

抑制性 Fc γ レセプターの免疫自己寛容制御機構の解析

The regulatory mechanism of the inhibitory Fc γ receptor in immune tolerance

大阪大学医学部 福山英啓

派遣期間 2002年4月2日～2006年7月31日

April 2, 2002 - July 31, 2006

研究機関 Laboratory of Molecular Genetics and Immunology,

The Rockefeller University, 1230 York Ave., New York, NY 10021, USA

研究指導者 Prof. Jeffery V. Ravetch

英文サマリー

Deletion of the gene encoding the Fc immunoglobulin G receptor IIB (Fc γ RIIB) results in a fulminant, lupus-like disease in C57BL/6 but not BALB/c mice. Here we have investigated this strain-specific, epistatic loss of tolerance using gene-targeted immunoglobulin variable heavy-chain (V_H) alleles 3H9 or 56R, which encode DNA-specific heavy chains, expressed on the C57BL/6 or BALB/c background. The combination of C57BL/6 and V_H 56R (B6.56R) resulted in a loss of tolerance; hybridoma and single-cell analysis indicated an Fc γ RIIB-independent

difference in immunoglobulin light-chain usage, consistent with an alteration in receptor editing. Fc γ RIIB deficiency resulted in an increase in immunoglobulin G (IgG) antibodies to DNA in the serum, an increased frequency of anti-DNA-reactive IgG⁺ B cells with a plasma cell phenotype and immune complex deposition in the glomeruli and renal disease in B6.56R mice. Thus, Fc γ RIIB provides a distal peripheral checkpoint to limit the accumulation of autoreactive plasma cells, thereby maintaining tolerance.

成果

序 論

抗DNA IgG抗体は全身性エリテマトーデスで見られる一つの特徴で、この抗体が自己免疫性腎炎の発症に関わっていると考えられている¹⁾。通常、生体内では様々なチェックポイントを設けることにより、この自己抗体の出現は抑えられている。これらの自己寛容のメカニズム解明には、自然発生、および遺伝子欠損マウスによる全身性エリテマトーデスモデルマウスが用いられてきた^{2,3)}。これらの多数が抑制性分子の欠損によるものであることが判明している⁴⁾。抑制性Fc γ レセプター、Fc γ RIIBの欠損も抗DNA抗体の産生を促し、自己免疫性糸球体腎炎を発症し、死に至らせる⁵⁾。この現象はマウスの系統によって異なる。すなわち、C57BL/6は発症し、Balb/cではこの現象は見られない^{6,7)}。

これまでに自己反応性B細胞の自己寛容が、除去、不応答、およびLight鎖の再編成などの機構により保たれていることが明らかになっている⁸⁻¹⁰⁾。私たちは、B細胞レセプター(BCR)のトランスジェニックマウスのシステムを用いて¹¹⁾、マウス遺伝学的アプローチで、抑制性Fc γ レセ

プターの欠損による自己免疫病の発症のメカニズム解明を目指した。すなわち、DNAに特異的に結合するBCRをコードするV_H遺伝子のノックインマウスとFcγRIIB欠損マウスを掛け合わせ、抗DNA-BCR : FcγRIIB欠損マウスを樹立し、解析を行った。

成 績

1. B6.56R マウスは自己寛容を破綻する

DNA 低親和性 3H9 V_H 遺伝子および DNA 高親和性 56R V_H 遺伝子は Balb/c ではともに自己寛容は維持されている¹¹⁾。56R V_H 遺伝子と C57BL/6 の組み合わせのみで自己寛容の破綻が起こり、血清中に高い IgM 抗 DNA 抗体価を認め、低いレベルではあるが有意に IgG についても抗 DNA 抗体価を認めた。

2. B6.56R マウスにおける不十分な light 鎖の再編成

Balb/c.56R は自己寛容は維持されている。これは約 140 もの V_L 遺伝子の中から、特定の V_L 遺伝子 Vκ21D 遺伝子が発現し、このイムノグロブリン (Ig) Light 鎖が DNA 高親和性 56R Ig Heavy 鎖と会合、この DNA 親和性を中和することで、自己反応性の Ig レパートリーを封印している⁹⁾。

