

## PD-1欠損マウスを用いた自己免疫疾患感受性遺伝子の網羅的探索

●岡崎 拓<sup>1,2)</sup>

1) 京都大学医学研究科 2 1 世紀 COE      2) 京都大学医学研究科分子生物学

### 〈研究の目的と進め方〉

自己免疫疾患は多くの遺伝子が関与する多遺伝子疾患であるが、複数の遺伝子による相互作用についてはほとんど分かっていない。そこで自己免疫疾患モデルマウスを用いて連鎖解析を行い、当該自己免疫疾患の発症に関わる遺伝子を網羅的に探索することにより、自己免疫疾患発症制御機構を包括的に理解することを目的とする。

免疫抑制受容体PD-1を欠損させることにより自己免疫応答を増強できることを利用して、当研究室で独自に樹立した自己免疫疾患高頻度発症モデルマウスを用いて連鎖解析を行う。独自に開発したモデル動物を用いることにより、これまでに同定されていない自己免疫疾患感受性遺伝子が同定できる可能性があると期待される。また従来の自己免疫疾患モデル動物よりも高頻度に自己免疫疾患を発症するために、感度の高い解析ができるものと期待される。

### 〈研究開始時の研究計画〉

これまでも多くの研究者によって同様の試みがなされてきているが、責任遺伝子に到達した例は少ない。そこで高頻度かつ早期に発症するモデルマウスを作成することにより、連鎖解析の精度をあげ、遺伝解析の効率化を図った。本研究補助金交付前までにI型糖尿病のモデルマウスであるNODマウスに免疫抑制受容体PD-1の欠損を導入することにより、従来のNODマウス（30週齢で約50%）よりも高率（10週齢で100%）に糖尿病を発症するモデルマウス（NOD-PD-1KOマウス）の作成に成功した。本研究期間内には糖尿病を発症しないC57BL/6系統のPD-1欠損マウス（B6-PD-KOマウス）を用いて、糖尿病感受性遺伝子の連鎖解析を行った。また、連鎖解析による網羅的解析とは逆に、これまで免疫応答に関与していると報告されている免疫制御因子とPD-1との相互作用を解析する目的で、抑制性Fc受容体であるFcγRIIBとPD-1の二重欠損マウスを作成し、自己免疫疾患発症における両者の相互作用を検討した。

さらに、複数分子の相互作用を解析する上で、PD-1の機能をより詳細に解析することが必要であると考え、PD-1欠損下における自己反応性CD8 T細胞の免疫寛容誘導の有無を検討した。

### 〈研究期間の成果〉

NOD-PD-1KOマウスとB6-PD-1KOマウスの交雑BC1マウス及びF2マウスを各々200匹作成したところ、各々約40%と約20%が20週齢までに糖尿病を発症した。これらのマウスを用いて連鎖解析を行ったところ、劣性に働く染色体領域が3領域と、優性に働く染色体領域が2領域同定された。後者は新規の遺伝子座であったため、Iddp1/Iddp2と命名した。野生型NODマウスを用いるとF2マウスは糖尿病を発症しないことから、長いNODマウス研究の中でも今回の解析が初めての優性遺伝子座の網羅的解析である。またNODマウスの糖尿病には20種類以上の遺伝子座が関与すると報告されているが、NOD-PD-

1KOマウスではわずか5種類であるため、遺伝学的により単純なモデルであると言える。これらの成果をまとめ、論文報告した（文献1）。

FcγRIIBとPD-1の二重欠損マウスをBALB/c系統において作成したところ、各々の欠損マウスでは見られなかった水腎症の発症を認めた。一方、PD-1欠損マウスでみられた心筋症、及び胃炎の発症は、FcγRIIB欠損によりほとんど影響を受けなかった。これらのことから、抗原によりPD-1とFcγRIIBは協調的に働く場合と、働かない場合があることが明らかとなった。今後、ヒト自己免疫疾患においても両者の協調的な制御機構が解明されると期待される。これらの成果を文献2に発表した。

樹状細胞を活性化せずに、LCMVウイルス由来ペプチドを提示することができるマウスを用いて、PD-1による自己免疫寛容誘導機構を解析した。活性化を受けていない樹状細胞はPD-1依存的にCD8 T細胞の免疫寛容を誘導できることを見出し、論文発表した（文献3）。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

国内外において自己免疫疾患の連鎖解析は数多く行われてきているが、単一遺伝子に至った例はごくわずかである。本研究計画は上述の通り、早期に、かつ高い頻度で自己免疫疾患を発症するため、従来の解析より精度の高い解析が可能となる。従って、単一遺伝子が効率良く同定されるものと期待される。またPD-1欠損マウスは、遺伝子背景によっては拡張型心筋症、水腎症等、独特の症状を示すため、旧来のモデルマウスでは見つけ得なかった遺伝子座を発見できる可能性があり、期待されている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

今回同定した新規のI型糖尿病感受性遺伝子座Iddp1、及びIddp2について、コンジュニックマウスの作成により糖尿病発症に与える影響の証明を試みたが、研究期間内には完了しなかった。コンジュニックマウスの作成には通常1～2年はかかるため、当然の結果といえるが、この手の解析にはまとまった期間に渡って研究費が交付されることが期待される。

### 〈今後の課題〉

今回同定した新規のI型糖尿病感受性遺伝子座Iddp1、及びIddp2について、コンジュニックマウスの作成により糖尿病発症に与える影響を証明するとともに、原因遺伝子を同定することが一番の課題である。また、連鎖解析により連鎖を示した5個の遺伝子座のみにより糖尿病の発症が再現できるかについても現在検討中である。さらに、NOD-PD-1欠損マウス以外に樹立した自己免疫疾患自然発症モデルマウスについても順次連鎖解析を行っていきたい。

FcγRIIBとPD-1による協調的な調節機構については、各々の機能不全が水腎症発症に与える影響について詳細に解析し、今後連鎖解析により同定した遺伝子とPD-1と

の相互作用を解析する上でのモデルとしていくことが重要である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) Wang, J. et al., Establishment of NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice as an efficient animal model of type I diabetes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 102:11823 (2005)
- 2) Okazaki, T. et al., Hydronephrosis associated with antiurothelial and antinuclear autoantibodies in BALB/c-Fcgr2b<sup>-/-</sup>-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice. J.Exp.Med. 202:1643 (2005)
- 3) Probst, H.C. et al., Resting dendritic cells induce peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. Nat. Immunol. 6:280 (2005)
- 4) Okazaki, T. and Honjo, T. Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. Trends.Mol.Med. 11:322 (2005)
- 5) Okazaki, T. and Wang, J. PD-1/PD-L pathway and autoimmunity. Autoimmunity. 38:357 (2005)
- 6) Kobayashi, M. et al., Enhanced expression of programmed death-1 (PD-1)/PD-L1 in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. J.Rheumatol. 32:2156 (2005)