

間質性肺炎および炎症性腸疾患責任遺伝子の同定

●石井 直人

東北大学大学院医学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

間質性肺炎および炎症性腸疾患はともに原因不明の重篤な疾患である。本研究者が作製したOX40L遺伝子導入(Tg)マウスはC57BL/6系統依存的に間質性肺炎と炎症性腸疾患を加齢とともに自然発症する。調べた範囲で、DBA/2、BALB/c、NODなどの他のマウス系統では両疾患とも全く発症しない。すなわちOX40-Tgマウスは、ヒト疾患と同様に特定の遺伝背景依存的な疾患発症を示す、疾患モデル動物として極めて有用なマウスである。OX40L遺伝子導入により疾患を発症する感受性系統と疾患を発症しない抵抗性系統を交配することによって、間質性肺炎およびIBDの感受性遺伝子を同定することが可能になる。本研究では、通常の遺伝子連鎖解析法に則ってマウスにおける上記2疾患の感受性/抵抗性遺伝子を同定する。疾患関連遺伝子がマウスで同定された場合には、ヒトの同疾患の原因解明や治療法開発研究に対する貢献度は計り知れない

〈研究開始時の研究計画〉

疾患感受性であるC57B/6 (B6) 遺伝子背景OX40L-Tgマウスを疾患抵抗性マウス系統であるBALB/cマウスと交配し、B6 x BALB/c F1雄OX40L-Tgマウスを作製する。交雑F1のOX40L-Tgマウスは疾患を発症しないことはあらかじめ確認済みである。従って、B6系統にBALB/c系統に対して劣性の疾患感受性遺伝子が存在すると考えられる。そこでさらに交雑F1雄OX40L-Tgマウスと感受性系統B6野生型雌マウスを交配し、B6-N2マウスを作成する。N2マウスのうちで遺伝子型がOX40L-Tgマウスのみを抽出し、B6系統OX40L-Tgマウスが100%疾患を発症する20週齢に達した時点で、疾患発症の有無を検索する。経験的に300匹のマウスを解析することにより、3ヶ所の疾患関連遺伝子座が同定できる。疾患の重症度(あるいは有無)を指標として、B6とBALB/c背景遺伝子座を区別できるマイクロサテライトマーカー(91種)を用いて、各個体の各染色体座における遺伝子型を決定する。得られた情報を常法通り統計解析を行い、疾患感受性遺伝子座を特定する。

遺伝子座が特定できた場合には、同部位に存在する遺伝子の中から、いくつかの候補遺伝子を抽出し、C57BL/6とBALB/c系統での遺伝子多型および遺伝子発現量の比較解析を行う。さらに、有望な遺伝子多型が見出された場合には、BALB/c型の多型を持つ候補遺伝子導入マウスをC57BL/6背景に作製し、OX40L-Tgマウス(C57BL/6背景)と交配し、間質性肺炎および炎症性腸疾患発症が抑制されるかどうかを検討する。

また、妥当な候補遺伝子が同定された場合には、ヒト間質性肺炎あるいは炎症性腸疾患患者で、同遺伝子の変異およびSNP解析を行い、候補遺伝子のヒト疾患発症における関連性も解析を行う。

〈研究期間の成果〉

疾患感受性であるC57B/6 (B6) 遺伝子背景OX40L-Tg

雄マウスを疾患抵抗性マウス系統であるBALB/c雌マウスと交配し、交雑F1雄OX40L-Tgマウスを40匹作製した。F1のOX40L-Tgマウスは疾患を発症しなかった。さらに交雑F1雄OX40L-Tgマウスと感受性系統B6野生型雌マウスを交配し、B6-N2マウスを約900匹作成した。N2マウスのうちで遺伝子型がOX40L-Tgマウスのみ(339匹)を抽出し、B6系統OX40L-Tgマウスが100%疾患を発症する20週齢に達した時点で、疾患発症の有無と発症した場合の重症度を策定した。その結果、B6-N2-OX40L-Tgマウスの3分の2に間質性肺炎と炎症性腸疾患の発症を認めた。それらの発症に性差を認めなかったことから、以下常染色体に限定して遺伝子座解析を行った。各個体について、その遺伝子型をC57BL/6とBALB/cで区別できる常染色体上のマイクロサテライトマーカー(91種)を用いて、各染色体部位の遺伝子型を決定した。そこで疾患重症度を指標とした遺伝子連鎖解析を行い、間質性肺炎発症関連遺伝子座1ヶ所とIBD発症関連遺伝子座を3ヶ所同定した。炎症性腸疾患発症関連遺伝子座の1ヶ所についてはその部位に位置するある遺伝子の遺伝子型と疾患発症の有無との相関が、 χ^2 検定で $p = 4.6 \times 10^{-8}$ であった。さらに疾患重症度と同部位遺伝子型との相関はQTL解析においてLodスコア7.4と極めて有意であった。加えて、同部位が、ヒト炎症性腸疾患感受性遺伝子座として報告されている部位のひとつとsyntenicでことが判明した。そこで、疾患感受性系統と抵抗性系統の2系統マウス間で同部位に存在する遺伝子群の塩基配列の相違と遺伝子発現量を比較した。その結果、疾患感受性系統であるC57BL/6系統におけるmRNA発現が、BALB/cを含む5つの疾患抵抗性系統の発現に比べて20分の1に減弱している遺伝子(IBDX:仮名)を見出した。さらに各組織におけるIBDX遺伝子発現量をreal-time PCR法で測定したところ、IBDX遺伝子は特に脾臓で発現量が高いことが明らかになった。脾臓細胞の免疫細胞分画を精製し、IBDX遺伝子発現量を測定したところ、T細胞やB細胞などのリンパ球にその発現を認めた。従って、C57BL/6系統におけるIBDX遺伝子の発現低下が、おそらくリンパ球関連免疫反応を攪乱することにより、炎症性腸疾患発症に促進的に機能するものと推察される(投稿準備中)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

