

血球細胞の酸化障害と血液関連自己免疫疾患

金野 祐[†], 藤井 順逸

1. はじめに

自己免疫疾患への活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の関与を示唆する報告は多数あり, 患者やモデル動物で酸化ストレスマーカーの上昇が示されている. たとえば全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) では脂質過酸化物量が増加し, 酸化修飾を受けた分子に対する抗体が生成している¹⁾. 抗酸化物質の投与でヒトおよび疾患モデル動物の症状が改善されることも, 酸化ストレスの関与を裏づける有力な証拠とされる. しかし自己免疫疾患以外のさまざまな疾患で病状の進行に伴い酸化ストレスの亢進が認められるため, 発症後の解析データのみでは酸化ストレスが疾患の原因となっているかどうか判断できない. 疾患の予防や治療の効果を高めるためには原因と結果の因果関係を明確にする必要があり, そうした目的のためには病態モデル動物の解析が有効である.

我々は約10年前に, スーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素SOD1 (superoxide dismutase 1, 図1A) を欠くマウスでは, SLEならびに合併症として高頻度に認められる自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia : AIHA) 様の症状を示すことを見いだした. その後, ROSがこうした血液系に関連する自己免疫疾患の発症に関わるとの仮説の下に研究を行ってきた²⁾. 本稿ではまずAIHAの発症への酸化ストレスの関与について概説し, さらにSLEの発症との関係について考察したい.

2. 赤血球の酸化ストレスのAIHAへの関与

SOD1の点変異は家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis) の原因として同定されていた³⁾ ことから, SOD1の欠損は個体にとって致命的であり, 生まれたとしても著しく病的な症状を示すであろうと多くの研究者が予想していた. しかし当初見いだされた最も顕著な表現型は雌マウスの不妊であった. その後世界中で研究が進められ, 現在では全身にわたってさまざまな酸化関連障害が報告されている.

我々は不妊の原因究明を目的としてSOD1欠損マウスの解析を始めたが, その過程で雌雄ともに著しい貧血を示し, 加えて赤血球に対する抗体が増加しSLE様の症状を示すことを明らかにした⁴⁾. SOD1欠損マウスは全身の細胞でSOD1を欠くため, 免疫系の制御を担う細胞が酸化障害されている可能性を考えて制御性T細胞について検討したが大きな違いは認めなかった.

免疫系がどのように関与するかを明確にするには, 臓器特異的なSOD1欠損マウスを作製して検討するのが常套手段であるが, floxマウスを保有していなかったため, 代わりに赤血球だけにSOD1を発現させることでAIHAの症状を救済できればその関与を除外できると考えた. そこでヒトSOD1 (hSOD1) を赤血球系だけで発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し, SOD1欠損マウスと交配してhSOD1を赤血球に発現し, 他の全身細胞ではSOD1を欠いているhSOD1-Tgマウスを作出した. 解析の結果, 赤血球にSOD1を有する場合には, 赤血球寿命・貧血そして自己抗体の産生といった症状が顕著に改善されたことから, SOD1欠損マウスでは赤血球の酸化障害がこうした症状をもたらす要因であると考えた⁵⁾. 最近, SOD1欠損マウスではユビキチン-プロテアソーム系の機能障害が起こっていることを見いだしており, タンパク質分解系が酸化障害の標的の一つとなっていることがわかった⁶⁾.

3. 自己免疫疾患自然発症マウスを用いた解析

ここまでは遺伝子改変マウスとして一般的に使用されているC57BL/6マウスを遺伝的背景とするマウスでの検討結果であるが, AIHAやSLEを自然発症するマウスで酸化ストレスの関与が確認できるかどうかに関心が持たれた. そ

山形大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座 (〒990-9585 山形県山形市飯田西2-2-2)

Oxidative damage on blood cells and blood-associated autoimmune diseases

Tasuku Konno[†] and Junichi Fujii (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medical Science, Yamagata University, 2-2-2 Iidanishi, Yamagata 990-9585, Japan)

[†] 現所属: 神戸大学大学院医学研究科生化学分子生物学講座シグナル統合学分野 (〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1) (Present address: Division of Molecular and Cellular Signaling, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890081

