

自己免疫性甲状腺疾患を中心とした自己免疫疾患関連遺伝子の解明

● 笹月 健彦¹⁾ ◆ 鈴木 春巳¹⁾ ◆ 高木 智¹⁾ ◆ 岡村 匡史¹⁾ ◆ 反町 典子¹⁾ ◆ 山本 健²⁾ ◆ 白澤 専二³⁾

1) 国立国際医療センター・研究所 2) 九州大学・生体防御医学研究所 3) 福岡大学・医学部

<研究の目的と進め方>

免疫システムにおける“自己寛容”の破綻した状態として捉えられる自己免疫疾患は複数の遺伝要因と環境要因の相互作用により発症する多因子疾患である。遺伝要因、環境要因ともに免疫システムの全体的な反応性、免疫細胞の性質に影響を与えることにより自己免疫疾患への感受性を増大させ、さらに遺伝・環境要因はどの抗原が、ひいてはどの臓器が免疫システムからの攻撃の対象となるかを制御する。自己免疫疾患の病態は解明されつつあるが病因に関しては不明の部分が多く、そのシステムの理解には感受性遺伝子群の同定と個々の遺伝子産物の分子機能の解明が基盤情報として必要である。

本研究では、臓器特異的な自己免疫疾患である自己免疫性甲状腺疾患 (AITD; Graves' 病、橋本病) を中心に、全身性エリテマトーデス (SLE) を含む自己免疫疾患の病因・病態を総合的に理解するためのアプローチとして、i) 感受性遺伝子・SNPs 同定のためのゲノム相関解析、および ii) 感受性遺伝子産物の分子・細胞・個体レベルでの機能解析を行い、そこで得られた情報に立脚して、先駆的な治療法・予防法開発の道を拓くことを目的とする。

<2008 年度の研究計画>

1. ゲノム相関解析による AITD 感受性遺伝子の探索

カスタムアレイにより同定した 5q31-q33 の AITD 感受性領域の SNP および候補遺伝子に関して、他のコントロール群および AITD 症例でさらに検証をすすめ、疾患関連遺伝子を同定する。また、同定された有力な AITD 感受性 SNP に関して、SLE 検体 (450 例) もタイピングし相関解析を実施する。

2. AITD 感受性遺伝子 ZFAT の機能解析

AITD 感受性遺伝子としてこれまでに同定した ZFAT の分子・細胞・個体レベルでの機能解析を推進し、病態の形成および維持との関連を明らかにする。新たに ZFAT を特異的に認識する抗体を樹立し、ウェスタン法、免疫沈降法等の生化学的性状を明らかにする。標的遺伝子を同定するため、ZFAT を過剰発現する細胞株やノックダウンにより発現を低下させた細胞株での遺伝子発現変化を検討する。

樹立した ZFAT 遺伝子改変マウスを用いて、免疫学的病態を主眼とする個体および細胞レベルでの機能解析を行う。免疫機能は宿主系統の持つ遺伝的バックグラウンドが影響することが知られているため、C57BL/6 系統への戻し交配をスピードコンジェニック法により行う。ZFAT 欠損により胎生致死となることが明らかになった。致死に至る原因を探索するとともに、C57BL/6 系統へ戻し交配した ZFAT ヘテロ欠損マウスを用いて、免疫応答における ZFAT の機能について検討する。胸腺、骨髄における T 細胞、B 細胞の初期分化の詳細を解析し、各種刺激に対する免疫担当細胞の増殖応答、サイトカイン産生、抗体産生を検討する。また関節炎や移植片宿主応答をはじめとする疾患モデル系を用いて ZFAT 発現量低下の影響を解析する。各種免疫担当細胞において細胞系統特異的に ZFAT を欠損するコンディショナル

