

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791111

 研究課題名（和文） 改良型モデル抗DNA抗体ノックイン・マウスにおける
自己反応性B細胞制御メカニズム

 研究課題名（英文） Regulation of autoreactive B cells in an anti-DNA antibody-
knock-in mouse model

研究代表者

吉藤 元 (YOSHIFUJI HAJIME)

京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・助教

研究者番号：20422975

研究成果の概要（和文）：全身性エリテマトーデス（SLE）について、自己反応性リンパ球のみを特異的に制御する治療法の開発が望まれる。SLEモデル「抗DNA抗体遺伝子ノックイン・マウス」を用い、自己反応性B細胞がどのように制御されているかを解析した。ホモ接合（Homo）型の脾臓B細胞数は著明に減少しており、骨髄で成熟が抑制されていた。Homo型のB細胞は脾臓において辺縁帯に高い割合で分布する傾向を認めた。Homo型のB細胞は野生型に比べIgM・IgDの発現が低下しておりアナジー（無反応化）に陥っていると考えられた。本モデルのさらなる検討によりSLEの病態解析につながる。

研究成果の概要（英文）：A therapy that inhibits only autoreactive lymphocytes is desirable for the treatment of systemic lupus erythematosus (SLE). We analyzed an SLE model ‘anti-DNA-antibody-knock-in mouse’ to know how autoreactive B cells are regulated. The homozygotes’ splenic B cells were significantly decreased, and their maturation was inhibited in the bone marrow. Homo’s B cells tended to move to the marginal zone in their spleens. Homo’s B cells showed low expression levels of IgM/IgD, and were supposed to be regulated by anergy. Further analyses will elucidate the pathophysiology of SLE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：膠原病学

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス（SLE）は多臓器をおかす難治性慢性疾患で、治療薬はステロイドと免疫抑制薬であるが、特異的治療ではないため目的以外の好ましくない副作用（易感染性、骨粗鬆症等）をきたし問題となる。SLEの病因・病態を特異的に抑制する治療法が望まれている。

(2) SLE患者では抗DNA抗体などの自己抗体を血中に認めるが、健常者では「自己抗体産

生B細胞」は「自己寛容系＝自己反応性監視システム」により排除・抑制されている。

(3) SLEにおいて「自己抗体産生B細胞」がなぜ「監視システム」を逃れるかを明らかにするため、実績のあるSLE動物モデル「抗DNA抗体遺伝子トランスジェニック・マウス＝R4A-Tgマウス」を用いて研究してきた（文献1-3）。今回、R4A-Tgマウスを改良した「抗DNA抗体遺伝子ノックイン・マウス＝R4A-Kiマウス」を開発した。R4A-Kiマウスは、抗

DNA 抗体重鎖の可変領域 (Fab) のみを V-D-J 遺伝子領域に遺伝子ターゲティングにより挿入しているため、各サブクラス (IgM→IgD→IgG) の抗 DNA 抗体を発現することができ、より生理的な SLE モデルである。

2. 研究の目的

改良された SLE モデルである R4A-Ki マウスの野生型・ヘテロ接合 (Hetero) 型・ホモ接合 (Homo) 型の 3 者を比較するという手法を用いて、生体が「自己抗体産生 B 細胞」をどのように抑制しているのか、明らかにする。

3. 研究の方法

(1) R4A-Ki マウスの表現型を確認した。4 週齢の仔マウスの尾部を採取し DNA を抽出、ノックインした抗 DNA 抗体 (R4A) 遺伝子を PCR 法により増幅し同定した。Homo 型と野生型の違いは、正常 JH1 遺伝子を PCR 法により増幅して鑑別する。すなわち、正常 JH1 遺伝子が両アリルより完全に欠失していれば Homo 型であり、R4A-PCR 陽性かつ正常 JH1-PCR 陽性であれば Hetero 型である。

(2) 遺伝子導入した抗 DNA 抗体の発現を確認するために、8 週齢の R4A-Ki マウスより採血し、血中抗 DNA 抗体を ELISA 法により測定した。血清 IgG も ELISA 法により測定した。

