

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461473

研究課題名(和文)腎炎発症モデル抗DNA抗体遺伝子ノックイン・マウスへの特異的治療アプローチ

研究課題名(英文)Approach to regulation of an anti-DNA antibody-knock-in mouse nephritis model

研究代表者

吉藤 元(Yoshifuji, Hajime)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20422975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、全身性エリテマトーデス腎症モデル「抗DNA抗体遺伝子(R4A)ノックイン・マウス」を作成した。自己反応性細胞を追跡するために、正常マウスとR4Aノックイン・マウスを交配したWT(a)/R4A(b)-F1マウスを作成し、正常B細胞を抗IgM(a)抗体で、抗DNA抗体産生B細胞を抗IgM(b)抗体で識別した。結果、IgM(b)陽性細胞が著減しており、クローン選択で排除されていると考えられた。IgM(b)陽性細胞のRAG遺伝子発現が著明に亢進しており、免疫グロブリン軽鎖のeditingが活性化されていると考えられた。自己反応性細胞が排除またはrescueされるメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established a systemic lupus erythematosus nephropathy model, anti-DNA antibody gene (R4A)-knock-in mice. To pursuit autoreactive B cells, we mated normal mice and R4A-knockin mice and obtained WT(a)/R4A(b)-F1 mice, in which we can identify normal B cells by anti-IgM(a) and anti-DNA-antibody-producing B cells by anti-IgM(b) antibodies. As a result, IgM(b)-positive cells were markedly decreased probably by a clonal deletion. RAG genes were markedly upregulated in IgM(b)-positive cells, implying that editing of immunoglobulin light chain was activated. These results elucidated a part of mechanisms how autoreactive B cells were deleted or rescued.

研究分野：医歯薬学

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。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。

(2) 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、著者らは、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, 2)。2010~2011 年度、著者らは科研費 (若手 B) を得て、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 (文献 3)。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ので、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。R4A-Ki マウスの表現型を解析したところ、自己反応性 B 細胞が成長過程で欠失 (deletion)、無反応化 (anergy) などの制御を受けていることを見出した (文献 3)。

(3) オリジナルの R4A-Tg マウスでは B6 バックグラウンドよりも Balb/c バックグラウンドの方が蛋白尿の出現率が高いことがわかっている。上記の R4A-Ki マウスが B6 バックグラウンドだったため、著者らは 17 か月かけて R4A-Ki マウスを Balb/c にバッククロスした。次に、抗 DNA 抗体産生 B 細胞のマウス体内での動態を知るために、Balb/c バックグラウンド (アロタイプ a) の野生型マウスと、B6 バックグラウンド (アロタイプ b) の R4A-Ki マウスを交配した WT(a)/R4A(b)-F1 マウスを作製した。この F1 マウスでは、Balb/c 野生型マウス由来の B 細胞を抗 IgM(a) 抗体で、R4A マウス由来の抗 DNA 抗体産生 B 細胞を抗 IgM(b) 抗体で識別することができる。

2. 研究の目的

(1) Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウスおよび B6 バックグラウンドの R4A-Ki マウスの表現型を比較することにより、疾患を引き起こす B 細胞の特性を明らかにする。

(2) WT(a)/R4A(b)-F1 マウスを用いて、抗 DNA 抗体産生 B 細胞のマウス体内での動態を追跡する。

3. 研究の方法

(1) 著者らの過去の報告 (文献 2) の要領で、

8~10 週例の Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウスおよび B6 バックグラウンドの R4A-Ki マウス (いずれも雌) の卵巣を摘除したのちに、エストロゲン (E2) ペレット (0.18 mg, 60 日間で徐放性) またはプラセボ (P) ペレットを皮下投与し、尿蛋白を試験紙で測定し、また、血中抗 DNA 抗体を ELISA で測定した。

