

特集：無細胞生命科学の創成

膠原病のゲノム解析に基づく疾病関連タンパク質の探索 —無細胞タンパク質合成系の応用—

能勢 真人¹, 小森 浩章¹, 宮崎 龍彦¹,
澤崎 達也², 遠藤 弥重太²

膠原病は、自己免疫異常を背景とし、複雑な病態、病理表現型を呈する全身性の複合疾患である。モデルマウスを用いて、膠原病の感受性遺伝子座をマップすると、そのゲノムのしくみを知ることができる。膠原病は相加性と階層性を有する複数の遺伝子が同義的に作用して発症し、それらはポリジーンとして集団内に潜在的に分布する多型遺伝子である。このポリジーンの組み合わせが膠原病の病像の多様性を規定していると考えられ、このシステムを膠原病のポリジーンネットワークと呼びたい。これらのポリジーンはその質的、量的差異に基づき、これらの下流に位置する遺伝子がコードするタンパク質の量的変動を介して膠原病を発症すると考えられる。この一連の反応系に関連するタンパク質の機能解析に無細胞タンパク質合成系の技術は極めて有用であり、その成果の一端を提示する。

はじめに

我々生物は、地球生命の誕生後 38 億年を経て今存在する。その間、遺伝情報の複製の不安定性などが引き起こす点突然変異や染色体突然変異は、それぞれ、自然淘汰や進化的新奇性の源となってきた。同種内であっても、蓄積された突然変異は個体間のゲノム多型として存在し、種々の環境下において、個体はそのゲノム多型に基づく個性性を表現する。自己免疫病に包含される膠原病という疾病も、この個性性の一病的表現型として位置づけられる。とすれ

ば、膠原病は、この地球上でゲノム変異と淘汰の繰り返しの中で生存してきた我々に課せられた、内なる必然といえる。

自己免疫病の根本的な表現型は、自己の組織、細胞あるいは分子に対する免疫応答と免疫反応の存在にある。この自己免疫応答、反応の発現が、疾病の原因か、促進か、それとも結果か、については、特定の臓器のみが傷害される橋本病、バセドウ病、悪性貧血、重症筋無力症などの「臓器特異的」自己免疫病においては、それが原因であることが明らかにされてきた。一方、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性血管炎など、膠原病に代表される「全身性」自己免疫疾患においては、未だに不明な部分が多い。これらの疾患では、従来、核物質を中心に、多岐にわたる自己抗原に反応するリンパ球、抗体が出現するとされており、これらが個々の疾患カテゴリーの分類や診断マーカー、治療効果の指針として用いられているものの、個々の病変の病理発生上の役割、さらにはその発現機構については不明なものが大部分である。

一般に、疾病の原因を究明する従来の方法として、疾病個体（ドナー）中の特定の物質を正常個体（レシピエント）へ移入することによる疾病の再構築が用いられてきた。こ

¹愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野(〒791-0295 愛媛県東温市志津川)；²愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

Exploration of collagen disease-related proteins based on pathogenomics: application of a cell-free protein synthesis system to it

Masato Nose¹, Hiroaki Komori¹, Tatsuhiko Miyazaki¹, Tatsuya Sawasaki² and Yaeta Endo² (¹Department of Pathogenomics, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0295, Japan and ²Cell-Free Science and Technology Research Center, Ehime University)

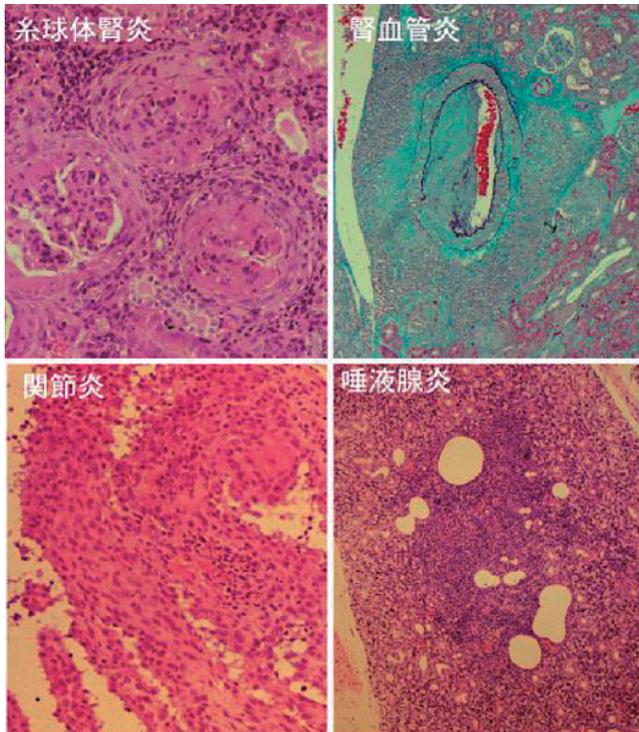


図1 MRL/lpr マウスの膠原病の病像多様性
糸球体腎炎, 関節炎, 血管炎, 唾液腺炎は, それぞれヒトのループス腎炎, 関節リウマチ, 結節性多発動脈炎, シェーグレン症候群のモデルとして幅広く研究されてきた。

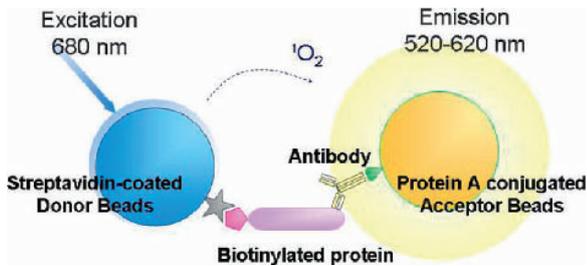


図4 AlphaScreen 法と無細胞タンパク質合成系の組み合わせによる自己抗体の測定

AlphaScreen 法は励起エネルギーの転移を利用してタンパク質-抗体の相互作用を見る解析法で, これまでの ELISA 法と比べ, 高感度・迅速・自動化可能という特徴を持つ。しかも反応を液相中で行うためタンパク質の立体構造を保ったまま解析ができる利点がある。コムギ胚芽を利用した無細胞タンパク質合成系は, 1) 一度に数多く (百個単位) のタンパク質を, 2) cDNA から直接, 3) 短期間, 高収量に, 4) 全自動で合成できるシステムである。この方法を用いることによって, 遺伝子の cDNA 情報に基づいて, 短期間にしかも容易にビオチン標識したタンパク質 (図中の Biotinylated protein) を一度に多数合成し AlphaScreen 法に供することができる。この両者を組み合わせることによって, ゲノムプロジェクト後データベース化された遺伝子情報に基づきプロテオームを基盤として網羅的に自己抗体の存在 (図中の Antibody) を定量的に評価しうる。