© 2017 公益社団法人日本生化学会

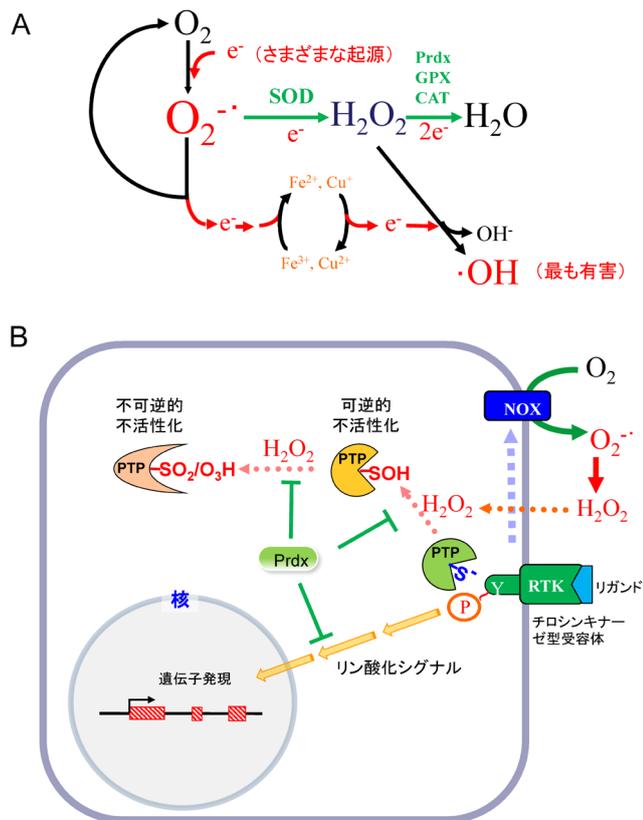


図1 細胞内リン酸化シグナル伝達のレドックス調節

(A) SODはスーパーオキシドを過酸化水素にすることで、スーパーオキシドのもつ不対電子が遷移金属(鉄や銅)を介するFenton反応によってヒドロキシラジカルの生成に向かうのを防いで抗酸化作用を発揮する。(B)チロシンキナーゼ型受容体(receptor for tyrosine kinase: RTK)にリガンドが結合すると、チロシンリン酸化が起こって下流のリン酸化シグナルが活性化される。同時にNADPH-オキシダーゼ(NOX)が活性化されてスーパーオキシドが生成し、それが過酸化水素へと変換される。過酸化水素は細胞内に入るとPTPの活性中心のシステイン(-SH)をスルフェン酸(-SOH)に酸化し、可逆的に不活性化化する。過剰な過酸化水素にさらされると酸化がさらに進んで不可逆的に不活性化され、リン酸化シグナルの異常な持続をもたらす。Prdxは過酸化水素を除去することで、リン酸化シグナルの程度を適正化する役割がある。

ここでAIHAを自然発症するNew Zealand Black (NZB) マウスに着目した。本マウスはAIHAに加えて、New Zealand White (NZW) マウスと交配した一代雑種NZB/NZW-F1マウスではSLEを自然発症するため、SLEの研究にも適用できる利点がある。NZBマウスは40週齢を過ぎたころからAIHAを、またNZB/NZW-F1マウスはSLE症状を発症するため病態モデルとして研究されてきたが、その分子機構は明確にされていない。NZBマウスがAIHAを自然発症するのに対して、NZWマウスは典型的な自己免疫様の症状を示さないに関わらず、自己免疫に関係する遺伝子異常は実はNZWマウスに起因することがこれまでの研究から明

