

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591450

研究課題名(和文) SLE 発症をもたらす枢軸的異常シグナル経路の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of SLE: Linkage Analysis of Critical Signaling Pathways

研究代表者

西村 裕之(NISHIMURA, Hiroyuki)

桐蔭横浜大学・医用工学部・教授

研究者番号：60189313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：我々は全身性エリテマトーデス(SLE)モデル(NZB x NZW) F1 マウスにおいて、末梢性免疫寛容の遺伝的欠損が、親系 NZB 系マウスの第1染色体上の抑制性Fc受容体 Fcgr2b 遺伝子と、これに密接に連鎖する SLAM 遺伝子群の epistatic な相互作用によって規定されていることを明らかにした。これらの NZB系由来の多型遺伝子群は、双方の親系由来の主要組織適合遺伝子複合体(MHC) class II遺伝子とともに、このマウスの獲得免疫系における自己寛容破綻・自己反応性クローン選択、さらには自己抗体の親和性成熟を規定していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In contrast to normal mice, autoimmune-prone New Zealand Black (NZB) mice are defective in susceptibility to tolerance induced by deaggregated bovine gamma globulin (DBGG). Susceptibility loci for this defect were examined by genome-wide analysis using F2 intercross of non-autoimmune C57BL/6 (B6) and NZB mice. One NZB locus on the telomeric chromosome 1, designated Dit (Defective immune tolerance)-1, showed a highly significant linkage. This locus overlapped with a locus coding for polymorphic Fcgr2b and Slam family genes. The similar defective tolerance was observed in Fcgr2b-deficient mice with autoimmune-type Slam family genes, but not in Fcgr2b-deficient mice with normal C57BL/6-type Slam family genes, indicating that epistatic interaction of both polymorphic genes is involved. Thus, this epistatic interaction is likely playing a pivotal role in the genetic predisposition to autoimmunity in NZB and related autoimmune-prone strains including SLE model (NZB x NZW) F1 mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス SLE 全身性自己免疫疾患 疾患感受性遺伝子 遺伝連鎖解析 QTL解析 多因子疾患 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は典型的な全身性自己免疫疾患であり、多数の遺伝的個性が集積して疾患感受性が形成された上でなんらかの環境因子の関与により発症がもたらされる複雑な多因子疾患である。SLEでは免疫系の自己寛容が破綻し、抗体の親和性成熟をもたらす機序が自己抗体産生において作動する。さらに自己反応性のB細胞およびTh細胞クローンに帰せられるべき自己抗体産生が、広汎なCD4陽性T細胞レパートリーの自発的活性化と機能異常を背景として起こることが特徴である。

New Zealand Black(NZB)系マウスはB1細胞の異常な増殖と分化を示し、自己免疫性溶血性貧血を自然発症する。このマウスと、表現型においては正常であるNew Zealand White(NZW)系マウスを交配して得られる(NZB x NZW)F1マウスは、ヒトSLEに酷似した病態を示すSLEモデルとして知られている。我々はこのマウスの遺伝連鎖解析を通じて、B1細胞の機能異常とCD4陽性T細胞の機能異常が、それぞれ第1染色体テロメアに位置する抑制性Fc受容体遺伝子*Fcgr2b*と第17番染色体上のMHC(H-2)遺伝子群に支配されていること、またこれらの相乗作用がグループ腎炎等の重篤な自己免疫病態表現を規定していることを明らかにしてきた。MHC多型の関与については、このマウスの双方の親系由来のH-2のヘテロ接合性が重要であり、ヘテロ接合性にユニークなmixed-haplotype MHC class II分子がこのマウスの自己反応性T細胞クローンの発生に重要な役割を担っていることが示唆される。しかし、このモデルのみならずヒトSLEにおいては特定のB細胞あるいはTh細胞クローンの選択的な増殖を検出することは希である。このモデルではSLE病態の亢進においてTh細胞レパートリーの構成は変動しないが、むしろ広汎なリンパ球サブセットに及ぶ表現型と機能異常が特徴であり、リンパ系細胞における内在性レトロウィルスゲノムの活動が顕著である。このマウスのSLE発症機序を明らかにするためには、獲得免疫系において自己反応性のTh細胞クローン選択とB細胞クローン選択に関する遺伝支配と、抗原非特異的なレベルでの免疫系の異常な機能亢進に関する遺伝支配とその因果関係を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では免疫系のシグナル伝達に関する先験的情報と、自己免疫応答を基礎づけるcomponent phenotypeを対象とする量的遺

