

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670232

研究課題名(和文) MHC機能改変による新規自己免疫疾患モデルマウスの確立

研究課題名(英文) Establishment of murine model of autoimmune diseases

研究代表者

宮寺 浩子 (Miyadera, Hiroko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40361464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の発症のしやすさは、さまざまな遺伝要因、環境要因の影響を受ける。多くの自己免疫疾患において、最も強い遺伝要因として、ヒト白血球抗原(Human Leukocyte Antigens (HLA))遺伝子が同定されており、特定のHLA遺伝子型を持つ人では、自己免疫疾患の発症率が高い事が知られているが、その詳細な機序には不明な点が多く残されている。これを明らかにするため、本研究は、マウスでのHLAに相当する主要組織適合性抗原(Major Histocompatibility Complex (MHC))を改変し、自己免疫疾患発症への影響を解析した。

研究成果の概要(英文)：Susceptibility to autoimmune diseases varies greatly among individuals. It has been known that various environmental and genetic factors contribute to susceptibility to autoimmune diseases. For certain autoimmune diseases, genes that encode human leukocyte antigens (HLA) is the strongest susceptibility loci, however, underlying mechanisms remain elusive. In this study, we have studied mechanism of autoimmune diseases by modifying the genes that encode major histocompatibility complex (MHC) of mouse, which is analogous to human HLA, to understand potential roles of HLA/MHC class II in the development of autoimmunity.

研究分野：免疫遺伝学、生化学

キーワード：主要組織適合性抗原 自己免疫疾患 ヒト白血球抗原

1. 研究開始当初の背景

ヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen; HLA) (もしくは主要組織適合性抗原 (Major Histocompatibility Complex, MHC)) は様々な自己免疫疾患と関連することが遺伝子関連解析によって報告されているが、なぜ特定の HLA 遺伝子型を持つと自己免疫疾患に罹りやすくなるのか、その機序には不明な点が多く残されている。研究代表者はこれまで、HLA のタンパク質安定性を多数のアリルを対象として行い、自己免疫疾患感受性 HLA タンパク質が低安定性であることを見出した (Miyadera et al. *J. Clin. Invest.* 2015)。この知見は HLA タンパク質の不安定性が自己免疫疾患発症の一要因であることを示唆するものである。そこで HLA/MHC の特性と自己免疫疾患感受性との関連の背後にある機序を明らかにするため、本研究では、1型糖尿病モデル Non-obese diabetogenic (NOD) マウスを用いて研究を進めることとした。

NOD マウスは膵 β 細胞に対する自己免疫応答により 1 型糖尿病を自然発症する系統であり、膵島炎の発症は MHC クラス II (I-A^{g7}) と強い関連がある。そのため、ヒトの 1 型糖尿病病態との類似性が高く 1 型糖尿病の病態解明、治療法開発に適している。

NOD マウスを用いた先行研究はこれまでに非常に多数報告されており、なかでも、1990 年代には、NOD に MHC または HLA 遺伝子を導入したトランスジェニック株が多数作成された。興味深いことに、これらのトランスジェニックマウスの多くでは、糖尿病発症が顕著に抑制されていた (Nishimoto et al. *Nature*, 1987; Miyazaki et al. *Nature*, 1990; Slattery et al. *Nature*, 1990; Lund et al. *Nature*, 1990; Singer et al. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993; Quartey-Papafio et al. *J. Immunol.* 1995, 他)。しかし、なぜ、これらの MHC または HLA をトランスジェンとして導入することで糖尿病発症が抑制されるのか、そのメカニ

ズムは明らかではない。これらの、HLA/MHC トランスジェニック NOD マウスでは、導入した MHC または HLA の発現量、発現細胞が本来の MHC クラス II 発現部位 (抗原提示細胞) とは異なっている。また、トランスジェン挿入部位の遺伝子構造、発現量の変化が表現型に直接、間接的に影響している可能性もある。これらの効果を除外し、MHC 多型による表現型 (糖尿病発症率) への影響を明らかにするため、本研究では CRISPR/Cas9 システムで NOD マウスの MHC クラス II 上に部位特異的変異を導入することとした。

2. 研究の目的

HLA/MHC の遺伝子多型と自己免疫疾患感受性・抵抗性との関連のメカニズムを明らかにすることを目的として、NOD の MHC クラス II (I-Ag7) に変異を導入した変異導入株を作成し、MHC の機能変化と自己免疫疾患 (1 型糖尿病) 発症との関係を解析した。

