

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510244

研究課題名(和文) 単一のMPO-ANCA産生因子として同定された新規遺伝子の解析

研究課題名(英文) Responsible genes for the aberrant production of MPO-ANCA

## 研究代表者

濱野 慶朋 (Hamano, Yoshitomo)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：10281354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：MPAの発症にはMPO-ANCAの産生が関わるが、その原因は不明である。我々は血管炎モデルマウスを用いてMPO-ANCA産生遺伝子座Man-1を同定し、マウス第1染色体上に単一の候補遺伝子Aを同定した。遺伝子Aのリコンビナントタンパクによる細胞増殖を検討したところ、有意な増殖促進を認めた。しかし、強制発現の系では活性化マーカーの増強は得られなかった。区間コンジェニックマウス作成過程で、Man-1領域内で染色体組み替えを生じたマウスを得ることができ、これを利用して位置的候補遺伝子の絞り込みを行い、機能解析につなげていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/Kinjoh (SCG/Kj) mouse is a unique model of vasculitis with production of MPO-ANCA. Genome wide mapping revealed the non-Fas susceptibility locus of MPO-ANCA on chromosome 1, designated as Man-1. The aim of this study is to identify the responsible gene (s) of Man-1. Interval mapping created single peak of LOD curve on the Gene A, a protein-coding gene with unknown function. Because of the highest LOD score, Gene A was the first positional candidate gene. Recombinant Gene A accelerated the proliferation of murine myeloid cell line Mcl33D. However, transfection of Gene A to Mcl33D did not influenced to expression levels of leukocyte activation markers.

We established SCG/Kj-derived interval congenic mice with B6 background. Fortunately, we obtained mice with recombination between B6 and SCG/Kj at the midpoint of Man-1 interval. These mice will help us to narrow down positional candidate genes on Man-1 interval.

研究分野：免疫病理学

キーワード：SCG/Kj MPO-ANCA 血管炎 半月体形成性糸球体腎炎 マッピング

### 1. 研究開始当初の背景

顕微鏡的多発血管炎(MPA)の発症には自己抗体の一種 MPO-ANCA の産生が関わるが、その原因は不明である。

我々は血管炎モデルマウスを用いて MPO-ANCA 産生遺伝子座 *Man-1* を同定した (*J Immunol.* 2006)。それに 6000 個以上の遺伝子型決定を追加し連鎖解析を進めて *Man-1* の遺伝子本体を追求した。その結果、マウス第 1 染色体上に単一の候補遺伝子 A を見いだした。

その遺伝子は、隣接する遺伝子よりほぼ 10 倍オッズ比が高く、MPO-ANCA 産生遺伝子本体である可能性が高い。これにより本プロジェクトを構想した。

### 2. 研究の目的

A 遺伝子の遺伝子多型及び機能を研究することにより、MPO-ANCA 産生機構を解明し、MPO-ANCA 産生を直接抑制する将来の分子標的療法開発の基礎的知見とする。

### 3. 研究の方法

(1) A 遺伝子の多型解析・アミノ酸置換の予測・発現レベル差異の検討

親系 2 系統の A 遺伝子の塩基配列から多型を解析し、アミノ酸置換や発現レベルへの影響を予測・分類する。

親系 2 系統の組織における A 遺伝子の発現レベルの差異を、リアルタイム PCR や発現アレイを用いて明らかにする。A 遺伝子及び *Man-1* の位置的候補遺伝子をカバーするアレイを設計し、これらの発現レベルを、関連遺伝子の発現を考慮しながら解析する。

(2) A 遺伝子の機能解析:

リコンビナント A を合成し、マウス由来白血球細胞株に投与、もしくはマウス個体に投与し、免疫学的機能を主体とした。機能解析を行う。

A 遺伝子の機能解析 (in vitro): マウス顆粒球細胞株 32Dcl3 において A 遺伝子を共培養・強制発現・ノックダウンすることにより MPO 放出や細胞死への影響をスクリーニングする。

A 遺伝子の機能解析 (in vivo): A 遺伝子投与マウスや、遺伝子変異マウスにおける免疫学的形質解析(腎炎・血管炎、リンパ球形質、MPO-ANCA ほか自己抗体産生)の変化を検討し in vivo での機能を確認する。

(3) 区間コンジェニックマウスの作製 (研究が当初計画どおりに進まない時の対応):

・染色体マーカーの遺伝子型を確認しながら B6 による退交配により、SCG/Kj マウス由来 MPA 関連遺伝子座の支持領域を導入した区間コンジェニックマウスを作製する。これらと比較・交配することで遺伝子座の絞り込みや個々の遺伝子座機能解析を行う。

### 4. 研究成果

平成 24 年度に MPO-ANCA 産生感受性遺

伝子 A の機能解析をするべく、この遺伝子のクローニング・リコンビナントタンパクの作製・精製を行った。平成 25 年度にはマウス由来白血球・リンパ球細胞株を用いて in vitro のリコンビナントタンパク機能解析を開始した。

