

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461474

研究課題名(和文) 活性型・抑制型FcRとSLAM遺伝子異常が自己免疫疾患モデルマウスに及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of SLAM mutation and activating and inhibitory FcR on autoimmune prone mice

研究代表者

高崎 芳成 (TAKASAKI, Yoshinari)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：80154772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：FcRIIB欠損C57BL/6(B6)マウスは、Slam遺伝子異常(Slam129)がある際、関節リウマチ(RA)の病態を呈し、さらにYaa遺伝子(TLR7重複)がある際、全身性エリテマトーデス(SLE)の病態を呈する。我々はFcRIIB異常のないSlam129マウス、加えてYaa遺伝子をもつSlam129.Yaaマウスを作製し解析した。Slam129マウスは、自己抗体上昇や腎炎は認めなかった。Slam129.Yaaマウスは、抗Sm/RNP抗体は認めるものの抗DNA抗体は認めず、軽微なループス腎炎と肺の炎症細胞浸潤を呈したことから、混合性結合組織病の病態を呈していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously obtained a 129-derive FcRIIB-deficient C57BL/6 (B6) congenic strain of mice, which developed rheumatoid arthritis (RA). The introduction of the Yaa (Y-linked autoimmune acceleration) mutation (Tlr7 gene duplication) to the FcRIIB-deficient B6 mice (B6.FcRIIB^{-/-}.Yaa) developed lupus like nephritis but not RA. By extensive backcrossing, we established wildtype FcRIIB and 129-derive autoimmune-prone SLAM haplotype (Slam129). We examined the phenotype of the mice, and also Slam129.Yaa mice by introducing Yaa mutation. Slam129 mice did not show any pathogenic autoantibodies. When introducing Yaa mutation, Slam129.Yaa mice showed significant increase the serum levels of anti-RNP/Sm antibodies. They did not show the elevation of anti-dsDNA antibodies. Also they developed nephritis but the pathological score was significantly lower than B6.FcRIIB^{-/-}.Yaa mice. Autoimmune-prone Slam129.Yaa mice developed specific lupus phenotype resembling mixed connective tissue disease.

研究分野：Rheumatology and Immunology

キーワード：SLE Slam Yaa Fc receptor モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

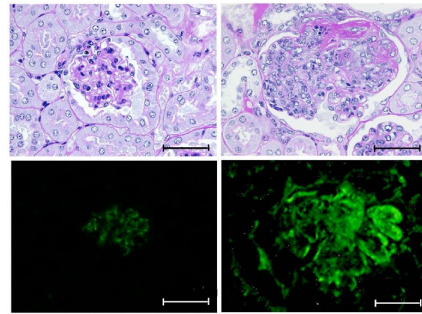
関節リウマチ(RA:rheumatoid arthritis)は、リウマトイド因子(RF)や抗 CCP 抗体などの自己抗体の出現と関節滑膜の増殖に続く関節破壊を特徴とする。同じく自己抗体を産生し多臓器に障害が生じる全身性エリテマトーデス(SLE: systemic lupus erythematosus)は、自己の DNA あるいは RNA に対する自己抗体の産生が大きな特徴である。両者の臨床症状は大きく異なっているものの、自己抗体を有することで臓器障害を引き起こす共通点が存在する。近年解析が進んだヒトゲノムワイド関連解析結果では、この2つの疾患に共通の遺伝子異常が見出されている。その中でもヒト、マウスに共通して第1染色体テロミア領域に存在するSLAM(signaling lymphocyte activation molecule)ファミリー遺伝子とIgG型免疫グロブリンのFc部分を認識する受容体であるFc受容体(FcR)に関連した遺伝子群は、SLEとRAに共通した疾患感受性遺伝子として知られている。

