene pools than commonly used laboratory mouse strains, to glomerulonephritis in an MRL/Mp-*lpr/lpr* (*MRL-Fas*<sup>*lpr*</sup>) lupus strain of mice and thereby to understand the steps controlling development of lupus nephritis. A genome wide scan for glomerulonephritis resistance loci in a dominant inheritance form was carried out by using *MRL-Fas*<sup>*lpr*</sup> x (*MRL-Fas*<sup>*lpr*</sup> x MSM/Ms) F1 backcross mice. Three dominant MSM/Ms resistance loci were mapped on chromosomes 2, 13 and 4. One of the candidate genes for the locus *Agnmr1* was *Cd59a*, encoding an glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein inhibiting the membrane attack complex of complement. Expression of *Cd59a* in the glomeruli was higher in MSM/Ms than in *MRL-Fas*<sup>*lpr*</sup>. Different transcriptional activity of the *Cd59a* promoter region was observed between the parental strains of mice. Then, the recombinant congenic strain of mice *MRL-Fas*<sup>*lpr*</sup>-*Cd59a*<sup>MSM</sup> was newly established, which was significantly decreased in severity of glomerulonephritis and also renal vasculitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：MRL/lpr、MSM/Ms、糸球体腎炎、QTL解析、位置的候補遺伝子、*Cd59a*、プロモーター多型、リコンビナントコンジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

我々生物は、地球生命の誕生後38億年を経て今存在する。その間、遺伝情報の複製の不安定性が引き起こす点突然変異や染色体突然変異は、自然淘汰や進化的新規性の源となってきた。同種内であっても、この歴史の中で蓄積された突然変異は個体間のゲノム多型として潜在し、種々の環境下にその個別性を発現する。本研究が対象とする膠原病も、この個別性の一表現型として位置づけられる。

この内なる必然ともいえるべき膠原病のゲノム的しくみを明らかにする上においてゲノムが均一である近交系モデルマウスを用いた解析は極めて有用である。しかし従来開発されてきた近交系マウスの大部分は、ヨーロッパから大航海時代を通じて新大陸を中心に広がる*Mus musculus* 群の一亜群である*M. m. domesticus*で、そのゲノム多型のプールは小さい。申請者が膠原病モデルマウスとして用いてきたMRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/lpr)マウスもこの亜群に入り、この亜群間での交配実験による膠原病感受性遺伝子の探索は限られたゲノム多型しか把握し得ない。

*Mus musculus* の亜群には、*domesticus*の他に、上図の分布を示す*musculus*、*molossinus*、*castaneus*、*bacterianus*の亜群が存在し、これらは約100万年前に分岐したと考えられている。*molossinus*は日本に生息する野生マウスで、*musculus*と*castaneus*との交配に由来する。このマウスから、1978年、森脇博士らによって近交系マウスMSM/Msが樹立された。

そのため、MSM/Msマウスとの交配は、従来の*domesticus*に由来する近交系マウス間の交配では得られない新たな膠原病感受性遺伝子の同定が可能になると考えられ、また、疾病の進化論を展開する上での貴重なツールとなり得る。実際、MSM/Msマウスを通じて、リンパ腫や癌に対する新たな抵抗性遺伝子の存在が明らかとなり、また、申請者は関節軟骨増殖性病変の新たな感受性遺伝子座を同定した。近年、MSM/Msマウスのマイクロサテライトマーカー、SNPsのデータベース、また、BACライブラリーの作成が精力的に行われており、これらを利用して我が国が発信する新たな疾病ゲノミクスの展開が期待される。