いくつかの疾患がマウス系統依存的に発症することが知られており、その系統依存性を利用して本研究と同様の手法により、疾患感受性遺伝子の同定が試みられている。しかしながら、多くの例では、遺伝子座の同定はなされても、単一の感受性遺伝子を特定するには至っていない。その理由として、同定した疾患感受性遺伝子座に数百以上の遺伝子が存在し、その中から、疾患感受性に直接関与する遺伝子の一つだけ特定することが極めて困難であるということが考えられる。その意味で、本研究では極めて有望な炎症性腸疾患感受性遺伝子IBDXが特定され、その成果は国内外の類似研究に比し、極めて大きいと考えられる。

他方、nod2などいくつかのクローン病感受性遺伝子が報告されたが、日本人炎症性腸疾患患者におけるそれら遺伝子多型の報告はなく、日本人炎症性腸疾患感受性遺伝子については不明である。今回同定されたIBDX遺伝子(仮名)はヒトにおいてもその遺伝子座が炎症性腸疾患感受性に関与すると報告されている部位に位置することから、ヒト炎症性腸疾患感受性遺伝子の同定に貢献できる可能性がある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

炎症性腸疾患発症に関与する有力な候補遺伝子IBDXを見出した。しかし、IBDX機能が如何にして炎症性腸疾患発症を促進するかは現時点で不明である。IBDX発現不全がOX40L-Tgマウス(B6系統)の炎症性腸疾患発症に促進的に関与することが想定される。従って、B6系統にIBDX遺伝子を導入し、その発現量を回復させることにより、OX40L-Tgマウスの炎症性腸疾患発症を抑制できる可能性が考えられる。既に、IBDX遺伝子導入マウスを作製中に研究期間が終了したために、残念ながらその成果を報告することができなかった。

前述のようにIBDX遺伝子はヒトゲノムにおいても、ヒト炎症性腸疾患の感受性遺伝子座のひとつに位置する。従って、ヒトクローン病、潰瘍性大腸炎患者におけるIBDX遺伝子変異の同定やSNP解析は是非行うべきであった。しかしながら、IBDX遺伝子の同定が研究期間の末期であったため、そこまで着手することがかなわなかった。

間質性肺炎発症に関与する遺伝子は本研究期間内には同定できなかった。候補遺伝子座が包含する遺伝子数が莫大であるため、そこから候補遺伝子を絞り込むのが困難であったためである。

〈今後の課題〉

本研究により、マウス炎症性腸疾患感受性に関与する有力な候補遺伝子IBDX(仮名)を同定した。現時点でIBDX発現不全がどのように炎症性腸疾患感受性に関与するかは不明である。そこで、IBDX遺伝子発現不全系統であるC57BL/6マウスにIBDX遺伝子を導入し、その発現を増強することにより、IBDX遺伝子発現不全が直接的に炎症性腸疾患発症に関与するかどうかを明らかにする予定である。