ノックアウトマウスの作成を推進する。

<2008 年度の成果>

1. AITD および SLE を対象としたゲノム解析

AITD 検体の収集については、研究機関と BioBank Japan を通じて目標数 (1500 検体) の収集を達成した。AITD 感受性候補領域 (5q) の解析について、カスタムアレイ (Illumina Custom Golden Gate Assay) による SNP dense mapping を開始した。連鎖領域をカバーする約 20 Mb (135.17-155.18 Mb) の範囲に位置する 58225 SNPs より、日本人集団におけるアレル頻度・SNP 間距離・遺伝子分布などを考慮した上で 2930 SNPs を選択し、Graves' 弧発症例 376 例・罹患同胞対家系発端者 86 例・対照群 481 例についてタイピングを行った。その結果、Graves' 弧発症例と罹患同胞対家系発端者で共通して相関を認める SNP として、新たにイントロン 9SNP (6 遺伝子)、UTR 1 SNP (1 遺伝子)、遺伝子間領域で 16SNP を同定した。

2. ZFAT・TR-ZFAT の機能解析

AITD 感受性遺伝子として同定した ZFAT は、18 個の C2H2 型 Zn-finger モチーフと N 末側に AT-hook を有する 1243 アミノ酸からなる転写制御因子様タンパクをコードし、スプライシングバリエーションである TR-ZFAT (truncated form of ZFAT) は 11 個の Zn-finger モチーフと AT-hook を有する 846 アミノ酸からなる蛋白をコードする。分子・細胞レベルでの機能解析のために、ZFAT 特異的な抗体を作製し、各組織および細胞分画での蛋白レベルでの発現を検討した。脾臓、胸腺において 180kDa の ZFAT 蛋白質が発現が確認された。CD19 陽性 B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞での発現が観察され、CD11b 陽性マクロファージには発現しないことがわかった。胎盤や腎臓、マクロファージでは mRNA の発現が検出されるものの ZFAT 蛋白質は確認されず、翻訳後修飾による ZFAT 発現制御機構の存在が示唆された。ZFAT は数カ所の核移行シグナル配列を持つ。細胞内画分での発現を検討し、核内にも分布することを確認した。さらにリンパ球前駆細胞株を用い、ZFAT の強制発現やノックダウンによる遺伝子発現変化を検討した結果、サイトカインや抗原受容体構成分子をはじめとする免疫応答への関与が考えられる一群の遺伝子発現が ZFAT により抑制されることを明らかにしている。

ZFAT および TR-ZFAT を過剰発現するトランスジェニックマウスを樹立した。トランスジーン mRNA 発現を確認し、表現型を解析したところ、免疫系細胞の分化および活性化に大きな変化はみられなかった。TR-ZFAT トランスジェニックマウスでは、full-length ZFAT トランスジェニックでみられない低週齢での発育遅延がみられた。ES 細胞での相同組み換えを行いキメラマウスの作成を経て ZFAT 遺伝子欠損ヘテロマウスを得た。これらの交配によりホモ欠損マウス作出を試みた結果、ZFAT 欠損個体は胎生 9-10 日で致死であり、初期個体発生において ZFAT が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。トランスジェニックマウスと交配し検討したところ、full-length ZFAT で

はホモ欠損による胎生致死を回避できるものの TR-ZFAT では回避されなかった。低週齢の TR-ZFAT トランスジェニックマウスでみられる発育遅延と合わせて、TR-ZFAT がドミナントネガティブ様の作用を持つ可能性が疑われた。ZFAT 発現量の低下による免疫応答への影響がみられるかどうか検討するため、スピードコンジェニック法による C57BL6 系統への戻し交配を行い純系化を進めた。戻し交配後の ZFAT^{+/-}ヘテロ個体においても B 細胞および T 細胞の分化に大きな異常はみられなかったが、軽度の脾腫など二次リンパ組織に於ける細胞数増多傾向が観察されている。脾臓細胞の培養では、抗原受容体刺激による増殖が ZFAT^{+/-}ヘテロ欠損 B 細胞で亢進する傾向がみられ、この傾向は培地の亜鉛濃度を制限することにより強く観察された。^{+/+}細胞でさらにノックダウンにより ZFAT 発現量低下を誘導するべく、shRNA 発現ウィルスベクターを作成した。致死に至る原因を探求するとともに、免疫応答における ZFAT の機能について検討するため各種免疫担当細胞特異的に ZFAT を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作成を進め、キメラマウスの作出に成功している。