## 2. 研究の目的

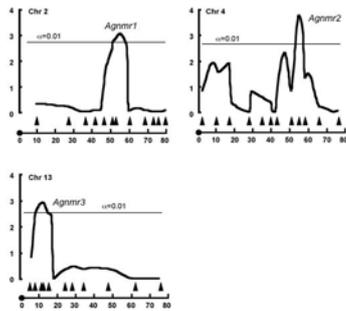
*lpr* 遺伝子は Fas 欠損変異であり、MRL/lpr マウスでは、*lpr* ホモの状態、その 80-90% の個体に重篤な糸球体腎炎、血管炎および唾液腺炎などを自然発症する。しかし、これらの病変の発症には MRL 系マウスの背景遺伝子がクリティカルであることを既に明らかにしている。従来、申請者らは、MRL/lpr という病変も発症しなす C3H/HeJ-*lpr/lpr* (C3H/lpr) との N2、F2 世代を用いて、個々の病変の感受性遺伝子座、14 座を同定してきた (血管炎：*Arvm1, 2, Aaom1, Aevm1, 2*、腎炎：*Agnm1, 2, 3*、関節炎：*Paam1, 2, Artmd1, 2*、唾液腺炎：*Asm1, Asm2*) (Mouse Genome Informatics (MGI); <http://www.informatics.jax.org/>参照)。これらの解析を通じて、個々の病変が Mather (1949) の提唱したポリジーン遺伝の概念に従うこと、また、このポリジーンのいくつかは、*Cd72* や *Oppn* の解析で示したように (文献 8, 9)、構造遺伝子多型に基づくことを明らかにしてきた。

そこで上述の概念に基づき、本研究では、MSM/Ms マウスの MRL/lpr マウスとの戻し交配マウスを作製し、膠原病の発症を制御する多型遺伝子の同定とその機能の解明を目的とした。MSM/Ms 系マウスのゲノムには多くの未知の疾病抑制遺伝子が潜在していると考えられ、この解析は、疾病と進化との関係を探る病態生物学的意義を明らかにするのみならず、疾病治療における新たな分子標的の開発にもつながるものと期待される。

## 3. 研究の方法と結果

(1) MSM/Ms マウスゲノムが有する糸球体腎炎抵抗性遺伝子座の同定：

MRL/lpr x (MRL/lpr x MSM/Ms) F1 マウス 504 匹の N2 世代を作製し、このうち *lpr* 遺伝子ホモマウス 236 匹を対象に二系統間の多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型と糸球体病変スコアの QTL 解析を行った。その結果、MSM アレルがヘテロにおいて、significant level の糸球体腎炎抑制効果を示す 3 座を同定した。即ち、MSM/Ms マウスゲノムには、少なくとも糸球体腎炎に対して優性遺伝形式を示す、強力な抑制遺伝子が存在することを発見した。(下図)



これらは第2, 4, 13染色体上の54cM, 54.8 cM, 13.0 cMに位置し、それぞれ *Autoimmune glomerulonephritis MSM resistance 1* (*Agnmr1*)、*Agnmr2*、*Agnmr3* と命名した。

(2) 糸球体腎炎抵抗性遺伝子座の候補遺伝子の解析:

*Agnmr1* 領域には補体制御遺伝子 *Cd59a* が位置していた。そこで MRL/lpr と MSM/Ms マウスの各腎糸球体を、顕微鏡下に laser capture microdissection (LCM) にて採取、RNA を抽出後、その cDNA を作製し、*Cd59a* の発現量を PCR にて解析した結果、MSM/Ms マウスの腎糸球体での *Cd59a* の発現は MRL/lpr マウスのそれに比し顕著に高いことを見出した。

(3) 候補遺伝子 *Cd59a* のプロモータ領域の解析:

*Cd59a* のプロモーター領域の多型が糸球体腎炎抵抗性を規定している可能性があり、そのプロモーターと考えられる領域の塩基配列を解析した結果、MRL/lpr と MSM/Mp マウス間で多型を見出した。

そこで luciferase reporter assay により、このプロモーター領域の多型についての機能解析を行ったところ、MSM/Ms におけるルシフェラーゼ活性が MRL/lpr のそれに比し顕著に高いことを見出した。

