

平成21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580286  
 研究課題名 (和文) 自己免疫性唾液腺炎における B 細胞異常増殖の原因遺伝子群と  
 遺伝子間相互作用  
 研究課題名 (英文) Genes regulating B cell dominant infiltration into autoimmune  
 sialitis lesions and their intergenic interaction  
 研究代表者  
 滝口 満喜 (Takiguchi Mitsuyoshi)  
 北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
 研究者番号：70261336

## 研究成果の概要：

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS) モデル IQI マウスにおける B 細胞優勢の下顎腺炎 (B 細胞性下顎腺炎) を遺伝学的に解析した。その結果、B 細胞性下顎腺炎の量的形質遺伝子座 (QTL) は少なくとも 3 個有り、単独で効果を発揮する主要 QTL (autoimmune sialitis in IQI mice, associated locus 1; Asq1) が第 6 染色体前端に、Asq1 の効果を增強するエピスタシス QTL が第 3 染色体後方 (Asq2) に、また、逆に Asq1 の効果を抑制する抵抗性遺伝子座が第 1 染色体後方 (Asq3) に位置することを明らかになった。Asq1 の 1LOD 区間内に位置する Ica1 に注目し、その cDNA 塩基配列を対照 C57BL/6 (B6) と比較した結果、IQI-B6 間で 6 個の一塩基多型があり、2 個のアミノ酸多型が生じていた。また、ウエスタンブロット法では、IQI マウスの血清中に抗 Ica1 自己抗体の存在を示すバンドが検出された。以上の結果より、IQI マウスにおいて、Ica1 に対する B 細胞自己免疫が成立していることが明らかになり、原因として、Ica1 の塩基多型の可能性が挙げられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	690,000	4,090,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学／基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：遺伝・自己免疫

## 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は自己反応性リンパ球によって唾液腺・涙腺が破壊される自己免疫疾

患であり、口腔乾燥と乾性角結膜炎を主徴とする。SSは決して稀な疾患ではなく、ヒト患者数が日米で最大450万人と推定される、“ありふれた



病気 common disease”である。本疾患はヒトに限った病気ではない。獣医学領域においても、イヌの眼科疾患で最も多い乾性角結膜炎がヒトSSの相同疾患と考えられており(Kaswanら、1984)、最近ではネコでもSS症例が報告されている(Canappら、2001)。このように、SSはヒトと伴侶動物において生活の質に関わる疾患であり、獣医学領域でSSを研究することは、パラメディカルと伴侶動物臨床の両面から重要である。

ヒトSSの特徴として、病期の初期から中期では、唾液腺における浸潤細胞の主体はCD4<sup>+</sup>T細胞であるが、末期に唾液腺でB細胞が異常増殖を始め、患者の約5%が消化管に悪性Bリンパ腫を発症することが挙げられる。

なぜ、SSにおいてB細胞が異常増殖をするのか？。この疑問を解決できれば、SSからBリンパ腫への進展をくい止め、B細胞の自己反応性、すなわち臓器特異的自己抗体の産生を抑えるためのゲノム創薬の基礎知見となりうる。しかしながら、いまだにこの疑問は解明されておらず、その理由は、以下の三つに集約される。

- 1) SS初期病巣の形成にあずかる抗原提示細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞に研究が集中し、B細胞異常増殖における研究者人口が絶対的に不足している。
- 2) SSを含め自己免疫疾患が複数の原因遺伝子の加算効果または相乗効果による多遺伝子疾患であるという認識が不足し、疾患の重篤度と相関性の低い、一種類の主要原因遺伝子のみを検出と証明にエネルギーを費やしている。しかもサイトカインや細胞表面タンパクなどの実行因子を候補遺伝子とみなすなど、先入観が強い。
- 3) SS自然発症マウスモデルとして研究に頻用されているのは、I型糖尿病モデルでも

あるNODマウスとSLEモデルでもあるMRL/lprマウスである。これらは有力な情報を提供しているが、ヒトSSと異なり、浸潤細胞は全病期を通してT細胞が優勢であり、ヒトSS末期にみられるB細胞異常増殖の研究モデルとして適さない。

## 2. 研究の目的

本研究は、SSにおけるB細胞異常増殖が多遺伝子疾患であると認識し、その原因遺伝子“群”を同定して、遺伝子間の相互作用モデルを構築することを目的とした。具体的には、SS自然発症マウスモデルであるIQIマウスの唾液腺炎病巣におけるB細胞異常増殖の複数の感受性遺伝子座(量的形質遺伝子座=QTL)を(IQIxC57BL/6)F2マウスの連鎖解析(QTL解析)によって同定し、それらの遺伝子座の相互作用の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

