

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明らかになり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・SNPsを対象とする分子・細胞・個体レベルでの機能解析を行い、そこで得られる情報に立脚した先駆的な治療法・予防法開発のための基盤を構築することを目的とする。

<2007年度の研究の当初計画>

- 候補領域からのAITD感受性遺伝子の同定:
 罹患同胞対を利用した連鎖解析により連鎖の可能性を示した領域についてSNP相関解析、連鎖不平衡解析により、感受性遺伝子の同定を試みる。連鎖解析によって既に同定していた有力な候補染色体領域(5番染色体長腕・約25Mb・多点LOD値3.4)に3072SNPを設定し、コントロール499検体、罹患同胞対86家系(181検体)、孤発症例374検体をタイピングし、①統計解析による感受性SNPsの同定、②候補感受性SNPsを対象とした独立検体(孤発症例)を用いての相関解析、を実施することで疾患感受性領域・SNPsを同定することを目指す。
- 感受性遺伝子ZFATの機能解析:
 a) ZFATノックアウトマウスを樹立し、その病理学的および生理学的解析を行う。また、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およびBalb/cに戻し交配したコンジュニック系統を、スピードコンジュニック法により樹立する。さらに、受精卵および精子の凍結保存を行う。
 b) ZFATおよびTR-ZFATトランスジェニックマウスと、ZFATノックアウトマウスの免疫応答を解析する。具体的には、これらの遺伝子改変マウスを用いて、実験自己免疫性甲状腺炎、実験自己免疫性脳炎、関節炎、I型糖尿病、大腸炎の炎症モデルを作製、あるいは既存のモデルマウスと交配し、病態と免疫細胞の機能解析(サイトカイン産生、抗体産生、キラーT細胞誘導、細胞浸潤など)を行う。また、皮膚移植、骨髄移植を遺伝子操作マウスを用いて同様に解析する。さらに、胸腺、骨髄におけるT細胞、B細胞の初期分化

の詳細を解析する。

<2007年度の成果>

- AITDおよびSLEを対象としたゲノム解析:
 a) AITD検体の収集
 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。
 b) AITD感受性候補領域(5q)の解析
 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。さらに候補領域を絞り込むため、非発端者85名を含めて相関解析を実施し、26 SNPsから7 SNPsに絞りこむことができ、発端者、非発端者、弧発例に共通する3つのSNPsが存在する領域を同定した。
 c) SLE感受性候補領域(4p)を対象とした解析
 10遺伝子を対象とした候補遺伝子解析で残った2つの遺伝子ならびにポジショナルアプローチで同定した1つの候補領域から合計110SNPsを選別し、SLE 450例・対照群 900例を対象に相関解析を実施した。BST1遺伝子の2つのイントロン内SNP、STK32B遺伝子内の3つのイントロン内SNPなどで有意差(P<0.05)を検出した。
- ZFAT・TR-ZFATの機能解析:
 我々がAITD感受性遺伝子として同定したZFATは18個のC2H2タイプ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、ZFATのスプライシングバリエントである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。
 a) ZFAT,TR-ZFATのトランスジェニックマウスを樹立し、トランスジーン発現を確認した。さらにこれらのトランスジェニックマウスにおいて表現型解析を行った。トランスジェニックマウスにおいては、ZFATのmRNAの発現増加は認められたものの、タンパクレベルでの発現増加は顕著ではなく、ZFATは転写後調節によって厳密にその発現量が制御されている可能性が示唆された。ZFATおよびTR-ZFATのトランスジェニックマウスでは主要な免疫系細胞の分化に異常は認められなかった。ZFAT-KOマウスに関しては、キメラマウスを作製し、キメラマウスとC57BL/6とのmatingからgermline transmissionが確認されたため、ヘテロマウス同士の交配によりホモマウス作出を試みた。その結果、ZFAT

KO個体は胎生致死であることが明らかとなった。胎生8.5日で致死が認められ、ZFATが初期個体発生において必須の役割を果たしていることが明らかとなった。そのためZFATコンディショナルKOマウス作出のための準備としてコンストラクトの作製に着手した。また、ZFATは転写因子であることから、ZFAT+/-のヘテロ個体で表現型解析を行う必要があることから、ヘテロ個体の作出をおこなった。これらのKOマウスでは、戻し交配（スピードコンジェニック法）によるC57BL6系統およびBALB/c系統への純系化を完了した。

