

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06027

研究課題名(和文)異なる遺伝子背景に起因する抗核抗体値上昇機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of increase in antinuclear antibody levels due to differences in genetic background of mice

研究代表者

伊藤 禎洋 (ITO, Sadahiro)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30345722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、当初、抗核抗体価の上昇を指標として、C57BL/6系統の遺伝子背景(Apca^s-/-; 129/Sv//Ev × C57BL/6)に存在する129/Sv//Ev領域{D1Mit36(76.73cM)からD1Mit115(82.78cM)}の免疫に関係する遺伝子群をランダムに20遺伝子、ゲノム編集法で破壊する予定でいた。そのため、ホモ個体1匹について、全ゲノムシーケンスを行った。

しかし、C57BL/6Nに戻し交配を続けて、系統維持しているうちに抗核抗体価の上昇が起きなくなっていた。したがって、抗核抗体価の上昇を指標として、ゲノム編集する方法はできなくなってしまった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホモ個体において、免疫に関係する表現系が現れた。前脚と後脚の間の腹部を体液が出る程掻きむしる個体と肥満して突然死する個体が出てきた。抗核抗体価の上昇に関わる領域は、129/Sv//Ev領域{D1Mit36(76.73cM)からD1Mit115(82.78cM)}の中ではなく、ごく近い近傍であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We initially investigated the 129/Sv//Ev region { The plan was to randomly destroy 20 genes related to immunity from D1Mit36 (76.73cM) to D1Mit115 (82.78cM) using genome editing. Therefore, we performed whole genome sequencing on one homozygous individual. However, as we continued backcrossing to C57BL/6N and maintained the line, the antinuclear antibody titer no longer increased. Therefore, it is no longer possible to edit the genome using an increase in antinuclear antibody titer as an indicator.

研究分野：分子生物学

キーワード：アレルギー 免疫反応の系統差 皮膚疾患 肥満と突然死

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先行研究において、ES細胞(マウス 129/Sv//Ev 系統から確立した ES 細胞)を用いて *Sap* ノックアウト(*Sap*-KO)マウスを作製したところ、C57BL/6 系統の遺伝子背景では、抗核抗体価の上昇が認められるが、遺伝子背景を C3H/He 系統に移すと抗核抗体価の上昇はなかった。この研究成果に基づき *Sap* の近傍遺伝子が、抗核抗体価の上昇に関わっていると強く示唆された。

血清アミロイド P 成分(SAP)等のペントラキシンは、自然免疫系に有意な影響を及ぼす。Nehemiah Cox 等の論文 DC-SIGN activation mediates the differential effects of SAP and CRP on the innate immune system and inhibits fibrosis in mice. / Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jul 7;112(27):8385-90 より、急性期の線維性病変では、SAP は、好中球の活性化および減少に関与し、線維芽細胞様の線維芽細胞への分化を阻害、IL-10 を分泌する非炎症性マクロファージへの分化促進に関与すると報告されている。

一方 IL-10 は、B 細胞に対して免疫賦活作用も有し、全身性エリテマトーデス(SLE)の病態では病原性を持つ可能性が論文 A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. / Immunity 2016 Mar 15;44(3):683-697. で指摘されている。

したがって、急性期と慢性期では、SAP の役割は違っている可能性があった。

2. 研究の目的

自己免疫疾患は、重篤な病であり、抗核抗体値上昇の原因となるメカニズムについては、いまだに不明な点が多い。

SAP の役割については、Darrell Pilling と Richard H. Gomer の総説 The Development of Serum Amyloid P as a Possible Therapeutic. / Front. Immunol., 16 October 2018 より、

