

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 9 年 5 月 1 5 日現在

機関番号 : 3 2 7 1 7

研究種目 : 基盤研究(C) (一般)

研究期間 : 2014 ~ 2016

課題番号 : 2 6 4 6 0 4 9 3

研究課題名 (和文) 細胞特異的FcγRIIB発現欠損マウスを用いたループス腎炎発症機序の解明

研究課題名 (英文) Cell type-specific role of inhibitory IgG Fc receptor IIB in murine lupus

研究代表者

林 青順 (LIN, QINGSHUN)

桐蔭横浜大学・医用工学部・客員研究員

研究者番号 : 0 0 4 6 8 5 8 9

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) : B細胞の活性化を負に制御するFcγRIIBは樹状細胞、単球、好中球など骨髄系細胞にも発現している。Yaa変異遺伝子の存在かで、FcγRIIB分子を欠損したマウスは重篤なループス腎炎を発症する。病態発症におけるFcγRIIB分子の役割を細胞レベルで明らかにする目的で、B細胞、樹状細胞及び骨髄系細胞にそれぞれFcγRIIB分子を欠損するマウスを作成した。B細胞及び骨髄系細胞特異的FcγRIIBを欠損したマウスは中程度のループス腎炎を発症した。樹状細胞特異的FcγRIIB欠損マウスでは正常所見だった。B細胞及び骨髄系細胞でのFcγRIIB欠損は違う機序でループス腎炎発症に寄与していることが示された。

研究成果の概要 (英文) : C57BL/6 mice carrying the Yaa autoimmune susceptibility locus spontaneously develop lethal lupus nephritis when the FcγRIIb gene is deleted (B6.FcγRIIb-/-Yaa). To define the cell type specific role of FcγRIIb in the disease, we established B cell (CD19Cre.Yaa), myeloid cell (C/EBPαCre.Yaa), and dendritic cells (DC) (CD11cCre.Yaa) specific FcγRIIb-deficient B6.Yaa mouse strains. CD19Cre.Yaa mice developed milder lupus nephritis compared to B6.FcγRIIb-/-Yaa mice, indicating that FcγRIIb deficiency on only B cells is not sufficient for the development of severe disease. Surprisingly, C/EBPαCre.Yaa mice developed similar mild disease as CD19Cre.Yaa mice whereas CD11cCre.Yaa stayed disease free. These observations indicate that, in B6.FcγRIIb-/-Yaa mice, FcγRIIb deficiency on both B cells and myeloid cells, but not on DCs, contribute to the development of severe lupus with high autoantibody titers.

研究分野 : 基礎医学・実験病理学

キーワード : ループス腎炎 自己免疫寛容破綻 細胞特異的FcγRIIB欠損 B細胞 単球/マクロファージ 樹状細胞
B細胞活性化因子 IL-1b, IL-10, CLcf1

1. 研究開始当初の背景

(1)Fc γ RIIB分子はB細胞の活性化を負に制御するkey分子である。我々は、ループス腎炎自然発症マウス系(NZB, BXSB, MRL)に、*Fcgr2b*遺伝子のプロモーター領域にAP-4結合部位欠損を伴う多型が共通してみられ、この自己免疫型多型は、活性化B細胞上のFc γ RIIBの発現低下と、自己反応性B細胞活性化による自己抗体産生を誘導することを報告した。さらに、BXSB δ マウスの自己免疫型*Fcgr2b*多型を、正常C57BL/6(B6)マウス型に入れ替えると、ループス腎炎が完全に抑制され、自己免疫型*Fcgr2b*遺伝子多型が重要な自己免疫疾患発症の感受性遺伝子の1つであることを立証した。