マウスで得られた情報により、ヒト炎症性腸疾患においてもIBDXが感受性遺伝子として機能する可能性がある。また、IBDXは類似構造を持ついくつかのファミリー分子を同一遺伝子座に有することから、ヒト炎症性腸疾患患者においてIBDXとファミリー遺伝子に塩基異常やSNPの偏りが存在しないかどうかを検討する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Murata, K., Ishii, N., Takano, H., Miura, S., Ndhlovu, L.C., Nose, M., Noda, T. and Sugamura, K. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J. Exp. Med.* 191:365-374, 2000
2. Onodera, J., Nagata, T., Fujihara, K., Ohuchi, M., Ishii, N., Sugamura K. and Itoyama, K. Expression of OX40 and OX40 ligand (gp34) in the normal and myasthenic thymus. *Acta Neurol Scand.* 102:236-243, 2000
3. Kumaki S, Ishii N, Minegishi M, Ohashi Y, Hakozaki I, Nonoyama S, Imai K, Morio T, Tsuge I, Sakiyama Y, Miyanoshita A, Miura Ji, Mayumi M, Heike T, Katamura K, Takada H, Izumi I, Kamizono J, Hibi S,

- Sasaki H, Kimura M, Kikuta A, Date Y, Sako M, Tanaka H, Sano K and Sugamura K. Characterization of the γ chain among 27 unrelated Japanese patients with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) *Hum. Genet.* 107:406-408, 2000
4. Takasawa, N., Ishii, N., Higashimura, N., Murata, K., Tanaka, Y., Nakamura, M., Sasaki, T., and Sugamura, K.: Expression of gp34 (OX40 Ligand) and OX40 on Human T Cell Clones. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:377-382, 2001
5. Yamada, M., Takeshita, T., Miura, S., Murata, K., Kimura, Y., Ishii, N., Nose, M., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Sasaki, H., and Sugamura, K.: Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3807-3819, 2001. Kikuchi, K., Kawasaki, Y., Ishii, N., Sasaki, Y., Asao, H., Takeshita, T., Miyoshi, I., Kasai, N., and Sugamura, K., : Suppression of thymic development by the dominant-negative form of Gads. *Int. Immunol.* 13: 777-783, 2001.
6. Nagata, T., Onodera, H., Ohuchi, M., Suzuki, Y., Tago, H., Fujihara, K., Ishii, N., Sugamura, K., Shoji, Y., Handa, M., Tabayashi, K., and Itoyama, Y.: Decreased expression of c-myc family genes in thymuses from myasthenia gravis patients. *J. Neuroimmunology*, 115; 199-202, 2001
7. Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D., and Sugamura, K.: The common γ -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J. Immunol.* 167: 1-5, 2001
8. Ndhlovu, L.C., Ishii, N., Murata, K., Sato, T., and Sugamura, K.: Critical involvement of OX40 ligand signals in the cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 167: 2991-2999, 2001
9. Ishii, N., Owada, Y., Yamada, M., Miura, S., Murata, K., Asao, H., Kondo, H., and Sugamura, K.: Loss of neurons in the hippocampus and cerebral cortex of AMSh-deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* 21: 8626-8637, 2001.
10. Chisaka, H., Morita, E., Murata, K., Ishii, N., Yaegashi, N., Okamura, K., and Sugamura, K. A transgenic mouse model for non-immune hydrops fetalis induced by the NS1 gene of human parvovirus B19. *J Gen Virol.* 83:273-281, 2002.
11. Tateyama, M., Fujihara, K., Ishii, N., Sugamura, K., Onodera, Y., and Itoyama, Y. Expression of OX40 in muscles of polymyositis and granulomatous myopathy. *J. Neurol. Sci.* 194: 29-34, 2002.
12. Ariga, T., Yamaguchi, K., Yoshida, J., Miyanoshita, A., Watanabe, T., Date, T., Miura, J-I., Kumaki, S., Ishii, N., and Sakiyama, Y.:The role of common γ chain in human monocytes in vivo; evaluation from the studies of X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) carriers and X-SCID patients who underwent cord blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 118:858-863, 2002
13. Yoshida, M., Hosoi, Y., Miyachi, H., Ishii, N., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Nakagawa, K., Yamada,

