

岡崎 拓

徳島大学疾患プロテオ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 (徳島大学疾患プロテオ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

(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疾患の発症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、戻し交配法により NOD-AID 欠損マウスを作製したところ、AID 欠損により I 型糖尿病が大幅に促進されたため、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、その後の解析により、これらの自己免疫症状は 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、LAG-3 遺伝子に突然変異として導入された機能欠失変異による影響であることが明らかとなった。

LAG-3 は、T 細胞の抗原刺激による活性化を抑制する能力を有しているが、その抑制メカニズムは不明である。LAG-3 の細胞質内領域には、機能が分かっているシグナル伝達モチーフが無いことから、本研究課題では LAG-3 による抗原受容体刺激抑制メカニズムの解明を試みている。本研究期間内には、LAG-3 との結合を指標として前年度までに同定していた分子の解析、関与が疑われる分子に対する阻害剤を用いた解析、関与が疑われる分子に対する RNA 干渉を用いた解析等を行った。その結果、LAG-3 の抑制能を減弱し得る、阻害剤 A を同定することに成功した。また、RNA 干渉により発現を減弱させることにより、LAG-3 による抑制機能が減弱される分子

Bを同定することに成功した。これらの解析は、全てマウスLAG-3分子を用いて行っているが、ヒトLAG-3分子でも同様の結果が得られることを確認する目的で、ヒトLAG-3分子についても解析を開始した。今後、網羅的RNA干渉等によりLAG-3の抑制シグナルに関与する分子を網羅的に探索するとともに、阻害剤Aおよび分子Bに着目して解析することにより、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ことを示唆する実験結果を得ている。前年度までに、cDNAレトロウイルスライブラリーを用いた発現クローニング法により、LAG-3リガンドの発現を誘導し得る転写因子Aを同定することに成功している。本研究期間内には、転写因子Aが発現を誘導する遺伝子を同定するとともに、それらの発現をRNA干渉法により減弱させ、LAG-3リガンドそのものの同定を試みた。その結果、LAG-3リガンドが、複数の分子により修飾を受ける、複数の分子からなる複合体であることを明らかとするとともに、修飾分子1個を同定することに成功した。今後、LAG-3リガンドの構成分子および修飾分子を全て同定することにより、その成立条件を解明するとともに、複雑な制御システムが存在することの生物学的意義を解明したい。

(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・胃炎および重急性のI型糖尿病を発症することを明らかにしてきた。PD-1欠損を用いることにより、各系統が有する自己免疫の遺伝素因を効率的に同定できると考え、NOD-PD-1欠損マウスを用いて連鎖解析を行ったところ、I型糖尿病の発症に連鎖を示す遺伝子座を4個同定することに成功した。その後、汎用系統であるC57BL/6マウスにおいて、これら4遺伝子座をNOD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型糖尿病を発症したことから、これまでに得られている遺伝子座がI型糖尿病の発症に必要な十分であることが明らかとなった。これらの遺伝子座には、既にI型糖尿病発症への関与が他の研究グループによって報告されているIL-2遺伝子が含まれるため、IL-2遺伝子の由来系統に着目したコンジェニックマウスを複数作製し、PD-1欠損下でのI型糖尿病発症におけるNOD型IL-2遺伝子多型の関与を解析した。その結果、NOD型IL-2遺伝子多型による経路に加え、IL-2遺伝子座のテロメア側に存在する遺伝子による経路が存在することが明らかとなった。今後、導入染色体領域をさらに狭小化したサブコンジェニックマウスを作製し、責任遺伝子の同定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すとともに、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。また、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マウスがPD-1欠損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5個同定している。本研究期間内には、胃炎の発症、血管炎の発症、心筋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継続して行った。今後、各疾患について発症の有無を評価するとともに、導入染色体領域を狭小化したサブコンジェニックマウスを作製することにより、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. Satoru Iwamoto, Masahiro Kido, Nobuhiro Aoki, Hisayo Nishiura, Ryutaro Maruoka, Aki Ikeda, Taku Okazaki, Tsutomu Chiba, Norihiko Watanabe, “TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression”, Clin Immunol, vol. 146, No. 1, pp.15-25, 2013 (DOI:10.1016/j.clim.2012.10.008)