

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461486

研究課題名(和文) Fc レセプターIIIB欠損マウスを用いたRAとSLEの特異性を決める遺伝子の解析

研究課題名(英文) Genotype identification of RA and SLE using Fc gamma RIIB-deficient B6 mice.

研究代表者

天野 浩文 (Amano, Hirofumi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50318474

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)：Fc RIIBを欠損(K01)マウスは、RAに類似した病態を発症する。このマウスにSLEの病態を促進させるYaa遺伝子、NZW系遺伝子を導入した際の病態変化と遺伝的要因を調べた。K01.Yaaマウス、(K01xNZW)F1およびF2マウスの病態解析とF2マウスの遺伝子マッピングを行った。K01.Yaaマウス、(K01xNZW)F1マウスではRAの発症は認めず、SLE様の糸球体腎炎を発症した。F2マウスでは、第12番染色体領域に腎炎、関節炎、唾液腺炎を重複する遺伝子が同定された。Fc RIIBの欠損に加え、Yaa遺伝子、NZW系遺伝子が加わることでRA類似の病態はSLE類似の病態へ変化した。

研究成果の概要(英文)：Background: Fc RIIB negatively regulates BCR-mediated activation signals. We used Fc RIIB-deficient B6-congenic mouse strain (K01) spontaneously developed pathology of rheumatoid arthritis (RA). Methods: To analyse the phenotypic change of K01 by crossing with lupus prone B6.Yaa and New Zealand White (NZW) mice, we established the K01.Yaa mice, F1 and F2 hybrid of K01 and NZW mice. Results: The K01.Yaa mice and (K01 x NZW)F1 mice did not develop the phenotype of RA, but developed lupus phenotype. In (K01 x NZW) F2 mice, RA, SLE, and Sjogren syndrome developed independently or overlapped in an individual mouse. We found that the B6-derived locus located in the centromeric region on chromosome 12 was significantly associated with all these disease phenotypes, suggesting that this locus may play a role in common process shared by these diseases. Conclusion: Phenotypic specificity depends on the genetic factors sharing RA, SLE, and Sjogren syndrome.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：全身性エリテマトーデス 疾患モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス (SLE) と関節リウマチ (RA) はどちらも自己抗体を産生する自己免疫疾患であるものの、その臨床における病態は全く異なる。しかしながら近年解析の進んだヒトゲノムワイド関連研究の結果により、その両者では多くの疾患関連遺伝子が共通であることが判明している。C57BL/6 (B6) .Fc RIIB 欠損マウスは、SLE を発症するという報告 (引用文献) がある一方、RA を発症するという報告がある (引用文献)。そのため、そこに存在する遺伝子異常のわずかな組み合わせの違いが自己免疫疾患の特異性に大きく影響していると考えられる。

一方、SLE の自然発症モデルである BXSB マウスにおいて疾患を促進させる *Yaa* (Y-linked autoimmune acceleration) 遺伝子は、近年本来 X 染色体上に存在する TLR7 と TLR8 をそれぞれコードする *tlr7*, *tlr8* をはじめとする十数個の遺伝子を含む領域が Y 染色体上に転座し維持されているものであることが明らかにされた (引用文献)。この *Yaa* 遺伝子による自己免疫応答を促進させる現象は、B6 を背景とするマウスでは認めず、BXSB のみならず MRL や NZB などの自己免疫応答を誘導する遺伝的背景の存在下で認める。

(2) NZW マウスはそれ自体では明らかな自己免疫による病態を呈さないものの、(NZB x NZW)F1 マウスのように他の自己免疫ストレインマウスとの交配により SLE に類似した自己免疫病態を呈する。このマウスでは *Yaa* 遺伝子の非存在下においても著明な自己免疫性腎炎を呈することから、これらのマウスにおいて何らかの自己免疫を誘導する遺伝的背景を含む遺伝子が複数存在することで自己免疫疾患の病態を呈すると考えられる。

2. 研究の目的

(1) RA を自然発症する B6. Fc RIIB^{-/-} マウス (K01) に前述した *Yaa* 遺伝子を導入することで B6. Fc RIIB^{-/-} *Yaa* マウス (K01. *Yaa*) マウスを作製し、K01 で生じている RA の病態が変化するかについて解析を行った。それぞれのマウスの生存率、関節炎・関節破壊の有無、腎症、おもに RA および SLE に関与する自己抗体の存在、血管炎の有無などについて分子細胞学的、免疫病理学的な解析を行った。