ほとんどのFcRは、免疫応答を活性化させる方向に働くが、FcRIIBは、唯一抑制性のシグナルを伝えるFcRである。このFcRIIBを野生型マウスであるC57BL/6(B6)マウスで欠損したB6.FcRIIB^{-/-}マウスでは、自己抗体の出現は認めず、12ヶ月齢までで死亡するマウスはいなかった(文献)。連携研究者である広瀬らは、FcRIIBをコードする*fcgr11b*遺伝子近傍に存在する*Slam*遺伝子部分を自己免疫疾患に感受性を有するとされる129型に置換したFcRIIB^{-/-}*Slam*マウスを作製した。このマウスにおいては生後6-8ヶ月例において関節破壊と変形を伴うRA様関節炎を発症した。さらに血清中ではリウマトイド因子(RF)やII型コラーゲン抗体(CII)、抗CCP抗体の出現を認め、RAの自然発症を認めた(文献)(写真:足趾)。



我々は、このRAを自然発症するFcRIIB^{-/-}*Slam*マウスにおいて、SLEの自然発症モデルであるBXSbマウスの疾患を促進させる*Yaa*(Y-linked autoimmune acceleration)遺伝子を導入することでFcRIIB^{-/-}*Slam.Yaa*マウスを作製し解析を行った。その結果、このマウスでは、RAの病態は発症せず、代わりにSLEに類似した糸球体腎炎を発症した(文献)(写真:右上)。

Fc RIIB^{-/-}*Slam* Fc RIIB^{-/-}*Slam.Yaa*



以上のことより、代表的な自己免疫疾患であるSLEとRAには共通して第1染色体上にある*fcgr11b*遺伝子と*Slam*遺伝子の異常が発症に重要な鍵を握っていると考えられる。

活性型FcRは、細胞内に活性化シグナルを伝達するimmunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)を細胞質内にもつ共通鎖(Fc receptor common subunit: FcR)と会合する。この共通鎖を有するのは、マウスではFcRI, FcRIII, FcRIVが知られ、マクロファージやマスト細胞、抗原提示細胞など多くの細胞に発現しており、これらがIgGのFc部分と結合すると活性化が生じ、マクロファージの貪食能や炎症性サイトカインの産生、マスト細胞の脱顆粒、抗原提示細胞の機能などが亢進する。Ravetchらは、SLEの自然発症モデルである(NZBxNZW)F1マウスで共通鎖を欠損するマウスを作製し(文献)、連携研究者の広瀬らは、BXSbマウスで共通鎖を欠損するマウスを作製して解析を行った(文献)。その結果、それらのマウスでは共通してIgG型の自己抗体の産生やIgG型免疫複合体と補体の腎糸球体への沈着は認められたが、腎炎の発症は著明に抑制されていた。これらの結果から、免疫複合体の沈着後に引き起こされる補体の活性化の結果として単に好中球など炎症性細胞の組織浸潤によって組織障害が引き起こされるのではなく、沈着したIgG抗体に活性型FcRを発現した好中球などの炎症細胞が作用し組織障害が生じることが示された。

一方、BXSbマウスは末梢血で単球増加が生じることが知られている。これは生後2-3ヶ月の若い月齢では単球増加は示さず、その後の腎症を発症してくる月齢とともに30-50%程の単球増加を示すことより病態形成に重要であると考えられている。また、マウスの末梢血の単球は機能的にも形態的にも2つのサブセットが存在することが明らかとされており、1つは炎症により速やかに局所に移動する特徴をもつ炎症性(Inflammatory)と呼ばれるCD11b⁺Gr1⁺CX3CR1^{low}CD62^{high}サブセットの単球で、もう一つは定常状態で局所に存在する定常性(Resident)と呼ばれるCD11b⁺Gr1⁻CX3CR1^{hi}CD62^{low}サブセットの単球である。われわれは、末梢血で単球の増加が生じたBXSbマウスではこれらのサブセットのうちCD11b⁺Gr1⁻CD62^{low}の単球が有意に増加しており、このサブセットで樹状細胞のマーカー

