

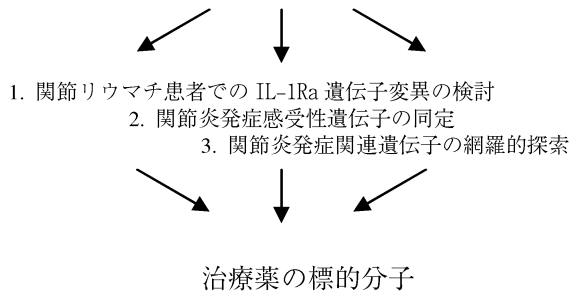
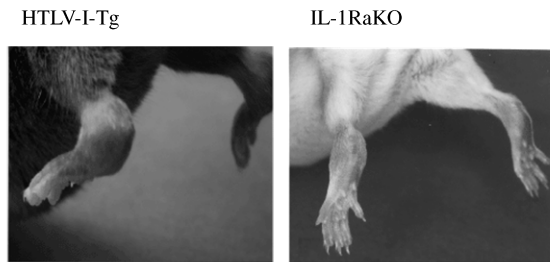
関節リウマチの遺伝要因の解明

●岩倉洋一郎

東京大学医科学研究所・ヒト疾患モデル研究センター

＜研究の目的と進め方＞

我々は、HTLV-I遺伝子導入トランスジェニック (HTLV-I-Tg) マウスが関節リウマチに似た自己免疫性の関節炎を引き起こすことを見いだした。さらにIL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) ノックアウト (KO) マウスも同様の自己免疫性慢性関節炎を発症することを見いだした。これらのモデルマウスは、どちらも関節炎の発症にマウスの遺伝的背景の影響を強く受け、BALB/c背景で発症率が高く、C57Bl/6J背景でほとんど発症しない。本研究では、これらの結果をふまえ、1) IL-1Raの変異がヒトでも関節リウマチの発症原因になっているか、2) HTLV-I-Tgマウス、およびIL-1RaKOマウスにおいて、関節炎感受性の差に関与している背景遺伝子は何か、3) これらのマウスで、自己免疫の発症や炎症の誘起に関与している遺伝子は何か、を明らかにすることを目的とした。



＜研究開始時の研究計画＞

1. 関節リウマチ患者におけるIL-1Ra遺伝子の解析

東京大学医科学研究所附属病院、および筑波大学医学部附属病院、これらの関連施設の協力のもと、関節リウマチ患者の血中のIL-1Raの量をELISA法により測定する。IL-1Ra量の少ない患者が見つかった場合、完全長のmRNAが正常に発現しているかどうかを調べるために、RT-PCRで確認すると同時に、シーケンス解析を行う。

2. 自己免疫感受性遺伝子の同定

HTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスは共にBALB/c背景で発症率が高く、C57Bl/6J背景ではほとんど発症しない。そこで、自己免疫発症の感受性を決定している背景遺伝子を探索する目的で、連鎖解析を行う。具体的には、まず、BALB/c背景のHTLV-I-Tgマウスと野生型のC57Bl/6Jマウスを交配し、F1世代での関節炎発症率を検討する。さらに、このF1マウスをBALB/cマウスと交配し、戻し交配の世代を作成し、各個体について関節炎発症時期と

重症度を観察する。また、この戻し交配世代は各個体について、マイクロサテライトマーカーを用いて、遺伝地図を作製し、関節炎発症時期、または重症度との連鎖解析を行う。

3. 関節炎発症関連遺伝子の網羅的解析

関節炎治療薬の新しい標的を見いだすことを最終目的に、HTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスとマイクロアレイを用いて、関節炎発症関連遺伝子の網羅的探索を行う。関節炎発症との関与が示唆された遺伝子に関しては、新たにKOマウスを作製することにより、その生理的・病理的役割を解析する。