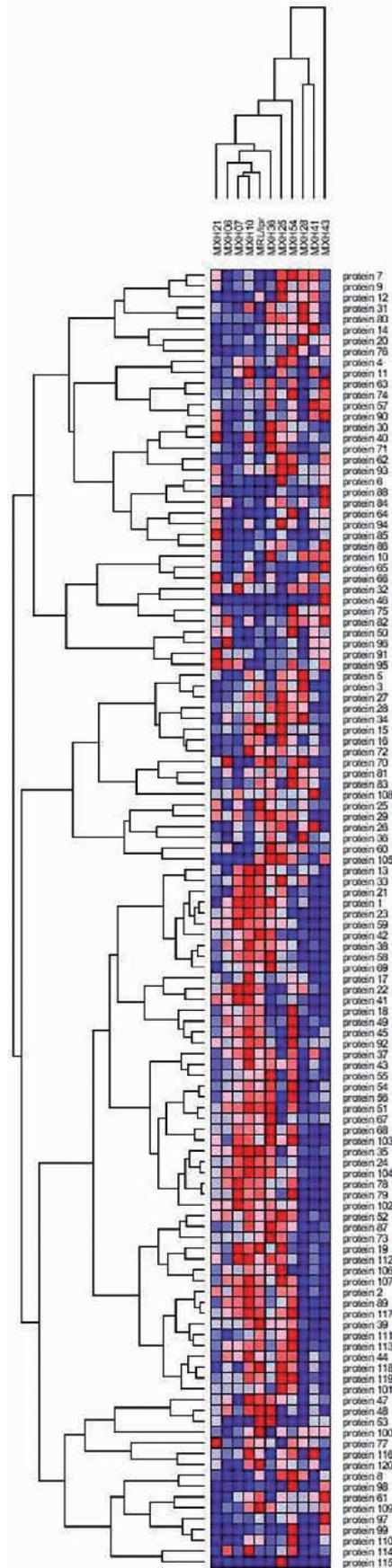


図5 MXH/lpr 各系統と自己抗体発現プロファイルのクラスタリング
縦軸は合成タンパク質, 縦軸は4ヶ月齢の親系統の膠原病好発系 MRL/lpr マウスと各 RI 系統マウスを対する各系統マウス (プールの血清) の抗体価は, 膠原病嫌発系 C3H/lpr マウスの値を1としてその比率で表現し, 青色が高値, 青色が低値を表す。距離尺度は Spearman 相関係数を用い, クラスタリングには最長距離法を用いた。例えば, MXH07, MXH10 は, MRL/lpr マウスに極めて類似する自己抗体発現プロファイルを示し, その自己抗体価は, 中央部の特定のクラスタターにまとめられる。一方, MXH43 は MRL/lpr マウスのそれとは異なり, その発現する自己抗体の多くは, 右端と左端のクラスタターに集中している。ゲノム交雑により, 自己抗体の対応抗原が特定のクラスタターを示すことがわかる。また, 病変と自己抗体との関連を示す対応タンパク質は, MXH06, MXH10, MXH41 であり, これらに共通して高値を示す対応タンパク質は, MRL/lpr ならびに MXH06, MXH10, MXH41 である。