(4) MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> コンジエニックマウスの作製とその病態解析:

*Agnmr1* が MSM マウスアレルを有するリコンビナントコンジエニック系の作製するなかで、幸運にもその交配系群に、*Cd59a* のプロモーター領域で組換えを起こしている個体を見出した。

そこでこの個体を MRL/lpr マウスに戻し交配し 14 代繰り返した後、兄妹交配によりこの領域が MSM アレルのホモであるコンジエニックマウス MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> を樹立した。

この系についてその組織病理学的解析を行い、各病変のスコアを測定したところ、糸球体腎炎のみならず、腎血管炎の発症が顕著に抑制されていることを見出した。

本研究では MSM/Ms マウスを MRL/lpr マウスへ戻し交配することにより、新たに糸球体腎炎、血管炎の位置的候補遺伝子として *Cd59a* を見出した。CD59 は、補体の膜侵襲複合体 (MAC) を阻害する GPI-anchored glycoprotein で、以前能勢、岡田らは、ヒト CD59 が糸球体の血管内皮細胞に発現していることを明らかにしており、また、近年、*Cd59a* のノックアウトマウスで糸球体腎炎が増悪する事実が示されている。これらの事実からすれば CD59 は糸球体に沈着した免疫複合体が結合する補体の過度の活性化を抑制していると考えられる。それ故、MSM マウスアレルを有する *Cd59a* は、恒常的に *Cd59a* の発現量が高く、その結果、MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> では糸球体に沈着した免疫複合体に誘導される補体の活性化を制御する結果、糸球体腎炎の進行を抑制していると考えられる。

一方、今回血管炎の発症においても *Cd59a* が関与していることを見出したが、この事実は、MRL/lpr マウスの血管炎の発症機序を再評価する上で重要である。即ち、MRL/lpr マウスにおける血管炎は少なくともその初期像では免疫複合体の沈着を伴わず、完成した病像では肉芽腫性血管炎を示すところから、従来、この血管炎は、免疫複合体の沈着に伴う補体の活性化に誘導される血管炎とは異なる機序が考えられてきた。しかしながら、今回の事実は、この血管炎病像が完成するプロセスにおいて、補体の活性化が重要であること、あるいは最近注目されてきた *Cd59a* の補体制御因子としての機能以外の機能、例えば T、NK 細胞の活性化などの免疫応答における制御機能が、血管炎の発症に係わっている可能性が示唆される。

## 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 9 件)

1. Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y, Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H, Sawasaki T, Endo Y, Nose M. Evaluating the role of rheumatoid factors in the development of rheumatoid arthritis in a mouse model with a newly established ELISA system. *Tohoku J Exp Med*. 査読有. 220: 199-206, 2010.
2. Matsuoka K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T. Simple screening method for autoantigen proteins using the N-terminal biotinylated protein library produced by wheat Cell-Free synthesis. *J Proteome Res*. 査読有. 9: 4264-4273, 2010.
3. Soga Y, Komori H, Miyazaki T, Arita N, Terada M, Kamada K, Tanaka Y, Fujino T,

Hiasa Y, Matsuura B, Onji M, Nose M. Toll-Like receptor 3 signaling induces chronic pancreatitis through the Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Tohoku J Exp Med*. 査読有. 217(3): 175-184, 2009.

4. Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Ohashi Y, Nose M. Genetic dissociation of dacryoadenitis and sialadenitis in a sjögren's syndrome mouse model with common and different susceptibility gene loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 50: 3257-3265, 2009.

5. Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Lei J, Miyazaki T, Yoshie O, Nose M, Yasukawa M. Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. *Gene Ther*. 査読有. 15: 171-182, 2008.

6. Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, Shimamori K, Ishii A, Sugai S, Kotaki H, Sudo K, Nose M, Iwakura Y. Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nature medicine*. 査読有. 14: 176-180, 2008.

