

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. 研究実施体制

(1)「岡崎」グループ(研究機関別)

① 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)

② 研究項目

- ・ LAG-3 の機能解析
- ・ 自己免疫疾患モデルマウスを用いた遺伝解析

### §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1) 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 欠損マウスを、自己免疫性の胃炎と拡張型心筋症を自然発症する BALB/c-PD-1 欠損マウスと交配したところ、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、LAG-3 の細胞内領域に結合する分子の同定を、免疫沈降法と質量分析法により試みた。その結果、共沈降される分子を約 20 種類同定することに成功した。各々について、様々な条件下で LAG-3 との結合を検証するとともに、LAG-3 の機能欠失変異体との結合の有無、ノックダウン時の LAG-3 による抑制機能減弱の有無等を指標に、分子 A と分子 B を絞り込んだ。しかし、分子 A と分子 B を T 細胞株でノックダウンすると T 細胞株が死滅したため、機能的な関与は証明できていない。そこで、分子 A と分子 B が細胞の生存に必須の機能と LAG-3 を

介して T 細胞株の活性化を抑制する機能の2種類の機能を有すると予測し、細胞の生存に必須の機能は有するが、LAG-3 への会合能を欠く変異体を作製するため、約20種類の変異体を作製して検討したが、今のところ条件に合う変異体を得るには至っていない。今後、変異体の作製を継続するとともに、免疫共沈降以外の手法も組み合わせて、LAG-3 による免疫抑制シグナルの解明につなげたい。

LAG-3 は、MHC クラス II 分子に結合することが報告されているが、我々は MHC クラス II 分子とは別のリガンドが存在し、そのリガンドが LAG-3 分子の抑制活性に必須であるという実験結果を得ている。そこで、MHC クラス II 分子以外のリガンドの同定を試みているが、本研究期間内には、LAG-3 の細胞外領域と抗体分子の Fc 領域を融合させたキメラ蛋白質によって特異的に染色される細胞株を同定することに成功した。また、その細胞株を用いて cDNA レトロウイルスライブラリーを作製して LAG-3 リガンドを発現しない細胞株に導入し、発現クローニングを行ったところ、転写因子 A を得ることに成功した。これまでに、LAG-3 リガンドを発現しない細胞株に転写因子 A を強制発現させることにより、LAG-3 リガンドの発現を誘導できることを明らかとしている。今後、転写因子 A によって誘導される分子の中から、LAG-3 リガンドそのものの同定を試みる予定である。

## (2) 自己免疫疾患モデルマウスを用いた遺伝解析

我々はこれまでに、免疫抑制受容体 PD-1 を欠損させたマウスが、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、連鎖を示した領域について、汎用系統である C57BL/6 マウスの当該領域を NOD マウス由来染色体領域に置換したところ、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。本研究期間内には、第3番染色体の *Idd3*、*Idd10*、*Idd17* を含む領域について、5 ラインのサブコンジュニックマウスの作製をほぼ完成することに成功した。今後、個体数を増やして糖尿病の発症頻度を観察するとともに、導入染色体領域をさらに狭小化したサブコンジュニックマウスを作製し、責任遺伝子の絞り込みを試みる予定である。

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。本研究期間内には、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ュニックマウスの作製を継続して行った。

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。本研究計画では、これら5個の遺伝子座について、

BALB/c マウスの染色体領域を MRL マウス由来染色体領域に置換したコンジェニックマウスを作製することにより、BALB/c マウスにおいて心筋炎を遺伝的に再構築することを試みている。本研究期間内には、コンジェニックマウスの作製を継続して行った。今後、心筋炎発症の有無を評価するとともに、各遺伝子座における責任遺伝子の同定を試みる予定である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Sugino Yoshio, Nishikawa Nobuyuki, Yoshimura Koji, Kuno Sadako, Hayashi Yukio, Yoshimura Naoki, Okazaki Taku, Kanematsu Akihiro, Ogawa Osamu. BALB/c-Fcgr2bPdcd1 mouse expressing anti-urothelial antibody is a novel model of autoimmune cystitis. *Sci Rep.* 2012;2:317. (DOI:10.1038/srep00317)
2. Iwamoto Satoru, Kido Masahiro, Aoki Nobuhiro, Nishiura Hisayo, Maruoka Ryutaro, Ikeda Aki, Okazaki Taku, Chiba Tsutomu, Watanabe Norihiko. IFN- $\gamma$  is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity.* 2012 Mar;45(2):186-198. (DOI: 10.3109/08916934.2011.616559)
3. Kayama Hisako, Ueda Yoshiyasu, Sawa Yukihisa, Jeon Seong Gyu, Ma Ji Su, Okumura Ryu, Kubo Atsuko, Ishii Masaru, Okazaki Taku, Murakami Masaaki, Yamamoto Masahiro, Yagita Hideo, Takeda Kiyoshi. Intestinal CX3C chemokine receptor 1high (CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 27;109(13):5010-5015. (DOI: 10.1073/pnas.1114931109)