

46. 新規免疫不全症の発症機構解明

徳永 文稔

*群馬大学 生体調節研究所 分子細胞制御分野

Key words : 免疫不全, インターフェロン, B細胞, NF- κ B, CRISPR/Cas9

緒言

分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency: CVID) は、低 γ グロブリン血症を特徴とする原発性免疫不全症で原因が特定されていない症候群を指す¹⁾。CVID 患者は、易感染性のため消化器や上下気道での炎症が頻発し、悪性腫瘍を併発するリスクも極めて高く、根治法はまだない。白人における CVID 発症頻度は、約 25,000 人に 1 人とされ、本邦でも多くの CVID 患者の存在が推測されている。近年、家族性 CVID の責任遺伝子として、B 細胞活性化因子受容体 (BAFF-R)、Inducible T cell co-stimulator (ICOS)、transmembrane activator and CAML-interactor (TACI) などが同定され、CD27⁺メモリー B 細胞が減少しているため抗体量の低下を導くことが明らかになったが¹⁾、詳細な疾患発症メカニズムは不明である。そのような状況の中、2012 年に欧米の研究室から LRBA (LPS-Responsive and Beige-like Anchor protein) が、新たな CVID の原因遺伝子として同定された^{2,3)}。LRBA は約 320kDa (2,580 残基) の巨大タンパク質であり、LPS で発現誘導されることが報告されている⁴⁾。家系解析から、LRBA 遺伝子のホモ接合性ノンセンスまたはミスセンス変異によって LRBA タンパク質が完全に欠損すると CVID が引き起こされると強く示唆されるが、LRBA の生理機能や CVID 発症に至る細胞メカニズムは全くの不明である。

我々は直鎖状ユビキチン鎖の産生を介して NF- κ B 経路を制御する LUBAC ユビキチンリガーゼを同定し、その機能解析を行っている⁵⁾。今回、LUBAC の相互作用因子を解析した過程で、LUBAC と LRBA の会合を見出した。NF- κ B は、自然・獲得免疫制御やリンパ球成熟、T 細胞や B 細胞の機能制御、炎症応答、細胞死制御などに中枢的な役割を果たす転写因子であり、LUBAC によって生成される直鎖状ユビキチン鎖は I κ B キナーゼ (IKK) 活性化の足場として特異的に働く。これらの知見から我々は、LRBA は炎症・免疫制御に関わるタンパク質であり、その欠損では B 細胞に機能不全を来とし、抗体産生低下を主徴とする CVID を発症するのではないかとの着想に至り、解析に着手した。

方法

1. LRBA の細胞機能解析

CRISPR/Cas9 法を用いて *Lrba* 遺伝子をノックアウトしたマウス胎児性線維芽細胞 (MEF) を構築し、様々な刺激に対するシグナル応答性を評価した。さらに、細胞分化・増殖、アポトーシスなどへの影響を解析した。

2. *Lrba*-KO マウスの作製

動物個体レベルでの LRBA の機能解析及び新たな CVID のマウスモデルの創出を進めるため、CRISPR/Cas9 法を利用して *Lrba*-KO マウスを作出し、表現型解析及び KO マウスから採取した免疫細胞を用いて各種リガンド刺激に対するシグナル伝達や抗体産生、B 細胞の成熟を解析した。

結果

1. *Lrba*-KO 細胞での炎症・免疫シグナル応答

マウス *Lrba* 遺伝子のエクソン 2 内の配列を標的として gRNA を作製し、野生型 MEF に CRISPR/Cas9 法にて導入し、制限酵素 *Ban* II の喪失を指標に細胞を取得したところ、片アレルのみ変異が導入されヘテロ接合型となった

*現所属：大阪市立大学 大学院医学研究科 分子病態学

Lrba^{+/-}と、両アレルにフレームのずれを引き起こし、*Lrba*の発現が完全に欠損した *Lrba*^{-/-}-MEF を取得した (図1)。これらの MEF の通常培養下での増殖の差はなかった。そこで、各種自然・獲得免疫刺激によって惹起するシグナル伝達経路活性化への影響を野生型 MEF と *Lrba*^{-/-}-MEF 間で比較した。その結果、polyI:C 刺激で誘導される IFN 産生経路が *Lrba*^{-/-}-MEF では亢進していることが明らかになった。これは、*Lrba* は生理的には IFN 産生経路を抑制することを示す。

