

Mini Review

DNAの分解異常による関節炎

川根公樹, 長田重一

京都大学大学院医学研究科

Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages

A large amount of chromosomal DNA is actively degraded during some physiological contexts such as programmed cell death and definitive erythropoiesis. DNase II is an acid DNase, and localized in lysosomes. It is required to degrade DNA of apoptotic cells after macrophages engulf dying cells, and also to degrade the nuclear DNA expelled from erythroid precursor cells. In the fetal liver and thymus of the DNase II^{-/-} mice, there are many abnormal macrophages which carry numerous undigested DNA, and the macrophages constitutively produce IFN- β . DNase II^{-/-} mice die *in fetu* due to severe anemia caused by the overproduction of IFN- β .

To analyze the physiological role of DNase II in adult stage, we established two mice lines: DNase II^{-/-} IFN-IR(type-I interferon receptor)^{-/-} mice and mice with an induced deletion of the DNase II gene. Here we show the two mice lines (referred to DNaseII deficient mice) develop a chronic polyarthritis resembling human rheumatoid arthritis (RA). Histology showed severe synovitis accompanied by pannus formation and bone erosion. A set of inflammatory cytokine such as IL-1, IL-6, and TNF- α genes was strongly activated in the affected joints of these mice. Macrophages in bone marrow and spleen accumulated undigested DNA. Both gene expression of TNF- α in bone marrow and concentration of TNF- α in serum were elevated in DNaseII deficient mice before the disease onset. The disease development was blocked by administration of neutralizing antibody against TNF- α or the loss of TNF- α gene indicating that TNF- α played an essential role for the arthritis caused by impaired DNA degradation. In contrast, Rag2 deficiency (thus lack of B cells and T cells) did not affect the onset of the disease. These results show the arthritis in DNaseII deficient mice is dependent of cytokines and innate immunity but independent of acquired immunity.

These findings add an evidence to the unique concept we have proposed: "*If DNA is not properly degraded, DNA causes adverse effects to organisms.*" We suggest an unexpected possibility that impaired DNA degradation can cause arthritis. Abnormal activation of macrophages or innate immunity may trigger the arthritis in some cases of human RA. DNase II deficient mice which show well resembling characteristics with human RA will contribute to reveal the pathology and develop beneficial therapies in RA.

Rec.11/25/2008, Acc.12/15/2008, pp204-208

Kohki Kawane, and Shigekazu Nagata

Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine Kyoto University

Key words rheumatoid arthritis, macrophage, innate immunity, cytokine, DNase II

DNase IIノックアウトマウスでは未分解DNAがマクロファージに蓄積し、胎生致死となる

自己の遺伝情報を担うDNAは、生体内でのいくつかの局面において、積極的に分解される。私達はDNA分解の生理的意義と分子機構を明らかにする目的で、DNA分解酵素を欠損したマウスを作製してきた¹⁾。その結果、アポトーシス細胞のDNA分解は、死細胞内で作用するCAD (caspase-activated DNase)と死細胞が貪食された後に貪食細胞のリソソームで作用するDNase IIが協調して担っていることを明らかにした²⁾。また、赤血球前駆細胞から脱核時に放出された核はマクロファージに貪食され、この核DNAはDNase IIによって分解されることも明らかにした³⁾。DNase II遺伝子が欠損し、DNA分解が妨げられると、マクロファージは未分解DNAを蓄積し、活性化されてインターフェロン(IFN)- β を産生する^{4,5)}。産生されたIFN- β はT細胞や赤血球前駆細胞の増殖、分化を抑制し、その結果、マウスは胸腺の小型化や重度の貧血を呈して胎生期で死滅する。これらの結果は、プログラム細胞死や赤血球の成熟過程で起こるDNAの分解が、胎生期における血球細胞の発生、ひいては個体の正常発生に必須であることを示した。しかし一方、DNase II遺伝子の欠損は胎生致死をもたらすため、成体マウスでDNase II遺伝子の生理的意義を解析することは不可能であった。