＜研究期間の成果＞

1. 関節リウマチ患者におけるIL-1Ra遺伝子の解析

患者材料を用い、血中のIL-1Ra量をELISA法で測定したところ、リウマチ患者495名中、15検体に低い値が得られ特に一検体はIL-1Raの値が検出限界以下であった。健康人9名および全身性エリテマトーデス、シェグレン症候群患者142名中には低い値はみられなかった (Table 1)。そこで、その15名の患者よりPBMCを採取し、mRNAの発現量、およびサイズを確認した。しかし、mRNAの発現量に有意な差は認められなかった。また、IL-1Ra遺伝子の発現調節に関与することが知られている第2イントロン内の繰り返し配列の重複度を検討したところ、健康人と差を認めなかった。これらの結果から、このIL-1Raタンパク量の少なかった15名患者の異常は転写レベルではないことが示された。血中のIL-1Raタンパク質が検出限界以下であった患者でもmRNAの発現量や、サイズも正常であったこと、また、その様な患者は1名しかおらず、家族歴も認められなかったことから、これ以上の解析は中断した。

尚、以上の解析は東京大学医科学研究所倫理委員会の承認を得た上で、患者に対する説明と同意 (インフォームド・コンセント) に基づき行った。

Table 1

IL-1Ra levels (pg/ml)	RA	SLE & SS	Healthy donor
0-50	3 (0.6%)	0 (0%)	0 (0%)
50-169	63 (12.7%)	14 (9.9%)	2 (22.2%)
169-1293	348 (70.3%)	117 (82.4%)	7 (77.8%)
>1293	81 (16.4%)*	11 (7.7%)	0 (0%)
Total	495 (100%)	142 (100%)	9 (100%)
Average	731±562	576±597	285±167

* p<0.05 vs. SLE & SS

2. 自己免疫感受性遺伝子の同定

BALB/c背景のHTLV-I-Tgマウスと野生型のC57Bl/6Jマウスを交配し、68匹のF1世代のHTLV-I-Tgマウスを得た。このうち、関節炎を発症した個体は9匹であった。さらにこのF1世代を野生型のBALB/cマウスと交配し、戻し交配 (BC) 世代243匹を得た。その内、関節炎を発症したマウスは138匹、未発症のものは105匹であった。

これらのBC世代のマウス243匹を用いて、マイクロサテライトマーカーにより、遺伝子地図を作製し、関節炎発症との連鎖を解析した結果、3番染色体の約7.2Mbの領域と13番染色体の約39.5Mbの領域が関節炎発症と連鎖していることが示された。連鎖解析には発症率による χ^2 検定と受賞度を指標としたQTL解析の2通りの方法を用いたが、何れの場合もほぼ同等の結果であった。また、3番染色体の7.2Mbの領域には176の遺伝子が、13番染色体の39.5Mbの領域には377の遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子のなかから効率よく責任遺伝子を探索するために、マイクロアレイを用いた発現解析と組み合わせ、関節炎発症時に発現が変動する遺伝子にまず着目した。3番染色体の176遺伝子のうち、マイクロアレイに網羅されていた遺伝子は106遺伝子で、そのうち、関節炎発症時に発現が亢進する遺伝子が8遺伝子見いだされた。13番染色体の377遺伝子のうち、マイクロアレイに網羅されていたのは、106遺伝子で、関節炎発症率に発現が亢進する遺伝子は3遺伝子であった。

次に、この11遺伝子の炎症誘導時での発現量がBALB/cとC57Bl/6Jで異なるかどうかを調べる目的で以下の実験を行った。まず、野生型のBALB/cマウスとC57Bl/6JマウスにLPSを投与し、脾臓でのこれら11遺伝子の発現変動を確認したところ、3つの遺伝子がBALB/cでより強く誘導されることがわかった。これらの結果から、この3遺伝子が系統間による関節炎感受性の差に関与している可能性が示唆された。

次に、関節炎発症時に発現変動を伴わない遺伝子の中から、候補遺伝子を探索する目的で、疾患データベースGAD (Genetic Association Database) に登録されている遺伝子のなかから、免疫系疾患と関連があり、かつ前述の領域に対応するヒト染色体領域に存在する遺伝子を探索した。その結果、一つの遺伝子が候補遺伝子として示唆された。