(3) R4A-Ki マウスの B 細胞分化を解析するために、9 週齢の R4A-Ki マウスの両大腿骨を採取し骨髓細胞を得て、フローサイトメトリーにより、(a) B220 陽性 IgM 陰性 CD43 陽性プロ B 細胞、(b, c) B220 陽性 IgM 陰性 CD43 陰性プレ B 細胞 (大型プレ B 細胞と小型プレ B 細胞は FSC で区別)、(d) B220 陽性 IgM 陽性未熟 B 細胞、(e) B220 強陽性 IgM 陽性成熟 B 細胞の数をカウントした。9 週齢の R4A-Ki マウスの脾臓を採取し、重量を測定し、フローサイトメトリーにより、(a) AA4.1 陽性 CD21 陰性 CD23 陰性 T1-B 細胞、(b) AA4.1 陽性 CD21 陽性 CD23 陽性 T2-B 細胞、(c) AA4.1 陰性 CD21 陽性 CD23 陽性濾胞 B 細胞、(d) AA4.1 陰性 CD21 強陽性辺縁帯 B 細胞の数をカウントした。T1-B 細胞、T2-B 細胞、濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞の 4 つのゲートに分けて膜表面 IgM と IgD の蛍光強度を測定した。

(4) B 細胞が正常に分化しているかを確認するために、9 週齢の R4A-Ki マウスの脾臓を凍結し、薄切切片を作成し、抗 B220, 抗 CD3, 抗 MOMA-1 抗体 (辺縁帯マクロファージを染める) による免疫染色により濾胞構造を解析した。次に、抗 IgM, 抗 IgD 抗体による免疫染色を行い、B 細胞表面の免疫グロブリン発現を調べた。

(5) B 細胞の機能を調べるため、フローサイトメトリーを用いたカルシウム流入試験を行った。11 週齢の R4A-Ki マウスの脾臓を採取し、indo-1 色素を添加して培養し、表面マーカーを B220, AA4.1, CD21, CD23 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーにかけ直前に抗 IgM および抗 IgD 抗体を添加して、カルシウム流入反応を 3 分間観察した。

4. 研究成果

(1) R4A-Ki マウスの Hetero 型の雌雄同士の交配により、野生型:Hetero 型:Homo 型=1:2:1 の割合で仔マウスが生まれ、メンデルの法則に従っていた。性比も雄:雌=1:1 であり偏りが無かった。R4A-Ki マウスの遺伝子変異は発生期に特段の障害をきたさないことを確認できた (表 1)。

表 1. R4A-Ki マウスの Hetero 型の雌雄同士の交配による仔マウスの遺伝子型

	Number (%)	Expected
WT	33 (23%)	25%
Hetero	72 (50%)	50%
Homo	38 (27%)	25%
Total	143 (100%)	100%

(2) 当初、Homo 型が最多量の抗 DNA 抗体を産生すると予想していた。しかし、Hetero 型が有意に高い血中抗 DNA 抗体価を示したのに比べ、意外にも Hetero 型では抗 DNA 抗体をまったく認めなかった (図 1)。その原因を調べるために、R4A-Ki マウスの血清 IgG を測定したところ、Homo 型では IgG が産生されていないことがわかった。自己抗体産生 B 細胞が「監視システム」により抑制されていることが示唆された。

(3) Hetero 型の B 細胞が分化段階で排除されている可能性が考えられたため Hetero 型の脾臓を調べたところ、脾臓重量が野生型に比べ有意に減少していた (図 2)。フローサイトメトリーにより脾臓 B220 陽性 B 細胞をカウントしたところ、野生型に比べ著明に減少していた。R4A-Ki マウスの骨髓を採取し、プロ B 細胞、大型プレ B 細胞、小型プレ B 細胞、未熟 B 細胞、成熟 B 細胞の数をカウントしたところ、Hetero 型では、小型プレ B 細胞の段階まで

は野生型と著変ないが、未熟 B 細胞の段階から著明に細胞数が減少していた。すなわち、未熟 B 細胞の初期段階でチェックポイントがあり、自己反応性 B 細胞が「細胞死」の機序により排除されていると考えられた。