CD11c が発現していることをつきとめている。

今回我々は、RA を自然発症する活性型の Fc R のみを有する Fc RIIB^{-/-}Slam マウスと SLE を自然発症する活性型の Fc R のみを有する Fc RIIB^{-/-}Slam.Yaa マウス、および活性型と抑制型両方の Fc R を有し Slam 遺伝子の異常を有する Slam¹²⁹ マウス、Slam¹²⁹ マウスに Yaa 遺伝子異常を有する Slam¹²⁹.Yaa マウスを作製しそれぞれについての病態や組織障害の有無、自己抗体の変化、および末梢血の単球サブセットの変化について比較検討することを計画した。さらにこれらのマウスを用いて、活性型 Fc R を欠損する Fc RIIB^{-/-}Slam.^{-/-} マウス、Fc RIIB^{-/-}Slam.Yaa.^{-/-} マウスを作製することを計画した。Slam 遺伝子の異常に加えて、抑制型の Fc RIIB を欠損して生じる RA と SLE の病態において、活性型の Fc R を欠損するマウスを解析することで、活性型・抑制型の Fc R と Slam 遺伝子異常が自己抗体の産生と臓器障害に及ぼす影響、さらに疾患や病態の違いによる Fc R の役割を解析することができる。

2. 研究の目的

我々が用いた Fc RIIB^{-/-}Yaa マウスでは 129 と呼ばれる胚細胞を使用しており、Fc RIIB をコードする遺伝子近傍に SLE や RA に感受性をもつ SLAM ファミリー遺伝子領域が存在する。我々は、Slam 遺伝子の異常を有するが、Fc RIIB 異常を持たない Slam¹²⁹ マウスを作製し、その病態を調べ、さらにこのマウスに Yaa 遺伝子変異を導入した Slam¹²⁹.Yaa マウスの病態を調べることで、自己免疫疾患の病態におけるこれらの遺伝子の役割を調べた。また、これらのマウスを用いて活性型 Fc R を欠損する Fc RIIB^{-/-}Slam.^{-/-} マウス、Fc RIIB^{-/-}Slam.Yaa.^{-/-} マウスを作製し、これらの病態の変化について解析を行うことを目的とした。

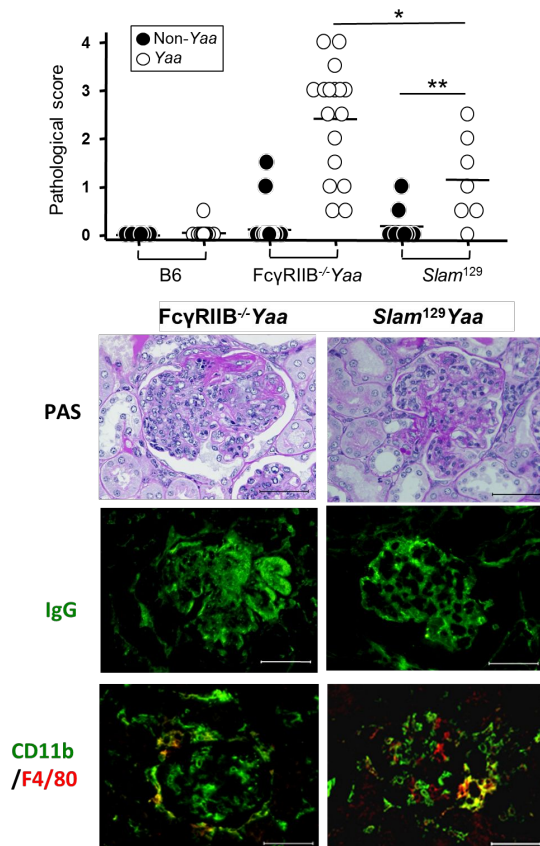
3. 研究の方法

B6 マウスで Slam 遺伝子部分を 129 型に置換した Slam¹²⁹ マウスを作製した。さらに Yaa 遺伝子を導入した Slam¹²⁹.Yaa マウスを作製しこれらのマウスの病態について自己抗体の産生と腎系球体・肺の免疫病理組織学的検討を行った。これらに加え Yaa 遺伝子を有する SLE モデルマウスで生じる末梢血中の単球増加とサブセットの変化についての解析を行った。また、Fc RIIB、Slam、共通鎖のそれぞれについて、ホモで欠損しているもの(-/-)とヘテロで欠損するもの(+/-)に分け交配を繰り返すことで、Fc RIIB^{-/-}Slam.^{-/-} マウスを作製した。さらにこれらのマウスに Yaa 遺伝子を導入するための交配を行い、Fc RIIB^{-/-}Slam.Yaa.^{-/-} マウスの作製を行った。