DNase IIを成体で欠損するマウスはヒト関節リウマチに類似した関節炎を発症した

最近私達は、成体でのDNase IIの働きを明らかにする目的で、2つの系統のDNase II欠損マウスを作製、解析した⁶⁾。1つはIFN- β の受容体、IFN-IR (Type I IFN receptor)とDNase IIの二重欠損マウス (DNase II^{-/-} IFN-IR^{-/-})である。二重欠損マウスは貧血を起こさず誕生し⁴⁾、DNase IIノックアウトマウスでの致死性貧血の原因がIFN- β であることを証明するとともに、成体における解析が可能となった。もう1つの系統として誘導型のDNase IIコンディショナルノックアウトマウス (Mx1-Cre^{Tg} DNase II^{fllox/-})を作製した。このマウスに、生後1ヵ月齢でpoly(I):poly(C)を投与することにより、IFN誘導遺伝子であるMx1遺伝子のプロモーター下に連結されたCre組換え酵素が発現し、多くの組織で、不可逆的にDNase II遺伝子が破壊される。この2系統のマウスは同様の表現型を示したことより、本稿では2つを併せてDNase II欠損マウスと表記する。

DNase II欠損マウスは、観察を続けるにつれ、前肢、後肢の末端が腫脹した (図1A)。腫脹は加齢とともに増悪化し、指が変形するとともに、関節部の可動性が著しく低下した。この所見は、二重欠損マウスでは生後2~3ヵ月くらいから観察され、5~6ヵ月までには全例で腫脹が認められた。コ

ンディショナルノックアウトマウスにおいてもpoly(I):poly(C)投与後、同様のタイムコースでこの異常が発生し、この腫脹は、DNase II遺伝子単独欠損の効果によるものと結論した。私達は、このマウスがヒト関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA)に類似した関節炎を発症しているのではないかと考えた。RAは、人口の約0.5~1.0%が罹患する慢性炎症性疾患である^{7,8)}。RAでは、関節を覆う滑膜細胞が過増殖し、pannusと呼ばれる肉芽様の炎症組織を形成する。炎症が進むと、軟骨、骨が破壊され、関節部の可動性が低下するとともに、炎症部に強い痛みをもたらす。RAの原因については不明の点が多いが、T細胞やB細胞、炎症性サイトカインなどが関与する自己免疫疾患と考えられている。

DNase II欠損マウスの関節部の組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った (図1B)。欠損マウスでは滑膜細胞が過増殖し、そこにリンパ球、マクロファージ、好中球などの免疫細胞も浸潤しており、これらが関節腔を埋め尽くしていた。pannusによって関節は浸食され、軟骨は消失していた。骨も激しく破壊されて骨髓と骨外部が貫通している部位も認められた。これら組織像はヒトRAの病理像によく類似していた。

RAでは関節の炎症部位で、炎症性サイトカインが大量に産生されることが報告されている。そこで、DNase II欠損マウスの関節組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現を、リアルタイムPCRによって定量した。すると欠損マウスでは、正常マウスに比べ、TNF- α が10倍、IL-1 β が20倍、IL-6が100倍にも大きく発現上昇しており、激しい炎症が起きていることを裏付けるとともに、このマウスでみられる関節炎がヒトRAに類似していることをさらに支持した。

また、このマウスにおいて、血清学的検査をELISAにより行ったところ、ヒトRA患者の血清中に上昇することが知られているリウマトイド因子やMMP-3 (matrix metalloproteinase-3)などがコントロールマウスに比較して有意に高い値を示した。これらの結果も、このマウスで発症する関節炎がRAに類似することを示すデータの1つといえる。一方、RA患者に高い特異性で検出される抗CCP (cyclic citrullinated peptide)抗体の上昇も認められたが、他のRAモデルマウスにおいて抗CCP抗体を検出した報告は少なく、他のアッセイ法でも確認するなど、慎重に検討を加える必要があると考えている。