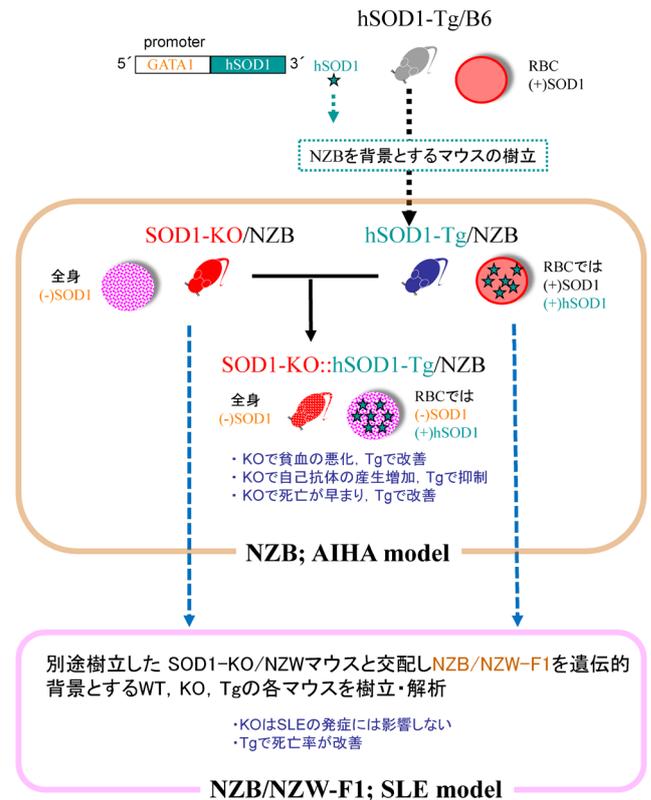


図2 SOD1に関するコンジェニック系統の樹立によるAIHAとSLE発症への酸化ストレスの関与についての検討

B6を遺伝的背景とするKOとTgマウスをNZBおよびNZWマウスとそれぞれ交配し、さらに8回以上戻し交配することでコンジェニック系統を樹立した。そのNZBマウスどうしを交配してAIHAの病態モデルを、またNZBとNZWマウスを交配してF1マウスを作出してSLEの病態について比較検討した。

らかにされている。それは、NZB以外にも、Y染色体に自己免疫に関わる変異を有するためループス腎炎を高発症するBXS系統のマウスとの一代雑種NZW/BXS-F1マウスもSLEを発症することからも裏づけられている。

我々はまずNZBマウスのAIHA発症と酸化ストレスの関連を調べた。その結果、赤血球内ROSについては、C57BL/6マウスでは加齢による変動はほとんどないが、NZBマウスの場合には赤血球内ROSが増加し、抗赤血球抗体とともに脂質過酸化物を認識する抗体も増加することがわかった⁷⁾。この結果は、NZBマウスでは何らかの遺伝的要因により赤血球系に酸化ストレスが増加することを示しており、AIHAならびにNZB/NZW-F1マウスにおけるSLEの発症にも関係する可能性を示唆している。なお、SOD・カタラーゼ(CAT)・グルタチオンペルオキシダーゼ-1(GPX1)といった遺伝子に異常は認められておらず、抗酸化系の異常を示す報告はない。

次に、こうした疾患マウスでSOD1の遺伝子改変による影響を調べた(図2)。NZBおよびNZWマウスの遺伝

子を直接改変することは困難であるため、先に作製したC57BL/6を遺伝的背景とする*SOD1*欠損ならびに*hSOD1-Tg*マウスと交配することでそれぞれのコンジュニック系統を作製した。C57BL/6を遺伝的背景とする*SOD1-KO/B6*マウスならびに*hSOD1-Tg/B6*マウスをNZBマウスおよびNZWマウスと8回以上戻し交配を行い、*SOD1-KO/NZB*・*hSOD1-Tg/NZB*・*SOD1-KO;hSOD1-TG/NZB*の3群のマウスを作製してWT/NZBマウスと比較検討を行った。その結果、*SOD1*を欠損したNZBマウスでは、予想どおり赤血球内のROS・抗赤血球自己抗体の産生・貧血・死亡率のいずれについても悪化が認められた⁸⁾。これだけならばC57BL/6で得られた結果の確認にすぎないが、*hSOD1-Tg/NZB*ではWT/NZBマウスに比べてもこうした症状が顕著に改善され、延命した。この結果は、何らかの要因でNZBマウスでは遺伝的に酸化ストレスが増加し、それがAIHAの発症にも関わることを示している。

4. SLEとその要因

SLEは1万人に1人ほどの罹患率で発病し、男女比は1対10で特に20~30代の女性に多い。細胞の核成分に対する抗体をはじめとする自己抗体が作られ、多くの臓器が障害されるため臨床所見も多彩で、AIHAの他に関節症状・皮疹・中枢神経病変・腎障害・心肺病変などが認められ、慢性に経過する。中でも糸球体腎炎（ループス腎炎）が約半数に現れ、重篤な場合はネフローゼ症候群や腎不全に進行して透析が必要になり、命に関わる場合がある。