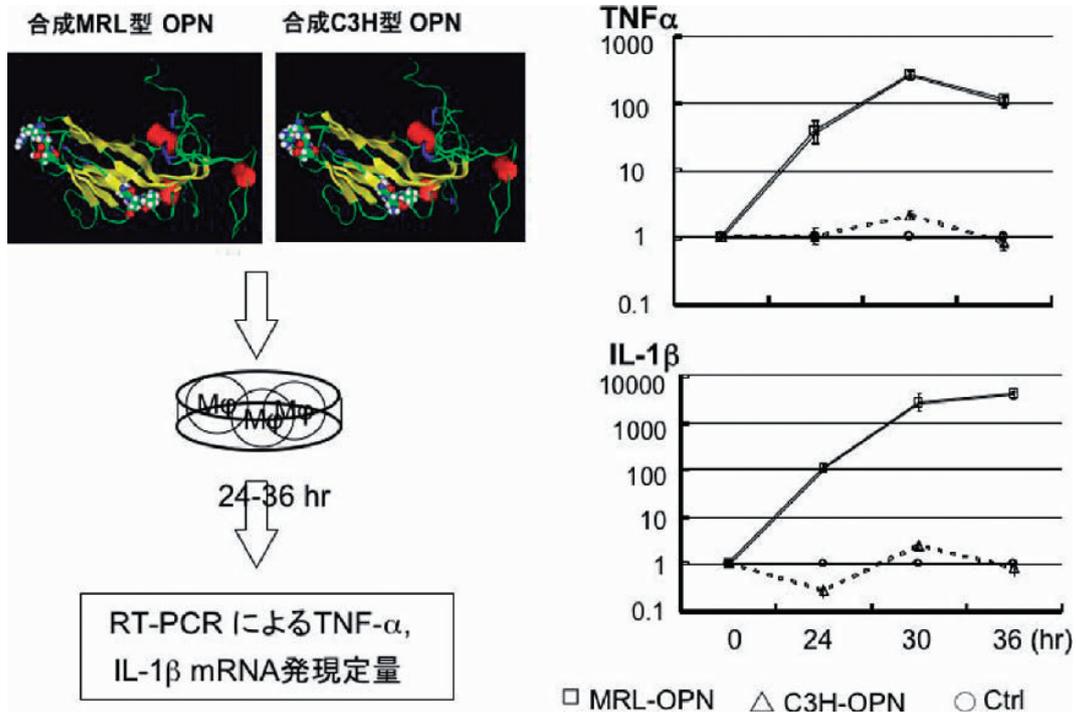


図9 OPN多型タンパク質の機能的差異

無細胞タンパク質合成系で合成したMRL/lprおよびC3H/lpr型のオステオポンチンを骨髄細胞から分化させたマクロファージに添加し、24-36時間後に、マクロファージに発現するTNF α およびIL-1 β をそれぞれRT-PCRにて測定した。MRL/lpr型オステオポンチンは、極めて高いTNF α およびIL-1 β の誘導能を有することがわかる。

の原理は、細菌、ウイルスなどの感染病原体の解明のみならず、腫瘍ウイルスの発見にもつながった実験医学のセントラルドグマである。自己免疫病においてもしかり、疾病個体の自己抗体が含まれている血清や自己反応性のリンパ球の正常個体への移入による疾病の再構築が、Witebsky & Milgromにより、自己免疫疾患の条件として挙げられてきた。臓器特異的の自己免疫病はこの方法により説明できるものが多い。DNAの移入実験では、1980年代の初頭のがん細胞DNAの正常細胞への移入による細胞のトランスフォーメーション実験によるがん遺伝子の発見を皮切りに、胚工学の発展に支えられて、特定の遺伝子の強制発現や削除による疾病個体の再構築に進展した。自己免疫病においても、後述するように、この延長上で、多くの単一遺伝子モデルが報告されてきた。

しかし、自己免疫病の大部分が単一遺伝子疾患でないことは、(NZB×NZW) F1マウスがF1世代で初めて重篤な自己免疫性糸球体腎炎を発症するところからも明らかであった。本稿で紹介するMRL/Mp-lpr/lpr (MRL/lpr) マウスにおいても、当初はlpr遺伝子という突然変異遺伝子により腎炎をはじめ血管炎、関節炎、唾液腺炎などの一連の膠原病が発症するとされながらも、その後、MRL系マウスの遺伝的背景の重要性が明らかにされてきた経緯があり、上述のセントラルドグマは通用しない。

このセントラルドグマが通用しないとすれば、どうすればいいのか。その打開策の一端として、遺伝要因の解明にあつては、疾病個体のトータルゲノム解析からの原因遺伝子そして分子の探索にあり、また、自己抗体にあつては、その対応抗原の網羅的な探索である。ここに無細胞タンパク質合成系の技術が大いに期待される。

本稿では、この経緯を述べるなかで、膠原病の発症に関連するタンパク質の探索における無細胞タンパク質合成系の技術を応用した戦略の一端を紹介する。

1. 膠原病モデルマウスのゲノム解析

1) MRL/lpr マウスの起源

我々が用いてきた膠原病モデルマウスMRL/lpr¹⁾は、3-4カ月齢になると、常染色体劣性遺伝様式をとるリンパ節腫脹 (lymphoproliferation, lpr 遺伝子と命名された) を発症する。CD4⁺CD8⁻B220⁺ T細胞のリンパ節への集積である。これに加えて、糸球体腎炎、血管炎、関節炎、唾液腺炎、間質性肺炎などが同一個体に自然発症する。同時に、自己抗体を含め、種々の自己免疫現象が発現する。

もとのMRLマウスそのものは、LG/J, AKR/J, C3H/Di, C57BL/6Jの4種類の近交系マウス間の交配や戻し交配を通じて樹立されたマウスに由来する¹⁾。平たく言えば、雑種から生まれた一卵性双生児の集団である。従って、MRL

系マウスはこれら4種類のマウスのゲノムのモザイクからなり、それぞれのゲノム比率はその交配過程から算定するとLG/J(75.0%), AKR/J(12.6%), C3H/Di(12.1%), C57BL/6J(0.3%)となる。

MRL/lpr マウスの病理像は極めて多彩で、糸球体腎炎は管内増殖型や分節性にワイヤーループ型病変を呈するもので、一部には半月体形成性腎炎を見る。血管炎は全身性の肉芽腫性動脈炎で、特に腎の弓状動脈、小葉間動脈に好発し、はじめに血管外膜側に活性化マクロファージの集簇に伴う外弾性板の破壊を生じ、中膜の変性、内弾性板の破壊、内膜肥厚へと進行する。関節炎は、発症頻度は低いが、多発性で、関節滑膜局所へのリンパ球、好中球浸潤に伴う滑膜表層細胞の多層化に始まり、滑膜下組織の肉芽性炎症病巣の形成、骨、軟骨組織へのパンサスの形成に進展する。また、小導管周囲へのリンパ球浸潤に始まる唾液腺炎、涙腺炎をも発症し、腺房組織の破壊、小導管の反応性増殖病巣の形成に進展する(図1)。

2) 遺伝的背景の重要性

このMRL/lpr マウスが樹立された当時は、これら一連の病態、病理は *lpr* 遺伝子を原因遺伝子とする単一遺伝子疾患と考えられた。1992年、この *lpr* 遺伝子がアポトーシスを誘導する Fas の欠損変異であることが長田重一らのグループにより明らかにされた。トランスポゾン第2イントロンへの挿入による欠損変異である。Fas 分子は、免疫系では主に活性化 T、B リンパ球、マクロファージに発現し、活性化 T リンパ球の Fas ligand の結合によりこれらの細胞にアポトーシスが誘導される。それ故、Fas 欠損変異はアポトーシス不全を引き起こす。その結果、自己反応性リンパ球の出現を生じ、また免疫応答、免疫反応の収束を妨げる。これらの細胞の持続的な活性化と炎症の遷延を許す結果、自己免疫病が発症すると考えられている。