親系統として6ヵ月齢のIQI雌雄およびC57BL/6N(B6)雌雄マウスを、交雑系として正交雑F1[(IQIxB6)F1]雌雄、逆交雑F1[(B6xIQI)F1]雌雄、正交雑F1雌雄の交配によるF2[(IQIxB6)F2]雌マウスを作製し、遺伝学的研究に供した。

### (2) 量的形質の定量

マウスから主要臓器を摘出・固定後、両側下顎腺の中央部・縦断面のパラフィン包埋組織を作製した。そのパラフィン包埋組織から3枚の隣接連続切片を作製し、1枚にHE染色を施した。HE染色下で50個以上の単核細胞からなる細胞浸潤巣をスコア1、両側下顎腺の合計スコアを1個体の唾液腺炎スコアとした。次に、唾液腺炎スコア陽性の個体に限り、残る2枚の切片にT細胞マーカーCD3の免疫

染色と、B細胞マーカーB220の免疫染色を行った(図1)。各染色標本から同一の細胞浸潤巣を全てデジタル画像化し、二量値化後、DAB発色域の面積計算を行い、B220反応域/CD3反応域>1.1の浸潤巣1個をスコア1、両側下顎腺の合計スコアを1個体のB細胞性唾液腺炎スコアとした。

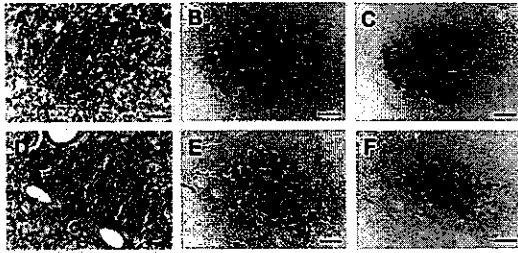


図1. IQIマウス(A-C)およびB6マウス(D-F)の下顎腺におけるリンパ球浸潤巣

A, D) HE染色、B, E)CD3免疫染色、C, F)B220免疫染色

### (3) 遺伝子型判定と統計解析

初めにF2マウス30個体を対象に、選出した多型性マイクロサテライトマーカー(89個)の遺伝子型を、尾ゲノムDNAを鋳型にPCR法で判定した。次に量的形質値と遺伝型データをMapManager QTXソフトウェアに入力し、スクリーニングの区間マッピングと $\chi^2$ 乗解析( $P=0.0001$ )による全マーカー遺伝子座対の交互作用解析を行った。区間マッピングの統計学的有意水準は、genome-wise experiment level (Lander and Kruglyak, Nature, 1995)を採用し、示唆レベル suggestive level を尤度比統計量  $LSR=12.9$  ( $LOD=2.8$ )、有効レベル significant level を  $LSR=19.8$  ( $LOD=4.3$ ) とした。最初のマッピングで唯一  $LSR$  が示唆レベルに達した第6染色体前端的領域と、 $LSR$  が示唆レベル未満であったが有意な交互作用を示したマーカー遺伝子座4対、計6個のマーカー遺伝子座

の領域を、F2雌マウスのサンプルサイズを179個体に拡大し、マーカー遺伝子を追加しながら、QTL絞り込みの区間マッピングを行った。続いて、2次マッピングで絞り込んだ4対の遺伝子座と、その4対を構成するマーカー遺伝子座6個と主要QTLと考えられた1マーカー遺伝子座(D6Mit138)の組み合わせ6対、合計10対の遺伝子座間で、二元配置分散分析( $p=0.05$ )を行い、交互作用を検定した。

(4) B細胞性唾液腺炎・候補遺伝子のポジショナル・クローニングと候補遺伝子産物に対するB細胞性自己免疫応答(自己抗体産生能)のウェスタンブロット法による解析

B細胞性唾液腺炎・感受性遺伝子座の複合区間マッピング・QTL解析と二元配置分散分析により絞り込んだ候補遺伝子をポジショナル・クローニングし、唾液腺炎発症・非発症マウス間で塩基配列を比較した。さらに、その遺伝子産物に対する自己抗体の存在をIQIマウス血清を用いたウェスタンブロット法による検討した。