DNase II欠損マウスでの関節炎にはTNF- α が必須である

次に、なぜDNase II遺伝子の欠損で関節炎が起こるのか、その原因を探った。まず、脾臓や骨髓などの造血器官において、DNAを蓄積したマクロファージが多数観察され、赤血球前駆細胞からの脱核由来DNAを蓄積していると考えられ

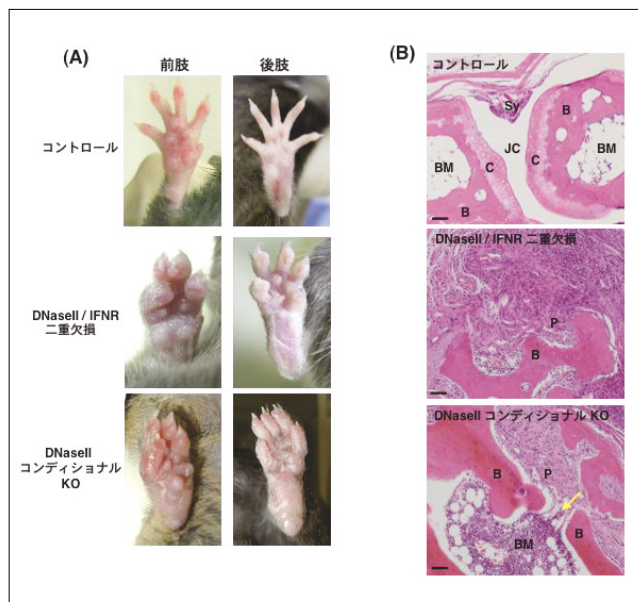


図1 DNase II欠損マウスにおける前肢, 後肢のヒトラ様病変

(A) DNase II欠損マウスにおける前肢, 後肢末端の腫脹と変形。(B) DNase II欠損マウスにおける関節炎の組織像。二重欠損マウス, コンディショナルKOマウスでは関節部で激しい炎症が起きている。矢印: 骨髄と骨外部が貫通している部位, B: 骨, C: 軟骨, BM: 骨髄, JC: 関節腔, Sy: 滑膜, P: pannus. スケールバー= 50 μ m (文献6より転載)

た。そして, DNase II欠損マウスの骨髄, 脾臓ではTNF- α 遺伝子の発現が, 正常マウスに比べ約2倍に上昇していることを見出した。この上昇は, 四肢の腫脹が観察され始める2.5ヵ月齢以前から既に観察された。加えて血清中に含まれるTNF- α は, 正常マウスでは検出限界 (20pg/ml) 以下なのに対し, 欠損マウスでは, 2.5ヵ月齢以前から約100pg/mlに達するTNF- α が検出された。次いで, 免疫染色を行った結果, DNAを蓄積したマクロファージがIFN- β ばかりでなく, TNF- α も産生していると結論した。

TNF- α はRA発症において重要な役割を果たしている代表的な炎症性サイトカインであり, TNF- α トランスジェニックマウスが関節炎を発症することから, RA発症のトリガーとなりうるとも考えられている。DNase II欠損マウスにおいて, TNF- α が関節炎発症に関与しているかを明らかにするため, TNF- α に対する中和抗体を, まだ腫脹が観察されない1ヵ月齢の時点から欠損マウスに投与し, 発症に与える影響を調べた。PBS投与DNase II欠損マウスでは2ヵ月から3.5ヵ月齢の間に四肢の腫脹が観察されたが, 中和抗体を投与した欠損マウスでは明確な腫脹は観察されなかった。また, 炎症の重篤度の指標となる, 血清中のMMP-3濃度を