- b) 分子・細胞レベルでの機能解析のために、ZFAT・TR-ZFAT共通領域を抗原とするmAb、ZFAT特異的なmAb/polyclonal Ab、TR-ZFAT特異的なpolyclonal Abを作成し、ウェスタン法、免疫沈降法、免疫組織染色法における各抗体の適性の評価を進めた。

<国内外での成果の位置付け>

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の収集検体数も国内では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結果として、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の機能はその重要性が強く示唆され、機能解明が待たれるところである。すでに種々の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は、今年度の年次目標は概ね達成された。ZFATの機能解析に関しては、下記2点において予想外の結果が得られたが、いずれもすでに対応策に着手できている。

1. ZFATノックアウトマウスの機能解析

ZFAT 遺伝子の生体内における機能を明らかにするために、ZFAT ノックアウトマウスを作製した。ヘテロマウス同士の交配によりホモマウスの作出を試みた結果、ZFAT KO 個体は胎生 8.5 日目で胎生致死となることが明らかとなった。このことから、ZFAT が初期個体発生において必須であることはわかったものの、胎児肝における一次造血が開始される前に致死となってしまうために、胎児肝の造血肝細胞・前駆細胞よりレシビエントマウスへの移植により成熟した免疫担当細胞を得ることも不可能であり、免疫担当細胞における ZFAT の機能解析は未だ十分に進められていない。

2. ZFATトランスジェニックマウスの個体レベルでの免疫応答の解析

樹立した ZFAT および TR-ZFAT のトランスジェニックマウスのコンジェニック化が終了したため、種々の病態モデルを作製して ZFAT の機能解析を行う予定であったが、ZFAT および TR-ZFAT いずれのトランスジェニック系統においても高発現ラインが得られなかった。いずれにおいても ZFAT の mRNA の増加は認められたため、ZFAT の発現量が転写後調節によって厳密に制御されることが個体発生や細胞分化・機能に重要である可能性があり、この分子の生体内における重要性が示

唆された。

<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、病態との機能的連関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

ZFAT+/-ヘテロマウスを用いて、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。さらに ZFAT の生体における機能を理解するために、ZFAT コンディショナルノックアウトマウス樹立を早急に進める。

<成果公表リスト>

1. Kunisaki Y, Tanaka Y, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Nakayama T, Harada M, Taniguchi M, Sasazuki T, Fukui Y. DOCK2 is required in T cell precursors for development of Valpha 14 NK T cells. *J. Immunol.* 176:4640-4645, 2006 [0705101114]
2. Fujimoto T, Koyanagi M, Baba I, Nakabayashi K, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. Analysis of KRAP expression and localization, and genes regulated by KRAP in a human colon cancer cell line. *J Hum Genet.* 52:978-84, 2007 [17934691]
3. Klampfer L, Huang J, Shirasawa S, Sasazuki T, Augenlicht L. Histone deacetylase inhibitors induce cell death selectively in cells that harbor activated kRasV12: The role of signal transducers and activators of transcription 1 and p21. *Cancer Res.* 67:8477-85, 2007. [17875686]
4. Tanaka Y, Hamano S, Gotoh K, Murata Y, Kunisaki Y, Nishikimi A, Takii R, Kawaguchi M, Inayoshi A, Masuko S, Himeno K, Sasazuki T, Fukui Y. T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor-alpha subunit controlled by the Rac activator Dock2. *Nat Immunol.* 8:1067-75, 2007 [17767160]
5. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Koderia Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood.* 110:2235-41, 2007. [17554059]
6. Cleyneen I, Huysmans C, Sasazuki T, Shirasawa S, Van de Ven W, Peeters K. Transcriptional control of the human high mobility group A1 gene: basal and oncogenic Ras-regulated expression. *Cancer Res.* 67:4620-9, 2007. [17510387]
7. Takeuchi F, Yanai K, Inomata H, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. Search of type 2 diabetes susceptibility gene on chromosome 20q. *Biochem Biophys Res Commun.* 357:1100-6, 2007 [17466274]