

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19152

研究課題名(和文) 自己免疫疾患の免疫グロブリン再構成におけるエピジェネティクス機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulatory mechanisms of immunoglobulin gene rearrangements in autoimmune diseases

研究代表者

山田 宗茂(YAMADA, Norishige)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：60625242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス(SLE)のモデルマウス等の動物試料を用いて、抗体産生に関わる免疫グロブリン遺伝子再構成とその転写に異常があることを明らかにした。また、SLEモデルマウスの初期分化過程のB細胞は、野生型マウスと比べて、正常な分化過程から逸脱している可能性も明らかにし、その原因となる可能性が示唆された分化調節因子をB細胞特異的にノックアウトするマウスの作製にも成功した。

今後、SLEモデルマウス等を用いて明らかとなった現象について、ヒトSLE等自己免疫臨床検体を用いて検討することにより、SLEをはじめとする自己免疫疾患の診断応用への可能性を探る。

研究成果の概要(英文)：Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease that can affect almost any part of the body, and B cell play critical roles in pathogenesis of SLE through autoantibody production. In a mouse model of SLE, aberrant gene rearrangement and transcription were found at immunoglobulin heavy chain locus in immature B cells. In addition, we observed abnormal bone marrow B-cell development in mouse model of SLE. Moreover, we successfully generated a mouse model for B cell conditional deletion of differentiation regulatory factor.

These findings open the possibility of using immunoglobulin rearrangement status as diagnostic tool for SLE.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：自己免疫疾患 免疫グロブリン遺伝子再構成 SLE

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患とは、自己反応性リンパ球の活性化により組織障害を引き起こす疾患であり、臓器特異的疾患と全身性疾患に分類される。全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) (指定難病; 告示番号 49) は、皮膚・関節・腎臓をはじめとする様々な臓器に影響をもたらす全身性の慢性炎症性疾患であり (*N Engl J Med.* 358, 900 (2008))、10 代後半から 40 代までの女性に好発するが、小児や高齢の男女においても発症する。

平成 27 年度「衛生行政報告書」において、国内の SLE 患者総数は約 6 万 3 千人となっており、難病疾患の中では潰瘍性大腸炎、パーキンソン病に次いで 3 番目に多い疾患である。

(2) 難病情報センターによる報告では、一卵性双生児での SLE 一致率は 25% 程度とされており、何らかの遺伝的素因を背景として、感染、性ホルモン、紫外線、薬物等の環境因子が加わって発症するものと推測されている。具体的な原因の一つとして、SLE は、患者の血中で抗 dsDNA 抗体・抗ヒストン抗体など、多種類の自己抗体が産生する自己免疫異常により、ループス腎炎をはじめとする多臓器病変が進展すると考えられている (*Nat Rev Rheumatol.* 12, 102 (2016))。自己抗体の産生機序を含め、その原因は未だ明らかになっていないところが多い。

SLE における自己抗体の産生機序を明らかにすることは、多種の自己免疫疾患の発症機構の解明や、新しい診断法や治療法の確立につながることを期待できる社会的に急務の課題である。

2. 研究の目的

自己免疫疾患とは、自己に対する体液性、または細胞性免疫反応により組織障害を引き起こす疾患であり、全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) 多発性硬化症、関節リウマチ等がある。これら自己免疫疾患においては、原因や病態等未だ不明な点が多く、効果的な根本治療の確立に至っていないのが現状であることから、SLE をはじめとする自己免疫疾患の成立機序の解明に繋げ、臨床応用への可能性を探ることを目指し、以下の項目を本研究での最重要課題とした。

(1) 本研究では、自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) のモデルマウス (NZB×NZW F1 等) の動物試料を用いて、自己抗体産生に関わる免疫グロブリン遺伝子座における再構成の状況を明らかにし、自己抗体産生機序の解明につなげることを目的とした。

(2) SLE モデルマウスの疾患発症前後の骨髓、および脾臓から分離した初期分化過程における B 細胞、ならびに成熟な B cell を用いて、自己免疫疾患に関わる免疫グロブリン遺伝子再構成関連因子、ならびに、自己免疫疾患に関与している可能性のある遺伝子の同定を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト SLE リンパ節を用いた病理組織学的解析

