ループス腎炎発症関連遺伝子と レセプターエディティング

鈴木 登*

review article

INFLAMMATION AND REGENERATION

The IgV κ gene encoding anti-DNA autoantibody and its receptor editing in patients with SLE

A germline IgV κ gene, A 30 is preferentially used for antibodies against self-antigens including DNA. A 30 may thus be autoantibody associated IgV κ gene. The A 30 gene is receptor edited in circulating B lymphocytes from normal individuals. SLE B lymphocytes failed to edit the A 30 gene, leading to the production of anti-DNA autoantibody. Recombination activating gene (RAG) expression is essential for the receptor editing. Thus, expression of RAG proteins by peripheral blood mature B lymphocytes of normal subjects and patients with SLE has been analyzed. Normal B cells did not express RAG proteins spontaneously, and after activation with *Staphylococcus aureus* and IL-2, the B cells expressed RAGs. Recombination signal sequence (RSS) binding activity was verified by a gel shift assay in the nuclear proteins of activated B cells. Usage of a most downstream J κ , J κ 5, was evident in activated B cells expressing RAGs. λ chain and intracellular RAGs were simultaneously expressed on the purified κ +B cells after activation. Both findings suggest secondary light chain rearrangement in mature B cells. Some of RAG-expressing B cells could have failed in productive secondary rearrangement and they died via apoptosis. Thus, RAG expressing B cells would revise their surface Ig or would die, leading to elimination of the autoreactive B cells.

We found that anti-DNA autoantibody secreting B cells in patients with SLE did not express RAG spontaneously nor even after activation. Thus anti-DNA secreting B cells did not revise their Ig gene nor die via apoptosis, causing them to develop and persist autoantibody secretion by SLE B cells. These results suggest that failure of RAG reexpression in anti-DNA secreting B cells may be important for autoantibody production of SLE patients.

Rec. 6/21/2001, pp 557~563

Noboru Suzuki*

key words : SLE, anti-DNA antibody, receptor editing, RAG, B lymphocytes

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus : SLE)は代表的な臓器非特異的な全身性自己免疫疾患であり、抗DNA自己抗体をはじめとする多彩な自己抗体の産生を特徴とする¹⁾。ヒトSLEやループスモデルマウスの抗

DNA抗体の遺伝子解析が積極的行われた。その結果、正常者にもときに認められることがあるIgM型で多くの抗原と反応する、いわゆる多反応性の病原性の低い抗DNA抗体が存在することが明らかになった。さらにほとんどSLE患者のみで認められるIgG型で抗原であるDNAに対する特異性、親和性が高く病原性の強い抗DNA抗体が存在することも明らかになった²⁾。これらの

* Department of Immunology and Medicine, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教室

図 1 B細胞分化とレセプターエディティング

(自己抗体と自己免疫 2000 第 7 回自己抗体と自己免疫シンポジウム講演録集より一部改変)

抗 DNA 自己抗体 B リンパ球が実際に自己抗体を産生するのにはポリクローナルな B 細胞刺激が関わる場合と (自己) 抗原特異的な B 細胞刺激が関わる場合とが想定された³⁾。

ことに病原性の強い IgG 型抗 DNA 抗体ではその免疫グロブリン可変部遺伝子の相補性決定領域 (CDR) に多数の突然変異を認めることから、(自己) 抗原特異的な B 細胞刺激が重要と考えられている。一方、ポリクローナルな B 細胞刺激では胚細胞型免疫グロブリン遺伝子を用いる病原性の低い IgM 型抗 DNA 抗体産生に関わると考えられている。しかしながら、抗 DNA 抗体産生の詳細、ことに自己免疫寛容の破綻機構は十分明らかになっていない。

抗 DNA 抗体産生 B 細胞の免疫グロブリン遺伝子

臨床的な観察から抗 DNA 抗体には、腎臓に対

する病原性の高いものと低い (ほとんど認めない) ものの少なくとも 2 種類が存在すると考えられた。これまで筆者らは、陽性荷電抗 DNA 抗体が腎糸球体基底膜のヘパラン硫酸プロテオグリカンと交差反応することで、腎障害を誘導しやすい抗 DNA 抗体であることを報告した⁴⁾。さらに SLE 患者からこの陽性荷電抗 DNA 抗体 cDNA の遺伝子クローニングを行い、対応する胚細胞型遺伝子も同定した⁵⁾。その後、筆者らの同定した陽性荷電抗 DNA 抗体の胚細胞型遺伝子 SG 3 は Zachau らの A 30 遺伝子と同一であることが明らかになった。この A 30 遺伝子は免疫グロブリン遺伝子としての構造にはまったく異常がなく、本来ならばもっと高頻度にも使用されてもおかしくない遺伝子であるにも関わらず、ほとんど正常者のレパートリーでは使用されない遺伝子であると Zachau らにより報告された⁶⁾。