伝学の方法により、自己寛容破綻と自己反応性細胞クローン選択の遺伝子支配、獲得免疫系の異常な機能亢進の遺伝支配、さらに双方の因果関係を明らかにし、SLE発症をもたらす免疫系の枢軸的異常シグナル経路の本質を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、これまで我々が進めてきた自己免疫病態表現を基礎づけている量的な表現型、component phenotypeに対する遺伝連鎖解析の方法¹⁾を発展させるとともに、mRNA発現プロファイルを量的表現型として連鎖解析を行う新しい研究法(分子表現型連鎖解析)を導入し、免疫系のシグナル伝達機構に関する情報を利用し、SLE発症機序に枢軸的役割を果たしている異常シグナル経路の本質を解明する。

4. 研究成果

免疫寛容原DBGGを用いた遺伝連鎖解析²⁾

超遠心分離によって微細な凝集物を除去した外来蛋白質抗原をマウスに投与すると、抗原に特異的な免疫寛容を誘導することができることは古くから知られている。特に超遠心分離によって精製したウシγグロブリン(DBGG)によってモデルは末梢性免疫寛容モデルとして研究されている。さらにNZB系マウスは、DBGGによって免疫寛容が見られないことが報告されている。そこで我々は、DBGGを寛容原とする末梢性免疫寛容不全を自己免疫病態を基礎づけるcomponent phenotypeとして注目し、NZB系マウスの免疫寛容誘導能の遺伝的欠如を規定する遺伝的背景を明らかにすることを目的とした。

図1は、正常C57BL/6(B6)系、自己免疫疾患モデルNZB系、(B6 x NZB)F1 hybrid系および(B6 x NZB)F2 intercrossマウス(n = 221)において、DBGGによる免疫寛容誘導能を比較した結果を示す。DBGGの腹腔内投与によって正常B6系マウスでは、ウシγグロブリン(BGG)をフロイントの完全アジュバントを用いて皮下投与しても抗体産生が見られなくなるのに対して、NZB系ではこのようなDBGGによる免疫寛容誘導が起こらないことが確認された。(B6 x NZB)F1 hybridマウスの表現型はB6マウスと同等であり、F2 intercrossマウスでは、B6型、NZB型さらにその中間の表現型を示すものも含め、多様な表現型が観察された。

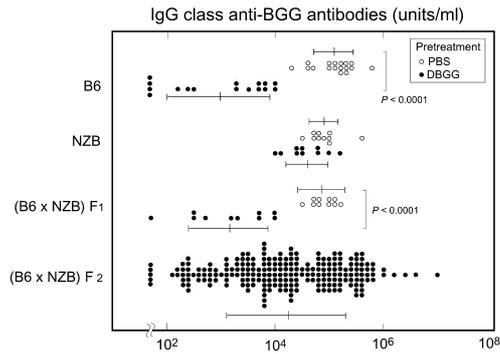


図 1: 正常 B6 系、自己免疫 NZB 系及び (B6 x NZB) F1 系、(B6 x NZB) F2 intercross マウスにおける免疫寛容誘導実験結果

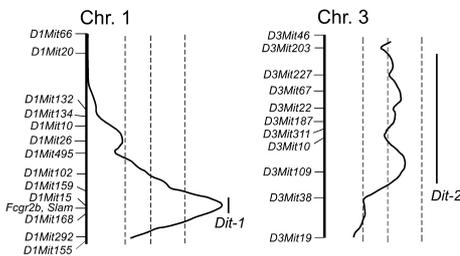


図 2: NZB 系の免疫寛容誘導能欠如を規定する遺伝子座に関する遺伝連鎖解析の結果

そこで、マウスゲノム DNA に散在するマイクロサテライト DNA 多型を遺伝子マーカーとして利用し、NZB 系マウスの免疫寛容不全を規定する遺伝子座を、QTL (Quantitative Trait Loci) マッピングにより検索した。

図 2 はマウス第 1 染色体及び第 3 染色体上に示された責任遺伝子座に関するロッドスコア曲線である。第 1 染色体上の遺伝子マーカー *D1Mit15* にピークロッドスコア 7.20 が示され、第 3 染色体においては、*D3Mit109* において、ロッドスコア 4.38 が示された。これらの遺伝子座が示す連鎖はゲノムワイドの連鎖解析における有意水準を上回っているため、これらの遺伝子座をそれぞれ *Dit-1* 及び *Dit-2* と命名した。*Dit-1* はすでに報告されている NZB 系マウス由来の自己免疫疾患感受性遺伝子座と一致しており、責任遺伝子の候補は抑制性 *Fcgr2b* 及び密接に連鎖する *Slam* 遺伝子群である。そこで、*Slam* 遺伝子多型に関する遺伝的背景について、正常 B6 型と自己免疫系と相同の 129 系型の、ふたつの異なる遺伝的背景を持つ *Fcgr2b* 欠損マウスについて、その表現型を比較した (図 3A)。その結果、129 系型の SLAM 遺伝子多型を持つ *Fcgr2b* 欠損マウスは免疫寛容能の欠損を示すのに対し、B6 系型の SLAM 遺伝子多型を持つ *Fcgr2b* 欠損マウスは正常な表現型を示すことが明らかとなった。この事実は、*Dit-1* 遺