(2) WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの脾臓より single cell を得て、抗 B220、抗 CD21、抗 CD24、抗 IgM(a)、抗 IgM(b) 抗体で染色し、FACS で解析した。B220⁺CD21^{high}CD24^{int} の細胞集団を辺縁帯 B 細胞としてカウントした。対照として、野生型 B6 マウスと野生型 Balb/c マウスを交配した WT(a)/WT(b)-F1 マウスの脾細胞と比較した。

(3) WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの骨髄および脾臓より single cell を得て、抗 B220、抗 IgM(a)、抗 IgM(b) 抗体で染色し、FACS Aria を用いて B220⁺IgM(a)⁺細胞と B220⁺IgM(b)⁺細胞をそれぞれ分離した。mRNA から cDNA を作成し、定量的 PCR により RAG-1、RAG-2 遺伝子の発現量を、恒常発現遺伝子である POLR2A 遺伝子に対する t 値として測定した。対照として、野生型マウス同士を交配して得た WT(a)/WT(b)-F1 マウスの骨髄および脾細胞も B220⁺IgM(a)⁺細胞と B220⁺IgM(b)⁺細胞に分離し、同様に RAG-1、RAG-2 遺伝子の発現量を測定した。

(4) WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの脾臓より single cell を得て、抗 B220、抗 IgD(a)、抗 IgD(b) 抗体で染色し、FACS 解析により B220⁺IgD(a)⁺細胞と B220⁺IgD(b)⁺細胞における IgD 蛋白の発現レベル (信号強度) を測定した。対照として、野生型マウス同士を交配して得た WT(a)/WT(b)-F1 マウスの脾細胞も抗 B220、抗 IgD(a)、抗 IgD(b) 抗体で染色し、FACS 解析により IgD 発現レベルを測定した。

4. 研究成果

(1) Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウスの表現型を調べた。B6 バックグラウンドの R4A-Ki マウスは 28 週齢で 80% において蛋白尿が観察されたのに対し、Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウスは 16 週齢で 80% において蛋白尿が観察され、より早期から高率に蛋白尿が出現することが示唆された。次に、腎炎発症を加速させるために、8~10 週例の Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウスおよび B6 バックグラウンドの R4A-Ki マウスに E2 を投与したところ、予想に反して、両群間で尿蛋白濃度に有意な差を認めなかった。血清中の抗 DNA 抗体を測定した (図 1) とところ、E2 投与マウスは P 投与マウスより抗 DNA 抗体価が高い傾向を示したが、Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウス (図 1 上) と B6 バックグラウンドの R4A-Ki (図 1 下) マウスとの

間で有意な差を認めなかった。脾臓の B 細胞分画を FACS で調べたところ、自己反応性 B 細胞と関係が深い辺縁型 B 細胞の割合が増えていた。2 つのバックグラウンドの間で自然発症による蛋白尿の頻度が異なることと、エストロゲンが辺縁型 B 細胞の成熟と抗 DNA 抗体産生に影響することがわかったが、最終的な SLE 動物モデルの表現型に大きな差を認めなかった。

図 1.

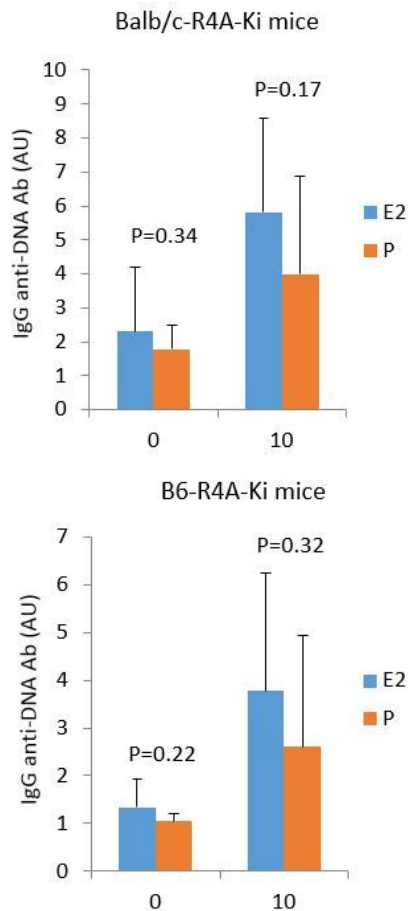


図 1. マウス血中抗 DNA 抗体価。Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウス (上図) と B6 バックグラウンドの R4A-Ki (下図) マウスにエストロゲン (E2) またはプラセボ (P) を投与し、投与前 (0 週) と投与後 (10 週) の血中抗 DNA 抗体価を ELISA で測定した。抗体価は、ある NZB/W-F1 マウスの血清を 100 AU として相対的に算出した。