図 1. R4A-Ki マウスの血清抗 DNA 抗体価

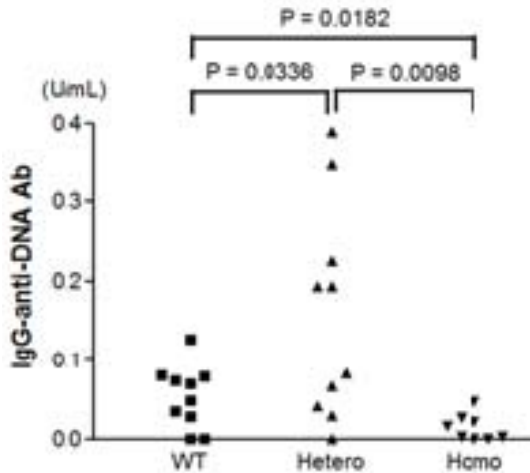
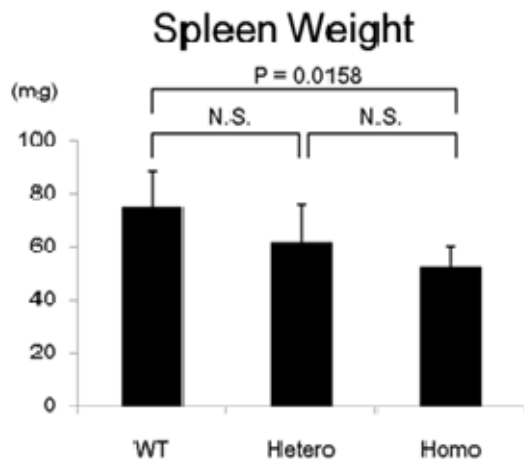


図 2. R4A-Ki マウスの脾臓重量

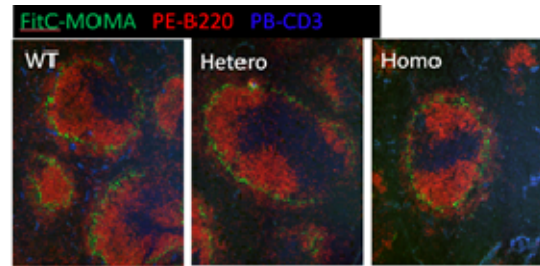


(4) 骨髄での排除をまぬがれた抗 DNA 抗体産生 B 細胞が脾臓にたどりつくと考えられるが、どの分画の B 細胞が脾臓に移行しているのかを解析した。脾臓組織の免疫染色を行ったところ、意外にも Homo 型の脾臓では濾胞構造 (T 細胞領域、濾胞 B 細胞領域、辺縁帯マクロファージ、辺縁帯 B 細胞領域) が正常に保たれていた。ただし、Homo 型の濾胞はサイズが小さい傾向にあった (図 3)。

(5) 次に Homo 型の脾臓を採取し、T1-B 細胞、T2-B 細胞、濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞の数をカウントした。T1-B 細胞、T2-B 細胞、濾胞 B 細胞の絶対数は野生型に比べ著明に少なかったが、辺縁帯 B 細胞の絶対数は Homo 型で

も野生型と同等に保たれていた。各分画 B 細胞の割合を調べたところ、T1-B 細胞、T2-B 細胞、濾胞 B 細胞の割合は野生型と著変ないが、辺縁帯 B 細胞のみが著明に増加していた。以上より、骨髄での排除をまぬがれた抗 DNA 抗体産生 B 細胞の多くは辺縁帯 B 細胞に分化していると考えられた。過去の文献でも辺縁帯 B 細胞が自己免疫に関わるとされており興味深い (文献 1, 4-5)。

図 3. R4A-Ki マウスの脾臓の免疫染色



(6) R4A-Ki マウスの脾臓の B 細胞の性質を調べるため、脾臓組織の免疫染色により B 細胞表面の免疫グロブリン発現を調べた。Homo 型の B 細胞表面に IgM を認め、R4A-Ki マウスで免疫グロブリンが発現していることを確かめることができた。しかし、野生型に比べ Homo 型では IgD 陽性 B 細胞が著明に減少していた。次に、フローサイトメトリーで T1-B 細胞、T2-B 細胞、濾胞 B 細胞、辺縁帯 B 細胞の 4 つのゲートに分けて IgM と IgD の蛍光強度を解析したところ、T1-B 細胞の IgM 発現が低下し、すべての B 細胞分画において IgD 発現が低下していた。