しかし、極めて重要なことは、「*lpr* のみでは、膠原病は

発症しない」ということである。というのも、*lpr* 遺伝子を他の系統マウスに導入した、少なくとも C3H/lpr や B6/lpr マウスでは、共にリンパ節腫脹をきたすものの、共にいずれの膠原病病像もほとんど示さない^{2,3)}。それ故、*lpr* の表現型は文字通り lymphoproliferation である。一方、*lpr* 遺伝子を持たない MRL 系マウスでは10カ月齢以上になると、軽微ながらも膠原病病像を示す。それ故、*lpr* 遺伝子は Fas 介在性アポトーシス不全により MRL 系マウスの膠原病の「促進要因」として捉え得るものであり、膠原病の原因遺伝子は MRL 系マウスの背景遺伝子にあることになる。

この考え方は、近年の免疫、炎症関連遺伝子の強制発現や削除による個体の病態、病理解析のデータの集積からも検証されている。即ち、単一遺伝子の操作により発現する自己免疫病の病理形質は、その個体の遺伝的背景により変化するという事実である。マウス系統差により発現形質が減弱するもの、また、異なった形質を発現するものなどが出現する。例えば、C4 欠損マウスにおいては、B6 マウスの遺伝的背景下では糸球体腎炎は減弱する。一方、PD-1 欠損マウスにおいては B6 マウスでは関節炎、糸球体腎炎を発症するが、BALB/c マウスでは拡張性心筋症を発症し、NOD マウスでは糖尿病形質を促進する。その他、種々の自己免疫病を発症するノックアウトマウスが多数報告されてはいる。従来ノックアウトマウスの作製には129/Sv マウス由来の ES 細胞が用いられているが、このマウスは元来自免疫感受性であるため、他の近交系マウスへの戻し交配の過程で、これらの形質が減弱、あるいは変化する可能性があり形質の解析に注意を要する。

3) 膠原病の複合病像の遺伝的解離

膠原病の発症が MRL 系マウスの背景遺伝子に規定されているとすれば、それは単一遺伝子か、それとも複数の遺伝子群であろうか。結論は後者である。背景遺伝子群の再

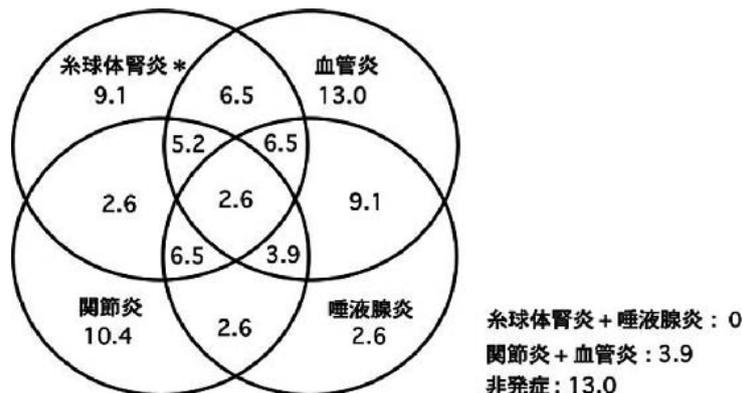


図2 膠原病の種々の病像の遺伝的解離

MRL/lpr × (MRL/lpr × C3H/lpr) F1 マウスの各個体の病理像を観察すると、個々の病像が単独、あるいは種々の組み合わせで発症している個体が見られる。4-5 カ月齢での各病像の発症頻度 (*) を%で表した。

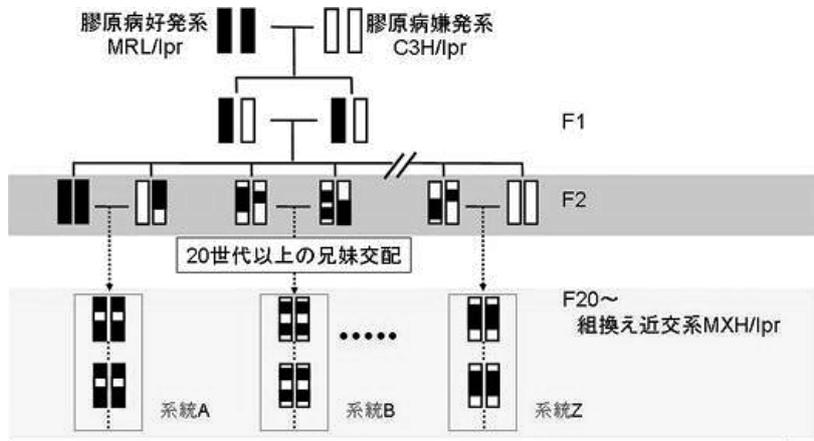


図 3-1

marker	position (cM)	系統										
		6	7	10	21	25	28	36	41	43	51	54
D5Mit145	0	C	M	M	C	C	M	C	M	C	M	C
D5Mit174	11	C	C	M	C	C	C	C	M	C	M	C
D5Mit149	19	C	M	M	C	C	C	C	C	C	M	C
D5Mit233	29	M	C	C	C	C	C	M	C	C	C	C
D5Mit158	41	M	M	M	C	M	C	M	M	C	C	C
D5Mit115	56	M	M	M	M	M	C	M	C	C	C	C
D5Mit431	66	M	M	M	M	M	C	M	C	C	C	C
D5Mit33	78	C	C	M	M	C	C	M	C	M	C	C

図 3-2

	MRL	06	07	10	21	25	28	36	41	43	51	54	C3H
関節炎													
腎血管炎													
糸球体腎炎													
涙腺炎													
IgG-RF													
MPO-ANCA													
抗dsDNA抗体													