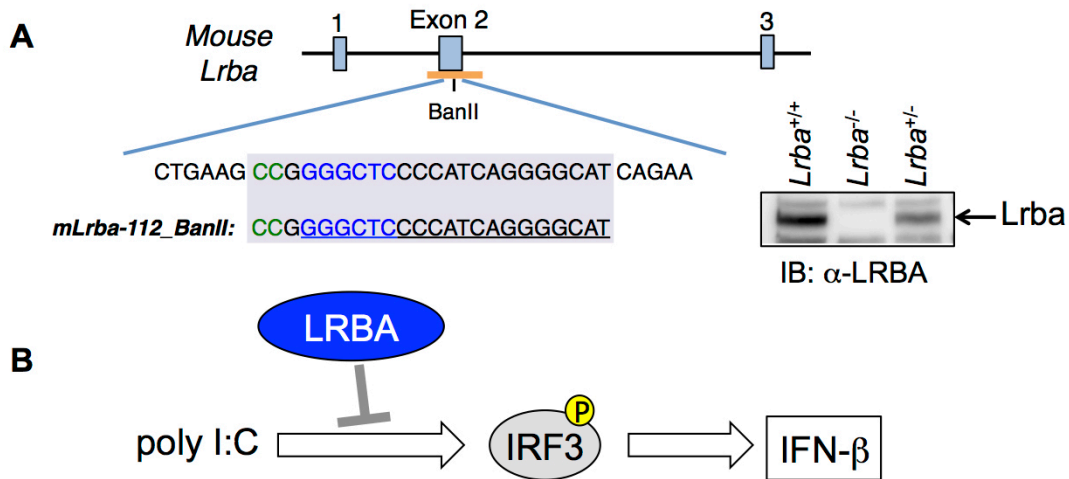


図1. CRISPR/Cas9 法による *Lrba*-KO MEF の作製とインターフェロン産生経路への影響

(A) マウス *Lrba* 遺伝子のエクソン2を標的として gRNA を作製し、*Lrba*-KO MEF を構築した。作製した *Lrba* ゲノム編集 MEF における *Lrba* タンパク質の発現レベルをイムノプロットで解析した。(B) LRBA のインターフェロン産生経路における制御部位をスキームで示した。

2. *Lrba*-KO マウスの作製

次に我々は、*Lrba* のマウス個体レベルでの機能解析と COVID モデル動物作出を目指して *Lrba*-KO マウスを上記 CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。すでに *Lrba*-KO マウスの樹立に成功しており、表現型や抗体量、免疫応答性を精査中である。*Lrba* mRNA の各臓器での発現は、腎臓、脾臓、膵臓で高く (図2A)、タンパク質レベルでは、これらの臓器以外に B 細胞でも高い発現レベルを示すことが明らかになった (図2B)。これは *Lrba* が各臓器で普遍的に発現しているものの、免疫応答に関わる組織では特に発現レベルが高い可能性を示唆している。

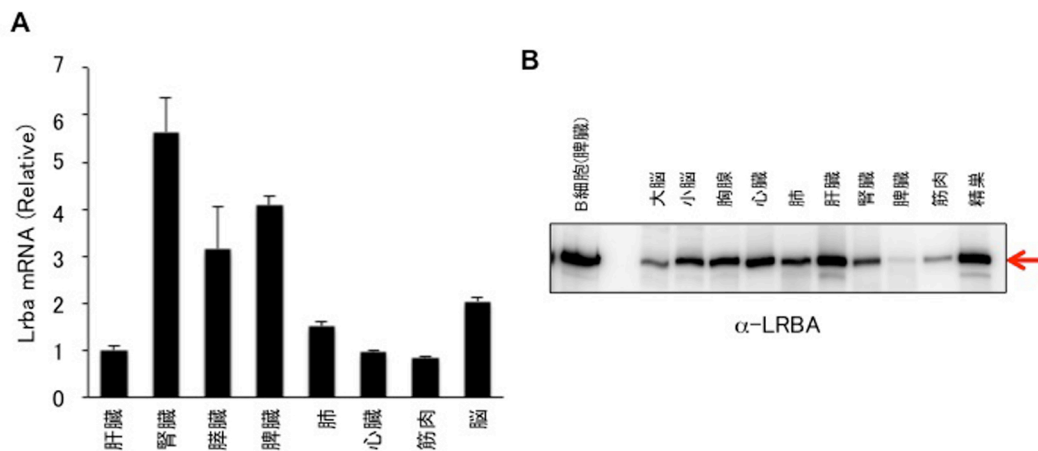


図2. マウス臓器における *Lrba* の発現解析

(A) マウス臓器における *Lrba* mRNA の定量 PCR による解析。(B) イムノプロットによる *Lrba* のタンパク質レベルでの発現解析。

これらの結果は、*Lrba* が免疫応答を中心に多様な臓器で生理機能を発揮する可能性が高いことを示唆している。今後、作出した *Lrba*-KO マウスを用いることで CVID の発症機序を明らかにするとともに、これを疾患モデルマウスとして活用し、CVID 治療を目指した創薬など化合物評価に用いる予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、群馬大学生体調節研究所の及川大輔助教、畑田出穂教授である。

文 献

- 1) Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin ME, Ma X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity—an inconvenient truth. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(8):858-64. Epub 2014/04/22. doi: 10.1016/j.autrev.2014.04.006. PubMed PMID: 24747700.
- 2) Burns SO, Zenner HL, Plagnol V, Curtis J, Mok K, Eisenhut M, et al. LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(6):1428-32. Epub 2012/09/18. doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.035. PubMed PMID: 22981790; PubMed Central PMCID: PMC3930010.
- 3) Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *American journal of human genetics*. 2012;90(6):986-1001. Epub 2012/05/23. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.04.015. PubMed PMID: 22608502; PubMed Central PMCID: PMC3370280
- 4) Wang JW, Howson J, Haller E, Kerr WG. Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both A kinase anchor proteins and *chs1/beige* proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(7):4586-95. Epub 2001/03/20. PubMed PMID: 11254716.
- 5) Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J Biochem*. 2013;154(4):313-23. Epub 2013/08/24 06:00. PubMed PMID: 23969028