(2) 当初予定とは異なる結果を得たため、次の手法として、Balb/c バックグラウンド (アロタイプ a) の野生型マウスと、B6 バックグラウンド (アロタイプ b) の R4A-Ki マウスを交配した WT(a)/R4A(b)-F1 マウスを用いて、抗 DNA 抗体産生 B 細胞のマウス体内での分布を検討した (図 2)。WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの脾 B 細胞を FACS で解析したところ、IgM(b) 陽性細胞 (抗 DNA 抗体産生 B 細胞) が著減しており、抗 DNA 抗体産生 B 細胞が clonal

deletion を受けている可能性が示唆された。辺縁型 B 細胞を IgM(a) 陽性細胞 (野生型 B 細胞) と IgM(b) 陽性細胞のいずれが占めるかを検討したところ、予想に反して、野生型 B 細胞由来の辺縁型 B 細胞が増加していた。

図 2.

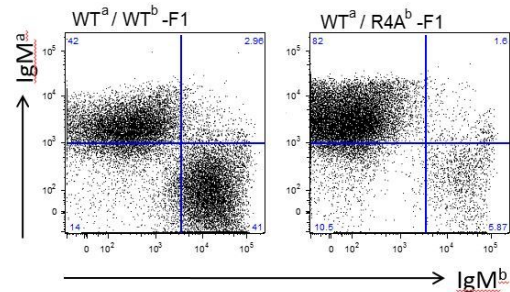


図 2. WT(a)/R4A(b)-F1 マウス (右図) の脾細胞を抗 B220、抗 IgM(a)、抗 IgM(b) 抗体で染色し、FACS で B220⁺IgM(a)⁺ 細胞と B220⁺IgM(b)⁺ 細胞をカウントした。対照として、野生型 B6 マウスと野生型 Balb/c マウスを交配した WT(a)/WT(b)-F1 マウスの脾細胞 (左図) と比較した。

(3) WT(a)/R4A(b)-F1 マウスにおける IgM(b) 陽性細胞 (抗 DNA 抗体産生 B 細胞) における RAG-1 および RAG-2 遺伝子発現を解析したところ、IgM(b) 陽性細胞では IgM(a) 陽性細胞に比べて、RAG-1 (図 3) および RAG-2 (data not shown) の mRNA 発現量が著明に亢進していた。自己反応性 B 細胞において、免疫グロブリン軽鎖の editing が活発になっている可能性が示唆された。

図 3.

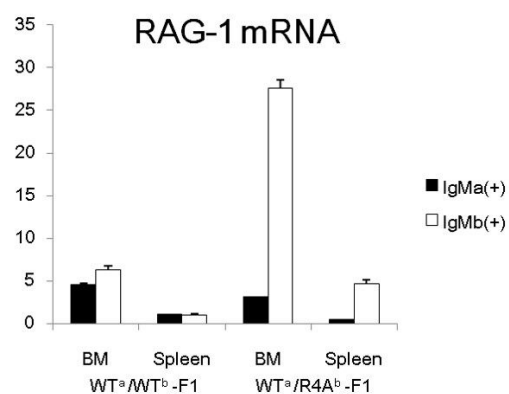


図 3. 右の 4 カラム ; WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの骨髄 (BM) および脾臓より FACSaria を用いて IgM(a) 陽性細胞と IgM(b) 陽性細胞をそれぞれ分離し、定量的 PCR により RAG-1 mRNA 発現量を測定した。左の 4 カラム ; 対照として、野生型マウス同士を交配して得た WT(a)/WT(b)-F1 マウスの骨髄および脾細胞も IgM(a) 陽性細胞と IgM(b) 陽性細胞に分離し、RAG-1 mRNA 発現量を測定した。 t