(2)ループス腎炎におけるFc γ RIIB分子の役割を解析する目的で、オランダライデン大学遺伝学教室のDr. Verbeekとの共同研究で、B6マウスのES細胞を用いてFc γ RIIB発現欠損B6マウスを作製した。しかし、Fc γ RIIB発現欠損のみではループス腎炎は発症しなかった。そこで、BXSB δ マウスが持つ*Yaa*遺伝子を導入したところ、高度のループス腎炎の発症が認められた。*Yaa*遺伝子を持つB6.*Yaa*マウス自身はループス腎炎を発症しないことからFc γ RIIB発現欠損と*Yaa*遺伝子の相互作用が病態発症に寄与していると考えられる。ループス腎炎マウスでは、B細胞の活性化による自己抗体の産生が特徴的である。そこで、B細胞特異的にFc γ RIIB発現を欠損させたB6.*Yaa*マウスを作製して、ループス腎炎発症の有無を解析した。その結果、全ての細胞上でFc γ RIIB発現を欠損するB6.Fc γ RIIB^{Null}.*Yaa*マウスでは高度のループス腎炎が発症したが、B細胞特異的にFc γ RIIB発現を欠損させたB6.CD19^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスでは自己抗体の産生および腎糸球体への免疫複合体の沈着はみられたが、蛋白尿の出現を伴うループス腎炎の発症はB6.Fc γ RIIB^{Null}.*Yaa*マウスに比較して高度に抑制され、死亡率も有意に改善された。

2. 研究の目的

Fc γ RIIB発現欠損によるB細胞の活性化は、自己抗体の産生とそれに伴う腎糸球体への免疫複合体の沈着をもたらすが、重篤なループス腎炎の発症には、B細胞上でのFc γ RIIB発現欠損のみで説明できなかった。Fc γ RIIBはB細胞の代表的な活性化抑制分子であるが、樹状細胞やmyeloid系細胞(単球/マクロファージ/好中球)にも発現し、免疫応答の調節を行なっている。これらの細胞特異的にFc γ RIIB発現を欠損するマウス系を樹立して、ループス腎炎におけるFc γ RIIB発現欠損の役割を細胞・分子レベルで明らかにすることを目的として本研究をスタートした。

3. 研究の方法

マウス系	Fc γ RIIB発現欠損細胞
B6.Fc γ RIIB ^{Flox} . <i>Yaa</i>	欠損無し
B6.Fc γ RIIB ^{Null} . <i>Yaa</i>	全て細胞
B6.CD19 ^{Cre} Fc γ RIIB ^{Flox} . <i>Yaa</i>	B細胞
B6.CD11c ^{Cre} Fc γ RIIB ^{Flox} . <i>Yaa</i>	樹状細胞
B6.CEBP α ^{Cre} Fc γ RIIB ^{Flox} . <i>Yaa</i>	骨髄系細胞

以上5種類マウスにおける病態解析及び免疫細胞の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)ループス腎炎の病態解析

図1に示したように、血中anti-dsDNA、chromatin、RNPの自己抗体価の測定結果、いずれの抗体産生においても、B6.Fc γ RIIB^{Null}.*Yaa*>>B6.CD19^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*=B6.CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*>>B6.CD11c^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*=B6.Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*の順であった。12ヶ月齢における蛋白尿の出現率も、B6.CD19^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスとB6.CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスでは、B6.Fc γ RIIB^{Null}.*Yaa*マウスと比較し有意に抑制された。一方、B6.CD11c^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスでは蛋白尿の出現が見られなかった。腎臓の病理組織学変化については、B6.Fc γ RIIB^{Null}.*Yaa*マウスでは明らかな腎糸球体の腫大及び細胞増殖、また、メザンジウム領域とepithelial領域に著しいIgG、C3の沈着が見られたが、B6.CD19^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスとB6.CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスでは、共に細胞増殖、主にメザンジウム領域のIgG、C3の沈着が見られたが、程度が抑制された。B6.CD11c^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}.*Yaa*マウスでは腎病変が認められなかった。