## 4. 研究成果

(1) 唾液腺炎およびB細胞性唾液腺炎の遺伝様式

唾液腺炎スコアはIQI雌マウスで100%の陽性率を示したものの、B6マウス雌雄および正交雑F1マウス雌雄でも低い発症率およびスコアながら認められた(図2A)。一方、B細胞性唾液腺炎はIQI雌雄マウスで検出されたが、正および逆交雑F1マウスではほとんど検出されなかった(図2B)。ゆえに、IQIマウスのB細胞性唾液腺炎は常染色体劣性に遺伝する疾患であると考えられた。

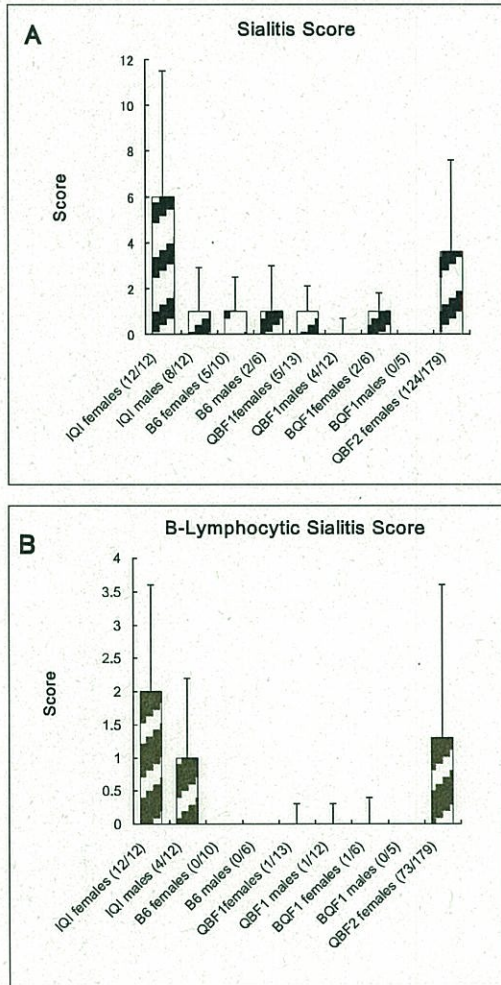


図 2 親系統および交雑系マウスの唾液腺炎スコア(A)および B 細胞性唾液腺炎スコア(B)

A. 親系統および交雑系マウスの唾液腺炎スコア

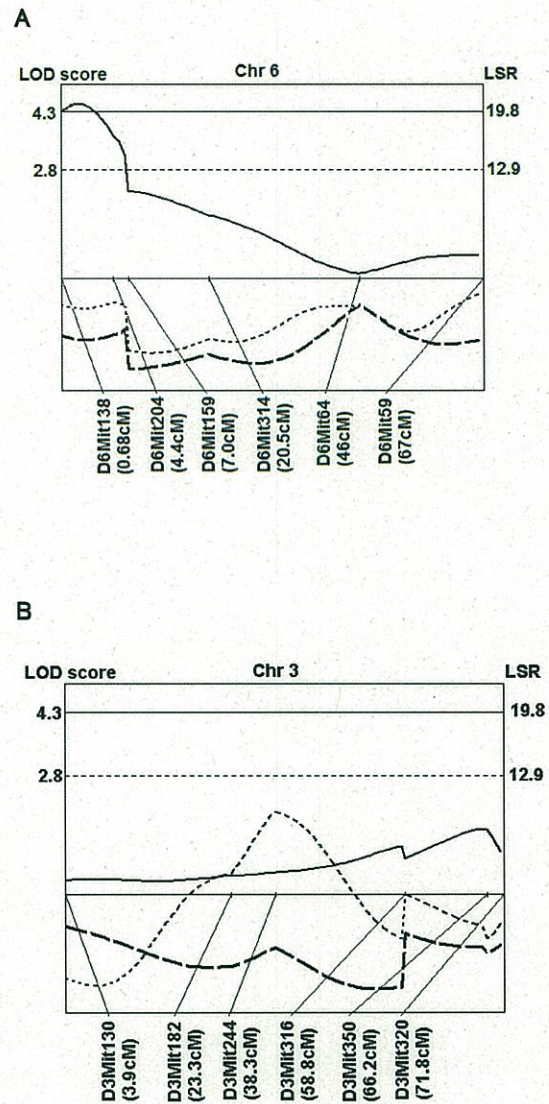
B. 親系統および交雑系マウスの B 細胞性唾液腺炎スコア

(2) B 細胞性唾液腺炎の主要 QTL の検出

F2 雌マウス 179 固体を使用した常染色体および X 染色体の区間マッピングにおいて、LOD スコアが significant level を越える量的形質遺伝子座 (QTL) は、第 6 染色体前端 D6Mit138 (0.68cM) - D6Mit204 (4.4cM) 間の一カ所のみ