伝子座によって規定される自己免疫疾患感受性に、*Fcgr2b* 遺伝子多型と、それに密接に連鎖する *Slam* 遺伝子族ハプロタイプとの epistatic な相互作用が関与していることが示唆される。

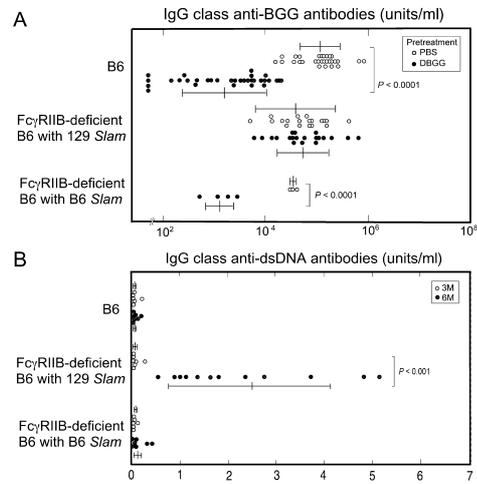


図 3: SLAM 遺伝子多型に関する遺伝的背景の異なるふたつの $Fc\gamma RIIB$ 欠損マウスの示す表現型の比較 A: 抗ウシγグロブリン抗体価。B: 自己抗体 (抗二重鎖 DNA 抗体) の産生。

免疫寛容原 PEG-OVA を用いた遺伝連鎖解析超遠心分離によって精製したウシγグロブリン (DBGG) は古くから用いられた免疫寛容原であるが、抗原タンパク質として基本的に不均一であり、しかも Fc フラグメントを含むため、寛容原のもたらす効果が抗原特異的な免疫担当細胞のみに及ぶものか、あるいは Fc 受容体を発現した広い範囲の細胞に及ぶ現象であるか不明であり、結果の解釈を複雑なものとする。そこで、このような問題を含まない免疫寛容原として、ポリエチレングリコール修飾卵白アルブミン (PEG-OVA) を選び、NZB 系において規定される末梢免疫寛容不全の遺伝支配を調べた。

ポリエチレングリコールは非免疫原性の合成高分子であり、これをリジン残基を介して抗原タンパク質表面に結合させると、このコンジュゲートは抗体との反応性を失って、抗原タンパク質として抗体産生を惹起する能力を失うのみならず、抗原タンパク質に特異的な免疫寛容を誘導する能力を獲得する。抗原タンパク質として、Th 細胞の認識するエピトープが明らかにされている卵白アルブミンを用いれば、抗原特異的な Th 細胞がこの寛容原を認識した際にどのような応答をするかを詳細に調べることが可能である。また、DBGG と異なり Fc フラグメントを持たないので、その免疫寛容原性において Fc 受容体を介した非特異的な効果の関与を排除することができる。我々は、OVA 特異的な transgenic TCR を持つ OT-II 系マウスを用いて、PEG-OVA によって誘導される OVA 特異的な末梢免疫寛容が、OVA 特異的な Th 細胞クロー

ンの clonal anergy、あるいはそのアポトーシスを背景としてみられる現象であり、PEG による化学修飾によって顕著に向上した PEG-OVA の血中安定性によってもたらされる現象であることを報告している²⁾。自己免疫系である NZB マウスは PEG-OVA によっても抗原特異的免疫寛容は誘導されず、PEG-OVA の前投与は免疫寛容を誘導しないことが示された。さらに (B6 x NZB)F2 intercross マウスにおける遺伝連鎖解析の結果、DBGG を寛容原とした場合と同様、第 1 染色体と第 3 染色体上に責任遺伝子の存在が示された。図 4 は、SLAM 遺伝子多型について異なる遺伝的背景を持つ *Fcgr2b* 欠損マウスについて、PEG-OVA による免疫寛容誘導を比較した結果である。PEG-OVA を免疫寛容原として用いても、DBGG によって観察されたのと同様の epistatic な遺伝子間相互作用が観察された。