4. 研究成果

Slam¹²⁹ マウスでは、末梢血中の単球は

CD11b⁺ Gr1⁻ CX3CR1^{hi} CD62^{low}、すなわち resident タイプのサブセットの単球の著明な増加を認めた。しかしながらこのマウスでは、血清中の ds-DNA 抗体や抗 Sm 抗体および抗 RNP 抗体の上昇は認めず、ループス腎炎様の糸球体腎炎は認めなかった。Slam¹²⁹.Yaa マウスは、血清中の IgM 型抗 ds-DNA 抗体の上昇は認めしたが、IgG 型抗 ds-DNA 抗体の上昇は認めず、抗 Sm 抗体および抗 RNP 抗体は B6 マウス、Slam¹²⁹ マウスと比較して有意な上昇を認めた。腎組織においては、ループス腎炎様の糸球体腎炎を呈したものの、腎病変の組織学的スコアは Fc RIIB^{-/-}Yaa マウスと比較し有意に低かった。(下図グラフ)しかしながら、腎系球体内の単球/マクロファージの浸潤について CD11b・F4/80 で染色し確認したところ、Fc RIIB^{-/-}Yaa マウスと比較し、Slam¹²⁹.Yaa マウスでより顕著であった。(下図、上段 PAS 染色、中段・下段免疫染色)



さらに肺病理についての解析を行ったところ、Slam¹²⁹ マウスで肺血管周囲に著しい細胞浸潤を認め、Slam¹²⁹.Yaa マウスでより顕著だった。これまで Yaa 遺伝子異常に伴う疾患モデルマウスにおける末梢血中の単球増加は、SLE の病態と関連して生じると考えられていた。しかし、今回の結果から末梢血中の単球増加と単球サブセットの変化は、Slam 遺伝子異常で生じることが明らかとなり、SLE の病態とは一致しないことが判明した。Slam¹²⁹.Yaa マウスの血清中の自己抗体の特徴から、Slam¹²⁹.Yaa マウスは、SLE の一部の疾患サブセット、あるいは混合性結合組織病

と類似した病態を生じていると考えられた。

Fc RIIB^{-/-}Slam. ^{-/-}マウス、Fc RIIB^{-/-}Slam.Yaa. ^{-/-}マウスについては、作製されており交配によって増やしつあるものの、未だ充分な数に達していないため、それらを増やしつ病態の変化を観察中である。

今回の研究結果から明らかになったことは、以下である。Slam¹²⁹マウスでは、末梢血中の単球増加と単球サブセットの変化が生じていた。Slam¹²⁹.Yaaマウスでは、IgG型抗ds-DNA抗体は認めず、抗Sm抗体および抗RNP抗体を認めた。SLE様の腎症はFc RIIB^{-/-}Yaaマウスと比較して著明に抑制されており、またSlam¹²⁹マウスで肺血管周囲に細胞浸潤を認め、Slam¹²⁹.Yaaマウスではより顕著であった。

以上のことから、全身性エリテマトーデスを中心とした全身性自己免疫疾患および関連する病態に対してFcレセプター、およびSlam遺伝子をターゲットとした治療が有効である可能性が見出された。

<引用文献>

- Boross P, Arandhara VL, Martin-Ramirez J, Santiago-Raber ML, Carlucci F, Flierman R, van der Kaa J, Breukel C, Claassens JW, Camps M, Lubberts E, Salvatori D, Rastaldi MP, Ossendorp F, Daha MR, Cook HT, Izui S, Botto M, Verbeek JS. The inhibiting Fc receptor for IgG, FcγRIIB, is a modifier of autoimmune susceptibility. *J Immunol.* 187:1304-13.2011
- 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: 2930-8. 2011
- 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
- Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science.* 279:1052-4.1998
- Lin Q, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M,

