

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659151

研究課題名(和文) アレルギー疾患制御因子同定に関する萌芽的研究

研究課題名(英文) Identification of genes that regulate allergic diseases.

研究代表者

岡崎 拓 (OKAZAKI, Taku)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：00362468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患の発症制御における免疫抑制受容体の機能を解析する目的で、PD-1およびLAG-3欠損マウスを、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNCマウスに戻し交配し、アトピー性皮膚炎の発症に与える影響を観察した。NCマウスにPD-1欠損を導入しても、SPF環境下でアトピー性皮膚炎を自然発症させることはできなかった。NC-LAG-3欠損マウスについては、一部のマウスが重篤な皮膚炎を発症したが、雑種不妊の影響からか遺伝学的に均質なNC-LAG-3欠損マウスが得られず、確定的な結果が得られなかった。今後、阻害抗体の利用や他のアレルギーモデルの利用等により、継続的に検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：To analyze the role of immuno-inhibitory receptors in the regulation of allergic diseases, we have backcrossed PD-1 and LAG-3 deficient mice on NC mice that spontaneously develop atopic dermatitis under conventional condition. PD-1 deficiency did not induce atopic dermatitis under SPF condition suggesting that PD-1 deficiency cannot overcome the requirement of pathogenic microbes for the development of atopic dermatitis in NC mice. On the other hand, some NC-LAG-3KO mice developed severe atopic dermatitis even under SPF condition. Unfortunately, the colony of NC-LAG-3KO mice was quite unstable by unknown reason and we failed to backcross LAG-3KO mice on NC mice more than 6 generations. Therefore, we could not have obtain a decisive data regarding the role of LAG-3 in the development of atopic dermatitis in NC mice so far. We are planing to use anti-LAG-3 blocking Abs or other allergic models to analyze the role of LAG-3 in the regulation of allergic responses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アレルギー 免疫学 ゲノム モデル動物 免疫補助受容体

1. 研究開始当初の背景

PD-1 は細胞死刺激により発現が誘導される遺伝子として 1992 年に京都大学の本庶佑博士らによって単離同定された遺伝子であり、I 型の膜タンパク質をコードする。我々は、PD-1 リガンドの同定、シグナル伝達機構の解析、PD-1 欠損マウスに発症する自己免疫疾患の解析等により、PD-1 が自己に対する不適切な免疫応答を抑制し、自己免疫疾患の発症を制御していることを明らかにしてきた。さらに、PD-1 欠損マウスが、マウスの系統により異なる種類の自己免疫疾患を自然発症すること、すなわち C57BL/6、BALB/c、NOD、MRL 系統において SLE 様の腎炎と関節炎、胃炎と自己免疫性拡張型心筋症、亜急性の I 型糖尿病、致死性の心筋炎を自然発症することを明らかにして来た。また、PD-1 欠損マウスが自然発症する自己免疫疾患の症状や程度がマウスの系統により異なる原因を解明する目的で、異なる系統の PD-1 欠損マウスを用いて連鎖解析を行い、I 型糖尿病をはじめとした各疾患の発症に關与する染色体領域 (遺伝子座) を同定し、解析してきた。これまでの解析結果から、PD-1 欠損は、各系統が遺伝的に有する自己免疫素因を増強することにより、各疾患を惹起しているとするモデルを提唱している。

自己免疫応答とアレルギー応答には類似点が多いことから、PD-1 欠損により、アレルギー応答も増強される可能性は高いと推察される。これまでに、他のグループによって、PD-1 の機能不全がアレルギー疾患を増悪する可能性が示唆されているが、増悪の程度が小さいこともあり、その詳細は依然不明である。

最近我々は、自己免疫疾患を自然発症するマウス系統 *aida* (activation induced cytidine deaminase (AID) - deficiency linked autoimmunity) を独自に樹立し、その原因が LAG-3 という免疫抑制受容体の機能欠失変異であることを見出した。I 型糖尿病のモデル動物である NOD マウスに、LAG-3 欠損を導入すると、I 型糖尿病の発症が大幅に促進される。また、BALB/c 系統において PD-1 と LAG-3 の両者を欠損させると、生後 10 週齢までに全てのマウスが激しい心筋炎を発症して死亡したことから、PD-1 と LAG-3 が自己免疫疾患の発症制御において協調的に働くと考えられる。LAG-3 は、CD4 近縁分子として約 20 年前に同定されたが、その機能は長らく不明であった。近年、免疫応答における機能がいくつかのグループによって報告され、急速に関心を集め出して

