

## 論文の内容の要旨

論文題目： Polymorphisms of BCR Signal Inhibitory Receptor Genes (FCGR2B, CD22, and CD72) in Systemic Autoimmune Diseases -Disease Susceptibilities and Their Molecular Mechanisms-

全身性自己免疫疾患における BCR シグナル抑制型受容体遺伝子多型  
-FCGR2B, CD22, CD72 の疾患感受性およびその分子機構-

指導教員 徳永勝士教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

人見 祐基

自己免疫疾患とは、本来非自己から自己を防衛するために機能すべき免疫系が、何らかの原因により、自己をも攻撃し発症する疾患である。そのなかでも、全身性の症状を引き起こすものとして、全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) および全身性強皮症 (Systemic Sclerosis: SSc) などが挙げられる。SLE は全身性の炎症・組織障害・自己抗体産生を特徴とし、SSc は重要臓器の線維化・血管炎症状・自己抗体産生を特徴とする疾患である。しかしながら、これまでの精力的な研究による知見の蓄積にもかかわらず、これらの疾患の本質的な発症メカニズムは未だ明らかにはされていない。

これらの全身性自己免疫疾患は、遺伝要因と環境要因の総合的な寄与により発症する多因子疾患であることが知られている。遺伝要因のうち、特に SLE では、免疫系を構成する T 細胞や B 細胞の活性化および生存に関与する数々の遺伝子のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスが SLE 様の自己免疫症状を示すこと、そして、ヒト SLE における連鎖解析や関連解析により HLA・補体成分・Fcγ 受容体群などをはじめとする多数の遺伝子が人種を越えた疾患感受性遺伝子であることが報告されている。

FcγRIIB・CD22・CD72 は、いずれも B 細胞受容体 (BCR) から伝達される活性化シグナルに対する抑制型受容体である。これらの細胞内領域には Immuno-receptor tyrosine based inhibitory motif (ITIM) と呼ばれる共通の抑制性モチーフが保存されており、リン酸化された ITIM のチロシン残基とチロシンフォスファターゼが会合することにより BCR シグナルを抑制する。これらの抑制型受容体のノックアウトマウスが示す症状などにより、これらの抑制型受容体の遺伝子多型の全身性自己免疫疾患への関与が示唆されていたが、我々の研究以前には全身性自己免疫疾患との関連は報告されていなかった。

過去に我々のグループでは、ヒト *FCGR2B* 遺伝子の膜貫通領域に存在する多型 (Ile232Thr)

を検出し、アジア人集団（日本人・タイ人・中国人）にて Thr/Thr 遺伝子型を有する集団における有意な SLE 発症リスクの上昇を観察している（OR=2.3, P=0.018: Kyogoku *et al.*, 2002）。この関連は、その後の機能解析により、BCR とその共受容体とが共に存在するためのシグナル伝達の「場」である脂質ラフトへの親和性が、Thr アリル産物では低下し、その結果 BCR シグナル抑制能が減弱するためであることが明らかになっている（Kono *et al.*, 2005）。

私はこれまでに、アジア人集団を対象にして、CD72 遺伝子多型と SLE 感受性との関連解析を実施し、4 箇所のヒト CD72 遺伝子多型により構成されるハプロタイプの一つ（CD72\*2）が、腎症を合併した SLE 患者にて有意に減少することに加え、CD72\*2 を有する集団での FCGR2B-232Thr/Thr による SLE 発症リスクの減弱を併せて見出した（OR=4.6, P=0.009）。さらに私は、CD72 遺伝子の選択的スプライシングにより生ずる CD72 AS 型アイソフォームの存在を新たに確認し、CD72\*2 を持つ集団における CD72 AS 型アイソフォームの発現量の有意な上昇を観察した（P=0.000038: Hitomi *et al.*, 2004）。すなわち、この CD72 AS 型アイソフォームは何らかの理由により SLE に対する疾患抵抗性を持つと推測されていた。

本研究では第一に、CD72 AS 型アイソフォームが SLE に対する疾患抵抗性に関与する分子機構を明らかにするため、2 種類の CD72 選択的スプライシングアイソフォーム（fICD72, CD72 AS 型アイソフォーム）の全長を健常者の末梢血単核球より採取し、それぞれを内在性のヒト CD72 による影響のないマウスの細胞株へ導入し、それらの機能を比較した。

SLE 発症に B 細胞のアポトーシスの異常が関与するという知見や、マウス CD72 による BCR シグナル抑制が B 細胞のアポトーシスに必須であるという知見を背景にし、まずはマウス B 細胞株である WEHI-231.5 細胞のヒト CD72 安定発現株におけるアポトーシスの惹起の差を検討した。それぞれの細胞を抗 IgM 抗体にて架橋し、24h, 48h 後の細胞を PI 染色しフロー・サイトメトリーにてアポトーシス細胞の割合を測定したところ、この CD72 AS 型アイソフォーム産物を発現する細胞におけるアポトーシスが有意に亢進していた（P<0.001）。