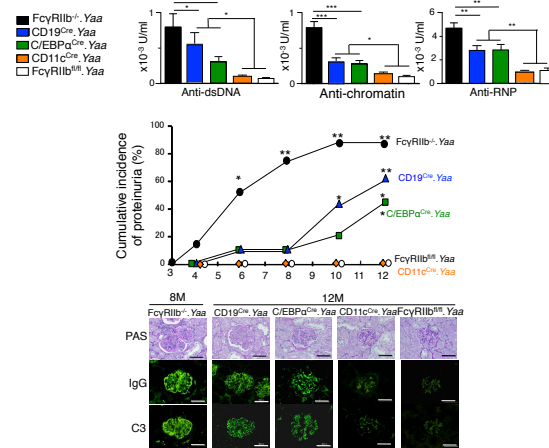


図1 自己抗体産生とタンパク尿及び腎臓病理学変化

(2)末梢血の単球組成の変化

図2に示したように、腎炎発症が見られる B6. Fc γ RIIB^{Null}. Yaa, B6. CD19^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa, 及び B6. CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa マウスではいずれも末梢血における CD11b 陽性 Monocytes の比率の増加が見られた。ところが、B6. Fc γ RIIB^{Null}. Yaa マウスと B6. CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa マウスのみ明らかに Gr1⁺CD11b⁺ monocytes の細胞集団の比率の増加が見られた。一方、ループス腎炎の発症が見られない B6. CD11c^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa マウスでは正常 B6. Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa マウスと同程度だった。これは B6. Fc γ RIIB^{Null}. Yaa マウスと B6. CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa マウスの単球/マクロファージ上での Fc γ RIIB 発現欠損によるものだと考えられる。

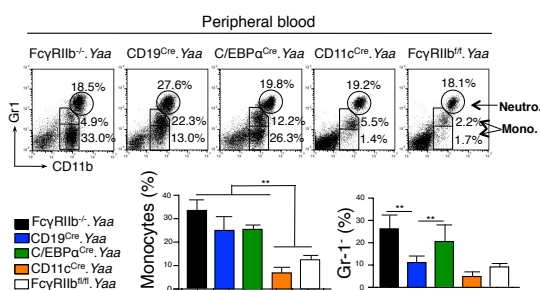


図2 末梢血における単球subset比率の変化

(3)Gr1⁺CD11b⁺ 及び Gr1⁻CD11b⁺ monocytes の比率と脾臓胚中心B細胞との相関関係

B6. Fc γ RIIB^{Null}. Yaa マウスと B6. CEBP α ^{Cre}Fc γ RIIB^{Flox}. Yaa マウスの Gr1⁻CD11b⁺ monocytes の比率と胚中心B細胞の比率と相関関係が認められた (図3)。

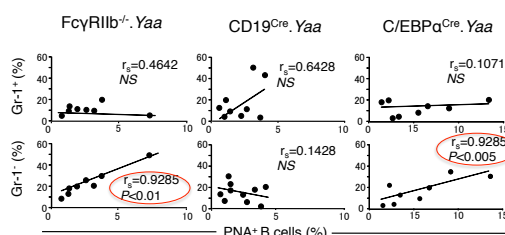


図3 単球subset比率と胚中心B細胞との相関関係

(4)Gr1⁻CD11b⁺ 及び Gr1⁺CD11b⁺ monocytes における RNA-Seq 解析結果

末梢血の Gr1⁻CD11b⁺ 及び Gr1⁺CD11b⁺ monocytes を FACS-sorting し、RNA-Seq 解析を行った結果、13322 個の遺伝子群がピックアップされた(図4)。その中で 292 個の遺伝子群が Gr1⁻CD11b⁺ monocytes において発現上昇が認められた (rank order score>1.5)。さらに細胞の活性化を誘導できる遺伝子群の検索を行った結果、Gr1⁻CD11b⁺ monocytes における IL-10, IL-1 β , CLcf 1 (B細胞刺激因子3, BSF3) の発現が著明に上昇していることが示された (図5)。