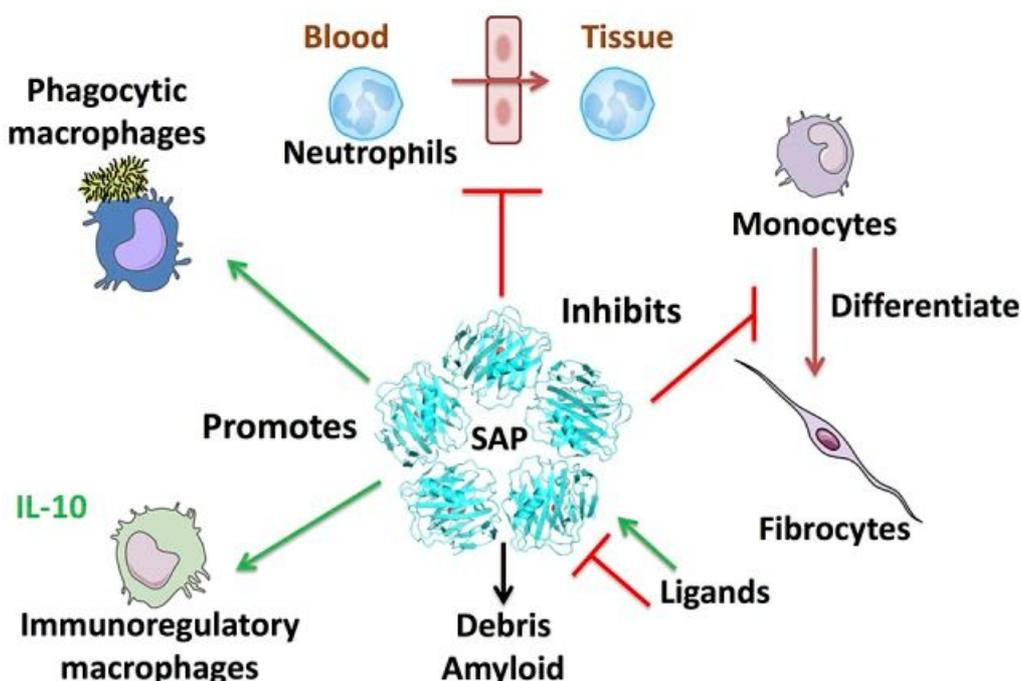


図1 SAP の役割

1 SAP は、細胞外マトリックスへの好中球の接着を阻害し、組織への好中球の移動を阻害する。

2 SAP は Fc R および DC-SIGN に結合して、単球から線維細胞への分化を阻害する。

3 SAP はまた、補体成分 C1q やマンノース結合レクチン (MBL) などの複数の血漿タンパク質に結合して、細菌の食作用を促進し、マクロファージの分化を調節する。

4 SAP はバクテリアと細胞破片をオプソニン化してマクロファージによる除去を促進し、アミロイド沈着物に結合する。

5 SAP は免疫調節および M1 食細胞マクロファージを促進する。

とされている。

Sap ノックアウト (Sap-KO) マウスを遺伝的に解析することで、抗核抗体値上昇に関係する遺伝子を特定することが目的だった。

3 . 研究の方法

抗核抗体価の上昇を指標として、C57BL/6系統の遺伝子背景 (Apcs-/- ; 129/Sv//Ev x C57BL/6) に存在する129/Sv//Ev領域 { D1Mit36 (76.73cM) からD1Mit115 (82.78cM) } この領域にマウス全身性エリテマトーデス (SLE) に関連が深い *Sle1* や *Nba10* 領域を含む538の遺伝子がある。これらの遺伝子の中から、まず、疑わしい免疫、造血、働きが不明な50遺伝子を候補として、ランダムに20遺伝子、ゲノム編集法で破壊する予定でいた。

表 1 . 免疫、造血、働きが不明な遺伝子 (D1Mit36 からD1Mit115)