いる。しかし、PD-1 と同様に免疫応答を抑制する膜受容体であるということはおそらく確かだとは思われるものの、どういった免疫応答をどのように制御することにより、自己免疫疾患の発症を抑制しているかについては、全く分かっていない。また、アレルギー応答における機能は、これまでに全く報告されていない。

アレルギー疾患の発症には、環境要因と遺伝要因が大きく影響するが、遺伝要因の解明はポストゲノムにあってもほとんど進んでいない。その理由として、あまりにも罹患率が高いために明確な家系を取れないことと、遺伝解析に適したモデル動物が存在しないことが考えられる。名古屋大学の近藤恭司博士によって 1955 年に純系化された NC マウスは、様々な病原微生物が存在する飼育環境 (コンベンショナル環境) において、ヒトのアトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎を自然発症することが報告されている。しかし、最近の免疫研究の基本である SPF 環境 (病原菌が存在しない飼育環境) においてはアトピー性皮膚炎を自然発症しないこともあり、有用性は世界的に認められているものの、その利用は限られている。

そこで、SPF 環境下でも高頻度に発症するアレルギー疾患モデルマウスを作製するとともに、それらを用いて、アレルギー疾患の発症に關与する遺伝子を体系的に同定して解析することが重要である。

2. 研究の目的

自己免疫応答とアレルギー応答には類似点が多いことから、PD-1 や LAG-3 がアレルギー応答の制御にも關与していると仮説を立て、その検証を目的とした。具体的には、アトピー性皮膚炎のモデルマウスである NC マウスに PD-1 欠損および LAG-3 欠損を導入し、アトピー性皮膚炎が増悪される可能性を検討することを目的とした。

また、NC マウスに発症するアトピー性皮膚炎が、PD-1 欠損および LAG-3 欠損の導入により増悪すると予測しているため、SPF 環境下でも高頻度に発症するアレルギー疾患モデルマウスを作製することを目的とした。さらに、遺伝解析に適したアレルギー疾患モデルマウスが得られた際には、連鎖解析を行い、アレルギー疾患の発症に關与する遺伝子座を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NC-PD-1 欠損マウスの作製と解析

C57BL/6 系統の PD-1 欠損マウスを NC マ

ウスに 8~17 世代に渡って戻し交配した後 (N8~17 世代) 欠損遺伝子座をホモ化した。得られたマウスを SPF 環境下で最長 30 週間に渡って観察し、アトピー性皮膚炎発症の有無および症状の程度を観察した。

(2) NC-LAG-3 欠損マウスの作製と解析

BALB/c 系統の LAG-3 欠損マウスを NC マウスに 5 世代に渡って戻し交配した後、欠損遺伝子座をホモ化した。得られたマウスを SPF 環境下で最長 30 週間に渡って観察し、アトピー性皮膚炎発症の有無および症状の程度を記録した。

4. 研究成果

(1) NC-PD-1 欠損マウスの作製と解析

最初に 15 匹の NC-PD-1 欠損マウス (N8) を作製して観察を続けたが、明らかなアトピー性皮膚炎を発症するマウスは認められなかった。戻し交配による染色体の置換が不完全であった可能性を考え、戻し交配を追加した。N10 及び N11 世代で解析したところ、極めて激しい全身性の皮膚炎を発症する個体が複数得られたため、数を増やして検討した。その結果、大多数のマウスは皮膚炎を発症しなかった。また、皮膚炎の発症は PD-1 欠損とは相関せず、むしろ野生型 NC マウスにおいてより高率に、皮膚炎の発症が確認された。