SLE 患者から採取したリンパ節炎と正常リンパ節を用いて、抗 CD138 抗体等による形質細胞マーカーを用いた免疫染色をおこなった。

(2) Degenerate PCR 法を用いた自己免疫疾患モデルマウスにおける免疫グロブリン再構成の検討

自己免疫疾患のリンパ節炎において、正常リンパ節と比較して Plasma 細胞の増加が確認されたことから、必要以上の抗体や、dsDNA 抗体をはじめとする自己抗体の異常産生が示唆された。このことから、自己免疫疾患における免疫グロブリン遺伝子座再構成の状況を確認するため、疾患発症前後の自己免疫疾患モデルマウス: NZB×NZW F1 (NZB/W F1)、および、コントロールマウス (C57BL/6 マウス) の骨髓から採取された初期分化過程における B 細胞を用いて、DNA 抽出後に Degenerate PCR (縮重プライマーを用いた PCR) を行った。

本検討で用いた degenerate primer は、これまで多くの文献で報告されている共通の primer 配列を用いた (*Immunity* 28: 335-45, 2008; *Nat Immunol* 5: 463-468, 2002; *J. Immunol* 162: 6029-39 等)。その後、免疫グロブリン遺伝子再構成後の PCR 産物配列アニールするプローブを用いてサザンブロットティングを行い、遺伝子再構成が行われた正確なバンドを確認した。

(3) マイクロアレイ等を用いた自己免疫疾患及び、免疫グロブリン遺伝子再構成に関わる遺伝子の同定

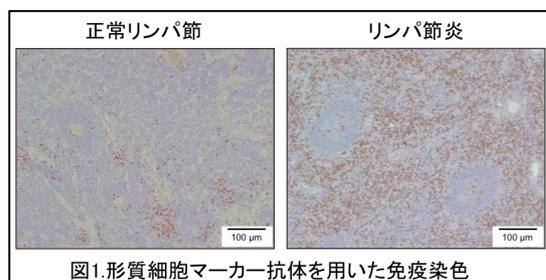
疾患発症前 (10 週前後) と発症後 (30 週以降) の NZB×NZW F1 (NZB/W F1) マウス (SLE モデルマウス) から骨髓 B 細胞を採取して、抽出した RNA を用いてマイクロアレイを行い、B 細胞分化関連因子や、免疫グロブリン再構成関連因子等 (エピジェネティクス制御関連因子含む) を中心に、自己免疫疾患へ関与の可能性のある遺伝子を含めた同定を目的として解析を行った。

免疫グロブリン遺伝子座における再構成、並びに B 細胞分化可能性のある遺伝子については、リアルタイム RT-PCR やウエスタンブロットティング法を用いて詳細に検討した。リアルタイム RT-PCR やウエスタンブロットティングにより、mRNA やタンパク質 発現量

について SLE モデルマウスと野生型マウス間で有意な差が見られた遺伝子については、免疫グロブリン遺伝子再構成への直接的な影響を確認するために、B 細胞特異的に遺伝子をノックアウトすることができる、コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。

4. 研究成果

(1) SLE 患者から採取したリンパ節炎と正常リンパ節を用いて、抗 CD138 抗体による形質細胞マーカーを用いた免疫染色により、正常リンパ節と比較して SLE リンパ節炎では形質細胞が有意に増加していることを確認した(図 1)。



(2) 我々は SLE 自然発症型モデルマウスである NZB×NZW F1 (NZB/W F1) マウス(以下、SLE モデルマウス)(PNAS, 93, 8563 (1996)) の免疫グロブリン遺伝子座特定領域において、BALB/c (以下、野生型マウス)と比較して、遺伝子再構成とその転写に異常があることを明らかにした(未発表データ: 論文投稿準備中)。

具体的には、疾患発症前後の自己免疫疾患モデルマウス、および、野生型コントロールマウス(C57BL/6 マウス)の骨髄細胞から、B 細胞マーカーの一つである B220 抗体を用いてソーティングを行い、初期分化過程における B 細胞を採取した。採取された初期分化過程における B 細胞からゲノム DNA を抽出し、DNA 抽出後に Degenerate PCR (縮重プライマーを用いた PCR) を行った。

本検討で用いた degenerate primer は、これまで多くの文献で報告されている共通の primer 配列 (Immunity 28: 335-45, 2008; Nat Immunol 5: 463-468, 2002; J. Immunol 162: 6029-39 等) を用いて PCR を行い、電気泳動を行ったゲルをメンブレンへ転写後、免疫グロブリン遺伝子再構成後の PCR 産物配列アニールするプローブを用いてサザンブロッティングを行い、遺伝子再構成が行われた正確なバンドを確認した。

また、新たに免疫グロブリン J 領域 J1-J4 において Reverse primer を作製し、J1-J4 全てに対応した Degenerate PCR を行った結果、同様の結果を得ることができた。

(3) 一方我々は、SLE モデルマウスの骨髄 B 細胞 (B220:B 細胞マーカー) は、野生型マウス (C57BL/6) と比べて B 細胞初期分化過程において、正常な分化過程から逸脱している可能性も明らかにした。(未発表データ: 論文投稿準備中)