Chromosome	Start	End	cM	strand	GRCh38	MGI	Feature Type	Symbol	Name
1	147249520	169211344				MGI:2387104	QTL	Nidd3k	Nidd3 on KK-A<cy>
1	147249520	189251027				MGI:2687238	QTL	Hbnr4	Heligmosomoides bakeri nematode resistance 4
1	150317922	188627115				MGI:3042880	QTL	Splq5	spleen weight QTL 5
1	152919071	186706423				MGI:5644314	QTL	Nba10	New Zealand Black autoimmunity 10
1	156774467	189571420	67.71			MGI:2656541	QTL	Lmr8	leishmaniasis resistance 8
1	164315658	190802075				MGI:2669988	QTL	Berr1	berghei resistance locus 1
1	168358674	171804689	76.25			MGI:2681136	QTL	Nkton1	natural killer T cell numbers 1
1	168358674	170239759	74.86			MGI:1931842	QTL	Sle1a	systematic lupus erythematosus susceptibility 1a
1	169211172	169211344	76.73			MGI:105971	QTL	Lbw7	lupus NZB x NZW 7
1	169211172	169211344	76.73			MGI:2151890	QTL	Cgnz1	chronic glomerulonephritis in NZM 1
1	169211172	177550021	76.73			MGI:3531330	QTL	Sle16	systematic lupus erythematosus susceptibility 16
1	169655501	169695813	76.84	+		MGI:1098434	protein coding gene	Rgs5	regulator of G-protein signaling 5
1	169741477	169747642	76.84	-		MGI:108409	protein coding gene	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4
1	170232749	170253608	76.84	+		MGI:3622649	protein coding gene	Sh2d1b2	SH2 domain containing 1B2
1	170277320	170286769	76.84	+		MGI:1349420	protein coding gene	Sh2d1b1	SH2 domain containing 1B1
1	170907273	170912941	77.56	-		MGI:3576487	protein coding gene	Fcrlb	Fc receptor-like B
1	170917576	170927583	77.65	-		MGI:2138647	protein coding gene	Fcrla	Fc receptor-like A
1	170958617	170976547	78.02	-		MGI:95499	protein coding gene	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb
1	170958617	170976547				MGI:1890622	QTL	Cia9	collagen induced arthritis QTL 9
1	171018920	171029761	78.53	+		MGI:2179523	protein coding gene	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV
1	171051174	171064935	78.8	-		MGI:95500	protein coding gene	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III
1	171150711	171161130	79.05	+		MGI:103177	protein coding gene	Mpz	myelin protein zero
1	171229572	171234365	79.23	-		MGI:95496	protein coding gene	Fcer1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide
1	171281945	171287991	79.3	-		MGI:1353665	protein coding gene	Usp21	ubiquitin specific peptidase 21
1	171329145	171342331	79.34	+		MGI:1333874	protein coding gene	Dedd	death effector domain-containing
1	171437535	171464603	79.43	+		MGI:1321398	protein coding gene	F11r	F11 receptor
1	171559193	171609746	79.52	+		MGI:109294	protein coding gene	Cd244	CD244 natural killer cell receptor 2B4
1	171588624	171607410	79.54	-		MGI:96885	protein coding gene	Ly9	lymphocyte antigen 9
1	171632403	171653035	79.54	-		MGI:1922595	protein coding gene	Slamf7	SLAM family member 7
1	171682009	171705258	79.54	+		MGI:88339	protein coding gene	Cd48	CD48 antigen
1	171767127	171801184	79.54	+		MGI:1351314	protein coding gene	Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
1	171839697	171890718	79.54	+		MGI:1336885	protein coding gene	Cd84	CD84 antigen
1	171917515	171953170	79.54	+		MGI:1353620	protein coding gene	Slamf6	SLAM family member 6
1	172066013	172082795	79.54	-		MGI:1891700	protein coding gene	Ncstn	nicastrin
1	172209894	172219868	79.54	-		MGI:1309468	protein coding gene	Casq1	calsequestrin 1
1	172581758	172590568	79.99	-		MGI:1921998	protein coding gene	Slamf8	SLAM family member 8
1	172698055	172833031	80.13	+		MGI:88512	protein coding gene	Crp	C-reactive protein, pentraxin-related
1	172893961	172895041	80.33	-		MGI:98229	protein coding gene	Apcs	serum amyloid P-component
1	173004198	173004325	80.33			MGI:2661242	QTL	Cd8mst1	CD8 T memory cell subset 1
1	173221284	173227214	80.33	-		MGI:95494	protein coding gene	Fcer1a	Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide
1	173331886	173333750	80.33	-		MGI:1097689	protein coding gene	Ackr1	atypical chemokine receptor 1 (Duffy blood group)
1	173350879	173466040	80.33	+		MGI:2686159	protein coding gene	Aim2	absent in melanoma 2
1	173747293	173766943	80.63	-		MGI:96429	protein coding gene	Ifi204	interferon activated gene 204
1	174172776	174248450	80.97	+		MGI:98385	protein coding gene	Spta1	spectrin alpha, erythrocytic 1
1	174628733	174628870	81.08			MGI:1346066	QTL	Gvhd1	graft-versus-host disease 1
1	174833785	174921819	81.08	-		MGI:1344367	protein coding gene	Grem2	gremlin 2, DAN family BMP antagonist
1	175641251	175641372	81.63			MGI:2148991	QTL	Yaa4	Y-linked autoimmune acceleration QTL 4
1	175641251	175641372	81.63			MGI:2149094	QTL	Sle9	systematic lupus erythematosus susceptibility 9
1	175880581	175913489	81.9	+		MGI:1349427	protein coding gene	Exo1	exonuclease 1
1	177020073	177258203	82.66	-		MGI:1345147	protein coding gene	Akt3	thymoma viral proto-oncogene 3

しかし、Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Aug 22;114(34):9158-9163. Complete overview of protein-inactivating sequence variations in 36 sequenced mouse inbred strainsの論文より、C3H/Heマウスは、LPS刺激などのIL1 経由の感染に対して耐性であると解った。このことにより、C3H/He系統の遺伝子背景では、炎症のシグナルが入らないために抗核抗体値上昇が起きないのであろうと強く推測された。加えて、C57BL/6Nに戻し交配を続けて、系統維持しているうちに抗核抗体価の上昇が起きなくなっていた。したがって、抗核抗体価の上昇を指標として、ゲノム編集する方法はできなくなっていた。

4 . 研究成果

ホモ個体において、免疫に関係する表現系が現れた。前脚と後脚の間の腹部を体液が出る程掻きむしる個体と肥満して突然死する個体が出てきた。

抗核抗体価の上昇に関わる領域は、129/Sv//Ev 領域{ D1Mit36(76.73cM)から D1Mit115 (82.78cM)} の中ではなく、ごく近い近傍であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	長友 啓明 (Nagatomo Akihiro) (30746813)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	
研究分担者	神沼 修 (Kaminuma Osamu) (80342921)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	

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