図 3-3

図 3 MXH/lpr 各系統の病像，病態形質と系統間分布表

膠原病好発系 MRL/lpr マウスと膠原病嫌発系 C3H/lpr との間の雑種第二世代を出発点に，兄妹交配を 20 世代以上繰り返して新たな組換え近交系 (recombinant inbred (RI) 系) MXH/lpr を作出した (図 3-1)。各系統の染色体上のマイクロサテライトマーカーは，両親系統のどちらかに由来する遺伝型のコホモ接合子となっている (第 5 染色体の系統間分布表の例) (図 3-2)。これら系統間において各種膠原病の病像のみならず，膠原病の代表的な自己抗体である IgG リウマトイド因子 (IgG-RF)，抗ミエロペルオキシダーゼ抗体 (MPO-ANCA)，抗 dsDNA 抗体の遺伝的解離が見られる (図 3-3)。それぞれの図の上段の数字は，各系統名を示す。

構成を図るべく作成した MRL/lpr マウスと膠原病を発症しない C3H/lpr マウスとの戻し交配マウス群 (N2 世代), あるいは兄妹交配のマウス群 (F2 世代) の病理形質の解析では, 個々の膠原病病像が分離して発症する. 図 2 は C3H/lpr マウスとの戻し交配の例であるが, 糸球体腎炎, 血管炎, 唾液腺炎, 関節炎を単独に発症する個体や, これらを種々の組み合わせで重複して発症する個体が認められた³⁾. さらに, 戻し交配系 N2 世代マウスから, 各兄妹交配世代毎に組織病理学的な選択を行うことで, 血管炎のみを発症する recombinant congenic 系統 McH5/lpr⁴⁾ や, 高頻度にかつ関節硬直 ankylosis に至る重篤な関節炎を発症する系統 McH/lpr-RA1 (Mori S, et al. in preparation) を樹立した. このことは, 血管炎や関節炎に感受性のある対立遺伝子が分離, 固定されたことを意味する.

それ故, MRL/lpr マウスの膠原病病質は, 個々の病像に固有の, 遺伝的に分離可能な背景遺伝子によって決まるといえる. これらの一連の現象から, 一般に一つの遺伝子変異があっても, そのマウス固有の遺伝的背景によって形質が異なるというもので, 種々の遺伝子ノックアウトマウスの形質も, 全てがその遺伝子特有のものではない可能性が高いことを MRL/lpr マウスはいち早く明示していたといえる.

4) 自己抗体の遺伝的解離

最近樹立した MRL/lpr マウスと C3H/lpr マウスとの recombinant inbred (RI) 系マウス群 MXH/lpr においては, 遺伝マーカーの解析から両親系統のゲノムモザイクがホモ型で“いれこ”になった状態にあることが明らかであったが, 上述の N2 世代の解析からも推定されるように, この RI 系統間には, 糸球体腎炎, 血管炎, 関節炎などを種々の組み合わせで, また種々の重症度で発症する系統が混在していた (Komori H, et al. in preparation). 同時にこれらの系統間では, 種々の自己抗体の発現も遺伝的に分離していた (図 3).

この MXH/lpr 系統間で種々の自己抗体の発現プロファイルを解析することは, 自己抗体と病像発症との関連を明らかにする上で重要な情報を与えてくれるだけでなく, 自己抗体発現のゲノム的基盤をも明らかにできる. 我々はこれを自己抗体ゲノミクスと呼ぶ. 無細胞タンパク質合成系と生体分子間の相互作用を高感度にしかも容易に評価できる assay 系である AlphaScreen 法とを組み合わせることにより, 自己抗体を網羅的に, しかも high-throughput に検索することが可能となった (図 4).

無細胞タンパク質合成系で後述する疾患感受性遺伝子座のゲノムデータベースに基づく候補タンパク質を網羅的に作成し, MXH/lpr マウス各系統の血清中の自己抗体の発現プロファイルをクラスター分類すると (図 5), 各系統の自己抗体発現プロファイルの類似性の距離 (それは特定

の自己抗体の発現に関わるゲノムの距離をも反映する) を知る一方, この距離を規定する自己抗原タンパク質群の類似性とこの距離を知ることができる.

2. 膠原病の感受性遺伝子座とその特性

1) 連鎖解析

MRL/lpr マウスの背景遺伝子を解析するためには, MRL/lpr × (MRL/lpr × C3H/lpr) F1 マウスあるいは (MRL/lpr × C3H/lpr) F2 マウスの全ゲノムを対象に, 各染色体の平均 10 cM 断片をカバーする多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定し, その遺伝子型とあらかじめ設定した一定のグレード以上の病像を呈した個体数 (陽性個体数) との関連解析をカイ 2 乗検定し, その値の高いマーカー位置を同定する. また, 各個体の病像のグレード, あるいはそれから算出したインデックスを用いて, 病像を連続した量的形質として数量化することで, 各マーカー位置でのオッズ比を logarithm に換算した LOD スコアにより連鎖検定を行い QTL (quantitative trait loci) を求める⁵⁾. このようにして MRL/lpr マウスの関節炎の感受性遺伝子座をマップした.

例えば関節炎の感受性遺伝子座については, 上記 2 系統間での N2 マウスの解析で significant linkage (間違いなくその位置に原因遺伝子があることを意味する統計上の指数) を示したものは, 第 15, 19 染色体上にマップされ, それぞれ *Paam1*; *Progressive autoimmune arthritis in MRL mice*, *Paam2* と名付けた⁶⁾. その他, suggestive linkage にとどまる三つの感受性遺伝子座が見出され, 仮に *Paam3*, *4*, *5* とした. また, 同様に, 糸球体腎炎は *Agnm*; *Autoimmune glomerulonephritis in MRL mice*, 血管炎は *Arvm*; *Autoimmune renal vasculitis in MRL mice*, *Aaom1*; *Autoimmune aortitis in MRL mice*, *Aevm*; *Autoimmune extremity vasculitis in MRL mice*, 唾液腺炎は *Asm*; *Autoimmune sialoadenitis in MRL mice* としてそれぞれマップした⁷⁻¹⁰⁾ (表 1).