7. Mori S, Tanda N, Ito R. M, Oishi H, Tsubaki T, Komori H, Zhang MC, Ono M, Nishimura M, Nose M. Novel recombinant congenic mouse strain developing arthritis with enthesopathy. *Pathology Int*. 査読有. 58: 407-414, 2008.

8. Saiga K, Yoshida M, Nakamura I, Toyoda E, Tokunaka K, Morihashi H, Abe F, Nemoto K, Nose M. Evaluation of the ameliorative effects of immunosuppressants on crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Int Immunopharmacol*. 査読有. 8: 1183-1189, 2008.

9. Zhang MC, Furukawa H, Tokunaka K, Saiga K, Date F, Owada Y, Nose M, Ono M. Mast cell hyperplasia in the skin of *Dsg4*-deficient hypotrichosis mice, which are long-living mutants of lupus-prone mice. *Immunogenetics*. 査読有. 60: 599-607, 2008.

[学会発表] (計 11 件)

1. Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Nose M. : Common and different gene loci susceptible to sialoadenitis and dacryoadenitis in a sjögren's syndrome mouse model. 14th International Congress of Immunology, Aug. 23-27, 2010, Kobe, Japan.
2. Tanaka Y, Fujino T, Terada M, Ito M,

Shudo M, Okabe M, Nose M. : A novel mouse model for primary focal segmental glomerulosclerosis developing associated with insertional mutagenesis by transgene. 14th International Congress of Immunology, Aug. 23-27, 2010, Kobe, Japan.

3. Miyazaki T, Tanaka Y, Kurata M, Ono M, Nose M. : Allelic polymorphism of murine osteopontin implicates functional differences in antigen presentation by dendritic cells. 14th International Congress of Immunology, Aug. 23-27, 2010, Kobe, Japan.

4. 宮崎龍彦、田中ゆき、小野栄夫、能勢真人. オステオポンチン蛋白多型による樹状細胞抗原提示能修飾の新たなメカニズム。第 98 回日本病理学会総会、京都、2009. 5. 1-3

5. 能勢真人. 血管炎に関する基礎研究の進歩。第 50 回日本脈管学会総会、東京、2009. 10. 29-31

6. 能勢真人. 膠原病のポリジーンネットワーク。第 37 回日本臨床免疫学会総会、東京、2009. 11. 13-15

7. Tanaka Y, Soga Y, Nose M. A simple capture ELISA for recombinant proteins synthesized in cell-free system: Genetic dissociation of rheumatoid factors from arthritis in MRL/lpr mice. 第 39 回日本免疫学会総会、大阪、2009. 12. 2-4.

8. Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Nose M. : Common and different gene loci susceptible to sialoadenitis and dacryoadenitis in a sjögren's syndrome mouse model. 6th International Congress on Autoimmunity, Sep. 10- 14, 2008, Porto, Portugal.

9. Soga Y, Komori H, Terada T, Miyazaki T, Nose M. : Genetic basis of autoimmune pancreatitis induced by the stimulation through the toll-like receptor 3 signaling. 6th International Congress on Autoimmunity, Sep. 10- 14, 2008, Porto, Portugal.

10. 小森浩章、曾我美子、能勢真人. : 自然免疫系刺激により誘導される自己免疫性膵炎の疾患感受性遺伝子解析、第 97 回日本病理学会総会、金沢、2008. 5. 15-17 (日本病理学会会誌第 97 巻第 1 号 p 169.)

11. 能勢真人. : 血管炎発症のポリジーンネットワークモデル、第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 17 回国際リウマチシンポジウム、札幌、2008. 4. 20-23.

[図書] (計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕  
該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

能勢 眞人 (NOSE MASATO)  
愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授  
研究者番号：70030913

### (2) 研究分担者

宮崎 龍彦 (MIYAZAKI TATSUHIKO)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80239384

曾我 美子 (SOGA YOSHIKO)  
愛媛大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10549182

### (3) 連携研究者

小野栄夫 (ONO MASAO)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20302218