(2) (K01 x NZW)F1 あるいは F2 マウスを作製し、NZW に含まれる遺伝子による影響で RA の病態が変化するかについて解析を行った。それぞれのマウスの生存率、関節炎の有無、腎症、RA および SLE に関与する自己抗体の存在、だ液腺炎の有無について分子細胞学的、免疫病理学的な解析を行い、さらにこれらの病態と関連する遺伝子の関与について調べた。

3. 研究の方法

(1) RA を自然発症する C57BL/6. Fc RIIB 欠損 (K01) マウスと C57BL/6. *Yaa* マウスのオスを交配させた。K01. *Yaa* マウス誕生の後、それらを飼育管理し関節炎の発症の有無について評価した。そのほか、定期的な採血、採尿、末梢血単核球のフローサイトメトリー解析、血清中の自己抗体について解析した。

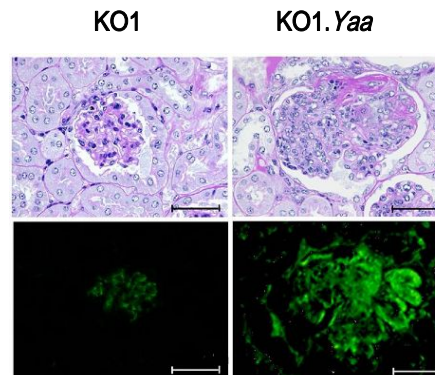
(2) K01 マウスと当教室の NZW マウスを交配させ (K01 x NZW)F1 を作製した。K01. *Yaa* マウス管理と同様に定期的な管理、関節評価、採血、採尿、末梢血単核球のフローサイトメトリー解析、血清中の RA 関連、SLE 関連の自己抗体について解析した。病態と遺伝子の関連について調べる目的で (K01 x NZW)F2 マウスを作製し、病理組織学的検討を行うと同時に遺伝的背景について QTL (Quantitative trait locus) 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 6~8 ヶ月齢において認める K01 マウスの RA に類似した関節炎は、K01. *Yaa* マウスにおいては認めなかった (写真: 上段 K01 マウス、下段 K01. *Yaa* マウス足趾)。

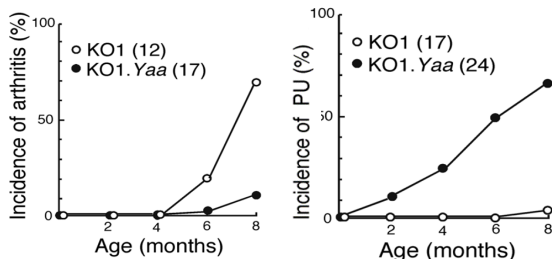


一方、腎糸球体においては、K01 マウスでは腎炎の所見は呈することはなく、K01. *Yaa* マウスにおいては、ループス腎炎に類似した糸球体腎炎を発症した。(写真: 左 K01 マウス、右 K01. *Yaa* マウス、上段 PAS 染色、下段蛍光抗体染色 IgG)

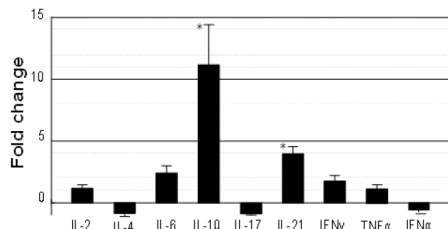


また SLE で特徴的に認める抗 ds-DNA 抗体、抗クロマチン抗体は、2 ヶ月齢の K01. *Yaa* マウスで K01 マウス、B6 マウス、B6. *Yaa* マウスと比較し有意に上昇を認め、RA で特徴的に

認めるリウマトイド因子(RF)は B6 マウスと比較して上昇していたが、KO1 マウス、B6. *Yaa* マウスと比較した際には変化を認めなかった。6ヶ月齢で KO1. *Yaa* マウスの半数で蛋白尿を認め、50%生存率は約 7 カ月であった。(下図: 左; 関節炎発症率、右; 蛋白尿発症率)



KO1. *Yaa* マウスの脾臓の B 細胞では CD69 陽性細胞および CD138 陽性細胞の増加を認め、マージナルゾーン B 細胞の低下を認めた。さらに ICOS 陽性 PD-1 陽性の濾胞ヘルパー T 細胞の著明な増加を認めた。また、脾臓細胞におけるサイトカインの mRNA の発現を解析し KO1 マウスと比較したところ、KO1. *Yaa* マウスにおいて有意に IL-6, IL-10, IL-21 の発現が高く、特に IL-10 においてその差は最も顕著であった(下図)。



