

岡崎 拓  
徳島大学疾患ゲノム研究センター・教授

## 自己免疫疾患制御分子の同定による新規治療法の開発

### §1. 研究実施の概要

人口の 5%が何らかの自己免疫疾患に罹患していると言われていたが、効果的な根治療法は無く、対症療法による治療が中心となっている。効果的な根治療法の開発には、疾患の成立機序を解明することが不可欠であるが、ほとんど全ての自己免疫疾患は多遺伝子疾患であるため原因遺伝子を解明することは極めて困難であり、思うように進んでいない。そこで本研究課題では、病態成立の遺伝要因がより単純であるモデル動物を利用することにより、疾患発症に関与する遺伝子を全て同定し、自己免疫疾患制御ネットワークシステムの全貌を解明することを目的としている。自己免疫応答の制御機構が解明できれば、やはり不適切な免疫応答であるアレルギー疾患や移植片の拒絶、一種の自己免疫応答である腫瘍免疫、自己の細胞に感染して毒性を発揮するウイルス感染症等に対しても、効果的な治療法の開発につながると期待される。

我々は、免疫抑制受容体 PD-1 の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から、PD-1 欠損マウスを用いて臓器特異的の自己免疫疾患の遺伝解析を行っている。平成22年度は、I 型糖尿病、心筋炎、末梢神経炎、血管炎等の発症に連鎖を示した遺伝子座について、コンジェニックマウスの作製を推進した。今後、各遺伝子座をより詳細に解析することにより、責任遺伝子を同定し、その機能を解析する予定である。

遺伝解析と並行して、最近新規に樹立した自己免疫疾患自然発症マウス(*aida* マウス)の解析を行っている。平成22年度は、*aida* マウスにおいて Th1 型の免疫応答が亢進していることを見出すとともに、*aida* マウスの原因遺伝子 LAG-3 の機能解析を行った。今後、LAG-3 分子による免疫制御メカニズムをより詳細に解析する予定である。

### §2. 研究実施体制

(1)「岡崎」グループ(研究機関別)

- ① 研究分担グループ長:岡崎 拓 (徳島大学疾患ゲノム研究センター、教授)(研究代表者)
- ② 研究項目
  - ・自己免疫疾患モデルマウスを用いた遺伝解析
  - ・LAG-3 の機能解析

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### (1) 自己免疫疾患モデルマウスを用いた遺伝解析

PD-1は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反応を抑制し、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。また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発症すること、すなわちC57BL/6、BALB/cおよびNOD系統においてSLE様の腎炎・関節炎、拡張型心筋症・胃炎および重症のI型糖尿病を発症することを明らかにしてきた。

その後、NOD-PD-1欠損マウスを用いて連鎖解析を行い、I型糖尿病の発症に関与する遺伝子座が4個に絞り込まれることを明らかとし、各々の原因遺伝子をより高精度に解析できる可能性を示した。実際、連鎖を示した領域を汎用系統であるC57BL/6系統に導入したところ、PD-1欠損下ではほぼ全てのマウスがI型糖尿病を発症し、これまでに得られている遺伝子座が必要十分なものであることを明らかとしている。本研究期間には、NOD由来染色体領域を短縮させた様々なサブコンジェニックマウスを作製することにより、責任遺伝子が存在する領域の絞り込みを行った。

NOD-PD-1欠損マウスのMHCハプロタイプを糖尿病抵抗性のbハプロタイプに置換したマウス(NOD.H2b-PD-1欠損マウス)では、自己免疫性の神経炎等を自然発症することを見出している。また、NOD.H2b-PD-1欠損マウスとC57BL/6-PD-1欠損マウスの交雑マウスを作製して連鎖解析を行い、神経炎、血管炎、唾液腺炎等に連鎖を示す遺伝子座を13個同定している。本研究期間には、神経炎の改善、胃炎の発症、血管炎の発症等が期待されるコンジェニックマウスの作製を開始し、これまでに戻し交配を5世代完了した。また、一部のコンジェニックマウスについては、置換した染色体領域のホモ化を開始した。

さらに、ループス様の病態を自然発症することが知られているMRLマウスにPD-1欠損マウスを戻し交配することにより、致死性の心筋炎を自然発症することを見出すとともに、MRL-PD-1欠損マウスとBALB/c-PD-1欠損マウスの交雑マウスを作製して連鎖解析を行い、心筋炎に関与する遺伝子座をMRL染色体上に5個同定している。本研究期間には、既に開始している心筋炎の発症が期待されるコンジェニックマウスの作製を継続し、5遺伝子座のうち3遺伝子座についてMRL由来染色体領域をホモで有するマウスを作製した。今後、5遺伝子座を全てホモで有するマウスを作製し、心筋炎発症の有無を判定する予定である。

#### (2) 自己免疫疾患制御分子LAG-3の機能解析

抗体遺伝子のクラススイッチ組換えと体細胞突然変異が自己免疫素因に与える影響を解析する目的で、両者が全くおこらないAID欠損マウスにBALB/c-PD-1欠損マウスを交配したところ、全てのBALB/c-AID-PD-1二重欠損マウスが生後7週齢までに激しい心筋炎を発症して死亡した。また、BALB/c-AID欠損マウスをNODマウスに戻し交配したところ、I型糖尿病が大幅

に悪化したため、AID が自己免疫疾患の発症を制御している可能性が示唆された。しかし、その後の解析から、自己免疫症状の悪化はAID欠損そのものの影響ではなく、AID遺伝子座近傍に存在する別の遺伝子によるものである可能性が疑われた。そこでこのマウスを *aida* マウス (AID-linked autoimmunity) と命名して原因遺伝子の同定を試みたところ、AID 遺伝子座近傍に存在する LAG-3 遺伝子に 2bp の欠失変異を同定することに成功したため、その機能を解析している。

本研究期間内には、BALB/c-PD-1欠損 *aida* マウスの免疫学的解析を行い、Th1型の免疫応答が増強されていることを見出した。また、リンパ球の非特異的な活性化が認められないこと、制御性 T 細胞の機能は障害されていないこと等を見出した<sup>3)</sup>。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Shunsuke Sakai, Ikuo Kawamura, Taku Okazaki, Kohsuke Tsuchiya, Ryouyusuke Uchiyama, and Masao Mitsuyama, "PD-1-PD-L1 pathway impairs T(h)1 immune response in the late stage of infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin", Int. Immunol., vol. 22, No. 9, pp.915-925, 2010 (DOI:10.1093/intimm/dxq446)
2. Seigo Terawaki, Shunsuke Chikuma, Shiro Shibayama, Tamon Hayashi, Takao Yoshida, Taku Okazaki, and Tasuku Honjo, "Interferon  $\alpha$  directly promotes programmed-cell-death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity", J. Immunol., vol. 186, No. 5, pp.2772-2779, 2011 (DOI:10.4049/jimmunol.1003208)
3. Taku Okazaki, Il-mi Okazaki, Jian Wang, Daisuke Sugiura, Fumio Nakaki, Taku Yoshida, Yu kato, Sidonia Fagarasan, Masamichi Muramatsu, Tomoo Eto, Kyoji Hioki, and Tasuku Honjo. "PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice." J.Exp.Med., vol. 208, No. 2, pp.395-407, 2011 (DOI:10.1084/jem.20100466)
4. Nobuhiro Aoki, Masahiro Kido, Satoru Iwamuro, Hisayo Nishiura, Ryutaro Maruoka, Jyunya Tanaka, Takeshi Watanabe, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Tsutomu Chiba, and Norihiko Watanabe. Gastroenterology., vol. 140, No. 4, pp.1322-1333, 2011 (DOI:10.1053/j.gastro.2011.01.002)