に検出され、autoimmune sialitis in IQI mice, associated locus 1 (*Asq1*) と命名し

た (図 3A)。 *Asq1* のマーカー遺伝子 D6Mit138 と他の non-significant QTL の二元配置分散分析の結果、単独では有意な効果を示さないものの、*Asq1* と共存することによって *Asq1* の効果を増強するエピスタシス遺伝子座 *Asq2* が第 3 染色体後部 D3Mit350 (66.2cM) 近傍に (図 3B)、また、*Asq1* の効果を抑制する遺伝子座 *Asq3* が第 1 染色体後方 D1Mit36 (92.3cM) 近傍に検出された (図 3C)。





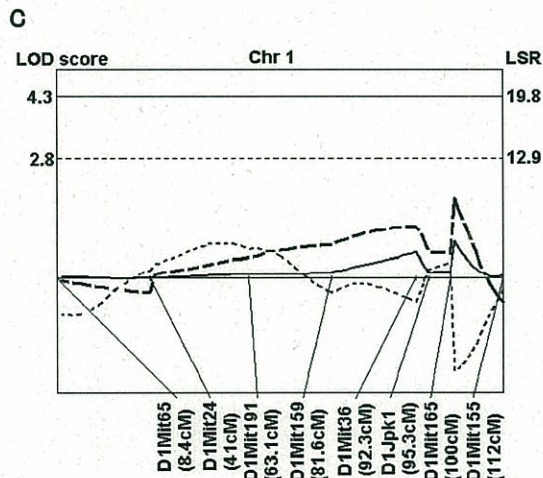


図 3. 第 1(A), 3(B), および 6 染色体(C)の区間マッピング結果

(3) B 細胞性唾液腺炎の量的形質に交互作用する遺伝子座の二元配置分散分析

表 1 に B 細胞性唾液腺炎の量的形質に交互作用する遺伝子座の二元配置分散分析結果を示す。

表 1. B 細胞性唾液腺炎の量的形質に交互作用する遺伝子座の二元配置分散分析

Chr	遺伝子座	Chr	遺伝子座	交互作用
Chr1	D1Mit165	Chr1	D1Mit24	P=0.2130
Chr1	D1Mit36	Chr3	D3Mit350	P=0.2393
Chr3	D3Mit350	Chr11	D11Mit15	P=0.8188
Chr3	D3Mit350	Chr17	D17Mit21	P=0.0602
Chr6	D6Mit138	Chr1	D1Mit165	P=0.4318
Chr6	D6Mit138	Chr1	D1Mit24	P=0.5501
Chr6	D6Mit138	Chr1	D1Mit36	P=0.0259*
Chr6	D6Mit138	Chr3	D3Mit350	P=0.0164*
Chr6	D6Mit138	Chr11	D11Mit15	P=0.2263
Chr6	D6Mit138	Chr17	D17Mit21	P=0.9310

Chr= chromosome (染色体)

\*遺伝子座 1-2 間の有意(significant)な交互作用

(4) Asq1 の候補遺伝子 Ica1 の塩基配列解析  
Asq1 の 1LOD 区間内に位置する Islet cell autoantigen 1 (Ica1) 遺伝子に注目し、IQI-B6 マウス間で cDNA の塩基配列を比較した結果、IQI-B6 間で 6 個の一塩基多型があり、2 個のアミノ酸多型が生じていた (図 4)。