戻し交配を 10 回行ったマウスでは、理論的には 99.9% の染色体が NC マウス由来配列に置換されていると考えられるが、N10 及び N11 世代の一部のコロニーにおいて激しい皮膚炎の発症が認められたこと、及び N8 世代では皮膚炎の発症が認められなかったことから、C57BL/6 系統由来の染色体領域が極わずかに残存し、皮膚炎の発症を妨げている可能性が疑われた。そこで、さらに戻し交配の回数を増やし、残存する C57BL/6 系統由来染色体領域を狭小化して、再度検討した。最終的に、N17 世代まで解析したが、NC-PD-1 欠損マウスにおいて激しい皮膚炎を認めることは無かった。また、N13 世代以降は、野生型 NC マウスや PD-1 ヘテロ欠損マウスを含む全てのマウスにおいて、激しい皮膚炎を認めることは無かった。

以上の結果から、PD-1 を欠損させても、NC マウスが SPF 環境でアトピー性皮膚炎を自然発症することは無いと結論付けられた。また、PD-1 欠損とは無関係に一部のマウスが激しい皮膚炎を発症したことから、C57BL/6 系統の染色体にアトピー性皮膚炎を増悪する遺伝子座が存在する可能性が示唆された。すなわち、NC マウスが有するアトピー性皮膚炎の感受性遺伝子座に、C57BL/6 系統が有する当該遺伝子座が組み

合わさると、PD-1 欠損とは関係無く、SPF 環境で激しい皮膚炎を発症すると考えられる。C57BL/6 系統が有する本遺伝子座については、PD-1 遺伝子座の近傍に存在する可能性が高いと考えられるため、激しい皮膚炎を発症したマウスと発症していないマウスについて、PD-1 遺伝子座近傍の染色体領域について、SNP マーカーを用いて由来系統を決定し、皮膚炎発症との相関の有無を検討したが、現在のところ、皮膚炎発症と相関を示すマーカーは得られていない。今後、他の染色体を含めて、マーカーの数を増やして検討するとともに、PD-1 欠損とは関係無く、連鎖解析を行う予定である。

(2) NC-LAG-3 欠損マウスの作製と解析

N5 世代でホモ化した NC-LAG-3 欠損マウスが、SPF 環境において耳介部に強い皮膚炎を発症するとともに、LAG-3 ヘテロ欠損マウスの一部が、耳介部に弱い皮膚炎を発症した。そこで、より遺伝学的に均質な NC-LAG-3 欠損マウスを作製して解析するために、戻し交配を継続した。しかし、その後得られた LAG-3 ヘテロ欠損マウスを含めて 20 ペア以上の交配を行ったにもかかわらず、全く産仔が得られなかった。雑種不妊が疑われたため、再度、BALB/c-LAG-3 欠損マウスの NC マウスへの戻し交配を試みた。特定の非 NC 系統由来染色体領域 (LAG-3 欠損マウスの LAG-3 遺伝子座近傍は、C57BL/6 系統、CBA 系統及び BALB/c 系統由来染色体配列が混在している可能性がある) と特定の NC 系統由来染色体領域が偶然組み合わさることにより雑種不妊となったと考えられたため、両者の邂逅を避けるため、できるだけ多くのマウスを用いて戻し交配を行った。しかし、戻し交配の世代が進むに連れて産仔が得られる確率が低下し、N6 世代で全く産仔が得られなくなった。

もし、NC-LAG-3 欠損マウスが遺伝学的に不安定である原因が、当初の予想通りに雑種不妊であれば、LAG-3 遺伝子座近傍に非 NC 系統由来要因と NC 系統由来要因の双方が存在する可能性と、LAG-3 遺伝子座近傍に非 NC 系統由来要因が、LAG-3 遺伝子座とは無関係のところ NC 系統由来要因が存在する可能性が考えられる。前者の可能性を検討する目的で、LAG-3 遺伝子座近傍領域の由来系統を SNP マーカーにて決定したが、雑種不妊と相関するマーカーは同定できなかった。後者の可能性を検証するには、より多くのマウスを用いて、全染色体を対象とした連鎖解析を行う必要があると思われる。