具体的には、SLE モデルマウス、および、野生型マウス (C57BL/6) の骨髄細胞を用いて、B 細胞分化に関わる細胞表面マーカーにより解析を行った結果、SLE モデルマウスは、野生型マウスと比較して、B 細胞分化に関わる細胞表面マーカーの発現量が低い状態であった。

(4) B 細胞成熟分化過程においては、骨芽細胞や神経細胞等、多種の細胞の分化調節因子である Zinc finger protein が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。我々は SLE モデルマウス骨髄中の初期分化過程における B 細胞においても、野生型マウスと比べて Zinc finger protein 遺伝子発現量が低下していることを確認した(未発表データ: 論文投稿準備中)。

具体的には、SLE モデルマウス、および、野生型マウス (C57BL/6) の骨髄細胞を用いて、B 細胞マーカーの一つである B220 抗体を用いてソーティングを行い、初期分化過程における B 細胞を採取した。採取された B 細胞から total RNA を抽出し、逆転写後 Zinc finger protein に対するプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。結果、SLE モデルマウスにおける Zinc finger protein 遺伝子発現量は、野生型マウスと比べて有意に低い状況であった。

(5) さらにごく最近、B 細胞特異的に Zinc finger protein をノックアウトする conditional knockout (cKO) マウスの作製に成功した。Zinc finger protein cKO マウスの骨髄中の初期分化過程における B 細胞、並びに脾臓中の成熟 B 細胞を、B 細胞マーカーの一つである B220 抗体を用いてソーティングを行い、回収された B 細胞からゲノム DNA を抽出し、Degenerate PCR を行った結果、骨髄中の初期分化過程における B 細胞、ならびに、脾臓中の成熟 B 細胞ともに免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子再構成に偏り(異常)が生じていることも確認した(未発表データ: 論文投稿準備中)。

本研究により、我々は SLE モデルマウスにおいて、免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子再構成と転写に異常があることを初めて見出した。今後、自己抗体産生へとつながる可能性を明らかにするため、免疫グロブリン遺伝子再構成が行われる骨髄中の初期分化過程における B 細胞 (pro-B、pre-B 細胞等) を研究対象とする。

また、SLE モデルマウスにおける骨髄 B 細胞において、野生型マウスと比べて B 細胞の成熟分化過程に異常がある可能性が明らかとなった。この結果から、多くの組織の分化

調節因子である Zinc finger protein に着目し、本研究課題遂行中に作製に成功した Zinc finger protein コンディショナルノックアウトマウスを用いて、免疫グロブリン再構成異常から、自己免疫疾患への影響までを詳細に検討する。

一方、SLE および関節リウマチ等では、エピジェネティックな変化を示す証拠が報告されている (*Nat Rev Rheumatol.* 10, 72 (2014))。これらの背景のもと、SLE モデルマウス、並びに Zinc finger protein コンディショナルノックアウトマウス等を用いて SLE における免疫グロブリン遺伝子座における遺伝子再構成・転写状況と、それに関わるエピジェネティクス制御機構を明らかにし、SLE 等自己免疫疾患の発症機構 (自己抗体産生機序等) の解明を目指す。

さらに、SLE モデルマウス等を用いて明らかとなった現象について、ヒト SLE 等自己免疫臨床検体 (末梢血等) を用いて検討することにより、SLE をはじめとする自己免疫疾患の診断応用への可能性を探る。

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 3 件)

Miyagawa A, Yoshifuji H, Kitagori K; Ito S, Oku T, Hirayama Y, Salah A, Nakajima T, Kiso K; Yamada N, Haga H and Tsuruyama T; Increase of MZB1 in B cells in systemic lupus erythematosus: Proteomic analysis of biopsied lymph nodes. *Arthritis Res Ther*, 20(1): 13, 2018
DOI: 10.1186/s13075-018-1511-5.

Tsuruyama T, Hiratsuka T and Yamada N; Hotspots of MLV integration in the hematopoietic tumor genome. *Oncogene*, 36(9): 1169-1175, 2017
DOI: 10.1038/onc.2016.285.

Salah A, Yoshifuji H, Ito S, Kitagori K, Kiso K, Yamada N, Nakajima T, Haga H, Tsuruyama T and Miyagawa- Hayashino A; High expression of galectin-3 in patients with IgG4-related disease- a proteomic approach. *Pathol Res Int*, 2017:9312142, 2017
DOI: 10.1155/2017/9312142.

[学会発表](計 0 件)

[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]

ホームページ等

http://www.cas.med.kyoto-u.ac.jp/tissue_research/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 宗茂 (YAMADA, Norishige)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：60625242