

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」

平成 21 年度採択研究代表者

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自己免疫疾患の遺伝解析を行っている。平成21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するとともに、心筋炎を自然発症するモデルマウスについて免疫学的な解析を行った。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、最近新規に同定した自己免疫疾患制御分子 AIDA の解析を行っている。平成21年度は、T 細胞ハイブリドーマを用いて、AIDA が抗原刺激応答を抑制することを明らかとした。また、同じ実験系において、AIDA が PD-1 と相加的に抗原刺激応答を抑制することを明らかとした。今後、本実験系を用いることにより、AIDA 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

- ① 研究分担グループ長: 岡崎 拓 (徳島大学、教授)
- ② 研究項目
  - (1) 自己免疫疾患モデルマウスを用いた遺伝解析。
  - (2) AIDA 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・胃炎および亜急性の 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10ライン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開始した。マウスの1世代はおおよそ3ヶ月であり、I 型糖尿病の発症にはおおよそ3ヶ月の観察期間が必要であるため、各サブコンジェニックマウスの解析は次年度以降になる予定である。

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2世代完了した。今後、戻し交配を4世代追加した時点で、各遺伝子座をホモ化するとともに PD-1 欠損を導入する予定である。

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、これまでに戻し交配を6世代完了するとともに、5遺伝子座を全てホモで有するマウスの作製を開始した。5遺伝子座を全てホモで有するマウスを作製するには、今後4回以上の交配が必要と予測されるため、心筋炎発症の有無が判定できるのは、平成22年度後半から平成23年度前半になるものと予測される。また、MRL-PD-1 欠損マウスの免疫学的な解析を行った。炎症局所である心臓には CD8 T 細胞、CD4 T 細胞および骨髄球系細胞が多数浸潤していること、および心臓に浸潤している骨髄球系細胞が免疫抑制能を有することを見出した。心筋炎を発症したマウスから脾細胞を採取して放射線照射した MRL 野生型マウスに移入すると数週間で心筋炎が惹起されたが、同じ MHC ハプロタイプを有する C3H マウスおよび AKR マウスに移入しても心筋炎が誘導されなかったことから、細胞傷害段階においても MRL の遺伝素因が促進的に働いていることが明らかとなった。また、MRL-*lpr* マウスに移入した場合には心筋炎が誘導されたことから、心筋細胞の傷害に Fas 経路は関与していないと考えられた (Wang J. *et al.* Int. Immunol. *in press*)。

## (2) 自己免疫疾患制御分子 AIDA 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 AID 遺伝子座近傍に存在する遺伝子の遺伝子配列を調べたところ、AID 遺伝子座近傍に存在する遺伝子に 2bp の欠失変異を同定することに成功したため、この遺伝子を AIDA (AID-linked autoimmune suppressor) と命名し、その機能を解析している。

本研究期間内には、AIDA の分子機能を解明する目的で、細胞株を用いた実験系の構築を試みた。具体的には、T 細胞ハイブリドーマに AIDA 分子を強制発現させ、抗原ペプチドを添加した抗原提示細胞を用いて刺激した。AIDA 分子を強制発現させた T 細胞ハイブリドーマは、コントロールの細胞と比較して IL-2 産生が大幅に抑制されていたため、AIDA 分子が抗原受容体刺激を抑制することが確認された。また、PD-1 分子との相加的な影響を検討した。実験に用いた T 細胞ハイブリドーマには PD-1 分子が恒常的に発現していたため、抗原提示細胞に PD-1 のリガンドである PD-L1 を強制発現させることにより、PD-1 分子の関与を制御した。その結果、PD-1 と AIDA はほぼ同程度に IL-2 の産生を抑制するとともに、両者が共に働く条件下では IL-2 の産生がより強力に抑制されたため、PD-1 と AIDA は抗原受容体刺激を相加的に抑制することが明らかとなった。今後、本実験系を用いることにより、AIDA 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。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ・論文詳細情報

- 1) Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani S, Tanaka Y, Minato N and Kumagai S. Anti-PD-1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J. Immunol.* 184(5):2337-2347 (2010)  
doi:10.4049/jimmunol.0901652
- 2) Wang J, Okazaki IM, Yoshida T, Chikuma S, Kato Y, Nakaki F, Hiai H, Honjo T and Okazaki T. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int. Immunol. in press* doi:10.1093/intimm/dxq026