実際、これまでのところ A 30 遺伝子はすべて

図2 抗DNA抗体における胚細胞型免疫グロブリン κ 鎖遺伝子の使用と κ 鎖ローカス (Annual Review 免疫 1997 より一部改変)

自己抗体でのみその使用が報告されており, A 30 は自己抗体関連遺伝子の可能性が高い. すなわち A 30 は正常者では使用されないにもかかわらず, SLE 患者では高率に使用される遺伝子であることがわかる.

そこで SLE 患者での抗 DNA 抗体産生を考えるのには, A 30 が高頻度使用される原因の解明が必要と考え検討を開始した.

第一に A 30 遺伝子の遺伝子座に正常者とループス腎炎患者で構造上に差異があるために A 30 を用いた自己抗体産生が起こるという可能性について検討を加えた⁷⁾. SLE 患者好中球ゲノム DNA からコスミドライブラリーを作成し, A 30 遺伝子を含むコスミドクローンを同定した. A 30 遺伝子周囲の DNA シーケンスを行い, その成績をもとに多数例で PCR を行い検討したが正常者とループス腎炎患者では A 30 遺伝子座にはまったく差異を認めなかった. すなわち正常者と SLE 患者ではゲノムの構造以外の原因, おそらく自己寛容のメカニズムの異常により A 30 が使われることが示唆された⁸⁾.

自己寛容のメカニズムとしてのレセプターエディティング

自己に対する免疫寛容の機構の解明は自己抗体遺伝子トランスジェニックマウスを用いることで明らかにされた. 正常者では自己寛容はクローン性欠失 (clonal deletion), アナジー (clonal anaergy) およびレセプターエディティング (receptor

editing) により維持されている. レセプターエディティングは H-2 や hen egg lysozyme の自己抗体遺伝子トランスジェニックマウスで比較的最近知られるようになった自己寛容の機構である^{9,10)}. Gay らは抗 DNA 抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは, 内因性の軽鎖遺伝子が rearrange して, トランスジーンされた抗 DNA 抗体軽鎖遺伝子と置き換わり, 自己反応性をもたない免疫グロブリンを発現すると報告した¹¹⁾. すなわち, 抗 DNA 抗体産生においても正常マウスではレセプターエディティングが働き, 自己抗体産生は調節されていることがわかる.

レセプターエディティングは自己反応性 B リンパ球では膜結合型の自己抗原と反応することで recombination activating gene (RAG) の活性が上昇し, より上流の V κ 遺伝子と, より下流の J κ 遺伝子の間で secondary rearrangement が起こり, その自己抗体軽鎖遺伝子は不活化され, 内因性の軽鎖を発現することで, もはや B リンパ球が自己反応性をもたなくなるというメカニズムである (図 1).

これまでに文献的に報告されている SLE 患者抗 DNA 抗体での軽鎖の使用を解析した. その成績をヒト V κ 遺伝子座のうえで示しているのが図 2 である. 抗 DNA 抗体軽鎖では C κ の近傍に存在するより下流にある V κ をもっぱら使用していることがわかる. 一方, 外来抗原に対する抗体軽鎖は, 広く V κ 遺伝子座全体を使用することが知られており, それとは対照的である. この成績は抗 DNA 抗体軽鎖が primary rearrangement の

産物であること, すなわち secondary rearrangement は起こっていないことを示唆している。

筆者らが SLE 患者から同定した抗 DNA 抗体軽鎖遺伝子はより下流の V_{κ} である A 30 とより上流の J_{κ} である $J_{\kappa}2$ を使用し, 筆者らの抗 DNA 抗体軽鎖遺伝子も primary rearrangement の産物であり, ヒト SLE でも抗 DNA 抗体産生にはレセプターエディティングの異常が関与することが示唆される。

