

自己免疫疾患における MAIR-II の機能解明とヒト MAIR-II 相同分子の同定

新妻 耕太 (筑波大学 生物学類)

指導教員：渋谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

自己免疫疾患は、自己抗原に対して通常働く自己寛容機構が正常に機能せず、自己反応性の免疫細胞が活性化して自身の組織が障害されることにより発症する。病態に密接に関連して検出されるのが、自己抗原に対する抗体である自己抗体であり、免疫複合体の組織への沈着が炎症、障害などの誘発に関わる。また、獲得免疫系の細胞である T 細胞、B 細胞のみならず、自然免疫応答に働く細胞が自己免疫疾患の病態に関わることも明らかになってきている。

自然免疫応答の制御に働く分子である、MAIR (myeloid-associated immunoglobulin-like receptor)-II は、当研究室が新たに同定した 228 のアミノ酸からなる膜型受容体で、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 配列を有するアダプター分子である DAP12 または FcR γ 鎖と会合して活性化シグナルを伝達する。

生体内においては盲腸結紮穿孔を施した腹膜炎による敗血症を誘導したマウスでは、施術の一週間後に野生型マウスの 90% が生き残る条件で、MAIR-II 遺伝子欠損マウスは全例死亡することから、細菌の排除に重要な役割を持つことを明らかにした。

一方で、B 細胞において、MAIR-II は DAP12 と会合して細胞増殖に対して抑制的に働く結果も得られており、DAP12 遺伝子欠損マウスでは自己抗体産生が亢進することから、MAIR-II が自己抗体の産生を抑制する機構に関わっていることが示唆された。以上のことから、MAIR-II の自己免疫疾患における機能の詳細を明らかにするため、MAIR-II 遺伝子欠損マウスを用いて全身エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) のモデルマウスを用いて解析を行うこととした。

さらに、マウス MAIR-II の生体内における役割の重要性から、これまでの知見をヒトの研究に応用するべく、ヒト相同分子の同定を行い、局在と、機能の解析を行うこととした。

方法

1. 自己免疫疾患における MAIR-II の機能解明

MRL/lpr マウスは免疫細胞のアポトーシス関連遺伝子である *Fas* 遺伝子に変異があるため、リンパ球の蓄積が生じることで自己抗体産生が亢進し、多臓器慢性炎症を引き起こす SLE のモデルマウスである。このマウスを C57BL/6 (B6) マウスに戻し交配して得られた *B6/lpr* マウスは自己抗体産生の亢進を認めるも、いずれの膠原病病態を発症しない。この *B6/lpr* マウスと MAIR-II 遺伝子欠損マウスを掛け合わせることで、自己寛容の破壊した状況下での MAIR-II の機能解析を行った。

1-1. 尿中タンパク質の測定

28 週齢、雌の *Mair-II^{+/+, lpr/lpr}* (n=8), *Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* (n=6) から代謝ケージを用いて 24 時間の蓄尿を行い、尿量と尿中タンパク質を測定し、これを掛け合わせて尿中 1 日総タンパク量を算出した。尿中タンパク質はピロガールレッド法を用いて測定し、t 検定法により有意差検定を行った。

1-2. 抗二本鎖 DNA 抗体の測定

1-1 のマウスより血清を採取し、抗二本鎖 DNA 抗体を IgG, IgM の二つのサブクラスに関して抗体価を ELISA 法にて測定し、t 検定法により有意差検定を行った。

2. ヒト MAIR-II に対するモノクローナル抗体の作製

NCBI のデータベースでマウス MAIR-II との相同性が高い分子を検索したところ *LOC100130520* 遺伝子を発見し、この遺伝子がコードするタンパク質をヒト MAIR-II 候補分子とした。ヒト末梢血から CD14 陽性細胞を分離したのち、cDNA を作製し、この遺伝子に対して作製したプライマーを利用してクローニングを行った。得られた遺伝子配列から、ヒト MAIR-II の細胞外領域と、ヒトの IgG 抗体の Fc 部分をつなげたキメラタンパク質 (ヒト MAIR-II Fc タンパク質) とヒト MAIR-II を強制発現させたトランスフェクタントを作製した。

ヒト MAIR-II Fc タンパク質を Balb/c マウスに免疫することで抗ヒト MAIR-II Fc タンパク質抗体産生 B 細胞を含む膝窩リンパ節由来細胞を得た。これとミエローマ細胞である SP2/O を細胞融合し、HAT 培地選択によってハイブリドーマを作製した。一次スクリーニングとして、ヒト MAIR-II 細胞外領域のみを認識するクローンを ELISA 法で絞り込み、二次スクリーニングとしては、ヒト MAIR-II トランスフェクタントに特異的に結合する抗体を産生するクローンをフローサイトメトリー法を用いた。二次スクリーニングを経て得られたクローンをヒト MAIR-II を特異的に認識結合する抗体を産生する陽性クローンとした。

結果

1-1. 尿中 1 日総タンパク質は野生型 *Mair-II^{+/+, lpr/lpr}* に比べて、*Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* で有意に亢進が認められた。(p<0.05)

1-2 抗二本鎖 DNA 抗体は IgG、IgM とともに *Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* が高い傾向はあるが、有意な差は見られなかった。(p=0.2824, p=0.1812)

2 ヒト MAIR-II 候補分子のクローニングを行い、HAT 培地選択により 427 クローンのハイブリドーマを得た。

一次スクリーニング(ELISA 法)により 48 クローンを陽性クローンとした。二次スクリーニング(フローサイトメトリー法)により 1 クローンが陽性クローンとなり、ヒト MAIR-II 候補分子に特異的な結合する抗体を産生するクローン TX93 を樹立した。

考察と展望

1 *Mair-II^{+/+, lpr/lpr}* と比べて、*Mair-II^{-/-, lpr/lpr}* で尿中一日総タンパク質に有意差を認めたが、自己抗体価に差が見られなかったのは、抗体価に差が生じるのは 28 週齢より若いポイントであり、28 週齢では差が見られないが、腎障害の蓄積に差があったためだと考えている。今後は免疫染色法による腎障害の評価を行う。

2 TX93 の樹立に成功したことから、今後はヒト末梢血中の発現局在と機能を解析し、マウス MAIR-II の相同分子であるかの判定を行う。