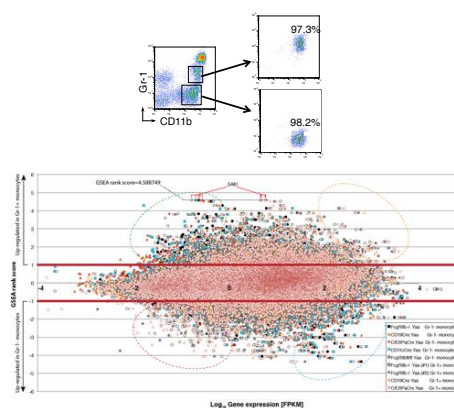


図4 単球subsetの分離及びRNA-Seq解析図

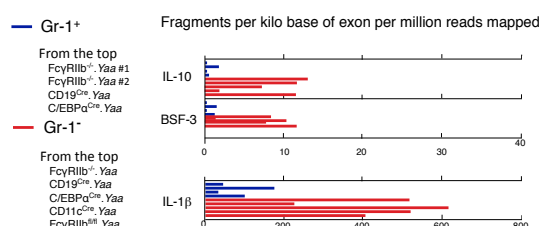


図5 Gr1⁻CD11b⁺monocyteにおけるB細胞活性化因子の発現レベル

(5)B6. Fc γ RIIB^{Null}. Yaa マウスに見られる重篤なループス腎炎は、B細胞上での Fc γ RIIB 発現欠損のみでは説明できなかった。また、B細胞上および単球上の Fc γ RIIB 発現欠損は、各々異なる機序で自己抗体の産生に寄与していることが明らかになった。

本研究結果は、B細胞のみをターゲットとしたループス腎炎の治療は不十分であり、単球/マクロファージをターゲットとする治療法の基礎的裏付けになると考えられる。

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)

論文発表 (5件)

①Ohtsuji M, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Okazaki H, Tsurui H, Amano H, Shirai K, Nishimoto N, Nishimura H, and Hirose S. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel Fc γ RIIB-deficient rheumatoid arthritis mouse model. Mod. Rheumatol. 査読あり、2014 ; 27:1-8

②Okazaki H, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Tsurui H, Ohtsuji M, Amano H, Tada N, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, and 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. 査読あり、2104 ; 24(6):931-8

③Kawano S, Lin Q, Amano H, Kaneko T, Nishikawa K, Tsurui H, Tada N, Nishimura H, Takai T, Shirai T, Takasaki Y and Hirose S. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of Yaa mutation into Fc γ RIIB-deficient C57BL/6 mice. 査読あり、Eur. J. Immunol. 2013 ; 43:770-778

④Sato-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, and Hirose S. Presumptive role of 129 strain-derived Sle16 locus for rheumatoid arthritis in a new mouse model with Fc γ receptor type RIIB-deficient C57BL/6 genetic background. Arthritis Rheum. 査読あり、2011 ; 63(10):2930-2938

⑤Lin Q, Hou R, Sato A, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Amano H, Amano E, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S. Inhibitory IgG Fc receptor promoter region polymorphism is a key genetic element for systemic lupus erythematosus. J. Autoimmun. 査読あり、2010 ; 34:356-363

〔学会発表〕(計 2 件)

①LIN Qingshun, TSURUI Hiromichi, NISHIKAWA Keiko, AMANO Hirohumi, OHTSUJI Mareki, NISHIMURA Hiroyuki, J. Sjeef. Verbeek, HIROSE Sachiko. Inhibitory IgG Fc receptor IIB on B cells and monocytes independently controls Yaa-induced murine lupus. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月4日-2016年12月7日 沖縄コンベンションセンター

②林 青順, 西川 桂子, 天野 浩文, 大辻 希樹, 西村 裕之, 白 井 俊一, 広瀬 幸子. 細胞特異的Fc γ FIIB発現欠損マウスを用いたループス腎炎発症機序の解明 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016年4月24日-2016年4月26日 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 青順 (LIN QINGSHUN)

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし