

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「抗 GBM 抗体関連疾患における HLA DR の解析」

分担研究者 今井裕一 愛知医科大学医学部 腎臓・膠原病内科
共同研究者 北川 渡 愛知医科大学医学部 腎臓・膠原病内科
小松田 敦、牧 伸樹、涌井秀樹 秋田大学第三内科
比企能之、杉山 敏 藤田保健衛生大学腎臓内科

研究要旨

急速進行性腎炎を引き起こす原因として抗GBM抗体がある。抗GBM抗体の出現はHLA DR15と強い相関が有るとい報告が欧米から出されている。今回、わが国の抗GBM抗体関連疾患患者16名でHLA DR genotypeを検討した。

A. 研究目的

抗原提示に際しては、HLA DR が重要であることが示されている。抗 GBM 抗体の抗原部分は、IV 型コラーゲンの $\alpha 3$ の非コラーゲン部分であることが分かっている。一方、患者の HLA DR に関しては、欧米から DR 15 の重要性が指摘されているが、わが国で解析はなされていない。今回 HLA DR genotype を検討する。

B. 研究方法

1990 年 12 月から 2005 年 10 月までの間に経験した抗 GBM 関連疾患 16 名を対象と臨床症状、検査成績、HLA A, B, C, DR DR genotype を検討した。統計学的処理は日本人でのデータを対照として Yeate 補正を行なった X² 検定を行なった。

(倫理面への配慮)

患者を特定できる項目は調査していない。遺伝子解析に関しては、患者の同意を得ている。

C. 研究結果

1. 性、年齢、臨床症候

男性8名、女性8名で性差はない。発症年齢の平均は60.6歳であった。4例で呼吸器症状があった。

2. 検査成績

14例で尿異常がみられたが、2例では無尿であった。BUN, クレアチニンは、それぞれ 25.2 ± 16.1 mmol/L, 725 ± 530 μ mol/dlであった。

3. 抗GBM抗体、抗好中球細胞質抗体 (ANCA)

5例は、14 ~88 ELISA units (EU) (基準値: 10 EU未満) 3例は100 ~199 EU, 1例は284 EU、7例は300 EU以上であった。4例で MPO-ANCA が陽性であった。

4. 予後

2例は死亡し、9例は維持透析療法が必要であり、1例は治療後2年で透析療法が開始された。2例は初期治療に反応したが腎機能は低下している。2例が腎機能正常化している。

5. HLAの解析

HLA A, B,Cには疾患との関連はなかった。HLA DR15 の発現頻度は、93.8% (15/16)であった。DR4は43.8%, DR9が31.3%であった。16例中1例でDR15がみられなかったが、その1例の組み合わせは、DR4,DR9であった。

HLA DRB1*1501のアリル頻度は、46.4% (13/28)であった。これは、日本人でのアリル頻度(11.6%)と比較して有意に高かった ($p < 0.001$)。HLA-DRB1*1501のオッズ比は6.4 (95% 信頼区間: 2.4-16.5)であった。一方、DRB1*1502の日本人でのアリル頻度は8.81%であるが、今回の16例中には存在しなかった。

D. 考察

これまで欧米からは、抗GBM抗体関連疾患のHLAについてDR15が重要であることが報告されていた。今回の検討で、日本人においても同様にHLA DR15(DRB1:1501)が重要であることがわかった。人種差を超えて共通の発症要因であることが明らかになった。

HLA DR15は、元来はDR2にまとめられていたが、DR15とDR16に分けられた。最近の遺伝子解析でさらに、DRB1*1501, DRB1*1502, DRB1*1601になっている。日本人でのそれぞれのアリル頻度は11.6%, 8.91%, 0.78%とされている。

DRB1*1501とDRB1*1502の差は、ポケット4の86番目のアミノ酸がDRB1*1501ではvalineでDRB1*1502ではglycineというわずかの差である。今回の検討で、DRB1*1502ではなくDRB1*1501であったことは、抗GBM抗体産生に置いて86番目のアミノ酸が重要であることを示唆している。

しかし、抗GBM抗体関連疾患の発症頻度とDRB1*1501の発現頻度を比較するとDRB1*1501のみで疾患が発症するとは言いがたい。今後とも直接の発症要因を検討する必要がある。

E. 結論

抗GBM抗体関連疾患が発症する要因として、HLA DRB1*1501が重要であることがわかった。しかし、抗GBM抗体関連疾患のわが国での発症頻度は年間10-20例であり、HLA DRB1*1501の発現頻度が10-20%であることを考えると、他の要因が存在して初めて発症することを示している。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miura N, et al The Efficacy of Tonsillectomy and Steroid-Pulse Combined Therapy(TSP) for Patients with IgA Nephropathy IgA Nephropathy Today 157 206, 2007

2) 今井裕一、西川和裕 腎臓専門医への紹介のタイミング[成人] 腎・泌尿器疾患診療マニュアル-小児から成人まで 136 (特2) 128-129, 2007

2. 学会発表

1) 山田晴生 ほか SLE に管内増殖を伴うP-ANCA陽性pauci-immune型半月体形成性腎炎を呈した1例 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会 横浜 2007

2) 三浦直人 ほか ループス腎炎におけるミゾリビンの効果 第50回日本腎臓学会学術総会 浜松 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「IgA 腎症の予後判定に有用な病理組織因子の抽出」

呉 瓊（東海大学医学部腎代謝内科）
仁科 良（東海大学医学部腎代謝内科）
遠藤 正之（東海大学医学部腎代謝内科）

研究要旨

IgA腎症腎機能安定群と進行群の腎生検組織上の因子と予後との関係を検討した。二群の間に、腎生検時の血圧、尿潜血、24h尿蛋白、SCrに差はなかった。進行群ではSCrと24h尿蛋白が翌年から増加していった。進行群では硬化糸球体の割合、間質の浸潤細胞数のほかに、間質のリンパ管密度およびリンパ管総面積の増加が観察された。間質リンパ管の増生はIgA腎症患者の腎機能進行群を推測するのに最も良い病理組織学的指標であると考えられる

A. 研究目的

腎生検組織所見からのみでは腎機能の予後推定はしばしば困難である。今回、IgA腎症腎機能安定群と進行群の腎生検組織上の因子と予後との関係を検討した。

B. 研究方法

腎生検時血清クレアチニン（SCr）が正常値を超えていたが、10年間腎機能が安定していた安定群と5年以内にSCrが2倍以上に増加した進行群各12例の腎生検組織を用い、病理組織学変化を定量化し、二群間の差の有無を検討した。T細胞、リンパ管内皮細胞に対する抗体を用い、間質のT細胞数、リンパ管密度、リンパ管面積比を算出し比較した。

（研究の倫理面への配慮）

患者データはすべて匿名化して研究を遂

行した。

C. 結果

二群の間に、腎生検時の血圧、尿潜血、24h尿蛋白、SCrに差はなかった。追跡中の治療、5年間の血圧にも差はなかった。進行群ではSCrと24h尿蛋白が翌年から増加していった。癒着と半月体の割合、残存糸球体密度と平均面積は両群間に差はなかった。全節性硬化糸球体の割合、尿細管の萎縮率、間質のT細胞数は進行群に多く認められた。ほぼ正常の腎臓にはリンパ管は血管に伴い少量に存在していたが、IgA腎症では硬化糸球体の周囲、半月体の中、間質浸潤細胞の周りに多く観察された。間質のリンパ管密度、リンパ管面積/間質総面積比が進行群で著明に増加していた（図1）。一方、間質病変が高度でもリンパ管の少ないIgA腎症患者では腎機能が保持されていた。

D. 考察

硬化糸球体の割合、間質の浸潤細胞数のほかに、間質のリンパ管密度も腎予後の判断に有用なパラメータであり、進行群を推測するのに最も良い病理組織学的指標であると考えられる。

E. 結論

IgA 腎症患者の腎機能を病理組織学的に推測する上で、全節性糸球体硬化の割合に加え、間質リンパ管の増生が良い指標となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

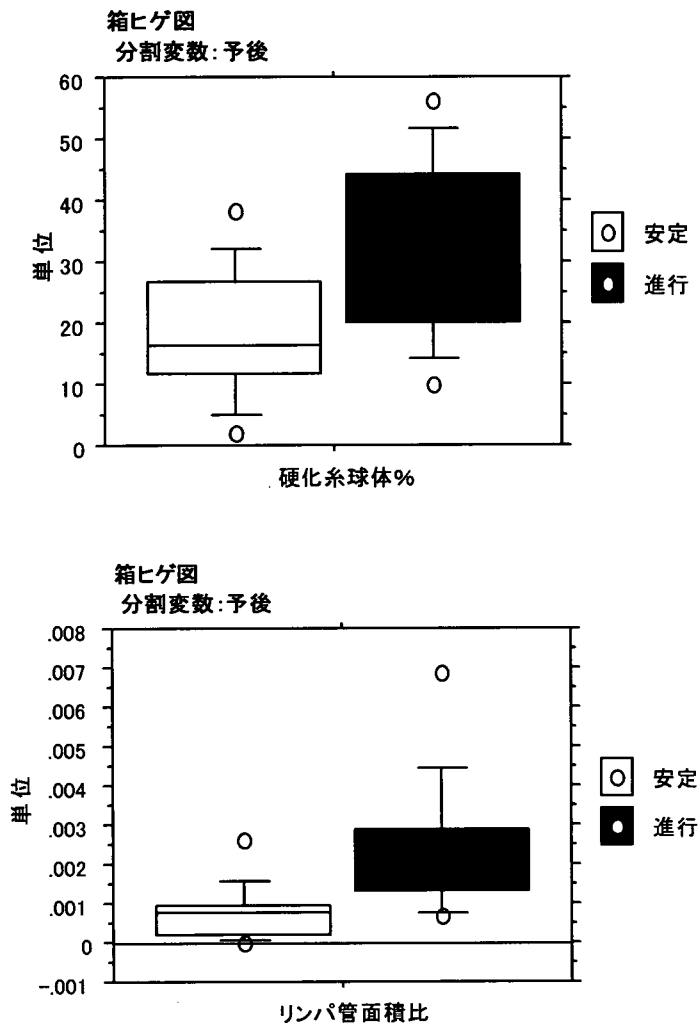
投稿準備中

2. 学会発表

呉 瓊、梅園朋也、豊田雅夫、仁科良、鈴木大輔、谷亀光則、遠藤正之：IgA 腎症組織上の間質リンパ管数が腎機能予後を規定する.日本腎臓学会総会、2007.

図 1

腎機能安定群および進行群での硬化系球体の割合および間質リンパ管面積比との関係



IgA 腎症患者の腎生検組織では、間質リンパ管増生所見が硬化系球体数の割合より正確に腎機能進行群を識別できる。

難病特別研究班
分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
難病特別研究班分担研究報告書

「全身性自己免疫疾患の遺伝的背景：Fcgr2b 遺伝子の関与」

分担研究者 西村裕之

桐蔭横浜大学・医用工学部 人間科学工学センター

研究要旨

免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎の基盤は免疫系における自己寛容の破綻である。正常な免疫系では獲得免疫系を構成するT細胞とB細胞のそれぞれの発生・成熟過程に監視機構が多重に備えられて自己寛容が維持されるが、自己免疫疾患においては複数の遺伝子多型を背景としてこれらの機序が重複して破綻すると想像される。疾患モデルを用いて自己寛容破綻を基礎づける量的な表現型に着目して連鎖解析を行えば、多段階の自己寛容破綻の遺伝的基礎を明らかにできると期待される。本研究では全身性自己免疫疾患モデルである New Zealand 系マウスにおいて自己寛容破綻を規定する多数の遺伝子座を明らかにし、特に抑制性 Fc 受容体を規定する *Fcgr2b* 遺伝子多型の自己免疫疾患発症における役割を明らかにした。

A. 研究目的

獲得免疫系を構成するT細胞とB細胞の発生・分化・成熟過程にはそれぞれ自己反応性クローンの出現を監視し、抑制する多重のチェックポイントがあって、免疫系の自己寛容が維持されていると考えられる。糸球体腎炎発症を示す自己免疫疾患モデルマウスでは、本来は外来抗原特異的なB細胞クローンにおいて起こるべき、抗体遺伝子の class switch と affinity maturation、さらには抗体産生細胞への分化が、自己反応性B細胞クローンにおいて起きることが示されている。このような疾患モデルについては、糸球体腎炎など、自己免疫病態表現に着目した遺伝連鎖解析が多く試みられているが、自己寛容破綻の遺伝的基盤については未だ不明の点が多い。

このような疾患モデルにおいて自己寛容

破綻を基礎づける量的表現型に注目した遺伝連鎖解析を行えば、多段階の自己寛容破綻の分子機序を明らかにできると期待される。我々は多遺伝子が関与する全身性自己免疫疾患モデル、NZB 系マウスにおいて、自己寛容破綻に密接に関連すると考えられる、免疫寛容原に対する異常な応答性に着目して責任遺伝子の連鎖解析を行い、自己寛容破綻の遺伝支配を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ウシ IgG (BGG)水溶液を超遠心分離(100,000g)によって精製して凝集物を除去し、特異的免疫寛容原(Deaggregated BGG: DBGG)とした。正常 C57BL/6 系と NZB 系の F2 intercross マウス(n=221)において、免疫寛容破綻を規定する遺伝子座を検索した。

動物実験については、桐蔭横浜大学動物実験委員会の倫理審査を経て承認を得た。

C. 結果

正常 C57BL/6 系マウスは免疫寛容原、DBGG の腹腔内投与(10 μ m)によって BGG 特異的な免疫寛容を誘導したが、NZB 系マウスではこの免疫寛容誘導がみられなかった。(C57BL/6 x NZB) F_2 intercross マウス(n=221)においては、DBGG による免疫寛容誘導能は量的形質であり、正常な免疫寛容を示す個体から、NZB 系同様、免疫寛容を誘導しない個体まで多様であった*。個々の F_2 マウスについて、ゲノムに散在するマイクロサテライト DNA 多型を調べ、NZB マウスの免疫寛容誘導能の欠如を規定する遺伝子座を *MapManager QTX* プログラムを用いて検索した結果、第 1 染色体テロメア近傍の *D1Mit15* に”highly significant linkage”第 3 染色体上 *D3Mit109* に”significant linkage”基準を満たす連鎖を見出した*。*D1Mit15* 近傍に存在する *Fcgr2b* 遺伝子を欠損した C57BL/6 マウスは DBGG によって BGG 特異的な免疫寛容誘導を示さず、第 1 染色体上の責任遺伝子は *Fcgr2b* であることが示唆された。しかし、用いた *Fcgr2b* 欠損マウスの作成プロセスにおいて、129 系由来の胚性肝細胞(ES cell)が用いられていたため、*Fcgr2b* 欠損マウスが示した免疫寛容不全の原因が *Fcgr2b* 遺伝子欠損によるものではなく、近傍の *SLAMF2* 遺伝子群の 129 系由来ハプロタイプが担う自己免疫疾患感受性にに基づくものではないかとの疑問が提唱された(図 1)。そこで、今年度 *Fcgr2b* が関与することを支持するデータを更に得るため、129 系と 129 系・NZB 系と相同な *Fcgr2b* 遺

伝子多型を持つ C57BL/6.Ly17.1 congenic 系を含め、Ig サブクラスに着目して DBGG 誘導による免疫寛容を比較した。その結果、129 系は全ての Ig サブクラスによる免疫応答について、C57BL/6 系と同様に正常な免疫寛容誘導を示したのに対し、C57BL/6.*Fcgr2b*^{-/-}系では全ての Ig サブクラスについて免疫寛容の不全がみられた(図 2)。以上の結果より、DBGG による免疫寛容誘導は *Fcgr2b* 遺伝子発現に依存した現象であることが示された。

C57BL/6.Ly17.1 congenic 系マウスにおいては、ほぼ正常に近い免疫寛容誘導が観察された。

D. 考察

Fcgr2b 遺伝子のコードする Fc γ RIIB は抑制性の ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)を持つ Fc 受容体であり、B 細胞受容体からのシグナルのフィードバック制御に関与し、B 細胞の自己寛容誘導に重要な役割を果たしていると考えられている。*Fcgr2b* 遺伝子はプロモーター領域に多型を有し、特に NZB 系ではこの系統にユニークな配列の欠損に基づいて、germinal center B 細胞における Fc γ RIIB 表現のレベルが異常に低い。このことが、NZB 系マウスの自己免疫疾患感受性に重要な役割を果たしていると考えられる。

NZB 系マウスの *Fcgr2b* 遺伝子多型を持つ C27BL/6.Ly17.1 系マウスにおいてはほぼ正常な免疫寛容誘導が観察された。このことは免疫寛容不全に複数の遺伝子多型の組み合わせが必要であることを示すものと考えられ、さらに詳しく検討を行っている。

E. 結論

糸球体腎炎を示す全身性自己免疫疾患モデル NZB 系マウスにおいて、*Fcgr2b* 遺伝子の発現制御異常はこのマウスの自己寛容の破綻に重要な役割を果たしている。同様の機序がヒトの SLE 感受性に寄与していることが最近報告されている。*FcgRIIB* を介した B 細胞のシグナル伝達の分子機構は自己抗体産生に基づく難治性疾患治療のための創薬ターゲットとして重要である。

* 平成 17 年度研究報告書にて報告

F. 健康危険情報

なし

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii T, Iida Y, Yomogida M, Ikeda K, Haga T, Jikumaru Y, Ninami M, Nishimura N, Kodera Y, Inada Y, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Genetic control of the spontaneous activation of CD4⁺ Th cells in systemic lupus erythematosus-prone (NZB x NZW) F1 mice. *Genes Immun.* 7: 647-654 (2006)
2. Nakamura K, Sugawara Y, Sawabe K, Ohashi A, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin Q-S, Nishimura H and Hirose S. Late developmental stage specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J. Neurosci.* 26:530-534 (2006)
3. Lin Q-S, Xiu Y, Jiang Y, Tsurui H, Nakamura K, Kodera S, Ohtsuji M, Shiroiwa W, Tsukamoto K, Amano H, Kinoshita K, Sudo

K, Nishimura H, Izui S, Shirai T and Hirose S. Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. *J. Immunol.* 177: 1646-1654 (2006)

4. Hirose S, Jiang Y, Nishimura H and Shirai T. Significance of MHC class II haplotypes and IgG Fc receptors in SLE. *Springer Semin. Immunopathol.* 28: 163-174 (2006)

2. 学会発表

1. Fujii T, Jikumaru Y, Haga T, Ikeda K, Nishimura N, Toei J, Mitsui K, Kodera Y, Inada Y, Xiu Y, Nakamura K, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Genetic predisposition to systemic autoimmune disease: Studies using mouse models. *Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2006*, Toin University of Yokohama, Japan (2006)
2. Nishimura H, Toei J, Mitsui K, Kodera Y, Hagiwara H and Inada Y, Center for inherited disease research. *Toin University of Yokohama. Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2006*, Toin University of Yokohama, Japan (2006)
3. Haga T, Fujii T, Jikumaru Y, Ikeda K, Isoyama N, Toei J, Mitsui K, Kodera Y, Inada Y, Xiu Y, Nakamura K, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Role of inhibitory Fc γ RIIB in defective immune tolerance in New Zealand Black mice. *Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2006*, Toin University of Yokohama, Japan (2006)
4. 芳賀俊明、藤井琢磨、軸丸由梨、稲田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之、「NZB 系マウスの自己免疫寛容破綻にお

- ける抑制性 Fc 受容体 FcγRIIB の役割」、
第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
5. 藤井琢磨、飯田行恭、蓬田雅人、池田賢一、芳賀俊明、軸丸由梨、西村尚樹、稲田祐二、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之、「自己免疫疾患モデルマウスにおける自発的 T 細胞の活性化を規定している遺伝子」、第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
6. Lin Q, Tsurui H, Nakamura K, Ohtsuji M, Tsukamoto K, Shiroya W, Nishimura H, Shirai T and Hirose S, Genetic dissection of the effects of stimulatory and inhibitory IgG Fc receptors on murine lupus. 第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
7. Ohtsuji M, Shiroya W, Tsukamoto K, Lin Q, Tsurui H, Nakamura K, Kadowaki N, Nishimura H, Shirai T and Hirose S. Possible contribution of neutrophil activation to lupus nephritis”, 第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)
8. Hirose S, Ohtsuji M, Shiroya W, Tsukamoto K, Lin Q, Tsurui H, Nakamura K, Nishimura H and Shirai T. IL-4R α polymorphism and its association with lupus nephritis. 第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪(2006)

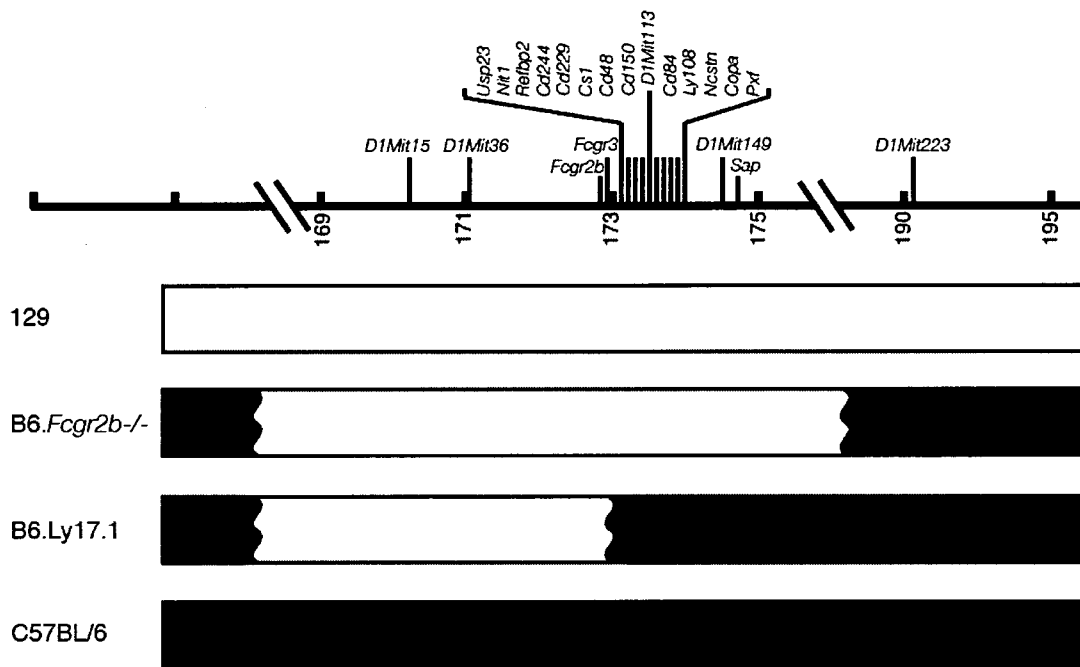


図1 マウス第一染色体テロメア近傍の物理地図。Fc受容体遺伝子族と *SLAM/CD2* 遺伝子複合体を含む領域を示す。地図の下の横棒は、129、C57BL/6. *Fcgr2b*^{-/-}、C57BL/6. *Ly17.1* および C57BL/6 系マウスにおけるこの染色体領域のハプロタイプを示す。129 系統由来は白、C57BL/6 系由来は黒で示す。

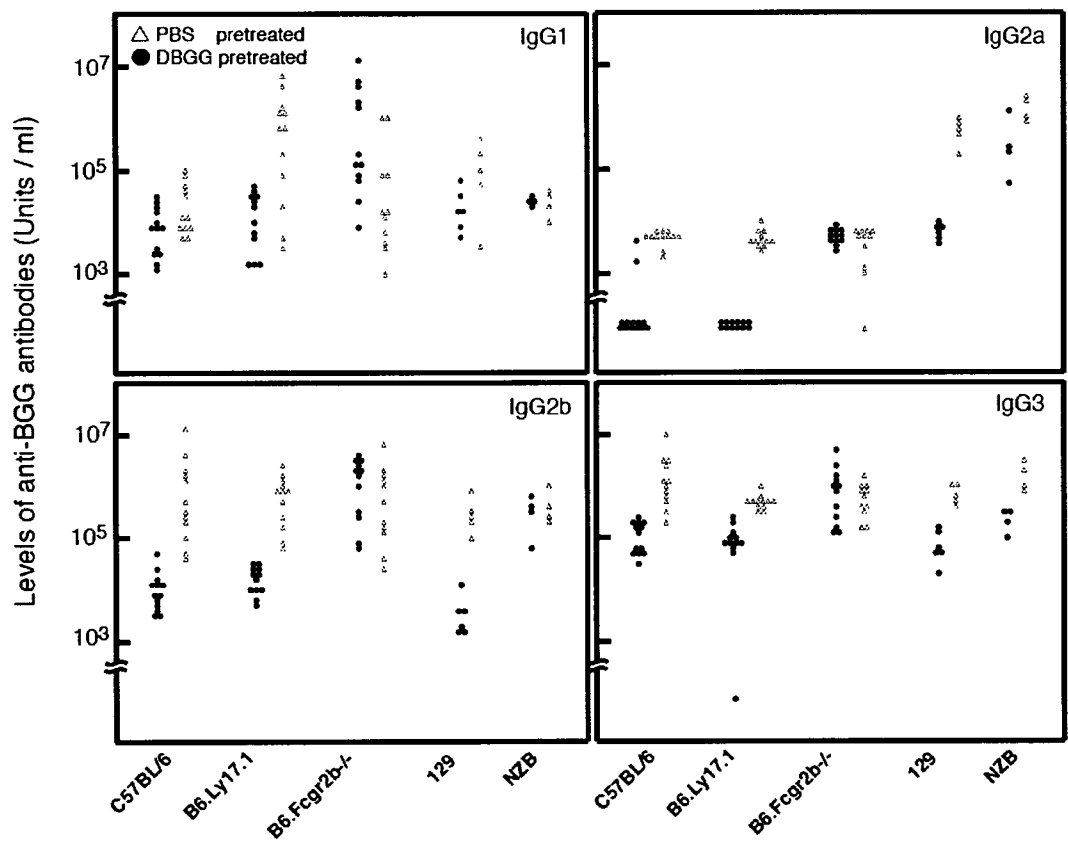


図2 C57BL/6, C57BL/6. *Ly17.1*, C57BL/6. *Fcgr2b*^{-/-}, 129 及び NZB 系マウスにおける免疫寛容誘導。Ig サブクラスごとに免疫応答の程度を示す。3 か月齢マウスを第 0 週および第 1 週において、10mg の超遠心精製ウシ免疫グロブリン(DBGG)を腹腔投与し、第 2 週にフロイントアジュバントとともに 250 μg の免疫原性を有するウシ免疫グロブリン(BGG)を後肢掌に投与し、第 3 週に眼窩静脈叢より採血し、血清を採取した。ペルオキシダーゼ標識マウス IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} 及び IgG₃ 特異的モノクローナルを用いた ELISA によって BGG 特異的な抗体応答を Ig サブクラスごとに定量した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
難病特別研究班分担研究報告書

自己抗体産生の多因子支配
B細胞とTh細胞の自己寛容破綻を規定する遺伝的背景

分担研究者 西村裕之
桐蔭横浜大学・医用工学部 人間科学工学センター

研究要旨

免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎の基盤は免疫系における自己寛容の破綻である。正常な免疫系では獲得免疫系を構成するT細胞とB細胞のそれぞれの発生・成熟過程に監視機構が多重に備えられて自己寛容が維持されるが、自己免疫疾患においては複数の遺伝子多型を背景としてこれらの機序が重複して破綻すると想像される。疾患モデルを用いて自己寛容破綻を基礎づける量的な表現型に着目して連鎖解析を行えば、多段階の自己寛容破綻の遺伝的基礎を明らかにできると期待される。本研究では全身性自己免疫疾患モデルである New Zealand 系マウスにおいて自己寛容破綻を規定する多数の遺伝子座を明らかにし、B細胞の寛容破綻には抑制性 Fc 受容体を規定する *Fcgr2b* 遺伝子多型、T細胞の寛容破綻にはMHC class II遺伝子多型と第12染色体セントロメア近傍の未知の遺伝子が重要な役割を担うことを明らかにした。

A. 研究目的

獲得免疫系を構成するT細胞とB細胞の発生・分化・成熟過程にはそれぞれ自己反応性クローンの出現を監視し、抑制する多重のチェックポイントがあつて、免疫系の自己寛容が維持されていると考えられる。糸球体腎炎発症を示す自己免疫疾患モデルマウスでは、本来は外来抗原特異的なB細胞クローンにおいて起こるべき、抗体遺伝子の class switch と affinity maturation、さらには抗体産生細胞への分化が、自己反応性B細胞クローンにおいて起きることが示されている。このような疾患モデルについては、糸球体腎炎など、自己免疫病態表

現に着目した遺伝連鎖解析が多く試みられているが、自己寛容破綻の遺伝的基盤については未だ不明の点が多い。

このような疾患モデルにおいて自己寛容破綻を基礎づける量的表現型に注目した遺伝連鎖解析を行えば、多段階の自己寛容破綻の分子機序を明らかにできると期待される。我々は多遺伝子が関与する全身性自己免疫疾患モデル、NZB 系マウスにおいて、自己寛容破綻に密接に関連すると考えられる、免疫寛容原（超遠心精製ウシ IgG, DBGG）に対する異常な応答性に着目して責任遺伝子の連鎖解析を行い、B細胞の自己寛容破綻に抑制性Fc受容体FcγRIIB分子を規定す

る *Fcgr2b* 遺伝子多型が重要な役割を担うことを明らかにした(平成 18 年度研究報告)。さらに FcγRIIB 欠損マウスは寛容原 DBGG の投与によって誘導されるべき免疫寛容誘導が見られなかった。しかし、FcγRIIB 欠損マウスでは加齢に伴って出現する糸球体腎炎などの自己免疫病態は軽微である。免疫複合体沈着を伴う重篤な糸球体腎炎の発症には Th 細胞の寛容破綻が必用と考えられる。今年度は New Zealand 系マウスの Th 細胞の寛容破綻を規定する遺伝的背景を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

加齢に伴い重篤な糸球体腎炎発症を示し、SLE モデルとして知られる (NZB x NZW)F1 マウスにおける Th 細胞の免疫寛容破綻に着目し、(NZB x NZW)F1 x NZW 退交配マウスにおいて、Th 細胞の自発的活性化と Th 細胞サブセット構成異常を規定する遺伝子座を検索した。動物実験については、桐蔭横浜大学動物実験委員会の倫理審査を経て承認を得た。

C. 結果

B 細胞の寛容破綻に関する遺伝的素因をもち、自己免疫性溶血性貧血を自然発症する NZB 系マウス、SLE モデルとして知られる (NZB x NZW)F1 マウス、表現型においては正常である NZW 系マウスについて、加齢に伴う CD4 陽性細胞の自発的活性化の程度 (CD69 陽性 CD4 陽性細胞の頻度)、および CD62L (L-セレクチン) と NTA260 抗原の表現によって分画される CD4 陽性 T 細胞サブセット構成の加齢変化を調べた。2 か月齢においては、3 系統のマウスの末梢 CD4 陽性

細胞において、CD69 を表現した細胞の頻度は 11~14% であり、系統間での差異は見られなかった。しかし、8 か月齢においては、(NZB x NZW)F1 系と NZB 系において CD69 陽性 CD4 陽性 T 細胞の頻度が上昇し、特に (NZB x NZW)F1 系マウスにおいて顕著であった。このような CD4 陽性 T 細胞の自発的活性化は、リンパ球の homing receptor である CD62L を表現したナイーブ CD4 陽性 T 細胞サブセットの減少と、メモリー CD4 陽性 T 細胞のマーカーである NTA260 抗原を表現したサブセットの CD4 陽性 T 細胞のサブセット構成異常を伴っていることが示された (図 1)。

以上の結果に基づき、(NZB x NZW)F1 x NZW 退交配マウス (female, N = 355) において、加齢に伴う CD4 陽性 T 細胞の自発的活性化とサブセット構成異常とゲノムのマイクロサテライト DNA マーカーの多型を調べ、CD4 陽性 T 細胞の自己寛容破綻を規定する遺伝子座のゲノムマッピングを行った。

表 1 は CD4 陽性 T 細胞の異常と連鎖するマイクロサテライトマーカーについてまとめた結果を示す。加齢に伴う CD4 陽性 T 細胞の自発的活性化は第 12 染色体セントロメア近傍のマーカー *D12Mit85* と第 17 染色体 MHC class II 領域のマーカー *D17Mit22* と連鎖し、ともにゲノムワイドの連鎖研究において” highly significant linkage” と認められる水準を超える Lod score を示したため、両者のマーカーに連鎖した QTL (quantitative trait loci) を *Sta-1*, *Sta-2* (Spontaneous T-cell activation) と命名した。これらの他に、4 つのマイクロサテライトマーカー (*D2Mit55*, *D6Mit25*, *D8Mit156*, *D15Mit15*) が相関することが示

された。これらの4つのマーカーの連鎖についての Lod score は” significant linkage” として認められる水準に達しなかったが、これらのマーカーに連鎖した QTL が CD4 陽性 T 細胞の自発的活性化に寄与していることは、相関ルール解析によって示された (表 2)。(NZB x NZW)F1 マウスにおいては、CD4 陽性 T 細胞の自発的活性化に伴って観察された CD63L 陽性ナイーブ CD4 陽性 T 細胞と NTA260 陽性メモリー CD4 陽性 T 細胞の減少も、基本的に同じ多因子支配を受けていることが示された。

D. 考察

(NZB x NZW)F1 マウスの SLE 発症機序において Th 細胞が重要な役割をになっていることについては、広く見解が一致している。若齢 (NZB x NZW)F1 マウスにおける抗 DNA 抗体産生は、老齢 (NZB x NZW)F1 マウス由来の Th 細胞の移入によって増強される¹⁾。

(NZB x NZW)F1 マウスにおける IgG クラス抗 DNA 抗体の重鎖可変部遺伝子の塩基配列は親和性成熟を受けた形跡を示しており Th 細胞の関与が推定される²⁾。このマウスにおける IgG クラス抗二重鎖 DNA 抗体の産生や、免疫複合体沈着を伴う糸球体腎炎 (lupus nephritis) の発症など、SLE に特徴的な病態の表現はこのマウスの MHC のヘテロ接合性が必需であり、Mixed-haplotype MHC class II 分子の表現が自己反応性の CD4 陽性 T 細胞の出現に必需であることが示されている^{3,4)}。また、このマウスの自己免疫病態の表現は MHC class II E 分子の発現レベルに大きな影響を受ける⁵⁾。このような事実は、いずれも (NZB x NZW)F1 マウスの SLE 病態形成に Th 細胞が関与すること

を示している。すなわち、Th 細胞の自己寛容破綻に基づく自己反応性 Th 細胞の自発的活性化が SLE 病態形成に重要な役割を担っていると考えられる。

ヒト SLE 患者を対象とした稠密な連鎖解析の結果、SLE への疾患感受性を担う MHC-class II 遺伝子のハプロタイプが報告され⁶⁾、SLE 発症機序に Th 細胞が関与することは明らかであるが、特定の MHC class II 遺伝子多型が SLE への疾患感受性を担うことと、CD4 陽性細胞の自発的活性化の現象は必ずしも軌を同じくする現象ではなく、その発症機序の因果関係における役割については不明であった。CD4 陽性 T 細胞の自発的活性化は関節リウマチ、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患発症に伴って観察される現象である^{7,8)}。SLE においては T 細胞における早期活性化マーカー CD69 の表現は SLE 病態の重篤度に関連する表現型と考えられている⁹⁾。(NZB x NZW)F1 マウスにおいては、加齢に伴って広い範囲の CD4 陽性 Th 細胞の集団が CD69 を表現するようになり、CD69 陽性と陰性の CD4 陽性 Th 細胞の集団間で、TCR V β 遺伝子レパートリーの用いられ方に偏りは見られない¹⁰⁾。加齢に伴うナイーブ CD4 陽性 Th 細胞サブセットの減少と、IL-2 産生能の低下も、ヒト SLE とマウス SLE モデルにおいて共通して見られる現象である¹¹⁾。

今回のゲノムマッピングで検出された二つの遺伝子座、*Sta-1*(Chr12) と *Sta-2*(Chr17) が Fc γ RIIB 欠損マウスの自己免疫病態を規定する二つの遺伝子座に連鎖していることはきわめて示唆に富むことである。Fc γ RIIB 遺伝子の欠損は C57BL/6 系の遺伝的背景では、加齢に伴う抗核抗体の

出現や糸球体腎炎の発症を促すが、BALB/c 系マウスではそのような自己免疫病態は出現しないと報告されている。Bollandら¹²⁾は、FcgrIIB 遺伝子の欠損において、自己免疫病態発現を規定する遺伝的背景のマッピングを行い、第 12 染色体セントロメア近傍に *Asbb2*、第 17 染色体 MHC(H-2)近傍に *Asbb3* 遺伝子座を同定した。近年 Fukuyamaら¹³⁾は抗 DNA 抗体を規定する抗体重鎖遺伝子の knockin マウスを用い、FcgrIIB 欠損 C57BL/6 マウスでは自己抗体のクラススイッチと親和性成熟が起こるが、FcgrIIB 欠損 BALB/c 系マウスでは親和性成熟が起こらないことを報告している。すなわち、自己抗体のクラススイッチと親和性成熟は *Asbb2* と *Asbb3* 遺伝子の相互作用で規定される。このことは本研究で得られた知見と相応する。NZB 系マウスにおいて規定される B 細胞の寛容破綻において、Fcgr2b 遺伝子の発現異常は中心的な役割を果たしていると考えられる。*Fcgr2b* の遺伝子多型単独では自己免疫病態は顕著に表れず、(NZB x NZW)F1 マウスにおける Th 細胞の寛容破綻との相互作用において重篤な自己免疫病態が出現する。(NZB x NZW)F1 マウスにおける Th 細胞の寛容破綻を規定する主な遺伝的背景は第 12 染色体セントロメア近傍の *Sta-1* と第 17 染色体 MHC(H-2) class II 領域と連鎖する *Sta-2* との相互作用である。*Sta-1/Asbb2* と *Sta-2/Asbb3* の同定は重篤な自己免疫疾患の発症機序を理解する上できわめて重要な課題となっている。

E. 結論

SLE などの重篤な全身性自己免疫疾患においては、B 細胞の自己寛容破綻と Th 細胞

の自己寛容破綻の双方が発症に必用であり、双方はそれぞれ別の遺伝的背景を基盤とすると考えられる。平成 18 年度までの研究により、SLE モデル(NZB x NZW)F1 マウスでは *Fcgr2b* 遺伝子の多型性が B 細胞の寛容破綻に重要な役割を演じていることを示した。今回我々はこのマウスの Th 細胞の寛容破綻が主に二つの遺伝子座 *Sta-1* と *Sta-2* の相互作用により規定されていることを明らかにした。*Sta-2* は MHC class II 遺伝子の多型性に基づくことがすでに明らかであるので、*Sta-1* の本体を明らかにすれば、全身性自己免疫発症の因果関係について包括的な洞察が得られると期待される。現在 *Sta-1* の候補遺伝子について検討を進めている。

1. Sekigawa I. *et al.*, *J Immunol* 1986; 136: 1247.
2. Hirose S. *et al.*, *Eur J Immunol* 1993; 23: 2813.
3. Hirose S. *et al.*, *Eur J Immunol* 1986; 16: 1631.
4. Tokushima M. *et al.*, *Immunology* 1994; 83: 221.
5. Zhang D. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13838.
6. Graham R R. *et al.*, *Am J Hum Genet* 2002; 71: 543.
7. Quayle A. *et al.*, *Springer Semin Immunopathol* 1989; 11: 273.
8. Fox R I. *et al.*, *Semin Arthritis Rheum* 1984; 14: 77.
9. Viallard F J. *et al.*, *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 485.
10. Ishikawa S. *et al.*, *J Immunol* 1998;

161: 1267.

11. Murakawa Y. *et al.*, *J Immunol* 1985; 134: 187.
12. Bolland S. *et al.*, *J Exp Med* 2002; 195: 1167-1174.
13. Fukuyama H. *et al.*, *Nat Immunol* 2005; 6: 99.

F. 健康危険情報

なし

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii T, Iida Y, Yomogida M, Ikeda K, Haga T, Jikumaru Y, Ninami M, Nishimura N, Kodera Y, Inada Y, Shirai T, Hirose S and Nishimura H. Genetic control of the spontaneous activation of CD4⁺ Th cells in systemic lupus erythematosus-prone (NZB x NZW) F1 mice. *Genes Immun.* 7: 647-654 (2006)
2. Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin QS, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M, Hirose S. CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 5128-5134
3. Shiroiwa W, Tsukamoto K, Ohtsuji M, Lin Q, Ida A, Kodera S, Ohtsuji N, Nakamura K, Tsurui H, Kinoshita K,

Nishimura H, Shirai T, Hirose S. IL-4Ralpha polymorphism in regulation of IL-4 synthesis by T cells: implication in susceptibility to a subset of murine lupus. *Int Immunol.* 2007; 19:175-185.

4. Nakamura K, Koyama Y, Takahashi K, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin QS, Sugawara Y, Sawabe K, Ohashi A, Ohnuma T, Arai H, Nishimura H, Hasegawa H, Hirose S. Requirement of tryptophan hydroxylase during development for maturation of sensorimotor gating. *J Mol Biol.* 2006; 363: 345-54.

2. 学会発表

1. Mitsui K, Toei J and Nishimura H. Development of Molecular Phenotypic Linkage Study. *Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2007*, Toin University of Yokohama, Japan (2007)
2. Onodera T, Fujii T, Yoshizawa Y, Ikeda K, Jikumaru Y, Kodera Y, Inada Y, Shirai T, Hirose S, Iida Y, Nishimura H. Genetic control of the spontaneous activation of CD4⁺ Th cells in systemic lupus erythematosus-prone (NZB x NZW)F1 mice. *Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2007*, Toin University of Yokohama, Japan (2007)
3. 軸丸由梨、藤井琢磨、池田賢一、大木麻

起子、吉澤侑也、小寺洋、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之 末梢性の免疫寛容誘導における抑制性 Fc 受容体 FcγRIIB の役割 第 37 回日本免疫学会学術集会、大阪 (2007)

4. 林青順、大辻希樹、天野浩文、天野恵理、鶴井博理、西村裕之、白井俊一、広瀬幸子 FcγRIIB 発現による自己免疫疾患の修復 第 37 回日本免疫学会学術集会、大阪 (2007)

5. 広瀬幸子、塚本和行、大辻希樹、林青順、鶴井博理、西村裕之、白井俊一 NKT 細胞機能と SLE の相関 第 37 回日本免疫学会学術集会、大阪 (2007)

6. 大辻希樹、林青順、鶴井博理、門脇奈緒美、西村裕之、白井俊一、広瀬幸子 好中球が SLE 発症に及ぼす影響 第 37 回日本免疫学会学術集会、大阪 (2007)

7. 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、仲野総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林青順、西村裕之、広瀬幸子、高崎芳成 BXS_B マウスの末梢血単球増加における IgG Fc レセプターの役割第 37 回日本免疫学会学術集会、大阪 (2007)

表1 (NZB × NZW)F1 × NZW 退交配マウスにおける CD4 陽性 Th 細胞異常の遺伝支配

Markers	Position (cM)	CD69 ⁺ T cells		CD62L ⁺ T cells		NTA260 ⁺ T cells	
		Lod	<i>p</i>	Lod	<i>p</i>	Lod	<i>p</i>
<i>D2Mit8</i>	31.7	1.0	0.003	1.8	0.003	1.5	0.008
<u><i>D2Mit254</i></u>	53.6	0.8	0.005	1.9	0.003	0.7	0.058
<u><i>D2Mit55</i></u>	74.3	0.8	0.047	2.1	0.002	0.3	0.188
<i>D4Mit16</i>	56.8	0.0	0.559	0.0	0.046	0.8	0.046
<i>D5Mit90</i>	36.1	0.0	0.755	0.0	0.004	1.8	0.004
<u><i>D6Mit25</i></u>	65.0	0.8	0.048	1.6	0.006	0.0	0.893
<u><i>D8Mit156</i></u>	75.4	1.3	0.013	2.4	0.001	0.0	0.505
<i>D9Mit11</i>	42.6	1.8	0.004	1.8	0.004	1.3	0.014
<u><i>D12Mit85</i></u>	9.8	3.9	<0.001	3.8	<0.001	2.6	<0.001
<u><i>D15Mit15</i></u>	63.4	1.7	0.004	1.7	0.004	1.5	0.007
<u><i>D17Mit22</i></u>	9.8	3.9	<0.001	4.3	<0.001	7.0	<0.001
<u><i>D17Mit92</i></u>	38.3	1.7	0.004	1.5	0.007	5.7	<0.001

(NZB × NZW)F1 × NZW 退交配マウス(雌, n = 355)の各ゲノム DNA について、合計 110 箇所のマイクロサテライト DNA 多型を調べ、脾臓 CD69 陽性 CD4 陽性 Th 細胞の頻度の異常な上昇、CD62L 陽性 CD4 陽性 Th 細胞頻度の低下、NTA260 陽性 CD4 陽性 Th 細胞頻度の低下を規定する quantitative trait loci (QTL)を MapManager プログラムを用いて検索した。太字で示したマーカーは highly significant linkage の水準を超える連鎖を示したマーカー、下線部を施したマーカーは、相関ルール解析によっても関与が示されたマーカーである。

表2 (NZB × NZW)F1 × NZW 退交配マウスの CD4 陽性 Th 細胞異常を規定する遺伝子座に関する相関ルール解析結果

Microsatellite Markers	confi- dence	sup- port	odds ratio	signifi- cance
CD69 ⁺ cells				
<i>D2Mit55 D6Mit25 D8Mit156 D12Mit85 D17Mit22</i>	0.83	0.028	9.78	0.0013
<i>D2Mit55 D6Mit25 D8Mit156 D12Mit85 D17Mit92</i>	0.86	0.034	11.95	0.0002
<i>D2Mit55 D8Mit156 D12Mit85 D15Mit15 D17Mit92</i>	0.85	0.031	10.86	0.0005
CD62L ⁺ cells				
<i>D2Mit254 D6Mit25 D8Mit156 D12Mit85 D17Mit22</i>	0.71	0.028	4.98	0.0084
<i>D2Mit254 D6Mit25 D8Mit156 D12Mit85 D17Mit10</i>	0.71	0.028	4.98	0.0084
<i>D2Mit254 D6Mit25 D8Mit156 D12Mit2 D17Mit22</i>	0.71	0.028	4.98	0.0084
NTA260 ⁺ cells				
<i>D2Mit254 D4Mit9 D12Mit85 D17Mit22</i>	1.00	0.051	>10 ⁴	0.0003
<i>D2Mit254 D4Mit9 D12Mit37 D17Mit22</i>	1.00	0.051	>10 ⁴	0.0003
<i>D2Mit254 D4Mit9 D12Mit85 D17Mit10</i>	0.94	0.051	15.55	0.0013

(NZB × NZW)F1 × NZW 退交配マウス(n = 355)の8か月齢において、それぞれの表現型を示す脾臓 CD4 陽性 Th 細胞の頻度の異常と相関するマイクロサテライトマーカを相関ルール解析によって調べた。118 箇所のマイクロサテライトマーカについて、NZB 型のアレルを持つか否かと、表現型について異常であるか否かについての、2 × 2 contingency table において、相関ルールの有意性を、odds ratio によって評価した。