CD72 は BCR シグナルに対する抑制型受容体であり、CD72 AS 型アイソフォーム産物を発現する細胞におけるアポトーシスの亢進が CD72 による BCR シグナル抑制能の差により生ずる可能性が考えられるため、次に、内在性のマウス CD22 およびマウス CD72 が欠損しているマウス B 細胞株である K46- $\mu$ v 細胞を用いて、これら 2 種類の選択的スプライシングアイソフォーム産物による BCR シグナル抑制能の検討を行った。K46- $\mu$ v 細胞に発現する BCR に対する特異的抗原である NP-BSA による BCR 架橋後、それぞれの CD72 選択的スプライシングアイソフォーム産物を発現する細胞における ERK リン酸化をウエスタン・ブロッティング法にて、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を Fulo-4 染色後フロー・サイトメトリーにて、CD72 の ITIM のリン酸化およびチロシンフォスファターゼとの会合を免疫沈降法にて検討したところ、fICD72 産物はマウス CD72 と同様に ITIM を介した BCR シグナル抑制能を有するのに対し、CD72 AS 型アイソフォーム産物はその機能を喪失していた。よって、CD72 AS 型アイソフォーム産物を発現する細胞におけるアポトーシスの亢進の原因は、CD72 による BCR シグナル抑制能の差による可能性は少ないと考えられた。

ところで、真核生物のタンパク質は小胞体（ER）内でフォールディングを受けるが、ミスフォ

ールディングされたタンパクの処理が滞る状態を ER ストレスと言ひ、アポトーシスが誘導されることが知られている。さらに、B 細胞のアポトーシスにこの ER ストレスが関与するという知見から、CD72 AS 型アイソフォーム産物によるアポトーシスの亢進に ER ストレスが関与しているか否かを検討するため、先ほど用いた WEHI-231.5 細胞を抗 IgM 抗体にて架橋し、4h, 12h 後の ER ストレス応答の構成要素の発現およびリン酸化をウエスタン・ブロッティング法にて検討した。その結果、ER ストレス応答の構成要素である CHOP 発現・eIF2 $\alpha$ リン酸化・成熟型 XBP-1 発現のいずれもが CD72 AS 型アイソフォーム産物を発現した細胞において上昇していた。

続いて、CD72 AS 型アイソフォーム産物はその表面発現量が fICD72 と比較し減弱し、ER ストレスを介したアポトーシスの亢進を導くため、CD72 AS 型アイソフォーム産物の ER への局在を検討した。マウス線維芽細胞株である Balb/c-3T3 細胞を各細胞小器官特異的なマーカータンパク質に対する抗体および CD72 に対する抗体で染色後、共焦点顕微鏡にてその共局在を観察したところ、CD72 AS 型アイソフォーム産物の ER への蓄積を確認した。

最後に、過去に行った CD72 AS 型アイソフォームの mRNA レベルでの研究と同様に、末梢血 B 細胞における内在性 CD72 AS 型アイソフォーム産物の発現が CD72\*2 を有する集団においてタンパクレベルで上昇しているか否かを、CD72 AS 型アイソフォーム産物特異的な抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法にて検討した。各 CD72 遺伝子型を有する健常者数名ずつの末梢血 B 細胞における CD72 AS 型アイソフォーム産物の発現量を比較したところ、mRNA レベルでの結果と同様に、CD72\*2 を有する集団における内在性 CD72 AS 型アイソフォーム産物の発現上昇が観察された。

以上より、CD72\*2 を有する集団では内在性 CD72 AS 型アイソフォーム産物の発現上昇が観察されるが、この CD72 AS 型アイソフォーム産物の小胞体への局在が ER ストレス応答を介してアポトーシスを惹起し、おそらく活性化した自己免疫性 B 細胞を除去することで、SLE 発症を予防している可能性が推測される。

本研究ではさらに、SSc モデルマウスの Tight skin mouse (TSK/+ mouse) における CD22 の機能異常を根拠にし、日本人集団における CD22 遺伝子多型と SSc 感受性との関連解析を併せて実施した。我々の研究グループでは過去に健常者・SLE 患者・関節リウマチ (RA) 患者を対象にした CD22 遺伝子多型スクリーニングを行っているが (Hatta *et al.*, 1999)、本研究ではその際に検出された 4 箇所の遺伝子多型を用いた。

関連解析の結果より、第 12 エクソンに存在する同義置換の多型 (c.2304 C>A) における AA 遺伝子型が SSc 患者のみに存在し、それらの患者はすべて SSc の病型の一つである限局性皮膚硬化型 (limited cutaneous SSc: lcSSc) へと分類された (P=0.008)。また、AA 遺伝子型を有する患者の CD22 遺伝子の全翻訳領域に渡って変異スクリーニングを実施したところ、この多型以外の遺伝子変異は検出されなかった。

さらに、ここで関連が検出された多型は同義置換であり、アミノ酸配列変化は生じないため、この遺伝子多型が CD22 の発現強度に関与する可能性を考え、フロー・サイトメトリーにより、この AA 遺伝子型を有する SSc 患者における CD22 発現強度を他の遺伝子型の SSc 患者と比較した。その結果、AA 遺伝子型を有する SSc 患者における CD22 発現強度の有意な減弱が観察さ

れた ( $P=0.0032$ )。

以上より、CD22 遺伝子多型により生じるアリル産物はその発現強度が減弱するため、過剰な BCR シグナル伝達による自己免疫性 B 細胞の生存および活性化を介して SSc 発症に関与している可能性が示唆された。

以上の結果を総合すると、本研究により、BCR より伝達される B 細胞活性化シグナルに対するこれら 3 つの抑制型受容体に生じた遺伝子多型は、BCR シグナル伝達に対する抑制能や B 細胞のアポトーシスの閾値を変化させ、結果として自己免疫性 B 細胞の活性化・生存あるいは除去により全身性自己免疫疾患の感受性と関連していることが、関連解析および分子機構の解明という両面から明らかになった。