NZB/NZW-F1マウスの他にもMRL/lprとMRL/gldマウスがSLEの病態モデル動物として知られる。MRL/lprとMRL/gldマウスは、それぞれ*Fas*と*Fas*リガンドに異常があるため、自己を認識するリンパ球が*Fas-Fas*リガンドを介するアポトーシスによって除去されないことが発症原因であることが示されている⁹⁾。しかしヒトでは*Fas*および*Fas*リガンドの遺伝子異常が原因と考えられるSLE症例はわずかであり、発症原因の大部分は不明のままである。

SLEなど一部の自己免疫疾患で典型的に増加する抗DNA抗体が、脂質過酸化物をもエピトープとして認識することが明らかになっている¹⁰⁾。そこで酸化ストレスがSLE発症の後天的要因となる可能性を検証するために、上記のNZBマウスで行ったと同様の実験を、NZB/NZW-F1マウスについても行った。すなわち*SOD1-KO;NZB/NZW-F1*と*hSOD1-Tg;NZB/NZW-F1*のコンジュニック系統を作製して、WT;NZB/NZW-F1マウスと比較検討を行った結果、NZBマウスの場合のAIHAとは異なり*SOD1*欠損によって死亡率などのSLE様症状に大きな違いは認められなかった¹¹⁾。しかし、*hSOD1*の過剰発現によって生存率などに改善が認められており、発症にROSが関与する可能性は

残されている。

5. 酸化ストレスと自己免疫性血液関連疾患

*SOD1*を欠くことで増加したROSが単に赤血球の酸化を促進する結果、抗赤血球抗体が増えるのであれば、赤血球に大量に存在するCATやGPX1といった抗酸化酵素の欠損によっても同様の症状を来すはずである。しかし、実際にはCATや赤血球中の主要なGPXである*GPX1*を欠損したマウスはAIHAを発症しない。それどころか、こうしたマウスの赤血球に過酸化水素を投与しても、野生型マウスと比較して酸化障害に違いを認めない。ところが同様に過酸化水素の消去活性を有するperoxiredoxin 2 (*Prdx2*)を欠損すると著しい貧血を来す¹²⁾。過酸化水素にはphosphotyrosine phosphatase (PTP)の活性中心のシステインを一過性に酸化することで活性を抑制し、チロシンリン酸化によるシグナル伝達を継続させる作用がある¹³⁾(図1B)。ここで*Prdx*にはCATや*GPX1*にはない、過酸化水素を消去してPTP活性を適正に保ちリン酸化シグナルが過剰に伝わるのを防ぐ役割がある。赤血球は核をはじめとする細胞小器官を欠くが、細胞外刺激に応答するリン酸化シグナル伝達機構を有しており、それが赤血球の機能や生存に関わるということが知られている。こうした点を総合して考えると、*SOD1*欠損によって亢進したROSは、単なる酸化傷害ではなくシグナル伝達に働く特定の標的分子の酸化を介してAIHAやSLEの発症に関わる可能性が考えられる。

6. 自己免疫疾患の発症に関わる遺伝的要因についての考察

これまでは主に抗酸化酵素の機能異常による自己免疫の発症の現象について紹介したが、こうした疾患マウスの遺伝的背景と分子機構についての報告を総合して考察してみたい(図3)。自己免疫疾患を保因するNZWマウスの染色体の一部を有するコンジュニック系統マウスの解析から、染色体の*Sle1b*領域のコードする遺伝子*SLAM/CD2*の異型のSLEへの関与が示唆されている¹⁴⁾。*SLAM/CD2*はリンパ球の細胞膜に存在し、細胞接着と細胞内への情報伝達を行う接着分子である。NZWマウスは*SLAM/CD2*遺伝子多型を有し、それが病態発症に関わると考えられている。しかしこの遺伝子多型単独ではSLE発症に至らず、さらに別の要因が加わることによって発症に至る。その要因は交配相手のマウスに由来するが、どのような因子かについては明確になっていない。

一方、SLE・I型糖尿病・関節リウマチといった自己免疫疾患患者のgenome-wide association studies (GWAS)から関連が示されている遺伝子の中で*PTPN22*はリンパ球特異