以上の結果から、合計4の遺伝子について関節炎発症感受性の系統間による差に関与している可能性が示唆された。

3. 関節炎発症関連遺伝子の網羅的解析

3-1 関節炎発症におけるIL-1の役割

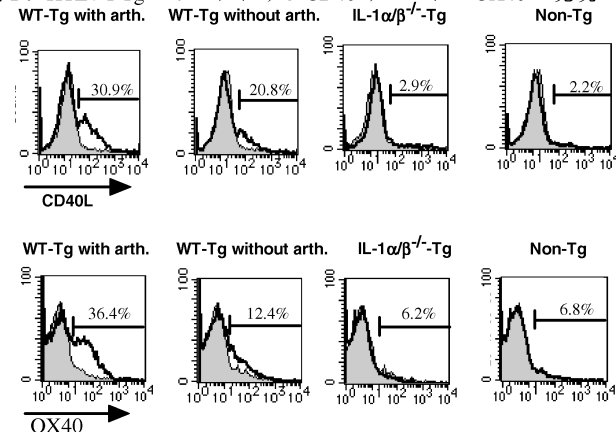
我々は、HTLV-I-Tgがヒトの関節リウマチに良く似た、自己免疫を伴う関節炎を自然発症することを見だし、このウイルスが関節リウマチの原因となる可能性を初めて示した。HTLV-I-Tgの関節局所ではIL-1, TNFといった炎症性サイトカインの発現が亢進していた。そこで、我々は、IL-1KOマウスを用いて、関節炎や自己免疫の発症におけるIL-1の役割を検討すると共に、IL-1の内在性アンタゴニストであるIL-1RaKOマウスを作製し、このマウスも自己免疫性の関節炎を自然発症することを見だし(文献1)、IL-1の重要性を示した。さらに、このIL-1RaKOマウスでは関節炎の発症にTNFが必須で、TNFを欠損したIL-1RaKOマウスでは関節炎の発症が完全に抑制されることを示した(文献12)。

一方、IL-1KOマウスを用いた結果では、(文献4)で、IL-1がCD40リガンドやOX40を介して、T細胞依存的抗原に対する抗体産生を亢進させること、(文献5)で、T細胞依存的抗原に対する抗体産生にはIL-1 α は関与せず、IL-1 β が重要であることを示した。

IL-1KOマウスを用いた関節炎発症における役割に関して(文献6)で、HTLV-I-TgとIL-1KOマウスを交配することにより、関節炎の発症が抑制されることを示した。この時、同時にコラーゲン誘導関節炎(collagen-induced arthritis; CIA)の発症率もIL-1KOマウスでは低下するこ

とを見いだした。これに先立ち、我々はIL-1がT細胞上のCD40リガンドやOX40を介してT細胞の反応性を高めていることを見いだした。そこで、関節炎の発症におけるIL-1の役割を明らかにする目的で、リンパ節細胞におけるこれらの副シグナル分子の発現を検討した。その結果、野生型マウスのリンパ節細胞は、IICに反応し、CD40LとOX40の発現が亢進していたが、IL-1 α / β ^{-/-} HTLV-I-Tgでは、これらの分子の発現亢進がみられず、IL-1はT細胞の活性化を介して、関節炎の発症に関与している可能性が示唆された(図1)。

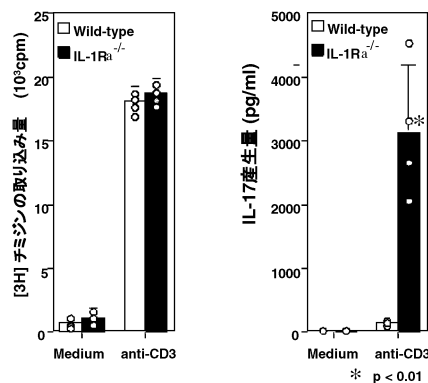
図1. HTLV-I-Tg マウスにおける CD40 リガンドと OX40 の発現



3-2 関節炎発症におけるIL-17の役割

IL-17は炎症性サイトカインとして知られるが、ほかの炎症性サイトカインとは異なり、活性化メモリーCD4⁺T細胞を主な産生細胞としている。ほかにCD8⁺T細胞や好中球から産生されているという報告もあり、病態によって産生細胞が変わる可能性がある。産生細胞が比較的限局されているのに対し、レセプターはほとんど全ての細胞に発現しており、そのため、IL-17は多様な細胞に作用すると考えられている。また、関節リウマチ患者の関節滑液中に高濃度に存在することから、関節炎発症との関与が疑われていたが詳細は不明であった。そこで、我々はIL-17のKOマウスを作製し、このサイトカインの炎症応答時における役割を検討した(文献7)。