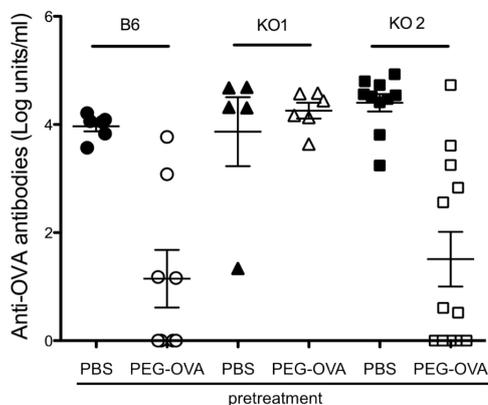


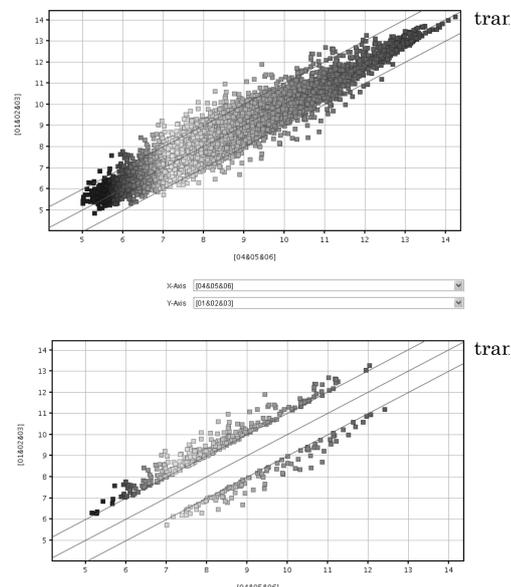
図 4 : SLAM 遺伝子多型を異にする *FcγRIIB* 欠損マウスの示す末梢トレランス誘導。K01: SLAM 遺伝子 129 型, K02: SLAM 遺伝子 B6 型
我々は、これまでの (NZB x NZW)F1 マウスの SLE 病態に着目した遺伝連鎖解析の成果に基づき、このマウスの SLE 発症には、異なる二つの多遺伝子支配 (multigenic control) が関与するという作業仮説を考えている。

第 1 は NZB 系マウス第 1 番染色体テロメア近傍領域の抑制性 Fc 受容体 (*fcgr2b*) 遺伝子を中核とする多遺伝子支配であり、B1 細胞の異常な増殖と分化に関与する想定していたが、今回の研究により、*Fcgr2b* 遺伝子多型は密接に連鎖する SLAM 遺伝子群とともに risk haplotype を形成し、NZB マウスの末梢性免疫寛容の破綻を規定することが明らかとなった。PEG-OVA を寛容原として用いた今回の研究により、この遺伝子間相互作用が抗原特異的な免疫寛容の破綻に及んでいることが示された。

第 2 は Th 細胞の自己寛容破綻をもたらす遺伝支配であり、第 17 番染色体上の主要組織適合遺伝子複合体 (*MHC*, *H-2 complex*) のヘテロ接合性が中心的役割を果たしている。(NZB x NZW)F1 マウスでは加齢に伴い、広い

範囲の CD4 陽性 T 細胞レパートリーが自発的活性化を示し、早期活性化マーカーである CD69 を表現するようになる。この現象はヒト SLE においても活動期に見られる現象として知られ、全身的な *Ifn-α* 産生に伴う CD4 陽性 T 細胞の二次リンパ組織からの輸出阻止に伴う現象であると報告されている (Shiow LR et al. *Nature* 440: 540 2006)。我々は (NZB x NZW)F1 マウスにおいて、この現象が自己抗体のクラススイッチと親和性成熟をもたらす自己反応性 Th 細胞の出現に伴う現象であり、MHC のヘテロ接合性に拘束されるとともに、第 12 番染色体セントロメア近傍の遺伝子領域の支配を受けていることを明らかにしている。

(NZB x NZW)F1 系マウスの SLE 発症に伴う脾臓細胞



胞における遺伝子発現異常の網羅的解析

図 5 : SLE 発症前 (2 か月齢 n = 3) と発症後 (8 か月齢 n = 3) の (NZB x NZW)F1 マウスの脾臓細胞を対象として、遺伝子転写産物の網羅的解析を行った結果