C57BL/6.56R でこの Light 鎖の再編成についてハイブリドーマ解析にて検討した。Balb/c.56R においては 78.3%のハイブリドーマで Vκ21D 遺伝子が使われ、DNA 親和性を中和していることがすでに知られているが¹¹⁾、今回、驚いたことに Vκ21D V_L 遺伝子は C57BL/6.56R で 2%しか使用されていないことがわかった。これを確認する目的で、単一細胞 PCR 法により Vκ21D、Vκ20、Vκ38c V_L 遺伝子の使用頻度について調べてみた。

Balb/c マウスとの比較で Vκ21D と Vκ38c で大きな違いが見られ、特に Vκ21D の使用頻度が C57BL/6 で顕著に低下していることが確認できた。このことより、56R によるマウス系統による自己免疫の破綻の違いは、この不十分な Light 鎖の再編成が原因であると結論づけた。

3. B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスにおける IgG 抗 DNA 抗体の産生

マウス系統による *Fcgr2b*^{-/-}マウスの自己免疫疾患の症状の違いは Light 鎖の再編成の違いで説明が可能であるが、どうして IgG のレセプターである FcγRIIB の欠損で自己免疫病を発症するのは、この段階では説明されていない。そこで血清中に少量ながら有意に IgG 抗 DNA 抗体を産生する B6.56R と *Fcgr2b*^{-/-}マウスを掛け合わせ、B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスと B6.56R *Fcgr2b*^{+/-}マウスを樹立し、マウスの解析を行った。血清中の抗 DNA 抗体価は B6.56R *Fcgr2b*^{+/-}マウスに比べ、B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスで顕著に高い値を示した。またこれらのマウスのハイブリドーマ解析から、FcγRIIB の有無に関わらず、Vk21D V_L 遺伝子の使用頻度に違いは見られなかった。また DNA 低親和性 3H9 については FcγRIIB 欠損による影響は受けなかった。さらに IgM 抗 DNA 抗体価は FcγRIIB の欠損には影響を受けないことがわかった。これらのことから、DNA 高親和性 56R と C57BL/6 バックグラウンド組み合わせによって漏れ出た血清中の IgG 抗 DNA 抗体価は FcγRIIB によって、IgG 特異的に抑制されていることが明らかになった。

4. B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスにおける IgG⁺ 形質細胞の蓄積

ハイブリドーマの解析から、IgG アイソタイプをもつ抗 DNA 抗体産生ハイブリドーマの割合が B6.56R *Fcgr2b*^{+/-}マウスよりも B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスの方が高いことがわかった。このことは FcγRIIB 欠損により、IgG 特異的な抗 DNA 抗体価の上昇と一致する。さらに様々な B 細胞表面マーカーを使って調べた結果、IgG へのクラススイッチまでは FcγRIIB 欠損による影響は受けていないが、顕著に IgG⁺B220^{dull} CD138⁺の抗体産生細胞 (plasma 細胞)の蓄積が B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスで見られた。この細胞群は、電子顕微鏡および Immunoblot の解析から IgG を産生する高度に分化した plasma 細胞であることがわかった。このことから FcγRIIB は plasma 細胞の制御に関わっていることを示唆した。

5. 56R IgG 抗 DNA 抗体は糸球体腎炎を起こす

DNA 高親和性 56R によって発現した IgG 抗 DNA 抗体が実際に糸球体腎炎を起こし得るかを検証した。B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウス、B6.56R *Fcgr2b*^{+/-}マウス、B6.3H9 *Fcgr2b*^{-/-}マウス、B6.3H9 *Fcgr2b*^{+/-}マウスの中で B6.56R *Fcgr2b*^{-/-}マウスだけが自己免疫疾患の発症した。すなわち、IgG および C3 の糸球体への沈着が見られ、病理学的にも細胞浸潤、メザンキウム層