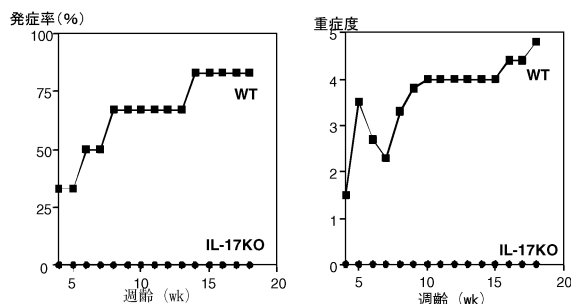
図2. IL-1RaKO マウスのT細胞からの過剰な IL-17 産



まず、(文献11)でIL-1RaKOマウスの関節炎発症にIL-17が関与しているかどうかを確認するために、マウスのCD4⁺T細胞を精製し、in vitroで、抗CD3抗体を用いて刺激を行った。その結果、IL-1RaKOマウスと野生型マウスでは、細胞増殖には差が認められなかったが、培養上清中のIL-17の濃度を測定したところ、IL-1RaKOマウスのCD4⁺T細胞は過剰にIL-17を産生していることを見いだされた(図2)。そこで、IL-1RaKOマウスとIL-17KOマウ

スを交配し、関節炎発症に及ぼす影響を検討した。その結果、IL-17の欠損により、IL-1RaKOマウスの関節炎は完全に抑制されることが明らかとなった（図3）。

図3. IL-17を欠損したIL-1RaKOマウスの関節炎発症率

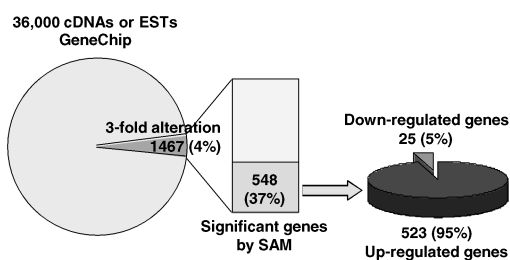


次に、(文献9)により、別の関節炎モデルであるCIAのモデルを用いて、IL-17の欠損が関節炎発症に及ぼす影響を検討した。その結果、CIAの系でもIL-17KOマウスでは関節炎の発症が有意に抑制されることが示された。これらの結果から、IL-17は関節炎治療薬の有効な標的となる可能性が示唆された。

3-3. 新規関節炎関連遺伝子探索の試み

これまでの結果から、IL-1やIL-17が関節炎治療薬の標的分子として有効である可能性を示した。さらに、HTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスの2種類の関節炎モデルマウスとマイクロアレイを用いることにより、新規関節炎発症関連遺伝子の探索を試みた。これらの2種類の関節炎モデルマウスの関節部位より、RNAを調整し、Affimetrix社のオリゴDNAチップを用いて関節炎発症時に発現が変動している遺伝子を探索した。

図4. 関節炎モデルマウスを用いたマイクロアレイ解析



その結果、関節炎発症時に両方のモデルマウスで共通に有意に変動している遺伝子を約500見出すことに成功した。発現変動していた遺伝子のうち、約95%は発現上昇していた遺伝子で、約5%が発現が低下していた遺伝子であった（図4）。さらに、この発現変動していた遺伝子を各染色体上にマップすることにより、関節炎発症時に発現変動する遺伝子クラスターの検出を試みた。その結果、一番強いピークは、17番染色体のMHC遺伝子クラスターが存在する部分に見いだされた。MHC遺伝子クラスターの関節リウマチ発症への関与は良く知られており、この方法が有効であることが示された。興味深いことに、これまで関節炎発症との関与が知られていなかった遺伝子クラスターのなかから有意に発現変動しているものが数カ所に見いだされた（文献13）。

本研究では、最終的に治療薬の標的となる分子を見出すことを目的としている。そこで、細胞膜表面に存在

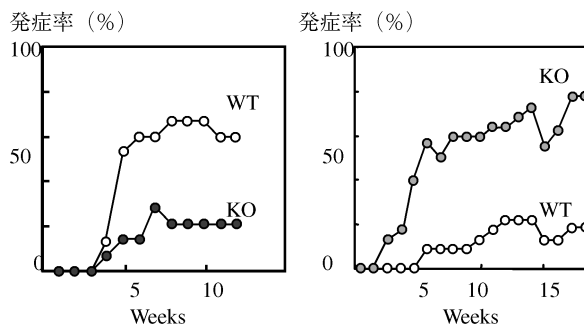
するもの、あるいは分泌されるタンパク質は抗体等、阻害薬の開発が容易であると考え、我々はバイオインフォマティクス的手法を用い、細胞膜表面に存在する、または分泌されることが予想される遺伝子を選択しKOマウスを作製した。