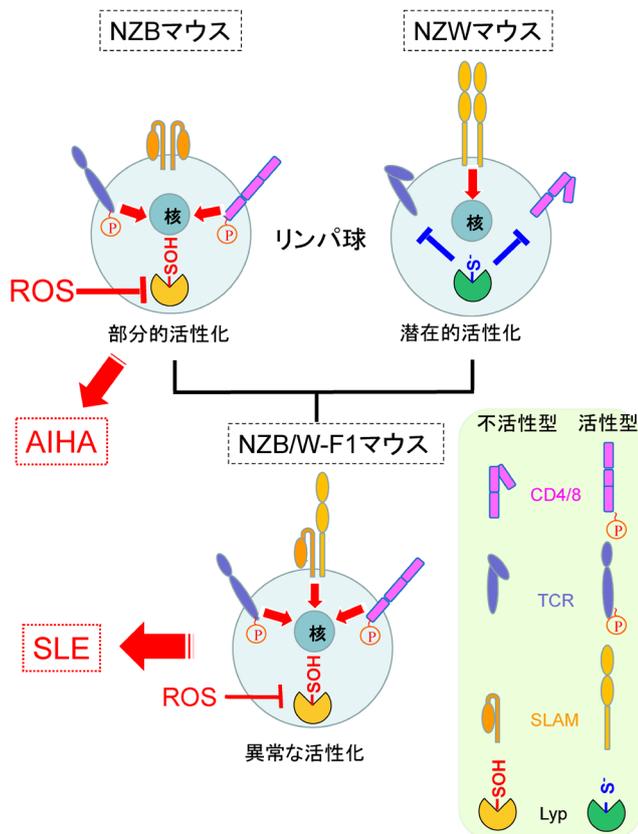


図3 NZマウスにおける自己免疫疾患発症機構に関する仮説
NZBマウスではROSによりリンパ球のLypの不活性化が起り、その結果TCRやCD4/8といった分子が活性化状態となり、NZWマウスではSLAMが恒常的に活性化した状態になると考えられる。NZB/W-F1マウスは両者の遺伝的な性質を受け継いでいるため、こうした分子が協調的に働いてSLEを発症すると考えられる。

的PTPであるLypをコードしている¹⁵⁾。マウスのオーソログ遺伝子がコードするLyp/PepはTCRやCD4/8の活性化を負に制御しているため、その活性低下はT細胞やB細胞の異常な活性化をもたらし、免疫系が制御不能に陥る可能性がある。実際にLypに変異があるリンパ球では、チロシンリン酸化レベルが増加し、抗原受容体刺激に対して感受性が高まることがわかっている。

NZBマウスでは酸化ストレスが亢進していることから、Lyp/Pepの活性が阻害され、SLAM/CD2の機能亢進をもたらす結果、免疫系の過剰応答が起こる可能性が考えられる。このNZBマウスの酸化ストレスの由来については、マウスゲノム由来するマウス白血病ウイルスの力価が高くウイルス外膜タンパク質のgp70が存在することからウイルス遺伝子の関与などが考えられるが、現段階ではまだ確定できていない。

7. 今後の展望

本稿ではROSと自己免疫疾患の発症機構との関連に焦点を当てて考察し、SLEモデルであるNZB/W-F1マウスでは、リンパ球の認識と活性化に関わる膜タンパク質の機能とチロシンリン酸化の制御異常が関与する可能性について述べた。その後の検討からSOD1のヘテロ欠損NZWマウスでも自己免疫様の症状が認められ酸化ストレス感受性が高いことがわかったため、現在分子機構について解析を進めている。このようにレドックス感受性の高いシグナル伝達経路は免疫系に限らないため、自己免疫疾患に限らず酸化ストレスに関わる他の疾患に同様の機構が関与する可能性がある。