2) ポリジーン系遺伝

糸球体腎炎, 血管炎, 唾液腺炎, 関節炎のいずれもが複数の遺伝子座に支配されていた. これらには, 関節炎感受性遺伝子座 *Paam1*, *Paam4* のように, 雄のみの発症に作用している遺伝子座も存在する. また, *Paam3* のように, MRL アレルホモではむしろ抵抗性を示すものもある. このことから, 何故もともと MRL/lpr マウスでは関節炎の発症頻度が低いのが理解できる.

これらの各病像の関節炎感受性遺伝子座の間には「相加性と階層性」が存在する. 例えば図 6 に示すように, *Paam1*, *Paam3*, *Paam4* の 3 個の遺伝子座で見ると, *Paam1* と *Paam3*, あるいは *Paam1* と *Paam4* との間には相加効果が見られる. 一方, *Paam3* と *Paam4* とでは相加効果は

表1 MRL/lpr マウスを用いた膠原病感受性遺伝子座

Lesion	Symbol	Name	MGI : ID	Chr	Position	Refs
Vasculitis	<i>Arvm 1</i>	autoimmune renal vasculitis in MRL mice 1	MGI : 2149546	4	19.8 cM	Qu WM et al. 2000
	<i>Arvm 2</i>	autoimmune renal vasculitis in MRL mice 2	MGI : 2149547	4	58.0 cM	Qu WM et al. 2000
	<i>Arvm 3</i>	autoimmune renal vasculitis in MRL mice 3		3	55-61 cM	Qu WM et al. 2000
	<i>Aaom 1</i>	autoimmune aortitis in MRL mice 1	MGI : 2680905	4	13.3 cM	Yamada A et al. 2003
	<i>Aevm 1</i>	autoimmune extremity vasculitis in MRL mice 1	MGI : 2680906	8	33.0 cM	Yamada A et al. 2003
	<i>Aevm 2</i>	autoimmune extremity vasculitis in MRL mice 1	MGI : 2680907	5	65.0 cM	Yamada A et al. 2003
Glomerulonephritis	<i>Agnm 1</i>	autoimmune glomerulonephritis in MRL mice 1	MGI : 3582415	4	22.0 cM	Miyazaki T et al. 2005
	<i>Agnm 2</i>	autoimmune glomerulonephritis in MRL mice 2	MGI : 3582416	4	53.0 cM	Miyazaki T et al. 2005
	<i>Agnm 3</i>	autoimmune glomerulonephritis in MRL mice 3	MGI : 3582417	5	56.0 cM	Miyazaki T et al. 2005
Arthritis	<i>Paam 1</i>	progression of autoimmune arthritis in MRL mice 1	MGI : 2387302	15	18.0 cM	Kamogawa J et al. 2002
	<i>Paam 2</i>	progression of autoimmune arthritis in MRL mice 2	MGI : 2387303	19	49.0 cM	Kamogawa J et al. 2002
	<i>Paam 3</i>	progression of autoimmune arthritis in MRL mice 3		7	24.5 cM	Kamogawa J et al. 2002
	<i>Paam 4</i>	progression of autoimmune arthritis in MRL mice 4		2	45.0 cM	Kamogawa J et al. 2002
	<i>Paam 5</i>	progression of autoimmune arthritis in MRL mice 5		1	100.0 cM	Kamogawa J et al. 2002
		<i>Artmd 1 (Amd 1)</i>	arthropathy in MRL and DBA/1 mice 1	MGI : 3588383	10	40.0 cM
	<i>Artmd 2 (Amd 2)</i>	arthropathy in MRL and DBA/1 mice 2	MGI : 3588384	3	29.5 cM	Oishi H et al. 2005
Sialoadenitis	<i>Asm 1</i>	autoimmune sialoadenitis in MRL mice 1	MGI : 2150642	10	39.0 cM	Nishihara M et al. 1999
	<i>Asm 2</i>	autoimmune sialoadenitis in MRL mice 2	MGI : 2150643	4	51.0 cM	Nishihara M et al. 1999
	<i>Asm 3</i>	autoimmune sialoadenitis in MRL mice 3		1	65.0 cM	Nishihara M et al. 1999
	<i>Asm 4</i>	autoimmune sialoadenitis in MRL mice 4		18	20.0 cM	Nishihara M et al. 1999

MGI : ID は significant linkage を示した遺伝子座として MGI (Mouse Genome Informatics) に登録されているもの (<http://www.informatics.jax.org/>を参照)。

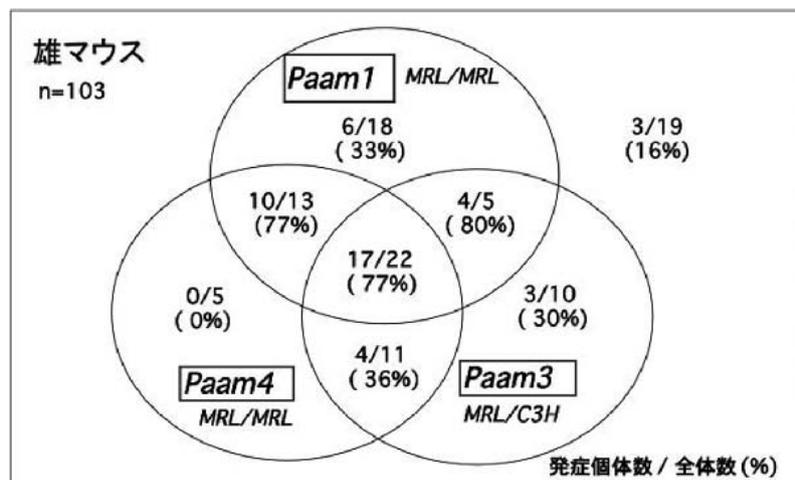


図6 MRL/lpr × (MRL/lpr × C3H/lpr) F1 マウスで解析した関節炎感受性遺伝子座 (Paam1, Paam3, Paam4) の相加性と階層性