雑種不妊以外の原因としては、N5~6 世代の LAG-3 ヘテロ欠損マウスが、雌雄ともに不妊である可能性が考えられる。上記の通り、

N5~6世代のLAG-3ヘテロ欠損マウスでは一部のマウスに軽い皮膚炎が観察されることがあったが、その他には特に解剖学上、大きな変化は認められていない。

NCマウスが自然発症するアトピー性皮膚炎に与えるLAG-3欠損の影響を解析するためには、遺伝学的に均質なNC-LAG-3欠損マウスを作製して解析することが必須である。上述の通り、N6以上の世代でLAG-3欠損マウスが得られなかったため、また、それよりも若い世代では遺伝学的な不均一性のためか症状が安定しなかったため、LAG-3欠損がアトピー性皮膚炎を悪化する可能性は高いと思われるものの、結論付けることは出来なかった。

今後、他のアレルギーモデルを用いて、これらの免疫抑制受容体の機能を解析する予定である。また、NCマウスにおいて、遺伝学的に均質なNC-LAG-3欠損マウスの作製を経ずに、LAG-3欠損条件下で、連鎖解析を行うことを計画している。

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4件)

Satoru Iwamoto, Masahiro Kido, Nobuhiro Aoki, Hisayo Nishiura, Ryutaro Maruoka, Aki Ikeda, Taku Okazaki, Tsutomu Chiba, and Norihiko Watanabe, TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression., *Clinical Immunology*, vol. 146, No. 1, pp.15-25, 2013 (DOI:10.1016/j.clim.2012.10.008)

Taku Okazaki, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, and Tasuku Honjo, A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application., *Nature Immunology*, 14(12): 1212-1218, 2013 (doi: 10.1038/ni.2762)

岡崎一美、岡崎 拓、”癌、自己免疫病とPD-1”、*医学のあゆみ*、第245巻、第3号、12353-12357、2013年
岡崎 拓、岡崎一美、“免疫抑制受容体分指標的(PD-1とその関連分子)”、*炎症と免疫*、第21巻、第3号、189-194、2013年

[学会発表](計10件)

Taku Okazaki, Regulation of autoimmunity by immunoinhibitory receptors. The 3rd Bizan immunology symposium, University of Tokushima (Tokushima City), February 14th, 2014.

Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Takeo Kajihara, and Taku Okazaki, Molecular analyses of an inhibitory co-receptor, LAG-3. The 3rd Bizan immunology symposium, University of Tokushima (Tokushima City), February 14th, 2014.

杉浦大祐、岡崎一美、高橋涼香、梶原武雄、岡崎 拓、免疫抑制受容体LAG-3によるT細胞活性化制御機構の解析、第12回四国免疫フォーラム、徳島文理大学香川キャンパス(香川県さぬき市)、2013年6月22日

Taku Okazaki, “Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity”, 2013 SKKU International Symposium on Molecular Medicine, Sungkyunkwang University (Suwon, Korea), February 28th, 2013

Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Suzuka Takahashi, Takeo Kajihara, and Taku Okazaki, “Identification of new therapeutic targets by genetic dissection and reconstitution of autoimmune diseases in mice”, JST-CREST International Symposium. *Frontiers in immunology and inflammation: from molecules to disease*. Hitotsubashi memorial hole (Tokyo), February 12-13th, 2013.

Taku Okazaki, “Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, University of Tokushima (Tokushima City), January 25th, 2013.

Il-mi Okazaki and Taku Okazaki, “Genetic reconstitution of autoimmunity in mice”, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, University of Tokushima (Tokushima City), January 25th, 2013.

岡崎 拓、”免疫抑制受容体による免疫応答の制御”、第4回 東京編・徳島大学研究者との集い、バイオインダストリー協会(東京都)、2012年7月27日

岡崎 拓、”*aida* マウスを用いた自己免疫疾患発症制御機構の解析”、第7回自己免疫疾患研究会、東海大学校友会館(東京都)、2012年7月7日

岡崎一美、杉浦大祐、高橋涼香、梶原武雄、岡崎 拓、”PD-1欠損マウスを用いた自己免疫疾患のゲノム解析”、第11回四国免疫フォーラム、高知大学(高知県南国市)、2012年6月9日

〔図書〕(計0件)

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dir/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡崎 拓 (OKAZAKI, Taku)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号: 00362468

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し