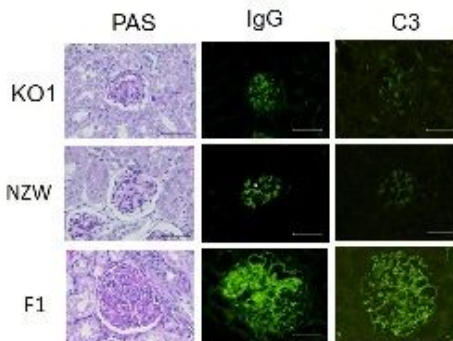
さらに IL-10 を発現する細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、濾胞ヘルパー T 細胞のフェノタイプを有していた。

IL-10 は B 細胞の抗体産生を亢進させる免疫賦活作用を有するとともに、T 細胞やマクロファージによる炎症性サイトカイン産生を抑制する作用を合わせ持つサイトカインである。RA は炎症性サイトカイン産生を特徴とする疾患であり、濾胞ヘルパー T 細胞による IL-10 の発現亢進が、KO1. *Yaa* マウスにおける RA から SLE への表現型の変化に深く関連している可能性が示唆された。

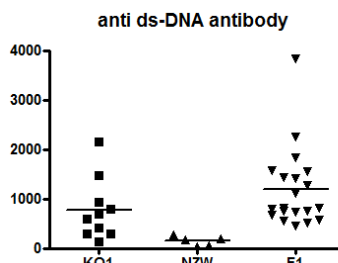
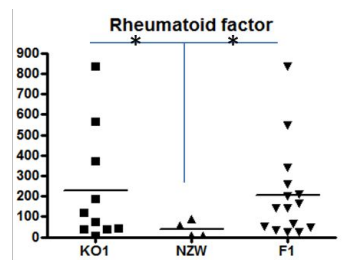
(2) (KO1xNZW)F1(F1)マウスにおいて6~8ヶ月齢で関節炎の発症は認めず(下図)



ループス腎炎に類似した糸球体腎炎を発症した(下図)。



血清中 RF と抗 ds-DNA 抗体は、どちらも NZW マウスと比較して有意に上昇していた。(下図)



(KO1xNZW)F2 マウスの解析では、ループス様腎炎が約 33.7%、唾液腺炎が約 27.6%、RA 類似関節炎が 6.1%に認められ、これらの病態を重複して発症するマウスの存在も認められた。(KO1xNZW)F2 マウスを用いた QTL マッピングでは、第 1、4、7、9、13、17 番染色体の領域にループス様腎炎に関連した遺伝子群を認め、第 12 番染色体領域にループス腎炎、RA 類似関節炎、唾液腺炎を合併する遺伝子が同定された(下図)。

Chr.	Mb	Lupus	RA	Sialoadenitis	Direction
1	<i>Fcgr2b</i>	172.8	$P=0.045$		-/-> NZW
	<i>D1Mit403</i>	177.5	$P=0.010$		129 > NZW
4	<i>D4Mit33</i>	149.9	$P=0.010$		B6 > NZW
6	<i>D6Mit66</i>	98.2		$P=0.014$	B6 < NZW
7	<i>D7Mit70</i>	63	$P=0.046$		B6 < NZW
9	<i>D9Mit17</i>	115	$P=0.011$		B6 > NZW
12	<i>D12Mit54</i>	54.9	$P=0.042$	$P=0.002$	B6 > NZW
	<i>D12Mit5</i>	82	$P=0.015$	$P<0.001$	B6 > NZW
	<i>D12Mit6</i>	92.1	$P=0.007$		B6 > NZW
13	<i>D13Mit13</i>	56.5	$P=0.017$	$P=0.006$	B6 < NZW
16	<i>D16Mit110</i>				B6 < NZW
17	<i>Tnfr, H-2</i>	35.3	$P=0.011$		B6 > NZW

$P<0.05$ の有意な相関を示すマーカーを示した。

以上の結果から、第 1 染色体に存在する Fc RIIB の欠損に加え、NZW 系遺伝子加わることによって RA 類似の病態は SLE 類似の病態へ変化し、同じ自己免疫疾患において疾患特異性が生じる背景には、それらの発症に重要な遺伝子群が関与することが示された。