<国内外での成果の位置づけ>

AITD および SLE に関して、当研究規模に匹敵する疾患遺伝子解析は国内外いずれにおいても行われていない。AITD の収集検体数もトップレベルに到達している。国際的な競争力という観点から、今後も検体収集の努力を継続する必要がある。収集した検体を用いた本研究成果として、AITD の疾患関連遺伝子としての新規分子を複数同定し、それらの機能解析から得られた成果についても、国内外において高い学術的評価を得ている。さらに、ZFAT は、私たちグループが独自に全ゲノム相関解析によって同定した新規免疫系転写関連因子であり、その独創性は高く評価されるべきものである。本年度の解析からも、生体内における ZFAT 機能の重要性が示唆され、機能解明が待たれるところである。種々の ZFAT 遺伝子改変マウスの樹立、共同研究に基づく ZFAT タンパク質の高次構造解析、ZFAT 標的遺伝子群の網羅的解析なども進行し、成果が集積しつつあり、国内外において卓越している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

疾患ゲノム解析についての年次目標は概ね達成され、疾患遺伝子の同定を推進中である。ZFAT の機能解析および自己免疫病態への関与解析に関しては、ZFAT 欠損マウスが胎生致死であること、胎児造血が開始される前に致死となることから胎児肝造血前駆細胞の成体マウスへの移植により免疫系を再構築して解析する手法が取れなかったことから困難に直面した。このため、スピードコンジェニック法により C57BL6 系統へ戻し交配し、ZFAT ヘテロ欠損マウスでの ZFAT 発現量低下による免疫応答への影響を均一な遺伝子背景のもとに検討を進めている。野生型とヘテロ欠損マウスを比較した場合に、いくつかの興味深い相違が見つかってきている。一方、各種免疫担当細胞特異的に ZFAT を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作成が順調に進んでおり、ヘテロ欠損マウスで得られた情報は迅速かつ効率のよい解析に大いに役立つものと思われる。

<今後の課題>

1. ゲノム相関解析による新規 AITD 感受性遺伝子の同定と病態における機能解析

5q31-q33 の AITD 感受性候補遺伝子に関して、高密度タイピングにより得られた 3 SNPs を含む候補遺伝子について、さらに

他のコントロール群および AITD 症例でさらに検証をすすめ、疾患関連遺伝子を同定する。また、同定された有力な AITD 関連遺伝子に関して、機能解析を進めていく必要がある。さらに、この遺伝子に関して、SLE 検体 (450 例) もタイピングし相関解析を実施する。また、これまでに同定してきた SNPs および疾患関連遺伝子について、病態との機能的関連の考察をさらに進めていくことが必要である。

2. ZFAT 遺伝子改変マウスの解析

免疫系での作用、個体レベルの免疫応答における機能、特に免疫寛容破綻および自己抗体産生による炎症応答を解析するため、樹立した ZFAT トランスジェニックマウス・ZFAT 遺伝子欠損マウス、および ZFAT^{+/-}ヘテロマウスを用い、抗原感作や炎症誘導、免疫異常疾患モデルでの検討など個体および細胞レベルの機能解析を進める。ZFAT をノックダウンした ZFAT^{+/-}リンパ球の機能を *in vitro* で検討するとともに、ZFAT ノックダウン造血前駆細胞を用い骨髄キメラマウスを作成してその免疫応答を検討する。ZFAT コンディショナルノックアウトマウスの作出を進める。各種生体応答に対する亜鉛欠乏の影響が ZFAT 発現量によりどのように変化するかを検討する。

<成果公表リスト>

- 1) 論文/プロシーディング (査読付き)
 1. 0901161005
Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: Implications for molecular mechanism. *Blood*, in press (2009)
 2. 0806251446
Koyanagi M, Nakabayashi K, Fujimoto T, Gu N, Baba I, Takashima Y, Doi K, Harada H, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT- regulated genes. *Genomics.*, 91:451-457 (2008).
 3. 0901161002
Furuno K, Ikeda K, Hamano S, Fukuyama K, Sonoda M, Hara T, Sasazuki T, Yamamoto K. One cut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. *Genes Immun.*, 9:302-308 (2008)
 4. 0901160954
Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Inayoshi A, Enjoji M, Takayanagi R, Sasazuki T, Fukui Y. Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells. *Blood*. 111:2973-2976 (2008)
 5. 0801151103
Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14:75-87 (2008)
- 2) データベース/ソフトウェア
なし