Ohtsuji N, Shiroiwa W, Tsukamoto K, Amano H, Amano E, Kinoshita K, Sudo K, Nishimura H, Izui S, Shirai T, Hirose S. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. *J Immunol.* 177:1646-54. 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 50 件)

Minowa K, Amano H, Ando S, Watanabe T, Ogasawara M, Kawano S, Kaneko T, Morimoto S, Yamaji K, Tamura N, Tokano Y, Hashimoto H, Takasaki Y. Disease flare patterns and predictors of systemic lupus erythematosus in a monocentric cohort of 423 Japanese patients during a long-term follow-up: The JUDE study. *Mod Rheumatol.* 27:72-6, 2017(査読あり)

Hachiya Y, Kawasaki A, Oka S, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Suda A, Setoguchi K, Nagai T, Shimada K, Sugii S, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Ohno S, Katayama M, Kono H, Hirohata S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Nagaoka S, Tohma S, Furukawa H, Tsuchiya N. Association of HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population: A Case-Control Association Study. *PLoS One.* 22:11(6), 2016 (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, Ohtsui N, Tsurui H, Ohtsui M, Amano H, Tada N, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. TNF α but not IL-17 is critical in the pathogenesis of rheumatoid arthritis spontaneously occurring in a unique Fc γ RIIB-deficient mouse model. Mod Rheumatol. 24(6):931-8, 2014(査読あり)

〔学会発表〕(計 154 件)

天野 浩文, 浅井悠貴, 安藤誠一郎, 山路健, 田村直人, 高崎 芳成. 全身性エリテマトーデス患者における酸化ストレスと抗酸化力の解析. 第 31 回臨床リウマチ学会 2016.10.29-30.

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 Fc RIIB-deficient C57BL/6 mice. 日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.4-24-26. グランドプリンスホテル新高輪(東京都、港区)

〔図書〕(計 9 件)

高崎 芳成: 全身性エリテマトーデス. 病氣とくすり増刊号. 根本英一編, 237-241, 南山堂, 東京, 2016

高崎 芳成, 山本一彦, 三森経世, Jack D Keene (編). 自己抗体と自己免疫 '14, 1-37, (株)医学生物学研究所, 名古屋, 2015

高崎 芳成: 全身性エリテマトーデス. ガイドライン外来診療2015. 泉孝英編集主幹, 506-510, 日経メディカル開発, 東京, 2015

高崎 芳成: 抗RNA抗体(抗U1-RNP抗体), 抗Sm抗体. 臨床検査ガイド. 三橋知明, 和田攻, 矢崎義雄, 小池和彦, 小室一成編, 747-749, 文光堂, 東京, 2015

高崎 芳成: 抗核抗体と臨床の関連性. コンピューター支援型免疫蛍光顕微鏡システムむよるFANA画像テキスト. 9-18, コスミックコーポレーション, 東京, 2015

高崎 芳成: 関節リウマチの診断、疾患活動性の評価、新しい治療目標. 関節リウマチと骨粗鬆症・内科医が実践すべき診断と治療. 田中良哉編, 36-43, 医薬ジャーナル, 大阪・東京, 2015

高崎 芳成, 山本一彦, 三森経世, Jack D Keene (編). 自己抗体と自己免疫 '15, 1-61, (株)医学生物学研究所, 名古屋, 2015

高崎 芳成: Behcet 病. 今日の診断指針第7版. 金澤一郎、永井良三総編集, 1314-1317, 医学書院, 東京, 2015

高崎 芳成: 関節リウマチの関節外病変に対する生物学的製剤治療のエビデンスについて. 関節リウマチクリニカルクエスチョン 100. 住田孝之編, 194-195, 診断と治療社, 東京, 2014

〔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

高崎 芳成 (TAKASAKI, Yoshinari)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号: 50318474

(2) 研究分担者

天野 浩文 (AMANO, Hirofumi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 50318474

(3) 連携研究者

広瀬 幸子 (HIROSE, Sachiko)

桐蔭横浜大学・工学部・客員研究員

研究者番号: 00127127