3. 研究の方法

MHC クラス II は α, β サブユニットから成るヘテロ二量体タンパク質である。NOD マウスでは、 α サブユニットは *I-Aa* 遺伝子 (d アリル) にコードされ、 β サブユニットは、*I-Ab* 遺伝子 (g7 アリル) にコードされる。*I-Aa*(d)、*I-Ab*(g7) と他のアリルには見られない特徴的な多型を複数持つ。変異導入部位を決定するため、*I-Aa*(d) および *I-Ab*(g7) がコードする MHC クラス II タンパク質 (I-Ag7) の立体構造情報 (PDB: 3CUP) を基に、抗原提示およびタンパク質安定性に影響を与える多型を複数選択した。各残基について部位特異的変異を導入した変異型 I-Ag7 を培養細胞株で発現し、細胞表面発現量をフローサイトメーターで測定することにより、各残基のアミノ酸置換が I-Ag7 発現に与える影響を解析した。培養細胞系で得られた知見を基に、NOD マウスに導入する変異部位を選択した。

選択したアミノ酸残基について、CRISPR/Cas9 システムを用いて NOD マウス MHCII に変異導入した。切断標的領域の guide RNA、ドナー領域の配列をコードする 1 本鎖 DNA を設計し、変異導入に用いた。guide RNA、Cas9 mRNA、ドナー領域の 1 本鎖 DNA を NOD マウス受精卵前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植して産仔を得た。産仔から DNA を抽出し、塩基配列を解読し変異の有無を確認した。目的の変異が導入された個体を基に変異導入株を系統化した。

樹立した変異導入株および、NOD マウス (野生型) について、糖尿病発症率、免疫学的解析を行った。糖尿病発症率は雄雌各群 15-20 匹について、血糖値、尿糖値測定を週 1 回行い、血糖値が二週間連続で 200 mg/dl 以上を示した場合を糖尿病発症とした。また、膵臓の免疫染色 (抗インスリン抗体、抗 CD3 抗体等) により膵島へのリンパ球浸潤を定量化した。さらに、胸腺、脾臓、膵臓における MHC 発現量をフローサイトメトリーにより解析した。

4 . 研究成果

本研究では NOD マウスの MHC(I-Ag7) の特定のアミノ酸を CRISPR/Cas9 システムを用いて変異導入したノックインマウスを樹立した。変異導入株および野生株について、オフ・ターゲット領域 (上位 8 位) を含む領域を PCR 増幅して塩基配列を確認した。その結果、目的とする変異導入部位以外に変異が導入されていないことを確認した。

野生株および変異導入株の尿糖値・血糖値測定を 50 週間以上に渡り測定した。先行研究と同様、NOD マウス (野生株) 雌個体では約 20 週齢以降に複数の個体が糖尿病を発症した。雄個体では雌個体より糖尿病発症時期が顕著に遅く、雌雄各群における 50% 発症時期は先行研究と同様であった。変異導入株に

ついては、雄、雌ともに、NOD 野生株と比較して糖尿病発症率が著しく異なっていた (論文投稿準備中)。

近年、NOD マウスを対象とした研究から、MHC に提示されるインスリンペプチドが、細胞内でのペプチド融合を経て新たに作られた融合型の配列を持つ可能性が示唆され、自己免疫疾患を引き起こすメカニズムの一端が解明されつつある (Delong et al. *Science*, 2016)。しかし、MHC 遺伝子多型と疾患感受性・抵抗性との関係の解明は現時点では国内外ともに進展が見られていない。今後は、本萌芽研究で得られた知見をさらに発展させ、ヒトにおける自己免疫疾患発症機序の解明につながる基本的なメカニズムの解明を進める。

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 2 件)

1. Miyadera H*, Ohashi J, Lernmark Å, Kitamura T, Tokunaga K. Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J Clin Invest* (2015) 125: 275–291 doi: 10.1172/JCI74961.

2. Miyadera H*, Tokunaga K. Associations of human leukocyte antigens (HLA) with autoimmune diseases: Challenges in identifying the mechanism. *J Hum Genet* (2015) 60:697-702. doi: 10.1038/jhg.2015.100

[学会発表] (計 1 件)

宮寺 浩子

「HLA と自己免疫疾患の関連のメカニズム」 (シンポジウム)

日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015 年 10 月
15-17 日 (東京)

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮寺 浩子 (Miyadera, Hiroko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センタ

ー・その他部局等・その他

研究者番号: 40361464

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

研究協力者

岡村 匡史 (Okamura, Tadashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センタ

ー・研究所・室長

研究者番号: 00333790

中野 堅太 (Nakano, Kenta)

国立研究開発法人国立国際医療研究センタ

ー・研究所・技術職員

高梨 理絵子 (Takanashi, Rieko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センタ

ー・研究所・技術職員

岡部 由紀 (Okabe, Yuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センタ
ー・その他部局等・技術補佐員