Paam1, Paam3, Paam4 の3個の遺伝子座のうち, Paam1 (遺伝子型 MRL/MRL), あるいは Paam3 (MRL/C3H) のみでは高々30%程度の発症率しかなく, Paam4 (MRL/MRL) に至っては, これのみで発症する個体数はゼロである。しかし, Paam1 と Paam3 とが, あるいは Paam1 と Paam4 とが揃うと発症率は約80%に上昇する。それ故「相加効果」があるといえる。一方, Paam3 と Paam4 とが揃っても, 相加効果は見られず, 従って Paam1 は関節炎の発症において他の二つの遺伝子座に対して優位に作用していると言える (階層性)。

見られず、従って *Paam1* は関節炎の発症において他の2遺伝子座に対して優位に作用する階層性を示す⁹⁾。このような相加性と階層性は、唾液腺炎、血管炎にも見られる。これらの結果は、膠原病の病像が Mather K (1949) が提唱した「ポリジーン系遺伝」の概念に従う。即ち、ある閾値に規定された量的形質は一個一個の遺伝子(ポリジーン)のみでは発現しがたく、特定の複数の遺伝子の組み合わせにより相補的にはじめて発現する。

3) 感受性遺伝子座の臓器特異性と共有性

MRL/lpr マウスの肉芽腫性動脈炎は、腎臓の動脈のみならず、大動脈主分枝、四肢の動脈にも発症するが、それぞれの動脈の血管炎感受性遺伝子座を解析すると、腎臓とは異なった部位にマップされた(表1)⁹⁾。このことは、血管炎の発症にはその組織分布を規定する遺伝子が存在することを意味する。大動脈炎主分枝の血管炎感受性遺伝子座(*Aaom1*)は、第4染色体上の腎臓の血管炎の感受性遺伝子座である *Arvm1* の極近傍に存在したが、腎臓の血管炎の他の感受性遺伝子座である *Arvm2* にはまったく感受性がなかった。また、四肢の血管炎感受性遺伝子座 *Aevm1*、*Aevm2* は、それぞれ腎臓、大動脈主分枝の血管炎とはまったく異なる遺伝子座、第8染色体(33 cM)、第5染色体(65 cM)に位置していた。

一方、三つの腎炎感受性遺伝子座のうち *Agm1* と *Agm2* は、三つの血管炎感受性遺伝子座のうちの *Arvm1* と *Arvm2* にそれぞれほぼ一致するところから、血管炎と糸球体腎炎がその病理発生におけるカスケード反応を部分的に共有していると考えられる。

3. 膠原病の位置的候補遺伝子

遺伝子座から遺伝子へのアプローチは、ポリジーンの実体を明らかにする上でのネックである。我々はその解決方法の一つを、感受性遺伝子座上の遺伝子多型の解析に求め

た。

1) 血管炎、糸球体腎炎の位置的候補遺伝子 *Cd72*

腎臓の血管炎感受性遺伝子座の一つである *Arvm1* ならびに糸球体腎炎の感受性遺伝子座の一つである *Agm1* の領域には *Cd72* が位置している。*CD72* は主にB細胞に発現するII型膜貫通性タンパク質で、細胞内領域に細胞の分化、活性化に対して負のシグナルを誘導するとされるITIMモチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)を持っており、*Cd72* ノックアウトマウスではB細胞の抗原刺激に対する増殖、分化が促進するとされている。このmRNAには、MRLとC3H系マウス間で互いに異なるalternative splicingがあり、さらにMRL系マウスでは、exon 7に3塩基の挿入とexon 8に21塩基の欠失があった。このexon 8の欠失は、intron 7/exon 8 junctionのゲノム多型にあった⁸⁾(図7)。MRL系マウスの*CD72*は、ITIMモチーフは保存されているものの上記の細胞外領域の少なくとも2カ所の顕著な変異は*CD72*の機能的差異を生み出すことが推定される。

2) 糸球体腎炎の位置的候補遺伝子 *Opn* と多型タンパク質の機能解析

腎炎感受性遺伝子座の一つである *Agm3* にはオステオポンチン遺伝子 *Opn* が位置しており、MRL/lprとC3H/lprマウス間で少なくともOPNの構造変異を起こすアミノ酸置換サイトが7カ所存在する(図8)。

この2種類のOPN多型タンパク質を無細胞タンパク質合成系で合成し、*in vitro*での機能的解析を行うと、両者間に著しい機能的差異のあることがわかった¹⁰⁾。即ち、MRL型OPNはC3H型OPNに比してマクロファージのTNF α 、IL-1 β 産生誘導能が著しく高かった(図9)。また、脾細胞培養系での免疫グロブリン産生誘導能も高く、OPN多型が糸球体腎炎の発症に作用していると考えられる。

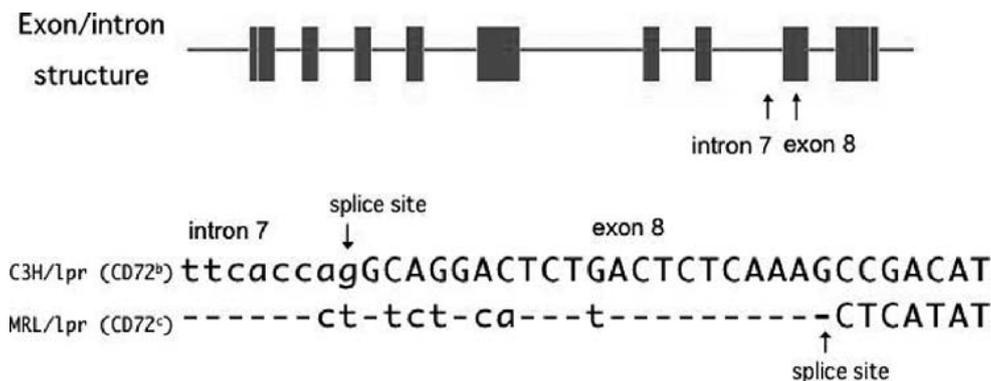


図7 血管炎、糸球体腎炎の位置的候補遺伝子 *Cd72* のゲノム多型

intron 7/exon 8 junctionのDNA多型(AG→CT)のためにAG splice siteが21塩基分下流側にずれ、exon 8に21塩基の欠失を生じ、その結果、*CD72*の細胞外ドメインの7アミノ酸の欠失が起こる。