SLEB リンパ球でのレセプターエディティング

正常者では A 30 遺伝子が実際にレセプターエディティングされるのか, さらに SLE 患者ではこのレセプターエディティングのステップに異常があるのかを検討した。自己反応性の A 30 遺伝子が productive な first rearrangement により細胞表面に発現されたと仮定する。正常者ではより上流の V_{κ} とより下流の J_{κ} の secondary rearrangement が起こることにより, A 30 遺伝子はレセプターエディティングされる。この過程が inversion により引き起こされれば, B 細胞ゲノム上では rearrange した A 30+ $J_{\kappa}2$ が定常部 C_{κ} から離れて逆向きに存在することになる (図 3)。

PCR 法を用いてそれぞれ特異的なプライマーを作成し, A 30/ J_{κ} と A 30/ $J_{\kappa}2/C_{\kappa}$ の両方が増幅されれば productive であり, 一方 A 30/ J_{κ} が増幅され, A 30/ $J_{\kappa}2/C_{\kappa}$ が増幅されなければ nonproductive な rearrangement であるのか, あるいは DNA シークエンスが productive であればレセプターエディティングされたことがわかる。筆者らが検討した正常者では全例において A 30/ $J_{\kappa}2$ は増幅されたが, A 30/ $J_{\kappa}2/C_{\kappa}$ は全例で増幅されなかった。さらに正常者末梢血 B 細胞ゲノム上にエディットされて残った A 30+ $J_{\kappa}2$ 遺伝子の相補性決定部位 CDR 3 領域のシークエンスを決定すると検討した全例で productive であった。この成績は正常者では A 30+ $J_{\kappa}2$ 遺伝子がレセプターエディティングされることを示している。一方, SLE 患者では A 30/ $J_{\kappa}2$ も A 30/ $J_{\kappa}2/C_{\kappa}$ も増幅される。すなわち正常者では A 30

図 3 レセプターエディティングによる A30 遺伝子の不活性 (自己抗体と自己免疫 2000 第 7 回自己抗体と自己免疫シンポジウム講演録集より)

はエディットされており, SLE 患者では, このレセプターエディティングの機構に障害があり, 抗 DNA 抗体産生に至ることが示唆された。

成熟 B 細胞レベルでの RAG 発現

この検討を行っている際に, 筆者らは SLE 患者で産生されている抗 DNA 抗体遺伝子 mRNA とまったく同じ somatic mutation を CDR 3 領域にもつ A 30+ $J_{\kappa}2$ 遺伝子が正常者ではエディットされていることに気付いた。抗原刺激により選択された自己抗体産生 B 細胞, すなわち成熟 B 細胞レベルにおいても, 正常者ではレセプターエディティングが起こる可能性が示唆された。

これまで RAG はプロ B 細胞レベル, プレ B 細胞レベルさらに未熟 B 細胞レベルに発現されると

考えられていた。最近になりヒトやマウスの成熟B細胞でもRAGの再発現が起こることが報告された。以上の成績からは、ヒトにおいても成熟B細胞レベルでRAGの発現が起こり、自己抗体遺伝子はレセプターエディティングされる可能性が示唆された。

そこで正常者末梢血成熟B細胞でのRAG発現をウエスタンブロット法を用いて検討した。非刺激状態ではRAG 1, RAG 2の発現は認められないが、SAC+IL-2刺激、あるいは抗CD 40抗体+IL-4刺激でRAG蛋白が細胞質で発現誘導された。さらにRAGは数時間遅れて核内に移行した。B細胞の細胞免疫染色を行うと、RAG 2は大型の活性化Bリンパ球の細胞質を中心にして認められ、一部は核内にも認められた。RAG 2蛋白の発現はmediumのみ、IL-2のみ、あるいはSACのみの培養では誘導することはできず、B細胞をSAC+IL-2で刺激したときにはじめてRAG 1, RAG 2の発現が誘導され、RAGの誘導にはT細胞由来のサイトカインすなわちT細胞のヘルプが必要と考えられた。

つぎに発現されたRAG 1, RAG 2が実際に遺伝子再編成に必須なrecombination signal sequence(RSS)を認識し結合することができるのか検討した。SAC+IL-2, 抗CD 40+IL-4のいずれの刺激で誘導されたRAG複合体もRSSに結合することがゲルシフト法で確認された。

再発現したRAGによるsecondary rearrangement

誘導されたRAG複合体が実際に免疫グロブリン軽鎖の再構成に働いているかは重要な問題である。そこで遺伝子再編成を検出するligation-mediated PCR assayを用いてこの点を検討した。B細胞ゲノムDNAではRAGが作用するとJ κ 領域にsignal endが形成される。このsignal endに合成のリンカーを導入し、このリンカーに対して設定したアンチセンスプライマーとJ κ 1の上流域に設定したセンスプライマーでPCRを行う。このPCR産物をJ κ 5上流域に特異的なプローブで検出する。コントロールの反応はJ κ 5下