本研究では、これまで我々が進めてきた自己免疫病態を基礎づける component phenotype に対する遺伝学的研究の成果を発展させ、mRNA 発現プロファイルを量的表現型として連鎖解析を行う新しい研究法 (分子表現型連鎖解析) を導入した。図 5 は、SLE モデル (NZB x NZW)F1 マウスの発症前 (2 か月齢) と重篤な SLE 病態を示した後 (8 か月齢) について、脾臓細胞における mRNA プロファイリングを行い、発症に伴うプロファイルの変化を検索した結果である。表 1 は、mRNA の転写量において 4 倍以上の変化が見られた遺伝子産物についてまとめて示す。

| genbank | genesdescription | genesymbol | Fold Change |
|----------|--|-----------------|-------------|
| BC019567 | syncollin | <i>Syncn</i> | 5.5 |
| AB009661 | trypsin 5 | <i>Try5</i> | 5.4 |
| AF499613 | Fc receptor, IgG, low affinity IV | <i>Fcgr4</i> | 5.1 |
| BC028761 | regenerating islet-derived 1 | <i>Reg1</i> | 4.8 |
| AF010254 | serine (or cysteine) peptidase inhibitor | <i>Serping1</i> | 4.8 |
| AJ297969 | TCR associated transmembrane adaptor 1 | <i>Trat1</i> | -4.5 |
| | apolipoprotein L 10a | <i>Apol10a</i> | 4.5 |
| BC116916 | death associated protein-like 1 | <i>Dap11</i> | -4.4 |
| BC057543 | lymphoid enhancer binding factor 1 | <i>Lef1</i> | -4.4 |
| AB005909 | deleted in malignant brain tumors 1 | <i>Dmbt1</i> | 4.1 |
| U33169 | carboxyl ester lipase | <i>Ce1</i> | 4.1 |

表 1: SLE モデル (NZB x NZW) F1 マウスの発症前 (2 か月齢) と発症後 (8 か月齢) との比較において、転写産物の量に顕著な差がみられた遺伝子群

T 細胞の免疫応答に係わる遺伝子群、ケモカインとその受容体、Fc 受容体遺伝子、アポトーシス制御に係わる遺伝子等において、転写産物の量に顕著な変化が見られた。近年のヒト SLE 研究において、I 型インターフェロンによって発現が制御される "Interferon signature" と呼ばれる遺伝子群についての発現プロファイルの変化が注目を集めている。Interferon signature に属する遺伝子群の発現プロファイルについて、どのような遺伝支配を受けているのかについて現在解析を進めている。これら量的表現型に着目した遺伝連鎖解析、さらに免疫系のシグナル経路に関するアプリオリな知識情報を総合的に用いれば、SLE 発症を規定する枢軸的異常シグナル経路の本質を明らかにすることができると考えられ、現在さらに解析を勧めている。

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 5 件)

- Obata M, Ohtsui M, Iida Y, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Genome-wide Genetic Study in Autoimmune Disease-Prone Mice. *Methods in Molec Biol* 2013.142: 111-41 doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4_13.PMID: 24706281
- Obata M, Fujii T, Ohtsui M, Kodera Y, Nishimura H. Peripheral tolerance of antigen-specific Th cells induced with polyethylene glycol-conjugate of protein antigen. *Open J Immunol* 2013 **3**: 62-70.
- Kawano S, Lin Q, Amano H, Kaneko T, Nishikawa K, Tsurui H, Tada N, Nishimura H, Takai T, Shirai T, Takasaki Y, Hirose S. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice. *Eur J Immunol*. 2013 **43**: 770-8. doi: 10.1002/eji.201243057.
- Sato-Hayashizaki A, Ohtsui M, Lin Q, Hou R, Ohtsui N, Nishikawa K, Tsurui H, Sudo K, Ono M, Izui S, Shirai T, Takai T, Nishimura H, Hirose S.

Presumptive role of 129 strain- derived *Sle16* locus in rheumatoid arthritis in a new mouse model with Fcγ receptor type IIb-deficient C57BL/6 genetic background. *Arthritis Rheum*. 2011 **63** :2930-8. doi: 10.1002/art.30485

- Fujii T, Hou R, Sato-Hayashizaki A, Obata M, Ohtsui M, Ikeda K, Mitsui K, Kodera Y, Shirai T, Hirose S, Nishimura H. Susceptibility loci for the defective foreign protein-induced tolerance in New Zealand Black mice: implication of epistatic effects of *Fcgr2b* and *Slam* family genes. *Eur J Immunol*. 2011 **41**:2333-40. doi: 10.1002/eji.201141552.

[学会発表] (計 5 件 : 詳細略)

[図書] (計 0 件)

[特許申請等] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐蔭横浜大学医用工学部 (教授)
西村 裕之
研究者番号 : 60189313

(2) 研究分担者

桐蔭横浜大学医用工学部 (専任講師)
大辻 希樹
研究者番号 : 30398664

(3) 連携研究

順天堂大学医学部 (准教授)
広瀬 幸子
研究者番号 : 00127127