<引用文献>

Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc (gamma) RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*. 13(2): 277-85, 2000

Sato-Hayashizaki A, Ohtsuji M, Lin Q, Hou R, Ohtsuji 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*. 63(10) : 2930-8, 2011

Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*. 16:312(5780):1669-72, 2006

Subramanian S, Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, Liang C, Bartov G, McDaniel LD, Zhou XJ, Schultz RA, Wakeland EK. A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 27;103(26):9970-5, 2006

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)

Kaneko T, Amano H, Kawano S, Minowa-K, Ando S, Watanabe T, Nakano S, Suzuki J, Morimoto S, Tokano Y, Takasaki Y. Increased serum concentration of BAFF/APRIL and IgA2 subclass in patients with mixed connective tissue disease complicated by interstitial lung disease. *Mod Rheumatol*. 24:310-5, 2014(査読あり)

Ohtsuji M, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Okazaki H, Tsurui H, Amano H, Shirai T, Nishimoto N, Nishimura H, Hirose S. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel FcγRIIB-deficient rheumatoid arthritis

mouse model. *Mod Rheumatol*. 27:1-8, 2014(査読あり)

Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Katayama M, Migita K, Suda A, Ohno S, Hashimoto H, Takasaki Y, Sumida T, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Human Leukocyte Antigens and Systemic Lupus Erythematosus: A Protective Role for the HLA-DR6 Alleles DRB1*13:02 and *14:03. *PLoS One*. 3:9(2), 2014(査読あり)

Okazaki H, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Tsurui H, Ohtsuji M, Amano H, Tada N, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. TNFα but not IL-17 is critical in the pathogenesis of rheumatoid arthritis spontaneously occurring in a unique FcγRIIB-deficient mouse model. *Mod Rheumatol*. 24(6):931-8, 2014(査読あり)

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*. 43:1-9, 2013 (査読あり)

[学会発表](計 36 件)

Hirofumi Amano, Seiichiro Ando, Kentaro Minowa, Takashi Watanabe, Michihiro Ogasawara, Shinji Morimoto, Yoshiaki Tokano, Ken Yamaji, Naoto Tamura, Yoshinari Takasaki. Disease flare patterns and predictors in a long-term follow-up of 423 Japanese SLE patients from monocentric cohort JUDE study. 16th The European League Against Rheumatism(EULAR). Rome, Italy. 2015.6.10-13.

Shinya Kawano, Hirofumi Amano, Lin Qingshun, Toshiyuki Kaneko, Hiromichi Tsurui, Toshikazu Shirai, Sachiko Hirose and Yoshinari Takasaki. Mechanism of Phenotype Conversion from Rheumatoid Arthritis to Lupus in Fc RIIB-Deficient C57BL/6 .Yaa mice. 16th The European League Against Rheumatism(EULAR). Rome, Italy. 2015.6.10-13.

天野 浩文. TLR 標的ループス治療の理論

と障壁. SLE における自然免疫. 日本リウマチ学会総会・学術集会 シンポジウム. 2015.4-23-25. 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

Shinya Kawano, Qingshun Lin, Hirofumi Amano, Toshiyuki Kaneko, Keiko Nishikawa, Hiromichi Tsurui, Norihiro Tada, Hiroyuki Nishimura, Toshiyuki Takai, Shirai Toshikazu, Sachiko Hirose, Yoshinari Takasaki. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into FcRIIB-deficient C57BL/6 mice. 日本リウマチ学会総会・学術集会 国際シンポジウム. 2014.4-24-26. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都、港区)

Shinya Kawano, Toshiyuki Kaneko, Aya Sato- Hayashizaki, Lin Qingshun, Hirofumi Amano, Sachiko Hirose, Yoshinari Takasaki. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into FcRIIB-deficient C57BL/6 mice. 5th East Asian Group of Rheumatology. 2013.5.31. 京王プラザホテル (東京都、新宿区)

〔図書〕(計 1 件)

天野 浩文: リウマチ・膠原病内科診療マニュアル. 「強皮症, 炎症性筋炎および混合性結合組織病-多発性筋炎・皮膚筋炎」, 「臨床上問題となる病態・合併症とその対応-間質性肺炎」高崎 芳成、田村 直人、安倍 千之(編集) 185-193, 298-306, 日本医学館, 東京, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 浩文 (AMANO, Hirofumi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 50318474

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

広瀬 幸子 (HIROSE, Sachiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 00127127