まずマウスリンパ球又は白血球株である J774, DC2.4, EL-4, 32Dcl3, RAW246.7, WEHI-3 を用いて、細胞増殖促進機能を検討したところ、一部で軽度ながら有意な増殖促進を認めた。しかし、pcDNA6.2 発現ベクターを導入したマウス顆粒球細胞株 32Dcl3 の表面形質の変化をフローサイトメトリーで LFA-1, CD40, CD86, H-2K の発現を検討したが、有意な発現変化は認められなかった。このため、*Man-1* の位置的候補遺伝子を再検討するため、次世代シーケンサーを用いてこの区域に存在する遺伝子の網羅的多型解析を行った。エクソンの多型によりアミノ酸変異を伴う遺伝子は、22 個存在し、うち 6 個はフレームシフト変異であった。

B6 マウス背景遺伝子に血管炎自然発症モデル SCG/Kj マウスの遺伝子座を導入した区間コンジェニックマウスの作成を継続した。当該年度において、B6.lprC1<sup>SCG</sup>, B6.lprSCG1<sup>SCG</sup>, B6.lprSCG2<sup>SCG</sup>, B6.lprC10<sup>SCG</sup>, B6.lprC16<sup>SCG</sup> の、合計 5 つの区間コンジェニックマウスの 10 代以上の退交配が終了し、これら全てにホモマウスを得てコンジェニックマウスの樹立に成功した。また、5 区間のうち 2 つを持つコンジェニックマウス作成を続け、現在 B6.lprC1<sup>SCG</sup>C16<sup>SCG</sup>, B6.lprSCG2<sup>SCG</sup>C16<sup>SCG</sup> の樹立に成功した。

・区間コンジェニックマウス作成過程で、SCG2/Man1 領域内で染色体組み替えを生じたマウスを得ることができ、これを利用してこの区間をほぼ 1/2 に区切るマウスを作成中である。これを利用して位置的候補遺伝子の絞り込みを行い、機能解析につなげていきたいと考えている。

### 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 10 件)

Hamano Y, Abe M, Matsuoka S, Zhang D, Kondo Y, Kagami Y, Ishigami A, Maruyama N, Tsuruta Y, Yumura W, Suzuki K. Susceptibility quantitative trait loci for pathogenic leucocytosis in SCG/Kj mice, a spontaneously occurring crescentic glomerulonephritis and vasculitis model. *Clin Exp Immunol.* 査読有 2014 Jul;177(1):353-65.

Suzuki K, Nagao T, Itabashi M, Hamano Y, Sugamata R, Yamazaki Y,

Yumura W, Tsukita S, Wang PC, Nakayama T, Suzuki K. A novel autoantibody against moesin in the serum of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 査読有 2014 Jun;29(6):1168-77.

Furuta S, Chaudhry AN, Hamano Y, Fujimoto S, Nagafuchi H, Makino H, Matsuo S, Ozaki S, Endo T, Muso E, Ito C, Kusano E, Yamagata M, Ikeda K, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Westman K, Jayne D. Comparison of phenotype and outcome in microscopic polyangiitis between Europe and Japan. *J Rheumatol.* 査読有 2014 Feb;41(2):325-33.

Hamano Y, Yumura W, Maruyama N, Suzuki K. Pathogenic leukocytosis and their susceptibility QTLs for vasculitis and crescentic glomerulonephritis in a model of SCG/Kj mice. *La Presse Medicale & Quarterly Medical Review* 査読有 2013 Apr;42(4):687

Hamano Y, Yoshizawa H, Sugase T, Miki T, Ohtani N, Hanawa S, Takeshima E, Morishita Y, Saito O, Takemoto F, Muto S, Yumura W, Kusano E. Rituximab Treatment for PR3-ANCA-Positive Membranoproliferative Glomerulonephritis Associated with Adult-Onset Periodic Fever Syndrome. 査読有 *Case Reports in Nephrol Urol* 2012;(2):92-101.

Takeda S, Chinda J, Murakami T, Numata A, Iwazu Y, Akimoto T, Hamano Y, Muto S, Takahashi M, Kusano E. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant.* 査読有 2012 May;27(5):1786-92.

Numata A, Akimoto T, Toshima M, Iwazu Y, Otani N, Miki T, Sugase T, Saito O, Hamano Y, Takemoto F, Ueda Y, Muto S, Kusano E. Membranous nephropathy in an HIV-positive patient complicated with hepatitis B virus infection. *Clin Exp Nephrol.* 査読有 2011 Oct;15(5):769-73.

Hanawa S, Akimoto T, Uehara E, Inoue M, Imai T, Kotoda A, Yoshizawa H, Matsuyama T, Ueda M, Saito O, Hamano Y, Yumura W, Ozawa K, Muto S, Kusano E. Renal failure caused by plasma cell infiltration in multiple myeloma. *Clin Exp*

*Nephrol.* 査読有 2011 Aug;15(4):586-90.