- S., Suzuki, N., Ono, T.: Roles of DNA-dependent protein kinase and ATM in cell-cycle-dependent radiation sensitivity in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 78:503-512, 2002.
14. Murata, K., Nose, M., Ndhlovu, L.C., Sato, T., Sugamura, K., and Ishii, N.: Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J. Immunol.* 169: 4628-4636, 2002
 15. Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L.C., and Sugamura K.: Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in Langerhans cell function: Enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 32: 3326-3335, 2002.
 16. Yamada, M., Ishii, N., Asao, H., Murata, K., Kanazawa, C., Sasaki, H., and Sugamura, K.: Signal transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8648-8658, 2002.
 17. Hoshino, A., Tanaka, Y., Akiba, H., Asakura, Y., Mita, Y., Sakurai, T., Takaoka, A., Nakaïke, S., Ishii, N., Sugamura, K., Yagita, H., and Okumura, K.: Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of Asthma. *Eur. J. Immunol.* 33: 861-869, 2003.
 18. Ishii, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Sato, T., Kamanaka, M., and Sugamura, K.: OX40 (CD134) and OX40 ligand interaction plays an adjuvant role during in vivo Th2 responses. *Eur. J. Immunol.*, 33: 2372-2381, 2003.
 19. Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K., and Ishii, N.: Distinct roles for the OX40-OX40L interaction in regulatory and non-regulatory T cells. *J. Immunol.*, 172: 3580-3589, 2004.
 20. Andarini, S., Kikuch, T., Nukiwa, M., Pradono, P., Suzuki, T., Ohkouchi, S., Inoue, A., Maemondo, M., Ishii, N., Saijo, Y., Sugamura, K., and Nukiwa, T.: Adenovirus Vector-Mediated in vivo gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances anti-tumor immunity of tumor-bearing hosts. *Cancer Res.*, 64: 3281-3287, 2004.
 21. Kato, H., Kojima, H., Ishii, N., Hase, H., Imai, Y., Fujibayashi, T., Sugamura, K., and Kobata, T.: Essential role of OX40L on B cells in persistent alloantibody production following repeated alloimmunizations. *J. Clin. Immunol.* . 24: 237-248, 2004.
 22. Sugamura, K., Ishii, N., and Weinberg, A.D.: Therapeutic targeting of the effector T cell costimulatory molecule OX40. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 420-431, 2004.
 23. Feng, J., Misu, T., Fujihara, K., Sakoda, S., Nakatsuji, Y., Fukaura, H., Kikuchi, S., Tashiro, K., Suzumura, A., Ishii, N., Sugamura, K., Nakashima, I., and Itoyama, Y.: Ibudilast, a nonselective phosphodiesterase inhibitor, regulates Th1/Th2 balance and NKT cell subset in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 10: 494-498, 2004.
 24. Horai, R., Nakajima, A., Habiro, K., Kotani, M., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Saijo, S., Kotaki, H., Sudo, K., Okahara, A., Tanioka, H., Ikuse, T., Ishii, N., Schwartzberg, P.L., Abe, R., and Iwakura, Y.: TNF α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114: 1603-1611, 2004.
 25. Ndhlovu, L.C., Takeda, I., Sugamura, K., and Ishii, N.: Expanding role of T-cell costimulators in regulatory T-cell function: recent advances in accessory molecules expressed on both regulatory and non-regulatory T cells. *Crit. Rev. Immunol.*, 24:251-266, 2004.
 26. Wang, X., Ria, M., Kelmenson, P.M., Eriksson, P., Higgins, D.C., Samnegård, A., Petros C, Rollins, J., Bennet, A.M., Wiman, B., de Faire, U., Wennberg, C., Olsson, P.G., Ishii, N., Sugamura, K., Hamsten, A., Forsman-Semb, K., Lagercrantz, J., and Paigen, B.: Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nat. Genet.*, 37:365-372, 2005.
 27. Kobayashi, H., Tanaka, N., Asao, H., Miura, S., Kyuuma, M., Semura, K., Ishii, N., and Sugamura K. Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein-sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins STAM1 and STAM2. *J. Biol. Chem.*, 280:10468-77, 2005.
 28. Hendriks, J., Xiao, Y. Rossen, J.W.A., van der Sluijs, K.F., Sugamura, K., Ishii, N, and Borst, J.: During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J. Immunol.* 175: 1665-1676, 2005.
 29. Komori, H., Furukawa, H., Mori, S., Ito, M., Terada, M., Zhang, M.C. Ishii, N., Sakuma, N., Nose, M., and Ono, M.: A Signal Adaptor SLAM-Associated Protein Regulates Spontaneous Autoimmunity and Fas-Dependent Lymphoproliferation in MRL-Faslpr Lupus Mice. *J. Immunol.*, 176: 395-400, 2006.
 30. Satoh, K., Kagaya, Y., Nakano, M., Ito, Y., Ohta, J., Tada, H., Karibe, A., Sakuma, M., Minegishi, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., Ono, M., Watanabe, J., Shirato, K., Ishii, N., Sugamura, K., and Shimokawa, H.: Important role of endogenous Erythropoietin system to recruit endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*, (in press)
 31. Chen, S., Ishii, N., Ine, S., Ikeda, S., Fujimura, T., Ndhlovu, L.C., Soroosh, P., Tada, K., Harigae, H., Kameoka, J., Kasai, N., Sasaki, T., and Sugamura, K.: Regulatory T cell-like activity of Foxp3+ adult T-cell leukemia cells. *Int. Immunol.* (in press)