流域にアンチセンスプライマーを設定した以外は同様の反応を行った。もし、成熟B細胞においてrearrangementが起こり形成されるsignal endを検出する方法である。正常者B細胞をSAC+IL-2で刺激して、secondary rearrangementの証拠であるもっとも下流のJ κ 5が使用されるか検討した。刺激48時間ではJ κ 5が使用されることが明らかになり、ヒト成熟B細胞においても下流のV κ と上流のJ κ の組み合わせから、より上流のV κ とより下流のJ κ へのsecondary rearrangementが起こることが示された。

κ 鎖遺伝子座のなかでsecondary rearrangementが起こっても、このrearrangementがnon-productiveに終わったときには λ 鎖へのsecondary rearrangementへと進むと考えられる。ヒトB細胞においても λ 鎖を用いたsecondary rearrangementが起こるのかを検討する目的で、末梢血B細胞より抗ヒト λ 鎖抗体とマグネチックビーズ法を用いて κ 鎖陽性B細胞を高度に精製した。 κ 鎖陽性B細胞のみを刺激してRAGと λ 鎖の発現誘導をフローサイトメーターを用いて検討した。 κ 鎖陽性B細胞をSAC+IL-2刺激して24時間後にRAGの発現がはじまり、刺激3日後にはRAG陽性細胞の一部が λ 鎖陽性となった。この成績は正常者末梢血成熟B細胞で誘導されたRAG複合体は λ 鎖遺伝子を用いたsecondary rearrangementを起こすことが示す。

最後までB細胞の分化過程においてsecondary rearrangementがnonproductiveに終わった細胞はアポトーシスにより除去される。正常者末梢血B細胞においてもsecondary rearrangementがnonproductiveに終わった細胞はアポトーシスに陥るのかAnnexinVを用いて検討した。非刺激状態では正常者末梢血B細胞ではRAG 2発現もAnnexinVの結合も認められなかった。SAC+IL-2刺激3日後にRAGが発現し、4日後にはRAG陽性細胞の一部がAnnexinV陽性となり、アポトーシスに陥る細胞が出現することが示された。以上の成績から正常者末梢血成熟B細胞では活性化に伴いRAGが誘導され、軽鎖遺伝子の再構成が起こり、抗原特異性が変わることにより、

自己反応性B細胞は消去される,あるいは再構成が不成功に終わったときにはアポトーシスに陥り,いずれにしても自己反応性B細胞は消去されることが示された。以上の成績は,正常者において末梢血B細胞レベルでRAGが発現され,レセプターエディティングの機序で自己反応性細胞の除去が行われることを示している。

SLE 患者末梢血B細胞でのRAG発現

そこでSLE患者で認められレセプターエディティングの不調にRAG発現が関与するのかを検討した。SLE患者末梢血B細胞でのRAG発現をウエスタンブロット法で検討すると,SLEでは非刺激状態でB細胞にRAG 1, RAG 2を過剰に発現しており,SAC+IL-2刺激による発現の増強を認めなかった。この成績はループスモデルマウスB細胞で報告されているRAG過剰発現と一致した成績であるが,筆者らの予想とは大きく異なっていた。

つぎにSLE患者自己抗体産生B細胞に着目してRAG発現を検討した。SLE患者B細胞から抗DNA抗体産生B細胞を分離した。方法はビオチン化DNAを患者B細胞と反応させたあと,ストレプトアビジン-マグネチックビーズを用いて,positive selectionによりDNA結合B細胞と非結合B細胞に分離した。分離したDNA結合B細胞と非結合B細胞の培養上清中の抗DNA抗体産生をELISA法で測定すると,DNA結合B細胞のみが抗DNA抗体を産生した。このようにして分離したDNA非結合B細胞はRAGを過剰に発現し,SAC+IL-2刺激後もRAGは持続的に発現していた。

一方,DNA結合B細胞は非刺激状態でもRAGの発現は認めず,SAC+IL-2刺激を行ってもRAGの発現を認めることはなかった。同様に,DNA結合B細胞と非結合B細胞の非刺激状態でのRAGmRNAの発現を検討した。DNA非結合B細胞はRAGmRNAを過剰に発現するのに対してDNA結合B細胞ではRAGmRNAの発現がまったく認めなかった。DNA結合B細胞では