(7) R4A-Ki マウスの脾臓 B 細胞の機能を調べるため、フローサイトメトリーを用いたカルシウム流入試験を行った。細胞膜表面 IgM または IgD の架橋刺激によって起こるカルシウム流入反応を観察したところ、野生型および Hetero 型の B 細胞では正常なカルシウム流入が観察されたが、Homo 型の T1-B 細胞は IgM 架橋刺激への反応が低下し、Homo 型の辺縁帯 B 細胞は IgD 架橋刺激への反応が低下していた。Homo 型の B 細胞がアナジー (無反応化) に陥っている可能性が考えられた。

(まとめ) R4A-Ki マウスの Homo 型の脾臓 B 細胞数は著明に減少していた。骨髄の各分化段階の B 細胞をカウントしたところ、小型プレ B 細胞から未熟 B 細胞へと分化する段階で成熟が抑制されていた。Homo 型の B 細胞は、脾臓において辺縁帯に高い割合で分布する傾向を認め、自己反応性細胞と辺縁帯の関連が示唆された。R4A-Ki マウスの B 細胞の表現型を調べたところ、Homo 型の B 細胞では野生型に比べ、IgM および IgD の発現が低下してい

た。R4A-Ki マウスの B 細胞の機能を調べるためカルシウム流入試験を行ったところ、Homo 型の B 細胞は刺激への反応が低下しており、アナジー（無反応化）に陥っている可能性が考えられた。本モデルにおいて自己反応性 B 細胞が排除・抑制されているメカニズムの一端がわかった。さらに検討することにより SLE の病態解析につながることを期待される。

〔参考文献〕

- 1) Grimaldi CM, Michael DJ, Diamond B. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *J Immunol* 167:1886-90, 2001
- 2) Grimaldi CM, Jeganathan V, Diamond B. Hormonal regulation of B cell development: 17 beta-estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J Immunol* 176:2703-10, 2006
- 3) Kawabata D, Venkatesh J, Ramanujam M, Davidson A, Grimaldi CM, Diamond B. Enhanced selection of high affinity DNA-reactive B cells following cyclo phosphamide treatment in mice. *PLoS One* 5:e8418, 2010, DOI: 10.1371/journal.pone.0008418
- 4) Heltemes LM, Manser T. Level of B cell antigen receptor surface expression influences both positive and negative selection of B cells during primary development. *J Immunol* 169:1283-92, 2002
- 5) Heltemes-Harris L, Liu X, Manser T. An antibody VH gene that promotes marginal zone B cell development and heavy chain allelic inclusion. *Int Immunol* 17:1447-61, 2005

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 3 件）

- 1) Venkatesh J, Yoshifuji H, Kawabata D, Chinnasamy P, Stanevsky A, Grimaldi CM, Cohen-Solal J, Diamond B. Antigen is required for maturation and activation of pathogenic anti-DNA antibodies and systemic inflammation. *J Immunol* 186: 5304-12, 2011, DOI: 10.4049/jimmunol.1000224 (査読あり)

- 2) Kiyama K, Kawabata D, Hosono Y, Kitagori K, Yukawa N, Yoshifuji H, Omura K, Fujii T, Mimori T. Serum BAFF and APRIL levels in patients with IgG4-related disease and their clinical significance. *Arthritis Res Ther* 14:R86, 2012, DOI: 10.1186/ar3810 (査読あり)

- 3) 吉藤 元. SLE モデルマウスにおける自己反応性 B 細胞制御メカニズム. *リウマチ科* 48:246-52, 2012 (査読なし)

〔学会発表〕（計 1 件）

- 1) 吉藤 元. SLE モデルマウスにおける自己反応性 B 細胞制御メカニズム. 第 10 回 リウマチ膠原病・よつやセミナー（招待講演）. 2011 年 8 月 27 日, ベルサール八重洲（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉藤 元 (YOSHIFUJI HAJIME)

京都大学大学院医学研究科・臨床免疫学・助教

研究者番号：20422975

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし