

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590491

研究課題名(和文) Fc R B欠損とSle16領域多型の相補作用による関節リウマチ発症機序の解明

研究課題名(英文) Epistatic interaction of FcγRIIB and Sle16 polymorphism in rheumatoid arthritis

研究代表者

広瀬 幸子 (Hirose, Sachiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00127127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性IgG Fc受容体(Fc RII)はB細胞および種々の免疫細胞上に発現し、その機能を負に制御する重要な免疫調節分子である。本研究では、Fc RII発現欠損による免疫系の異常亢進が自己免疫疾患を誘発するかを解析した。その結果、Fc RII発現欠損のみでは自己免疫疾患は発症せず、Fc RIIコード遺伝子Fcgr2bに近接して存在するSle16領域にコードされる自己免疫型SLAM family遺伝子の多型との相補作用でヒト関節リウマチ(RA)に近似した全身の多発関節炎を自然発症する可能性を見出した。本研究成果は、ヒトRAの疾患感受性遺伝子解析に重要な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Fc RII is expressed on B cells and a wide variety of immune cells, and negatively controls function of these cells. In the present studies, we examined whether the lack of Fc RII expression leads an aberrant activation of immune cells and the development of autoimmune diseases, by establishing Fc RII-deficient B6 congenic strains. The result suggested that the epistatic interaction between Fcgr2b null-mutation and autoimmune-type 129-derived polymorphic gene(s) in Sle16 region located in the distal of Fcgr2b gene contributes to the RA susceptibility. Identification of the susceptibility gene(s) for RA is of paramount importance to shed light on the genetic mechanisms that control RA in humans.

研究分野：免疫病理学

キーワード：疾患モデル 関節リウマチ ループス腎炎 疾患感受性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) B細胞上の FcγR II B は代表的 B細胞活性化抑制分子で、その発現低下は B細胞を活性化する。我々は、全身性エリテマトーデス(SLE)自然発症マウス系である NZB, MRL, ♂BXSB には共通して、FcγR II B をコードする *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存在すること、この多型により活性化 B細胞上の FcγR II B 分子の発現低下をきたし、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発見した。さらに、BXSB マウスの SLE 型 *Fcgr2b* 遺伝子多型を正常 C57BL/6 (B6)マウス型多型に入れ換えると、SLE 病態は完全に抑制された。従って、この *Fcgr2b* 遺伝子多型は SLE 感受性遺伝子の 1 つであると考えられた。

(2) しかしながら、♀BXSB マウスは SLE 型 *Fcgr2b* 遺伝子多型を持つにも係らず、SLE は発症しない。この原因は、♂マウスが持つ Y 染色体上の TLR7 の発現重複を伴う *Yaa* 変異遺伝子が、♀マウスでは存在しないことによる。すなわち、SLE 型 *Fcgr2b* 遺伝子多型と *Yaa* 変異遺伝子の相補作用が、SLE を誘発することが明らかになった。

(3) FcγR II B 発現低下の SLE 発症における役割を、さらに詳細に解析する目的で、129 マウス由来の embryonic stem (ES) cell を用いて FcγR II B 発現欠損マウスを作製し、正常 B6 マウス系に退交配して FcγR II B 欠損 B6 マウス系を作製した。その結果、極めて興味深いことに、SLE は発症せず、高度の関節リウマチ(RA)を発症する新規マウス系(KO1 と命名)の樹立に成功した。この KO1 マウスでは、FcγR II B 欠損とともに、*Fcgr2b* 遺伝子下流の約 6.3 Mb の *Sle16* と呼ばれる領域が 129 マウス由来であることが判明している。

## 2. 研究の目的

(1) KO1 マウスの RA 発症は、FcγR II B 発現欠損のみで起こるのか、あるいは、FcγR II B 発現欠損と *Sle16* 領域遺伝子の相補作用によるのかを明らかにする。また、RA 発症機序を細胞・分子レベルで解析し、*Sle16* 領域に存在する疾患感受性遺伝子の同定を目指す。

(2) RA 発症 KO1 マウスに、*Yaa* 変異遺伝子を導入すると、RA は発症せず、代わりに高度の SLE が発症した。さらに、

それ自身では病態を発症しない NZW マウス系と KO1 マウスを交配した第 1 代雑種 (KO1 x NZW) F1 マウスには、やはり RA は発症せず、高度の SLE が発症した。この事実から、KO1 には SLE および RA に対する感受性遺伝子が存在すると想定された。そこで、これらのマウス系を用いた遺伝的解析実験で、RA および SLE の発症に係る疾患特異的あるいは疾患共通の感受性遺伝子について解析する。

(3) B6.*Yaa* マウスには SLE は発症しないが、FcγR II B 発現欠損 B6.*Yaa* マウスには高度の SLE が発症した。そこで、SLE における *Fcgr2b* 遺伝子欠損の役割を、細胞・分子レベルで解析する。

## 3. 研究の方法

(1) KO1 マウスの RA 発症に係るサイトカインの解析

RA 発症に関与すると考えられる代表的なサイトカインである TNFα, IL-17 および IL-6 の役割を明らかにする。このために、前 2 者に関しては、TNFα 遺伝子欠損あるいは IL-17 遺伝子欠損を KO1 マウスに導入する。また、IL-6 の役割解析のためには、抗 IL-6 受容体抗体を KO1 マウスに投与して、発症予防効果および治療効果を解析する。

(2) *Sle16* 領域に存在する RA 疾患感受性遺伝子の同定

RA 発症 KO1 マウスは、*Fcgr2b* 遺伝子欠損とともに、その下流に 129 マウス由来の *Sle16* 領域が存在している。これらの遺伝領域の役割を個別に解析するために、*Fcgr2b* 遺伝子欠損と *Sle16* 領域を分離して持つコンジェニックマウス系を作製し、病態を観察する。また、KO1 に導入されている *Sle16* 領域の範囲を狭めたコンジェニックマウス系を作製して、原因遺伝子を探る。

(3) *Sle16* 領域以外に存在する RA および SLE 疾患感受性遺伝子の同定

KO1 マウスと NZW マウスを交配すると、RA は発症せず、代わりに SLE が発症する。そこで、KO1 マウスと NZW マウスの遺伝的交配実験を行ない、両マウス間で多型を示すマイクロサテライトマーカー多型を用いて、RA および SLE の疾患感受性遺伝子をゲノムワイドに解析する。

(4) *Fcgr2b* 遺伝子欠損によるループス腎炎発症機序の細胞レベルでの解析

FcγR II B は B 細胞のみでなく、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞など様々な骨髄系細胞上にも発現している。従って、*Fcgr2b* 遺伝子欠損 B6.*Yaa* マウスに

発症するループス腎炎において、どの細胞上における  $Fc\gamma R II B$  発現欠損が病因となっているかの詳細は明らかではない。そこで、細胞特異的に  $Fc\gamma R II B$  発現を欠損するコンディショナルノックアウトマウス系を作製して、 $Fcgr2b$  遺伝子欠損 B6.*Yaa* マウスに発症するループス腎炎における  $Fc\gamma R II B$  発現欠損効果を細胞レベルで解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) KO1 マウスの RA 発症におけるサイトカインの役割の解析

TNF $\alpha$  欠損 KO1 マウスでは、RA 発症は完全に抑制されたが、IL-17 欠損 KO1 マウスでは、予想に反して RA の発症は全く抑制されなかった。また、抗 IL-6 受容体抗体の投与で、KO1 の RA 病態は高度に抑制された。RA 発症率の比較を図 1 に示した。

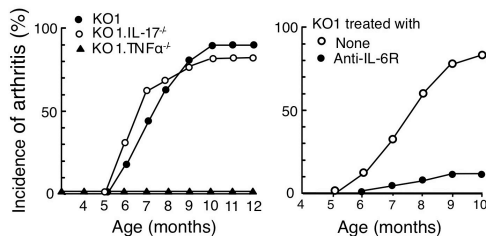


図 1 関節炎の発症率の比較

IL-17 はヒト RA の滑膜で多く産生されていることから、病因としての重要性が示唆されているが、本解析から、IL-17 の産生亢進は病態の原因ではなく、むしろ結果である可能性が示唆された。RA の病因はとして破骨細胞の活性化が重要であり、破骨細胞は末梢の単核球由来する。TNF $\alpha$  欠損 KO1 マウスでは、RA を発症する KO1 や IL-17 欠損 KO1 マウスに比べて、末梢の単核球比率の有意な減少が認められた。従って、TNF $\alpha$  欠損による RA の抑制の一因として、破骨細胞数の減少が考えられた。KO1 マウスでは、単核上の  $Fc\gamma RII B$  発現欠損により、IgG 免疫複合体による異常な刺激を受け、単球増多をきたすことが、RA の一因となっていると考えられた。また、IL-6 シグナル抑制による RA の抑制には、IgG 自己抗体産生の低下が関与すると考えられた。

##### (2) *Sle16* 領域に存在する RA 疾患感受性遺伝子の同定

KO1 マウスの RA 発症に、 $Fcgr2b$  遺伝子欠損および 129 マウス由来の *Sle16* 領域の相互作用が必要か否かを解析する目的で、KO1 マウスをさらに B6 マウスに戻し交配して、図 2 に示すように

$Fcgr2b$  遺伝子欠損のみを持つ KO2 マウス系および *Sle16* 領域のみをもつマウス系 (仮に SLAM<sup>129</sup> マウス系と命名) を作製した。図 2 は、マウス第 1 染色体テロメアの  $Fcgr2b$  遺伝子近傍の遺伝子地図である。KO1 と KO2 は  $Fcgr2b$  遺伝子が欠損しているが、SLAM<sup>129</sup> は  $Fcgr2b$  遺伝子は B6 由来の正常遺伝子であり  $Fcgr2b$  遺伝子欠損は見られず、*Sle16* 領域のみが 129 マウス由来である。

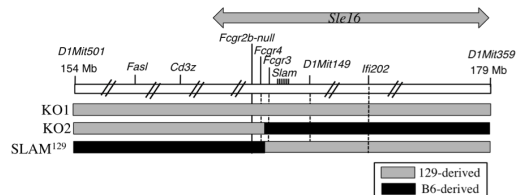


図 2 第 1 染色体テロメア領域の遺伝子地図

これらのマウス系の病態を解析したところ、KO1 は加齢に伴い高度の RA が発症したが、KO2 および SLAM<sup>129</sup> には発症が見られなかった。すなわち、KO1 マウスの RA 発症には、 $Fcgr2b$  遺伝子欠損と *Sle16* 領域遺伝子の相補作用が必要であることが明らかとなった。

$Fc\gamma RII B$  発現欠損と *Sle16* 領域遺伝子多型の、RA 発症における相補作用の機序を解析する目的で、KO1、KO2 および SLAM<sup>129</sup> マウスの末梢単核球の比率を比較した。その結果、図 3 に示すように、SLAM<sup>129</sup> では KO1 と同様に末梢の CD11b 陽性の単核球比率が高く、中でも Gr1 陰性の活性型単核球比率が高いことが注目された。前述したように、RA における破骨細胞は末梢単核球由来である。従って、 $Fc\gamma RII B$  発現欠損マクロファージの活性化と SLAM 遺伝子の 129 型多型による破骨前駆細胞を含む末梢単核球の増加が、RA 発症に相加的に関与することが強く示唆された。現時点では、*Sle16* 領域内の RA 候補遺伝子として 129 マウス由来の SLAM family 遺伝子多型が最も可能性のある候補遺伝子と考えており、現在、さらに遺伝子領域を絞り込んだコンジュニクマウス系の作製を行なっている。

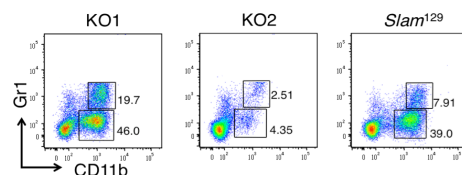


図 3 末梢血白血球の FACS 解析。図中の数値は比率を示す。

##### (3) $Fc\gamma RII B$ 発現欠損、*Sle16* 領域および *Yaa* 変異遺伝子の相補作用の解析

KO1、KO2 および SLAM<sup>129</sup> マウス系に

*Yaa* 変異遺伝子を導入して、病態の変化を解析した。その結果、KO1. *Yaa* マウスでは RA が抑制され、代わりに極めて高度の SLE が発症した。また KO2. *Yaa* マウスにも SLE が発症したが、その病態は KO1. *Yaa* マウスに比較して有意に抑制されていた。一方、SLAM<sup>129</sup>. *Yaa* マウスでは SLE の発症は認められなかった。これらの結果から、*Fcgr2b* 遺伝子欠損と *Yaa* 変異遺伝子の相補作用で SLE を発症すること、さらに *Sle16* 領域遺伝子の作用が加わることで、SLE 病態がさらに増悪することが示された。前述したように、末梢単核球の増多には、*Sle16* 領域遺伝子多型が関与しており、この現象が KO1 の RA 発症に係るのみでなく、SLE 病態の増悪にも関与している可能性が強く示唆された。

#### (4) *Sle16* 領域以外に存在する RA および SLE 疾患感受性遺伝子の同定

KO1 マウスには RA が発症するが、それ自身では病態を示さない NZW マウスと KO1 を交配した第 1 代雑種(KO1 x NZW) F1 マウスには高度の SLE が発症する。すなわち、KO1 マウスには劣性に働く RA 感受性遺伝子が、NZW マウスには優性に働く SLE 感受性遺伝子が存在すると想定される。そこで、(KO1 x NZW) F2 マウスを作製し、第 1 染色体に存在する KO1 マウス由来の *Fcgr2b* 遺伝子欠損をホモに持つ Group I、ヘテロに持つ Group II および *Fcgr2b* 遺伝子欠損を持たない Group III に分けて、RA および SLE の発症の有無を解析した。その結果、図 4 に示すように、RA の発症は *Fcgr2b* 遺伝子欠損と相関したが、SLE の発症とは相関しなかった。

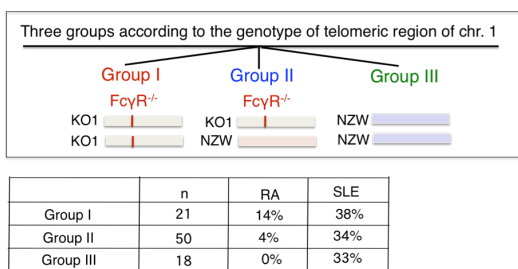


図 4 (KO1 x NZW) F2 マウスの *Fcgr2b* 遺伝子欠損の有無によるグループ分類と各グループにおける RA および SLE の発症頻度の比較

次に、KO1 と NZW の間に多型の見られるマイクロサテライトマーカーを用いて、RA および SLE の疾患感受性遺伝子をゲノムワイドに解析した。その結果、図 5 に示すように、NZW マウスの第 1 2 染色体セントロメアに RA および SLE の何れにも有意の相関を認めるロッドスコアが得られ、両者に共通する感受性遺伝

子の存在が示唆された。

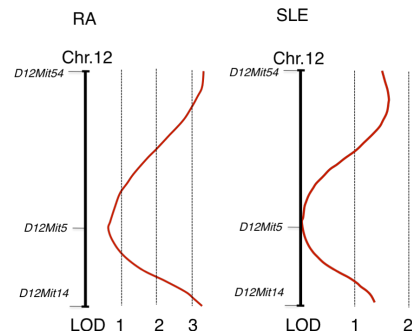


図 5 (KO1 x NZW) F2 マウスによる RA および SLE の感受性遺伝子のマッピング

本解析で、F2 マウスでは、RA の発症率が 5.6% と低いことから、感受性遺伝子領域の絞り込みが難しいことが解ったので、この解決の為に、さらに、(KO1 x NZW) F1 x KO1 退交配マウス(BC-1)を 220 匹作製して解析を続行している。現時点での解析では、BC-1 のうちの RA 発症率が 32.0%、SLE 発症率が 10.7%、RA および SLE の両方を発症する率が 2.9%、いずれも発症しないものが 54.4% という結果を得ている。ヒト RA 患者家系に SLE 発症率が高いことが知られており、本解析の結果は、ヒト感受性遺伝子解析に有用な情報を提供するものである。

#### (5) *Fcgr2b* 遺伝子欠損効果の細胞レベルでの解析

上記のごとく、*Fcgr2b* 遺伝子欠損と *Yaa* 変異遺伝子の相補作用で SLE を発症する。*Yaa* 変異遺伝子は ssRNA 受容体である TLR7 の重複をきたす変異遺伝子で、その作用は B 細胞に発現し、RNA 反応性の B 細胞を活性化する。一方、*FcyRIIB* は B 細胞のみでなく、様々骨髄系細胞系に発現し、その機能を負に制御している。そこで、B 細胞特異的、樹状細胞特異的、骨髄系細胞特異的に *FcyRIIB* 発現を欠損するマウス系を樹立し、さらに *Yaa* 遺伝子を導入して、ループス腎炎発症に係る細胞群の同定を進めた。その結果、樹状細胞での *FcyRIIB* 発現欠損はループス腎炎発症には寄与していないことが示された。一方、興味深いことに、B 細胞上のみで *FcyRIIB* 発現を欠損する場合には、全ての細胞上で *FcyRIIB* 発現を欠損する場合に比較して、血中自己抗体レベルが低く、またループス腎炎の程度も高度に抑制された。また、単核球上で *FcyRIIB* 発現が欠損する場合にも、B 細胞上のみで *FcyRIIB* 発現を欠損する場合と同程度の自己抗体産生とループス腎炎の発症が認められた。従って、B 細胞および単核球上の *FcyRIIB* 発現欠損が、各々異なる機序で自己抗体産生を誘導し、ループス腎炎発症に関与すると考えられた。