\*T cell epitope p69 (Tep69)

```

(B6N) 1  MSGHKCYSWELQDRFAQDKSVVNMQQKYWETKQAFKATGKKEDEHVVASDADLDAKLE 60
(IQI) 1  MSGHKCYSWELQDRFAQDKSVVNMQQKYWETKQAFKATGKKEDEHVVASDADLDAKLE
(B6N) 61  LFHSIQRTCLDLSKAVLYQKRIQFLSQEENELGKFLRSQGFQDKTRAGKMMQATGKALC 120
(IQI) 61  LFHSIQRTCLDLSKAVLYQKRIQFLSQEENELGKFLRSQGFQDKTRAGKMMQATGKALC
(B6N) 121 FSSQQRALRNPLCRFHQEVETFRHRAISDTWLTVNRMEQYRTEYRGALLVMKDVSOEQLD 180
(IQI) 121 FSSQQRALRNPLCRFHQEVETFRHRAISDTWLTVNRMEQYRTEYRGALLVMKDVSOEQLD
(B6N) 181 PDLYKQMEKFRKVGTVQLAKIQNFQKLVKMDVCCQKVDLLGASRCNLLSHMLATYQITLLHF 260
(IQI) 181 PDLYKQMEKFRKVGTVQLAKIQNFQKLVKMDVCCQKVDLLGASRCNLLSHMLATYQITLLHF
(B6N) 261 WEKTSHTMAAHESFPGYQPYEFTTLKSLQDPMKQLVEKEGKTSWRENREAVAPEPRL 300
(IQI) 261 WEKTSHTMAAHESFPGYQPYEFTTLKSLQDPMKQLVEKEGKTSWRENREAVAPEPRL
(B6N) 301 ISLEDEHKDSSAYKTEEGTSVLSVVDKGSVHDTCSGPIDELLDGKPEEACLGPTAGTPEP 360
(IQI) 301 ISLEDEHKDSSAYKTEEGTSVLSVVDKGSVHDTCSGPIDELLDGKPEEACLGPTAGTPEP
(B6N) 361 ESGDKDQLLLNFEFSTSCLEDEGEFSREWAAVFGDDQLKEPAPMGAQGEFDPKQIGSGF 420
(IQI) 361 ESGDKDQLLLNFEFSTSCLEDEGEFSREWAAVFGDDQLKEPAPMGAQGEFDPKQIGSGF
(B6N) 421 LPSQLLDQNMKDLQASLQEPAKAASDLTAWFSLFADLPLSNPDVAVGKTDKEHELLNA* 479
(IQI) 421 LPSQLLDQNMKDLQASLQEPAKAASDLTAWFSLFADLPLSNPDVAVGKTDKEHELLNA*
  
```

図 4. B6 および IQI マウス Ica1 タンパクの予想アミノ酸配列の比較

(5) IQI マウスにおける抗 Ica1 自己抗体の検出

ウエスタンブロット法では、IQI マウスの血清中に抗 Ica1 自己抗体の存在を示すバンドが検出された。一方、対照 B6 マウスの血清中には同自己抗体は検出されなかった (図 5)。

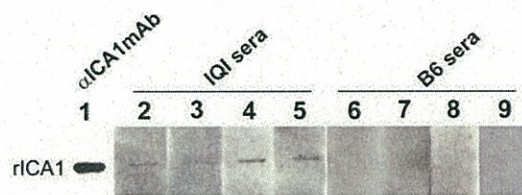


図 9. ウエスタンブロット法による IQI 雌マウス血清中の抗 Ica1 自己抗体の検出

## 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 4 件)

- ① Konno A, Takiguchi M, Takada K, Usami T, Azumi K, Kubota H, Inaba M, Saegusa J, Kon Y., Identification of a quantitative trait locus regulating B cell-dominant infiltration into autoimmune sialitis lesions of the IQI mouse model of primary Sjögren's syndrome. *Immunogenetics*, 59, 853-859, 2007. 査読有.
- ② Machida T, Uchida E, Matsuda K, Hirayama K, Yoshii K, Takiguchi M, Taniyama H., Aldosterone, corticosterone and cortisol-secreting adrenocortical carcinoma in a dog: Case report, *J. Vet. Med. Sci.*, 70, 317-320, 2008. 査読有.
- ③ Yamasaki M, Hwang S-J, Ohta H, Yamato O, Maede Y, Takiguchi M, Flow cytometry to evaluate the level of *Babesia gibsoni* parasitemia in vivo and in vitro by using the fluorescent nucleic acid stain SYTO16, *Jpn. J. Vet. Res.*, 55, 129-136, 2008, 査読有.
- ④ Nakamura K, Sasaki N, Yoshikawa M, Ohta H, Hwang Shiang-Jyi, Mimura T, Yamasaki M, Takiguchi M. Quantitative contrast-enhanced ultrasonography of canine spleen *Vet Radiol Ultrasound* 50: 104-108, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

滝口 満喜 (Takiguchi Mitsuyoshi)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：70261336

(2007. 9. 14~2009. 3. 31)

今野 明弘 (Konno Akihiro)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助手

研究者番号：00271651

(2006. 4. 1~2007. 9. 13)

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし