

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08388

研究課題名(和文) 関節リウマチと転写伸長遺伝子Aff3の関連についての解析

研究課題名(英文) Analysis of relationship between Aff3 gene and rheumatoid arthritis

研究代表者

九十九 伸一 (TSUKUMO, Shin-ichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：10346596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Aff3の生理的、分子的な機能を解明することを目的として、Aff3欠損マウスの解析を行った。その結果、IgG2c等へのクラススイッチの低下が認められ、また、マウスマラリア感染モデルでは、感染抵抗性の低下が認められることを明らかにした。さらに、Aff3がクラススイッチを制御する分子機構について解析を行い、AFF3タンパク質が直接抗体遺伝子座のスイッチ領域の結合し、そのDNA変異率を向上させることでクラススイッチを促進していることを明らかにした。ヒトにおいても、Aff3と抗体の発現量が相関していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AFF3遺伝子は、関節リウマチなどの自己免疫疾患と関連していることが遺伝的な解析によって示唆されているが、その機能についてはほとんど分かっていなかった。本研究では、AFF3が抗体のクラススイッチを直接制御しており、感染防御に関与していることを明らかにした。これは、抗体のクラス変換が関節リウマチなどに重要な役割を果たしていることを示唆しており、新しい治療・診断法の開発に対して有用な情報を与えることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed Aff3-deficient mice in order to elucidate the physiological and molecular functions of Aff3. As results, I found that the class switch of antibodies to IgG2c and other classes was decreased and that the resistance to infection was decreased in the mouse malaria infection model. Furthermore, we analyzed the molecular mechanism by which Aff3 regulates class switch, and found that AFF3 protein directly binds to the switch region of the antibody locus and enhances its DNA mutation rate, thereby promoting class switch. In addition, I found that the expression levels of Aff3 and antibodies were also correlated in human.

研究分野：免疫学

キーワード：抗体 クラススイッチ 自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

mRNA の転写伸長は、遺伝子発現制御における重要なステップである。発生に関連する遺伝子について、遺伝子のプロモーター領域に RNA ポリメラーゼが結合はするが、30-40 ヌクレオチド進んだところで止まる場合があることが報告されており、発生に伴って転写が伸長するには Super elongation complex (SEC) が必要であると考えられている。SEC は、p-TEFb (CDK9/Cyclin T1)、ELL、AFF などのタンパク質から構成されている。分化等の刺激に伴って、SEC 中の CDK9 が RNA ポリメラーゼおよびその転写伸長の阻止因子をリン酸化し、転写の伸長を開始する。この転写調節機構の重要性は、ES 細胞の分化、ウイルス遺伝子の転写・複製、白血病細胞でのがん化機構で示されているが、免疫制御における役割についてはよくわかっていない。

また、SEC 中の AFF は、AFF1-4 の 4 種類が存在することが報告されているが、その中で AFF3 は主にリンパ球に高い発現が認められ、また GWAS 解析から関節リウマチ、1 型糖尿病との関連が示唆されていることから、免疫制御に深い関与があることが推測された。

## 2. 研究の目的

本研究は、転写伸長制御と免疫システムの調節の関わりについて、その分子機構を解明することを目的とした。特に AFF3 は、リンパ球での高い発現が認められることから、細胞種特異的な機能を持っていることが予想され、さらに GWAS 解析から AFF3 と各種免疫疾患との関連性が推測されていることから、本研究の成功によりこれまで未知の制御機構が明らかになることが期待される。また、この遺伝子の機能と、自己免疫疾患発症との関連を明らかにすることができれば、免疫制御の新たなメカニズムの解明と、免疫疾患の予防・診断・治療に重要な手掛かりが得られることも期待できる。