Zhang D, Kobayashi T, Kojima T, Kanenishi K, Hagiwara Y, Abe M, Okura H, Hamano Y, Sun G, Maeda M, Jishage KI, Noda T, Hino O. Deficiency of the Erc/mesothelin gene ameliorates renal carcinogenesis in Tsc2 knockout mice. *Cancer Sci.* 査読有 2011 Apr;102(4):720-7.

Hamano Y, Tsukamoto K, Abe M, Sun G, Zhang D, Fujii H, Matsuoka S, Tanaka M, Ishida-Okawara A, Tachikawa H, Nishimura H, Tokunaka K, Hirose S, and Suzuki K. : Genetic dissection of vasculitis, myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibody production, and related traits in spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/Kinjoh mice. *J Immunol.* 査読有 2006 Mar 15;176(6):3662-73

〔学会発表〕(計 10 件)

濱野慶朋、鶴田悠木、佐野夏帆、丸山直記、湯村和子、佐々木裕子、亀岡洋祐、鈴木和男 . 腎疾患における抗 moesin 抗体の病的意義 . 日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 ~ 6 日 (横浜市)

濱野慶朋、鶴田悠木、佐野夏帆、新井富生、櫻井うらら、久保里奈、宮腰重三郎、湯村和子、丸山直記 . A case of membranous nephropathy with podocytic infoldings after hematopoietic stem cell transplantation. 東京内科学会総会 2014 (東京都)

濱野慶朋、吉澤寛道、大谷尚子、三木拓也、武島えり、斉藤修、森下義幸、湯村和子、武藤重明、竹本文美、草野英二. 顆粒球吸着療法(GCAP)で解熱・軽快した成人発症型周期性発熱症候群の一例. 日本透析医学会総会 2012 年 6 月 22 ~ 24 日 (札幌市)

濱野慶朋、長尾朋和、吉澤寛道、草野英二、鈴木和男、湯村和子 . MPO-ANCA 関連血管炎自然発症モデルマウスにおける腎炎・自己免疫形質とサイトカイン動態との関連. 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 ~ 3 日 (横浜市)

Wako Yumura, Yoshitomo Hamano, Yoshiyuki Morishita, Osamu Saito, Chiharu Ito, Fumi Takemoto and Eiji Kusano. Urinalysis is the clue for early detection of ANCA-associated vasculitis. *The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and*

ANCA Workshop 2012, March 30, 2012, Tokyo Conference Center Shinagawa, Shinagawa, Tokyo, Japan. (Abstract p. 103)

Yoshitomo Hamano, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Hiromichi Yoshizawa, Eiji Kusano and Wako Yumura. Role of IL-17/IL-23 axis and pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneously occurring glomerulonephritis in a model of SCG/Kj mice. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012, March 29, 2012, Tokyo Conference Center Shinagawa, Shinagawa, Tokyo, Japan. (Abstract p. 119)

Yoshitomo Hamano. Genomics and Genetics in ANCA-associated Vasculitis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012, March 28, 2012, Tokyo Conference Center Shinagawa, Shinagawa, Tokyo, Japan. (Abstract p. 61)

大谷尚子、濱野慶朋、今井利美、吉澤寛道、草野英二、上田善彦．無顆粒球症に伴い急激な腎機能低下をきたしたMPO-ANCA関連腎炎の一例．日本腎臓学会東部学術大会2010年9月24日（宇都宮市）

Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Kazuo Suzuki: Genetic dissection of leukocytosis related to spontaneously occurring crescentic glomerulonephritis in a model of SCG/Kj mice. The American Society of Nephrology, The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting and Scientific Exposition, October 29, 2009, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.

Hamano, Y., Hirose, S., and Suzuki, K. : Genetic dissection of vasculitis, MPO-ANCA production and related traits in SCG/Kj mice. International Conference on Regulation of Inflammatory Diseases, Vasculitis and Asthema- 2008 in Chiba, Jan. 18~19, 2008.

〔図書〕(計 3 件)

濱野慶朋、湯村和子．第2章 5) 肉芽腫の血管炎ってあるの？小型血管炎：多発血管炎性肉芽腫症．In 見逃すとこわい血管炎 東京 日本医事新報社、2014, p.76.

濱野慶朋、丸山直記、湯村和子、鈴木和男．血管炎症候群．老年医学 51 ; 593~602, 2013 .

濱野慶朋、丸山直記、湯村和子、鈴木和男．In 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 血管炎 V. ANCA 関連血管炎の病因・病

理、診断・治療 1. ANCA 関連血管炎 (AAV) の基礎研究から臨床へのアプローチ (1) ゲノミクスと遺伝子解析 疾患モデルマウスによる疾患関連遺伝子の解析．大阪 日本臨床社 2013, p. 214.

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
濱野 慶朋 (HAMANO, Yoshitomo)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)  
東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
研究者番号：10281354

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：