

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08874

研究課題名(和文)小胞体膜分子Nogoによる病原性自己抗体産生の新たな制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of pathogenic autoantibody production by Nogo

研究代表者

乾 匡範 (Inui, Masanori)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80443985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は小胞体膜タンパクであるNogoがマクロファージに発現し、核酸認識TLRの細胞内輸送に関与すること、核酸認識TLRシグナルに必須であることを明らかにしている。Nogo遺伝子欠損マウスをSLE様の自己免疫症状を呈するBXSBマウスに戻し交配したBXSB.Nogo欠損マウスの解析において、BXSB.Nogo欠損マウスは血中総IgG抗体価に変化を認めないが、有意に抗ds-DNA IgG抗体価が減少すること、一方、血中総IgM抗体価および血中抗ds-DNA IgM抗体価はいずれも有意に減少することを見出した。Nogoは自己抗体を産生するB細胞のクラススイッチを制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体産生細胞であるB細胞の寛容機構の維持が破綻すると、病原性自己抗体の産生が誘導され全身性エリテマトーデス(SLE)など様々な自己免疫疾患の発症につながる。そのためB細胞の寛容誘導機構を解明することは自己免疫疾患の新規な治療法の開発に不可欠である。申請者は小胞体膜タンパクであるNogoが自己抗体産生、さらにはクラススイッチに関与することを明らかにした。本研究課題の遂行により、免疫寛容の成立・維持を制御する新規な概念を提唱できた。

研究成果の概要(英文)：I have shown that Nogo, an endoplasmic reticulum membrane protein, is expressed on macrophages and is essential for the induction of intracellular signaling through nucleic acid-sensing TLRs. I generated Nogo-deficient mice backcrossed to BXSB mice, a disease model with SLE-like autoimmune symptoms, and found that BXSB.Nogo-deficient mice showed significantly decreased anti-ds-DNA IgG antibody titer while total IgG antibody titer in blood was comparable to BXSB mice. On the other hand, both total IgM and anti-ds-DNA IgM antibody titer in blood were significantly decreased in BXSB.Nogo-deficient mice. These results suggest that Nogo could regulate the class switch recombination to IgG in autoantibody-producing B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：自己抗体 自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

抗体産生細胞である B 細胞の寛容維持機構が破綻すると、病原性自己抗体の産生が誘導され全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) など様々な自己免疫疾患の発症につながる。しかしながら、自己寛容の成立に関わる分子基盤は依然十分に解明されておらず、自己抗体の産生制御機構を理解することは自己免疫疾患の新規治療法の開発に必須である。

SLE をはじめとする自己免疫疾患の発症には遺伝的要因のみならずウイルス感染など環境的要因が深く関係していることが知られている。近年、ウイルスや細菌の核酸を認識する Toll-like receptors (核酸認識 TLRs) のシグナル異常が免疫寛容の破綻に重要な役割を果たすことが報告され、自己免疫疾患との関係が注目されている。実際に、ヒト SLE 患者の SNP 解析より、核酸認識 TLR である TLR7 の SNP と SLE の関連が示されている (Shen N, et al. *PNAS* 2010)。さらに、SLE 様モデルマウスである BXSB マウスは、抗 double-strand (ds) DNA 抗体など自己抗体の過剰な産生による致死性の糸球体腎炎の発症を特徴としているが、これは TLR7 遺伝子の遺伝子重複に起因すると考えられている (Pisitkun P, et al. *Science* 2006)。また、核酸認識 TLR の機能獲得には UNC93B1 などシャペロン分子の働きによる小胞体からエンドソームへの小胞輸送が必須であり、これらシャペロン分子の機能異常は核酸認識 TLR のシグナル錯乱を誘導し、自己免疫疾患の発症に寄与している (Fukui R, et al. *Immunity* 2011)。このように、核酸認識 TLR のシグナル伝達経路、動態、ならびに小胞輸送機構の分子機序を明らかにすることは、病原性自己抗体の産生と自己免疫疾患の発症制御機構の解明における重要な課題である。

## 2. 研究の目的

ウイルスや細菌の核酸を認識する TLR (核酸認識 TLR) シグナルの制御異常は免疫寛容の破綻を導き、全身性エリテマトーデスなど自己免疫疾患発症の重要な要因となることが報告されているが、これらに関わる分子基盤は依然十分に解明されていない。申請者は小胞体膜タンパクである Nogo がマクロファージにおいて核酸認識 TLR の輸送に関与し、TLR シグナル伝達に必須の分子であることを明らかにしている。本研究では、核酸認識 TLR による免疫寛容の成立・維持、破綻の分子基盤を解明することを目指し、小胞体膜分子 Nogo の B 細胞における核酸認識 TLR のシグナル伝達経路、動態制御、ならびに自己抗体産生 B 細胞のクラススイッチに与える影響を検討する。

## 3. 研究の方法

小胞体膜分子 Nogo は核酸認識 TLR シグナル伝達経路に必須である。そこで TLR シグナル異常と自己抗体産生、自己免疫疾患の発症の関係解明を目指し、B 細胞の TLR シグナルにおける Nogo の役割を Nogo 欠損マウスおよび自己免疫疾患モデル BXSB マウスに交配した BXSB.Nogo 欠損マウスを用いて免疫学的、病理学的解析手法により分子レベルで制御機序を調査する。新たに同定した Nogo 会合分子 GRAMD4 を含め、小胞体に存在する自己抗体産生、クラススイッチに関わる新規分子群の探索を免疫沈降法や質量分析法、網羅的遺伝子発現解析法を駆使して行い、自己抗体のクラススイッチ制御と小胞体膜タンパク、TLR シグナルの関係解明を目指す。