謝辞

SOD1欠損とAIHAの関わりを明らかにするために多大な貢献をいただいた井内良仁氏（現在、山口大学農学部准教授）をはじめ、本研究にご尽力いただきました多数の共同研究者の皆様へ心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Perl, A. (2013) *Nat. Rev. Rheumatol.*, **9**, 674–686.
- 2) Fujii, J., Kurahashi, T., Konno, T., Homma, T., & Iuchi, Y. (2015) *World. J. Nephrol.*, **4**, 213–222.
- 3) Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., den Bergh, R.V., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R., & Brown, R.H. Jr. (1993) *Nature*, **362**, 59–62.
- 4) Iuchi, Y., Okada, F., Onuma, K., Onoda, T., Asao, H., Kobayashi, M., & Fujii, J. (2007) *Biochem. J.*, **402**, 219–227.
- 5) Iuchi, Y., Okada, F., Takamiya, R., Kibe, N., Tsunoda, S., Nakajima, O., Toyoda, K., Nagae, R., Suematsu, M., Soga, T., Uchida, K., & Fujii, J. (2009) *Biochem. J.*, **422**, 313–320.
- 6) Homma, T., Kurahashi, T., Lee, J., Kang, E.S., & Fujii, J. (2015) *Arch. Biochem. Biophys.*, **583**, 65–72.
- 7) Iuchi, Y., Kibe, N., Tsunoda, S., Suzuki, S., Mikami, T., Okada, F., Uchida, K., & Fujii, J. (2010) *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 935–944.
- 8) Konno, T., Otsuki, N., Kurahashi, T., Kibe, N., Tsunoda, S., Iuchi, Y., & Fujii, J. (2013) *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 1378–1384.
- 9) Strasser, A., Jost, P.J., & Nagata, S. (2009) *Immunity*, **30**, 180–192.
- 10) Otaki, N., Chikazawa, M., Nagae, R., Shimozu, Y., Shibata, T., Ito, S., Takasaki, Y., Fujii, J., & Uchida, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 33834–33842.
- 11) Otsuki, N., Konno, T., Kurahashi, T., Suzuki, S., Lee, J., Okada, F., Iuchi, Y., Homma, T., & Fujii, J. (2016) *Free Radic. Res.*, **50**, 793–800.
- 12) Lee, T.H., Kim, S.U., Yu, S.L., Kim, S.H., Park, D.S., Moon,

- H.B., Dho, S.H., Kwon, K.S., Kwon, H.J., Han, Y.H., Jeong, S., Kang, S.W., Shin, H.S., Lee, K.K., Rhee, S.G., & Yu, D.Y. (2003) *Blood*, **101**, 5033–5038.
- 13) Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A., & Böhmer, F.D. (2011) *J. Biochem.*, **150**, 345–356.
- 14) Wandstrat, A.E., Nguyen, C., Limaye, N., Chan, A.Y., Subramanian, S., Tian, X.H., Yim, Y.S., Pertsemlidis, A., Garner, H.R. Jr., Morel, L., & Wakeland, E.K. (2004) *Immunity*, **21**, 769–780.
- 15) Delgado-Vega, A., Sánchez, E., Löfgren, S., Castillejo-López, C., & Alarcón-Riquelme, M.E. (2010) *Curr. Opin. Immunol.*, **22**, 698–705.

著者寸描

●金野 祐 (この たすく)

神戸大学大学院医学研究科生化学・分子生物学講座シグナル統合学分野学術研究員、博士 (医科学)。

■略歴 1987年神奈川県に生る。2010年山形大学理学部物質生命化学科を卒業。その後、山形大学大学院医学系研究科生命環境医科学専攻博士前・後期課程を修了し、15年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞内外で産生される刺激因子が生体の恒常性や疾患の発症に及ぼす影響について解析している。

■趣味 音楽鑑賞。

●藤井 順逸 (ふじい じゅんいち)

山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座教授、医学博士。

■略歴 1982年静岡大学理学部生物学科卒業。84年同大学院理学研究科修士課程修了。同年大阪大学大学院医学研究科博士課程入学。87年大学院在籍のままトロント大学ベスト研究所留学。88年大阪大学大学院医学研究科博士課程大学院修了 (医学博士)。同年トロント大学ベスト研究所博士研究員。90年学術振興会特別研究員。91年大阪大学医学部生化学講座助手、92年同講師、96年同助教授。99年山形大学医学部生化学第二講座教授。2004年より同大学院医学系研究科教授。

■研究テーマと抱負 抗酸化系とレドックス応答の分子機構の解明。

■ウェブサイト <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/BiochemII/b2.html>