また、マイクロアレイ解析の結果、関節炎発症時に発現変動が一番大きかった遺伝子はSerum Amyloid Aであったが、この遺伝子も炎症や、関節リウマチ発症時に強く誘導されることが良く知られている。そこで、遺伝子発現の変動幅が大きかった遺伝子も順にリストアップを行ったところ、機能未知の遺伝子が見いだされた。これらの遺伝子についても、バイオインフォマティクス的手法を用い、細胞局在や、発現細胞、機能ドメインなどを予測し、免疫担当細胞で発現し、かつ胞膜表面、あるいは分泌される遺伝子を選びKOマウスの作成を開始した。

現在までに5遺伝子についてKOマウスの作成に成功し、2遺伝子はKOマウスの作成を試みている。先行するKOマウスのうち、2系統はCIAの系を用い、関節炎発症における役割の解析を行った。その結果、1つのKOマウスはCIAの発症が抑制され、別の1系統はCIAの反応が亢進した（図4）。

以上の結果から、2種類の関節炎モデルマウスを用いた関節炎発症関連遺伝子の網羅的探索は治療薬の標的を見出すために有効な方法であることが示された。

図5. 新規KOマウスを用いたCIAの誘導



<国内外での成果の位置づけ>

我々が開発したHTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスの2種類の関節炎モデルマウスは疾患モデルとして、非常に有用であることが国内外で認められ、広く利用されている。また、我々はIL-1と関節炎の発症との関与を世界に先駆けて示した。IL-1Ra遺伝子に変異のあるヒトのリウマチ患者は未だ世界でも見つかっていないが、リンコンピナントIL-1Raが臨床に応用されている。

さらに、我々は、IL-17KOマウスを作製し、種々の炎症性疾患におけるIL-17の重要性を初めて示した。その後、IL-17と炎症性疾患の関与は注目を集め、IL-17を産生するT細胞はこれまでの概念であった、活性化メモリーT細胞はTh1細胞とTh2細胞の2種類に分けられると言う考え方を覆し、Th1やTh2と同じ分化段階であるThIL-17という別の細胞集団が存在するということが示されている。我々の作成したIL-17KOマウスも早速、その有用性が評価され、広く利用され始めた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1. 関節リウマチ患者におけるIL-1Ra遺伝子の解析
ヒトで、IL-1Ra遺伝子に変異のある関節リウマチ患者をみつけることは出来なかった。これは、ヒトではその様な患者が存在しないのか、存在するのを見つけていることが出来なかったのかどうかは判らない。しかし、我々は、

1次スクリーニングにおいて関節リウマチ患者495名の血中のIL-1Raタンパク質の量を測定し、検出限界以下であった1名を含む、15検体に有意な低下を確認した。これらの患者は全て転写レベルまでは正常で、IL-1Ra遺伝子に変異は見つからなかった。そこで、この解析を中断した。

今回の解析で、1次スクリーニングの数は不足しているとは考えて居らず、ヒトの場合逆にIL-1Raの機能不全になると、より若年期に全身性の発熱性疾患等が優位に発症するため検出できなかった可能性がある。実際、その後別のグループによる約850名の患者と900名の健康人を対象としたSNPs解析でも、IL-1Ra遺伝子と関節リウマチとの連鎖は未だ報告がなされていない。しかし、IL-1は治療薬の標的としては有効であり、リコンビナントIL-1Raは既に臨床に応用されている。

2. 自己免疫感受性遺伝子の同定

連鎖解析の結果から候補遺伝子を4遺伝子見いだした。5年間の研究期間での目的はほぼ達成できたと考えている。

3. 関節炎発症関連遺伝子の網羅的解析

新しいKOマウスを作製し、関節炎の解析に適した遺伝的背景に戻し交配を行い、実際に解析をはじめめるためには、ES細胞で相同組換え体クローンを樹立後、さらに2年を必要とする。網羅的探索の結果、関節炎発症との関連が示唆された遺伝子のKOマウスの作成はほぼ順調に進んだが、1遺伝子に関しては、1500クローンのES細胞をスクリーニングしたが、相同組み換え体は得られなかった。現在はBACを用い、相同領域を150kb程度にしたターゲット・ベクターを作成中である。通常、相同組み換え体は1/100~1/500の頻度で得られるとされているが、その遺伝子により頻度は大きく異なり、その理由は世界的に解決されていない。