表 1 SLE 患者Bリンパ球でのRAG発現とレセプターエディティング

	抗DNA抗体 産生B細胞	抗DNA抗体以外の 抗体産生B細胞
RAG発現	認めない	過剰
Secondary rearrangement	認めない	過剰
アポトーシス	認めない 自己抗体 産生の持続	過剰

SAC+IL-2刺激を加えてもRAGmRNAの発現を誘導できなかった。すなわちSLE患者の抗DNA抗体産生B細胞は,RAGを発現できないことが示された。

SLE患者抗DNA抗体産生B細胞がRAGの発現を経てアポトーシスに陥ることがあるのかAnnexinVを用いて検討した。RAGを恒常的に発現しているDNA非結合B細胞ポピュレーションにはAnnexinV陽性細胞を認めた。これに対してRAGをまったく発現することのないDNA結合B細胞ポピュレーションにはAnnexinV陽性細胞を認めず,アポトーシスに陥る細胞はいなかった。すなわち,DNA結合B細胞はRAGを発現せず,レセプターエディティングを起こさず,アポトーシスにもならず生体内で持続しつづけることがわかった。

この点を機能的に確認する目的で抗DNA抗体遺伝子であるA30+J κ 2 mRNAの発現を検討した。SLE患者では抗DNA抗体遺伝子mRNAは非刺激でも,SAC+IL-2刺激でも発現が持続して認められた。この成績は,SLE患者抗DNA抗体産生B細胞では非刺激でもSAC+IL-2刺激でもRAGは発現されず,レセプターエディティングも起こらず,アポトーシスにもならないため,SLE患者抗DNA抗体産生B細胞が自己抗体遺伝子の発現が持続することを示している(表1)。

以上の成績から,SLE患者B細胞はおそらく自発的な活性化を反映して過剰にRAGを発現しているにもかかわらず,SLE患者抗DNA抗体産生B細胞ではRAGの発現はまったく認められない。このためにSLE患者抗DNA抗体産生B細胞

は自己反応性B細胞レセプターがレセプターエディティングを起こすことなく、またアポトーシスで除去されることもなく、抗DNA抗体産生を維持することで、SLEの病態形成に至ると考えられた。今後、このような自己抗体産生B細胞にRAGの発現を誘導することができれば、SLEの新規治療法となる可能性がある。

文 献

- 1) Hahn BH : Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 338 : 1359-1368, 1998.
- 2) Rahman A, Latchman DS, Isenberg DA : Immunoglobulin variable region sequences of human monoclonal anti-DNA antibodies. *Semin Arthritis Rheum* 28 : 141-154, 1998.
- 3) Spatz L, Iliev A, Saenko V, Jones L, Irigoyen M, Manheimer-Lory A, Gaynor B, Putterman C, Bynoe M, Kowal C, Kuo P, Newman J, Diamond B : Studies on the structure, regulation, and pathogenic potential of anti-dsDNA antibodies. *Methods* 11 : 70-78, 1997.
- 4) Suzuki N, Harada T, Mizushima Y, Sakane T : Possible pathogenic role of cationic anti-DNA autoantibodies in the development of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 151 : 1128-1136, 1993.
- 5) Harada T, Suzuki N, Mizushima Y, Sakane T : Usage of a novel class of germ-line Ig variable region gene for cationic anti-DNA autoantibodies in human lupus nephritis and its role for the development of the disease. *J Immunol* 153 : 4806-4815, 1994.
- 6) Huber C, Schable KF, Huber E, Klein R, Meindl A, Thiede R, Lamm R, Zachau HG : The V kappa genes of the L regions and the repertoire of V kappa gene sequences in the human germ line. *Eur J Immunol* 23 : 2868-2875, 1993.
- 7) Suzuki N, Harada T, Mihara S, Sakane T : Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 98 : 1843-1850, 1996.
- 8) Suzuki N, Mihara S, Sakane T : Development of pathogenic anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *FASEB J* 11 : 1033-1038, 1997.
- 9) Russell DM, Dembic Z, Morahan G, Miller JF, Burki K, Nemazee D : Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354 : 308-311, 1991.
- 10) Fang W, Weintraub BC, Dunlap B, Garside P, Pape KA, Jenkins MK, Goodnow CC, Mueller DL, Behrens TW : Self-reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-xL escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing. *Immunity* 9 : 35-45, 1998.
- 11) 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.