の肥大がみられた。このことから、IgM でなく IgG 抗 DNA 抗体の蓄積により、糸球体腎炎を引き起こすことがわかった。

考察・結論

自己寛容は、様々なチェックポイントで、巧妙なメカニズムを使って、破綻を防いでいる。この自己寛容の破綻が起きると、自己反応性 B 細胞が出現し、自己抗体を産生、この自己抗体が様々な組織に対し、あたかも自分の組織が外来抗原だと認識し、自分自身を攻撃し始める。私たちは、今回、抑制型 Fc レセプターの欠損による自己免疫疾患の発症メカニズムについて 2 つの新たな発見を報告する。一つは抑制型 Fc レセプターが自己反応性 B 細胞の出現制御に直接関与しているのではなく、B 細胞の plasma 細胞への最終分化段階で抑制を行っていることである。しかし、抑制型 Fc レセプターがどのような分子メカニズムで plasma 細胞への分化、増殖あるいは死の制御を行っているかは未解決のままである。もう一つは、抑制型 Fc レセプターの欠損による自己免疫疾患のマウス系統による発症の違いは、イムノグロブリンの Light 鎖の再編成の制御の違いによることが明らかになった。

以上をまとめると、通常、ある確率で出現する DNA に結合するような自己反応性 B 細胞は Light 鎖の再編成によって制限されている。マウス系統、さらにはヒトでは個人によって、十分な再編成が行われず、末梢に自己反応性 B 細胞が漏れ出て、最終的に BCR からのシグナルでクラススイッチを起こし、非常に危険な IgG 型自己抗体が血清中に存在することになる。最後の砦としてこれらの病原性の IgG は、抑制型の Fc レセプターによって最小限に抑えられている。

実際、自然発症型の自己免疫疾患モデルマウスにおいても、この抑制型 Fc レセプターの発現が低いことが以前より指摘されていた^{14,15)}。最近の報告から、レトロウイルスによる FcγRIIB の強制発現により、これらの自己免疫疾患モデルマウスの症状が軽減することも明らかになっている¹⁶⁾。今後、自己免疫疾患の創薬には IgG 型自己抗体産生細胞(plasma 細胞)の抑制が一つの焦点になるべきであると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、ご助成頂いた山田科学振興財団に心から感謝いたします。本研究はロックフェラー大学、分子遺伝免疫研究室の Jeffrey V. Ravetch 博士の指導のもと、Falk Nimmerjahn 博士の協力で行ったものです。以上の結果および図表は、Nature Publishing Group の許可を得て、Fukuyama H et al.: The inhibitory Fcγ receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G⁺ anti-DNA plasma cells.

Nat Immunol. 2005 Jan;6(1):99-106 に掲載されたものを一部変更・再録したものです。

参考文献

1. Peter, J.B. & Shoenfeld, Y. *Autoantibodies*, 534-539 (Elsevier, New York, NY, 1996).
2. Wakeland, E.K., Liu, K., Graham, R.R. & Behrens, T.W. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* **15**, 397-408 (2001).
3. Fields, M.L. & Erikson, J. The regulation of lupus-associated autoantibodies: immunoglobulin transgenic models. *Curr Opin Immunol* **15**, 709-717 (2003).
4. Ravetch, J.V. & Lanier, L.L. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-89. (2000).
5. Ravetch, J.V. *Fc receptors, Fundamental Immunology, Fifth Ed*, (Lippincott-Raven, Philadelphia-New York, 2003).
6. Bolland, S. & Ravetch, J.V. Spontaneous autoimmune disease in FcγRII deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* (2000).
7. Bolland, S., Yim, Y.S., Tus, K., Wakeland, E.K. & Ravetch, J.V. Genetic Modifiers of Systemic Lupus Erythematosus in FcγRIIB(-/-) Mice. *J Exp Med* **195**, 1167-1174 (2002).
8. Goodnow, C.C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-682 (1988).
9. Gay, D., Saunders, T., Camper, S. & Weigert, M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* **177**, 999-1008 (1993).
10. Tiegs, S.L., Russell, D.M. & Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* **177**, 1009-1020 (1993).

11. Li, H., Jiang, Y., Prak, E.L., Radic, M. & Weigert, M. Editors and editing of anti-DNA receptors. *Immunity* **15**, 947-957 (2001).
12. Fukuyama H *et al.* The inhibitory Fc γ receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G⁺ anti-DNA plasma cells. *Nat Immunol* **6**, 99-106 (2005)
13. Wardemann, H. *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**, 1374-1377 (2003).
14. Pritchard, N.R. & Smith, K.G. B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology* **108**, 263-273 (2003).
15. Xiu, Y. *et al.* Transcriptional regulation of Fc γ 2b gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses. *J Immunol* **169**, 4340-4346 (2002).
16. McGaha T *et al.* Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science* **307**, 590-3 (2005)