現在、その詳細な機序を解析中である。

#### 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 9 件)

- ① Ohtsuji M, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Okazaki H, Tsurui H, Amano H, Shirai T, Nishimoto N, Nishimura H, and Hirose S. IL-6 signal blockade ameliorates the enhanced osteoclastogenesis and the associated joint destruction in a novel FcγRIIB-deficient rheumatoid arthritis mouse model. *Mod. Rheumatol.* 査読有、25:270-277,2015  
DOI:10.3109/14397595.2014.950035
  - ② Kanari Y, Sugahara-Tobinai A, Takahashi H, Inui M, Nakamura A, Hirose S, and Takai T. Dichotomy in the FcγRIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype clarifies the roles of the Fc receptor in female-biased autoantibody production and glomerulo- nephritis. 査読有、*BMC Immunology* 15:47, 2014.  
DOI:10.1186/s12865-014-0047-y
  - ③ Okazaki H, Lin Q, Nishikawa K, Ohtsuji N, Tsurui H, Ohtsuji M, Amano H, Tada N, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S. TNFα but not IL-17 is critical in the pathogenesis of rheumatoid arthritis spontaneously occurring in a unique FcγRIIB-deficient mouse model. *Mod. Rheumatol.* 査読有、24:931-938, 2014.  
DOI:10.3109/14397595.2014.886351
  - ④ Xu M, Hou R, Sato-Hayashizaki A, Man R, Zhu C, Wakabayashi C, Hirose S, Adachi T and Tsubata T. Cd72<sup>c</sup> is a modifier gene that regulates *Fas<sup>lpr</sup>*-induced auto- immune disease. *J. Immunol.* 査読有、190:5436-5445,2013.  
DOI:10.4049/jimmunol.1203576
  - ⑤ Kawano 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 FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 査読有、43:770-778, 2013.  
DOI: 10.1002/eji.201243057
  - ⑥ Kitabatake M, Toda T, Kuwahara K, Igarashi H, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, and Sakaguchi N. Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice. *J. Immunol.* 査読有、189:1193-1201, 2012.  
DOI: 10.4049/jimmunol.1102774
- [学会発表] (計 27 件)
- ① LIN Qingshun, et al. B cell specific FcγRIIb deficiency is enough for autoantibody production, but not for the progression of *Yaa*-related lupus nephritis. 第 43 回 日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 10 日-12 日 京都、京都国際会議場
  - ② NISHIKAWA Keiko, et al. Genetic dissection of FcγRIIb deficiency and autoimmune-type SLAM haplotype reveals the important role of FcγRIIb in *Yaa*-related lupus nephritis. 第 43 回 日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 10 日-12 日 京都、京都国際会議場
  - ③ Mareki Ohtsuji, et al. IL-6 signal blockade ameliorates spontaneous occurring rheumatoid arthritis in an FcγRIIB-deficient mouse model through loss of the receptor activator of NF-κB ligand/osteoprotegerin balance. 第 58 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 24 日-26 日 東京、新高輪プリンスホテル
  - ④ Shinya Kawano, et al. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of *Yaa* mutation into FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice. 第 58 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 24 日-26 日 東京、新高輪プリンスホテル
  - ⑤ OKAZAKI Hideki, et al. Blockade of TNFα, but not IL-17, ameliorates spontaneously occurring autoimmune arthritis in FcγRIIB-deficient mice. 第 42 回 日本免疫学会総会・学術集会 2013 年 12 月 11 日-13 日 千葉、幕張
  - ⑥ Sachiko Hirose, et al. Phenotype conversion from rheumatoid arthritis to systemic lupus erythematosus by introduction of *Yaa* mutation into FcγRIIB-deficient C57BL/6 mice. *International Congress of Immunology*, August 22-27, 2013, Milan, Italy
  - ⑦ 広瀬幸子、他 FcγレセプターIIB 欠損マウスの樹立 第 56 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 26 日-28 日 東京、新高輪プリンスホテル
- [図書] (計 1 件)
- ① Masaomi Obata, Mareki Ohtsuji, Yukiyasu Iida, Toshikazu Shirai, Sachiko Hirose, and Hiroyuki Nishimura: Genome-wide genetic study in autoimmune disease-prone mice. In *Arthritis*

Research, Methods and Protocols,  
Second Edition. Shunichi Shiozawa  
(eds), 204 (111-142), Human Press,  
2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 幸子 (HIROSE, Sachiko)

順天堂大学大学・医学部・准教授

研究者番号：00127127

(2) 連携研究者

天野 浩文 (AMANO, Hirofumi)

順天堂大学大学・医学部・准教授

研究者番号：50318474