法を用い、WT(a)/WT(b)-F1 マウスの IgM(b) 陽性細胞を 1 とした。

(4) WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの IgD(a)陽性細胞 (正常 B 細胞) における IgD 蛋白の発現レベル (FACS 信号強度) は、WT(a)/WT(b)-F1 マウス (野生型マウス同士を交配) の IgD(a) 陽性細胞 (正常 B 細胞) の IgD 発現レベルと等しかった。しかし、WT(a)/R4A(b)-F1 マウスの IgD(b)陽性細胞 (抗 DNA 抗体産生 B 細胞) における IgD 発現レベルは、WT(a)/WT(b)-F1 マウス (野生型マウス同士を交配) の IgD(b) 陽性細胞 (正常 B 細胞) の IgD 発現レベルよりも高かった。

(まとめ)

自己免疫反応を誘発するためにエストロゲンを投与した Balb/c バックグラウンドの R4A-Ki マウスと B6 バックグラウンドの R4A-Ki マウスとの間で、尿蛋白濃度および抗 DNA 抗体価に有意な差を認めなかった。系統の差による表現型の違いを確認できず、当初予定とは異なる結果となった。

次に、疾患を引き起こす B 細胞の特性を知る目的で、我々が作成した WT(a)/R4A(b)-F1 マウスを作成し、正常 B 細胞を抗 IgM(a)抗体で、抗 DNA 抗体産生 B 細胞を抗 IgM(b)抗体で識別して解析した。その結果、WT(a)/R4A(b)-F1 マウスにおいて IgM(b)陽性細胞 (抗 DNA 抗体産生 B 細胞) が著減していることを見出した。すなわち、自己反応性の B 細胞はクローン選択において排除されていると考えられた。自己反応性 B 細胞と関係が深い辺縁型 B 細胞において、予想とは逆に、IgM(a)陽性細胞 (野生型 B 細胞) が増加していたが、これは、IgM(b)陽性細胞 (抗 DNA 抗体産生 B 細胞) が分泌するサイトカインにより、IgM(a)陽性細胞 (野生型 B 細胞) を引き寄せたからかもしれない。さらなる検討を要する。IgM(b)陽性細胞の RAG-1/2 および IgD 遺伝子発現が亢進していたことは、自己反応性細胞において免疫グロブリン軽鎖の editing が活性化されていることを示唆し、その結果 IgD 陽性細胞に成熟して生き延びると考えられた。本モデルにより B 細胞が排除または rescue されるメカニズムの一端を明らかにした。

〔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.* 2001 Aug 15;167(4):1886-90.

2) 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.* 2011 May 1;186(9):5304-12. doi: 10.4049/jimmunol.1000224. Epub 2011 Mar 28.

3) 吉藤 元, 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, 科研費報告: 課題番号 23791111, 2012

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 2 件)

Yamamoto N, Yamaguchi H, Ohmura K, Yokoyama T, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Fujii T, Morita S, Nagata S, Mimori T. Serum milk fat globule epidermal growth factor 8 elevation may subdivide systemic lupus erythematosus into two pathophysiologically distinct subsets. *Lupus.* 2014 Apr;23(4):386-94. doi: 10.1177/0961203314523870

Shiheido H, Kitagori K, Sasaki C, Kobayashi S, Aoyama T, Urata K, Oku T, Hirayama Y, Yoshitomi H, Hikida M, Yoshifuji H, Mimori T, Watanabe T, Shimizu J. Human T cells expressing BEND3 on their surface represent a novel subpopulation that preferentially produces IL-6 and IL-8. *Immun Inflamm Dis.* 2014 Jun;2(1):35-43. doi: 10.1002/iid3.17

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

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