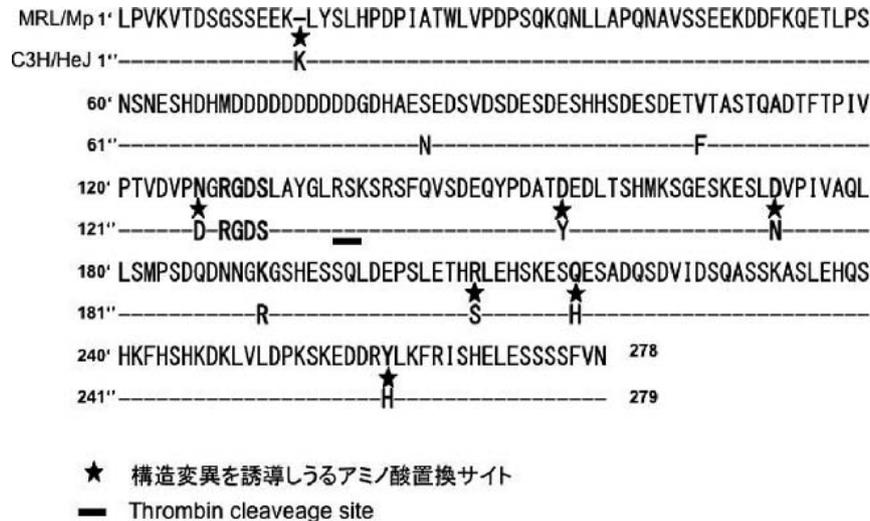


図8 糸球体腎炎の位置的候補遺伝子 *Opn* のタンパク質多型

MRL/lpr と C3H/lpr マウス間では、オステオポンチンの構造変異を生じるアミノ酸置換サイトが7カ所存在している(★)。RGDSモチーフそのものには変異は無いが、MRL/lpr マウスでは、N末端側のアスパラギン酸がアスパラギンに変異しており、インテグリンへの結合親和性に变化を及ぼすと考えられる。

4. 膠原病のポリジーンネットワーク

一般に疾病の病因論は表現型の解析に始まる。膠原病も、もともと Klemperer Pら (1942) により提唱された病理形態学的概念である。彼らは、全身性エリテマトーデスや全身性硬化症など結合組織にフィブリノイド変性という共通した組織病理学的所見を呈する疾患に対し、結合組織系の系統的疾患として collagen disease (膠原病) という疾患カテゴリーを提唱した。しかしその後、Burnet Mらにより提唱された自己免疫病の概念などを経て、現在では、結合組織疾患、リウマチ性疾患、自己免疫疾患の三つのカテゴリーを満足する疾患とされるに至っている。しかし、膠原病にみられる病像多様性が、このカテゴリーの設定からして、単に膠原病が独立した疾患の寄せ集めであるためなのか、それとも、何らかの生物学的必然性なのか、という問題は、Klemperer の提唱以来、未解決な重要課題であった。前者とするならば個々の疾患に何か特異的な病像があるはずであり、後者とすればその必然性とはいったい何なのか、ということになる。

少なくとも膠原病モデルマウスのゲノム解析をもとに得た結論は、膠原病の病像多様性は、膠原病が独立した疾患の寄せ集めであるからではなく、多型遺伝子として集団内に潜在的に分布するポリジーンの組み合わせ(ポリジーンネットワーク)により必然的に生み出されるものと考えられる。ポリジーンにおこる突然変異は、その作用が小さいため潜在的に変異を集団に伝え適応性の幅を広げる効果を持つだろう。そして、ポリジーンの組み合わせを生ぜしむるゲノム交雑は、新たな膠原病病像をも生み出すポテン

シャルを有すると考えられる。

文 献

- Murphy, E.D. & Roths, J.B. (1978) in Genetic Control of Autoimmune Disease (Rose, N.R., Bigazzi, P.E., & Werner, N. eds.), pp. 207-220, Elsevier North Holland Inc., New York.
- Nose, M., Nishimura, M., & Kyogoku, M. (1989) *Am. J. Pathol.*, 135, 271-280.
- Nose, M. (1993) in Intractable Vasculitis Syndromes (Tanabe, T. ed.), pp. 145-153, Hokkaido University Press, Hokkaido.
- Nose, M., Nishimura, M., Ito, M.R., Itoh, J., Shibata, T., & Sugisaki, T. (1996) *Am. J. Pathol.*, 149, 1763-1769.
- Lander, E. & Kruglyak, L. (1995) *Nat. Genet.*, 11, 241-247.
- Kamogawa, J., Terada, M., Mizuki, S., Nishihara, M., Yamamoto, H., Mori, S., Abe, Y., Morimoto, K., Nakatsuru, S., Nakamura, Y., & Nose, M. (2002) *Arthritis Rheum.*, 46, 1067-1074.
- Nishihara, M., Terada, M., Kamogawa, J., Ohashi, Y., Mori, S., Nakatsuru, S., Nakamura, Y., & Nose, M. (1999) *Arthritis Rheum.*, 42, 2616-2623.
- Qu, W.-M., Miyazaki, T., Terada, M., Nishihara, M., Yamada, A., Mori, S., Nakamura, Y., Ogasawara, H., Yazawa, C., Nakatsuru, S., & Nose, M. (2000) *Eur. J. Immunol.*, 30, 2027-2037.
- Yamada, A., Miyazaki, T., Lu, L.M., Ono, M., Ito, M.R., Terada, M., Mori, S., Hata, K., Nozaki, Y., Nakatsuru, S., Nakamura, Y., Onji, M., & Nose, M. (2003) *Arthritis Rheum.*, 48, 1445-1451.
- Miyazaki, T., Ono, M., Qu, W.-M., Zhang, M.C., Mori, S., Nakatsuru, S., Nakamura, Y., Sawasaki, T., Endo, Y., & Nose, M. (2005) *Eur. J. Immunol.*, 35, 1510-1520.