## 3. 研究の方法

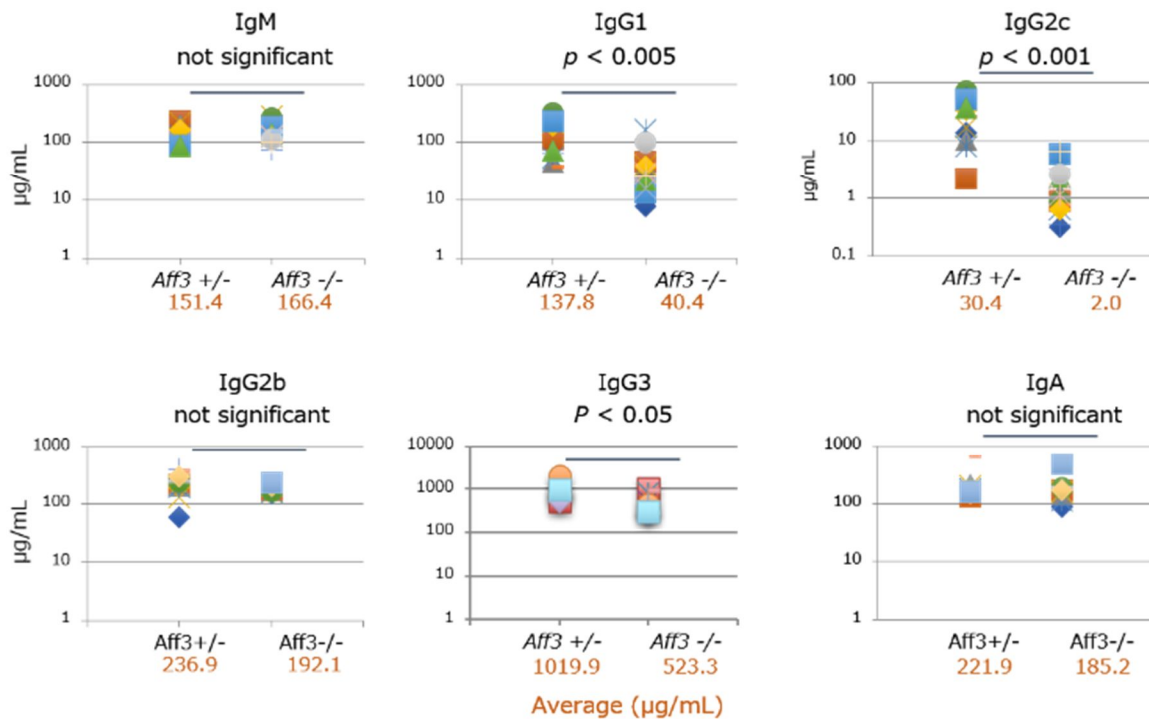
Aff3 欠損マウスを用いて、そのリンパ球の数や種類の変化を測定した。また、リンパ球の分化・機能、抗体量等について、in vitro 培養系や in vivo の免疫・感染モデルを用いて解析した。変化が認められた機能について、その分子機構を、cDNA microarray、ChIP-qPCR、DNA 変異測定、遺伝子導入等によって解析した。また、ヒトにおいて Aff3 近傍 SNP と Aff3 と抗体の発現量の相関について測定した。

## 4. 研究成果

Aff3 欠損マウスにおいて、リンパ球の分化、数に異常は見られなかったが、血清中の抗体量に変化が認められた。特に、IgG2c が減少しており、つづいて IgG1、IgG3 の減少が大きかった。一方、IgG2b、IgA の減少は認められなかった (図 1)。この減少が、感染免疫においてもみられるかどうかを、マウスマラリアモデルにおいて検証した。その結果、Aff3 欠損マウスでは、マウスマラリア感染に対してより感受性が上がり、マラリア原虫特異的な IgG2c、IgG1 が減少していることがわかり、このモデルにおいても特定のクラスの抗体の減少が見られることが分かった。また、CD19-cre マウスを用いたコンディショナル KO マウス等の解析により、Aff3 が B 細胞

で欠損したところに、この表現型が認められることを示した。

図1 Total amounts of IgG2c, IgG1, IgG3 are low in *Aff3*<sup>-/-</sup> mice serum (unimmunized)



*Aff3* 欠損によって抗体が減少するメカニズムを解明するため、in vitro 培養系を用いた。マウス B 細胞を LPS/IL4 刺激下培養したところ、細胞表面および培養液中の IgG1 は、*Aff3* 欠損によって減少していた。細胞増殖には影響は認められなかった。cDNA microarray 解析を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行ったが、影響を受けた遺伝子は少数であり、またこれらの遺伝子は B 細胞の機能とは関連が無いと思われるものであった。そこで、抗体のクラススイッチについて、スイッチ領域の DNA 組換えを解析したところ、*Aff3* 欠損マウスで減少が見られた。RNA 転写については、postswitch の転写産物は減少していたが、germline 転写産物には影響がなかった。また、それぞれのスイッチ領域の変異率を解析したところ、IgM では変化が無かったが、IgG1 では有意な変異の減少が認められた。*Aff3* の C 末端側半分に FLAG タグをつけて ChIP-qPCR 解析を行ったところ、IgM と IgG1 のスイッチ領域への結合が見られた。

以上の結果を得て、*Aff3* は、B 細胞において直接各抗体のスイッチ領域に結合し、特定のスイッチ領域での変異導入を制御していることが分かった。抗体のクラススイッチ制御は、免疫機能・免疫疾患発症において、重要な役割があることがこれまで報告されており、本研究の新知見は、これらの制御機構・診断・治療に対して、有用な情報となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sasaki Yuki, Otsuka Kunihiro, Arimochi Hideki, Tsukumo Shin-ichi, Yasutomo Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct Roles of IL-1 and IL-18 in NLR4-Induced Autoinflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 591713 ~ 591713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.591713	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shin-ichi Tsukumo, Koji Yasutomo
2. 発表標題 Aff3 is required for the class switching of IgG2c, IgG1 and IgG3 in a B cell-intrinsic manner
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 九十九伸一、安友康二
2. 発表標題 自己免疫疾患におけるAFFファミリーの役割
3. 学会等名 自己免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Tsukumo, Koji Yasutomo
2. 発表標題 Transcriptional elongation factor Aff3 regulates class switching of antibody in B cells
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------