<今後の課題>

1. 関節リウマチ患者におけるIL-1Ra遺伝子の解析

前述のように、今回検討した495名の関節リウマチ患者の中には、IL-1Ra遺伝子に変異のある患者はいないことがわかった。現在は中断している。

2. 自己免疫感受性遺伝子の同定

HTLV-I-Tgマウスを用いた連鎖解析の結果、系統による関節炎発症感受性に関与している可能性のある遺伝子として、現在4つの遺伝子が候補に挙がっている。これらの遺伝子のうち、既にKOマウスが作製されているものは、そのKOマウスを導入し、関節炎発症における役割の検討をおこなう。

3. 関節炎発症関連遺伝子の網羅的解析

HTLV-I-TgマウスとIL-1RaKOマウスの2種類の関節炎モデルマウスを用いた、関節炎発症関連遺伝子の網羅的解析の結果、関与が示唆された遺伝子のうち、既に5遺伝子についてKOマウスを作製した。このうち、2遺伝子は関節炎発症に関与していることが示された。残りの3系統に関しては、順次解析をすすめる。また、別の2遺伝子のKOマウスを作成中であり、完成次第解析を進める予定である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M. and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor

antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191: 313-320 (2000)

2. Shibata, S., Kakuta, S., Hamada, K., Sokawa, Y. and Iwakura, Y. Cloning of a novel 2',5' -oligoadenylate synthetase-like molecule, Oas15 in mice. *Gene*, 271; 261-271 (2001)
3. Nakae, S., Naruse-Nakajima C., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. IL-1 a, but not IL-1 b, is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. *Int. Immunol.*, 13; 1471-1478 (2001)
4. Nakae, S., Asano, M., Horai, R., Sakaguchi, N., and Iwakura, Y. IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells. *J. Immunol.*, 167; 90-97 (2001)
5. Nakae, S., Asano, M., Horai, R. and Iwakura, Y. Interleukin (IL)-1 b, but not IL-1 a, is required for T cell-dependent antibody production. *Immunology*, 104; 402-409 (2001)
6. 0303281113 Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H. and Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in interleukin-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40 ligand and OX40 expression on T cells. *Arthritis Rheum.*, 46; 533-544 (2002)
7. 030328117 Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, resulting in the suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, 17; 375-387 (2002)
8. 404061439 Asano, M. Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S. and Iwakura, Y. Impaired selectin-logand biosynthesis and reduced inflammatory responses in beta-1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood*, 102; 1678-1685 (2003)
9. 404061452 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. and Iwakura, Y. Suppression of immune unduced of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.*, 171; 6173-6177 (2003)
10. 404061485 Nakae, S., Komiyama, Y., Yokoyama, H., Namubu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, 15; 483-490 (2003)
11. 404061504 Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S. and Iwakura, Y. IL-17 production from activated T cells is required for the development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 100; 5986-5990 (2003)
12. 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, PL., Abe, R. and Iwakura, Y. TNF a is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 114; 1603-1611 (2004)

13. Fujikado, N., Saijo, S. and Iwakura, Y. Novel arthritis - related gene clusters revealed by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis. Submitted. (2005)
14. Matsuki, T., Isoda, K., Horai, R., Nakajima, A., Aizawa, Y., Suzuki, K., Ohsuzu, F., and Iwakura, Y. Involvement of TNF α in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation*, 112, 1323-1331 (2005).
15. Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Araki, M., Ishi, T., Ishida, Y., Tanuma, S., Tanabe, K., Toma, Horai, R., Iwakura, Y., and Abe, R. Presence of CD28-dependent and independent pathways in autoimmune arthritis developed in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arth. Rheum.*, 54, 473-481 (2006).
16. Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and Iwakura, Y. The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 56, 129-153 (2006).
17. Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, in press.
18. Nambu, A., Nakae, S., and Iwakura, Y. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.*, in press.