## 4. 研究成果

Nogo 遺伝子欠損マウスを SLE 様の自己免疫症候を呈する疾患モデルマウスである BXSB マウスに戻し交配した BXSB.Nogo 欠損マウスを作製し、自己免疫疾患の発症、ならびに自己抗体産生における Nogo の役割を検討したところ、BXSB.Nogo 欠損マウスにおいて血中総 IgG 抗体価に変化を認めないが、有意に抗 ds-DNA IgG 抗体価が減少すること、一方、血中総 IgM 抗体価および血中抗 ds-DNA IgM 抗体価はいずれも有意に減少することを見出した (図 1)。

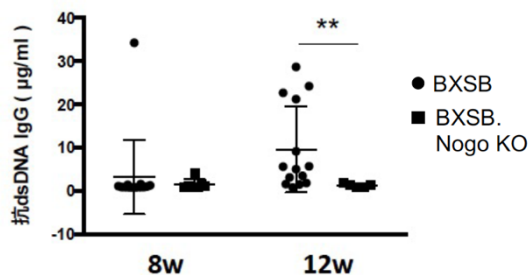


図1 BXSB.Nogo KOマウスは減少した血中抗dsDNA IgG抗体価を示す

次に、クラススイッチにおけるNogoの役割をin vitroでの誘導系を用いて検討したところ、LPS+IL-4やanti-CD40+IL-4により誘導されるIgG1へのクラススイッチにおいて、BXSB.Nogo欠損マウスB細胞ではBXSBマウスB細胞と比較して減少傾向を示した(図2)。さらに、培養上清中のIgG1抗体価においても減少傾向を確認した。このように、NogoはIgG1へのクラススイッチを促進する働きをもつことが示唆された。

また、生体内におけるNogoとクラススイッチした形質細胞についての関係を調査したところ、全形質細胞数やクラススイッチした形質細胞数にNogo遺伝子欠損マウスと野生型マウスとに有意な違いは認められなかった。

これらのことから、Nogoは自己抗体を産生するB細胞のIgGへのクラススイッチを制御する可能性が示された。

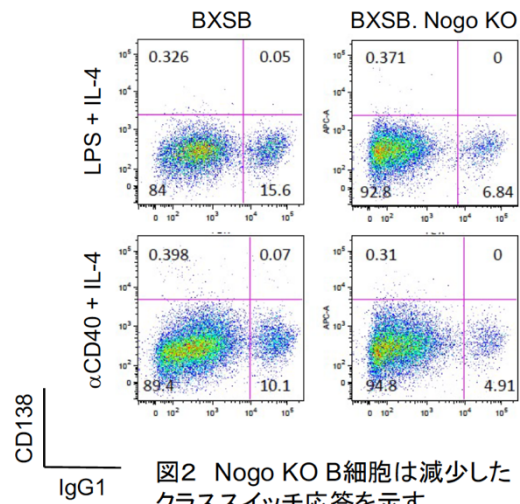


図2 Nogo KO B細胞は減少したクラススイッチ応答を示す

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Su Mei-Tzu, Inui Masanori, Wong Yi Li, Takahashi Maika, Sugahara-Tobinai Akiko, Ono Karin, Miyamoto Shotaro, Murakami Keiichi, Itoh-Nakadai Ari, Kezuka Dai, Itoi So, Endo Shota, Hirayasu Kouyuki, Arase Hisashi, Takai Toshiyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Blockade of checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B binding to fibronectin ameliorates autoimmune disease in BXSB mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Tatsuya, Biswas Mrityunjoy, Kosugi Kouyu, Nagashima Maria, Inui Masanori, Tomono Susumu, Takagi Hidekazu, Ichimonji Isao, Nagaoka Fumiaki, Ainai Akira, Hasegawa Hideki, Chiba Joe, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 606518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.606518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima Akina, Tomono Susumu, Yamazaki Tatsuya, Inui Masanori, Morita Naoko, Ichimonji Isao, Takagi Hidekazu, Nagaoka Fumiaki, Matsumoto Misako, Ito Yasuhiko, Yanagishita Takeshi, Miyake Kensuke, Watanabe Daisuke, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Phospholipase A2 from bee venom increases poly(I:C)-induced activation in human keratinocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kayaba Atsuko, Itoh-Nakadai Ari, Niibe Kunimichi, Shiota Matsuyuki, Funayama Ryo, Sugahara-Tobinai Akiko, Wong Yi Li, Inui Masanori, Nakayama Keiko, Takai Toshiyuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Bone marrow PDGFR +Sca-1+-enriched mesenchymal stem cells support survival of and antibody production by plasma cells in vitro through IL-6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugahara-Tobinai Akiko, Inui Masanori, Metoki Takaya, Watanabe Yohei, Onuma Ryoichi, Takai Toshiyuki, Kumaki Satoru	4. 巻 38
2. 論文標題 Augmented ILT3/LILRB4 Expression of Peripheral Blood Antibody Secreting Cells in the Acute Phase of Kawasaki Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 431 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wong Yi Li, Su Mei-Tzu, Sugahara-Tobinai Akiko, Itoi So, Kezuka Dai, Endo Shota, Inui Masanori, Takai Toshiyuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Gp49B is a pathogenic marker for autoantibody-producing plasma cells in lupus-prone BXSB/Yaa mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Tatsuya, Inui Masanori, Hiemori Keiko, Tomono Susumu, Itoh Makoto, Ichimonji Isao, Nakashima Akina, Takagi Hidekazu, Biswas Mrityunjoy, Izawa Kumi, Kitaura Jiro, Imai Teruko, Sugiura Nobuo, Tateno Hiroaki, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 294
2. 論文標題 Receptor-destroying enzyme (RDE) from Vibrio cholerae modulates IgE activity and reduces the initiation of anaphylaxis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6659 ~ 6669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------