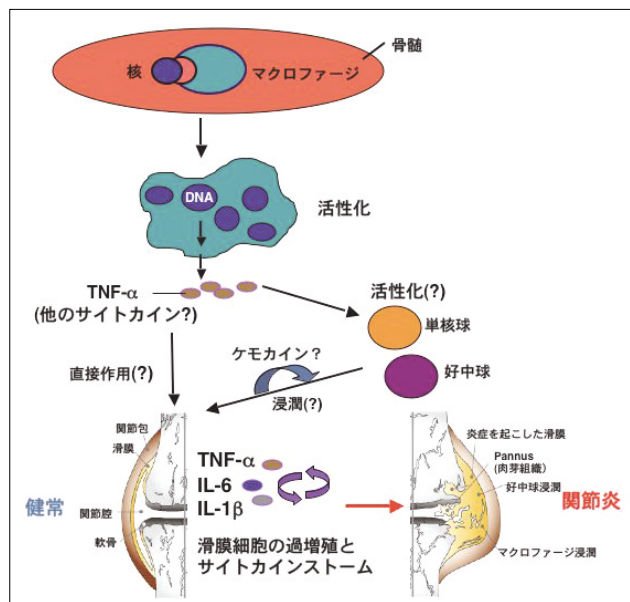


図2 DNase II欠損マウスでの関節炎発症機構のモデル (図の一部は文献16を改変したものを使用)

ELISAにより測定したところ, PBS投与群ではコントロールマウスの4倍に上昇しているのに対し, 抗体投与群では上昇はみられなかった。すなわち, 抗TNF- α 中和抗体の投与により, このマウスでの関節炎発症は抑制された。抗体投与の実験が一過的な効果をみているにすぎない可能性を否定するため, DNase II/IFN-IR/TNF- α 三重欠損マウス (DNase II^{-/-} IFN-IR^{-/-} TNF- α ^{-/-}) を作製し, 長期的な経過観察を行ったところ, 生後12ヵ月の時点でも関節炎の発症はほとんど観察されず, TNF- α が発症に必須な役割を果たしていることを遺伝学的にも証明した (未発表)。

さらなる詳細な発症機構の解明に向けて

RAでは, B細胞, T細胞といった獲得免疫が発症に関与していると考えられている。DNase II欠損マウスでの関節炎における獲得免疫の関与を検討するため, 機能的なB細胞, T細胞を共に欠損するRag2欠損マウスとの交配を行い, 三重欠損マウス (DNase II^{-/-} IFN-IR^{-/-} Rag2^{-/-}) を作製したところ, Rag2欠損下においても関節炎は発症した (未発表)。すなわち, このマウスでの関節炎は獲得免疫非依存性であることがわかった。この結果は同時に, 最近RAへの関与が注目されているTh17細胞およびIL-17も発症に必須ではないことを示している。

一方, マクロファージによるTNF- α 産生が発症に重要と考えられたが, それでは, 自己DNAの蓄積によってマクロファージにサイトカイン産生を誘導する分子機構は一体何であろうか? 私達は, 細菌の非メチル化CpG配列を認識し

て自然免疫を活性化させる Toll like receptor-9 (TLR-9) の関与を考え、TLR-9 との三重欠損マウス (DNaseII^{-/-} IFN-IR^{-/-} TLR-9^{-/-}) を作製したが、関節炎は変わらず発症した (未発表)。最近、DNA を細胞質で認識してサイトカイン産生を誘導する分子として、DAI¹⁰⁾, inflammasome システム¹¹⁾が、またDNAからのシグナル伝達に関与するアダプター分子として小胞体に存在する STING¹²⁾などが相次いで報告された。DNase II 欠損マウスでは自己DNAはリソソームに蓄積している。この一部が何らかの機構によってリソソーム外に輸送、もしくは漏洩しているかは明らかでないが、これら分子を介したシグナル伝達が発症に関与しているかを検討することは興味深いと考えられる。

以上より、DNase II 欠損マウスで関節炎が発症する機構は次のように考えられる (図2)¹³⁾。赤血球前駆細胞からの脱核由来DNAが分解されずに脾臓や骨髄のマクロファージに蓄積した結果、マクロファージは活性化されてTNF- α を産生する。TNF- α は現時点での発症のトリガーの有力候補である。TNF- α は体内を循環し、炎症刺激に対して感受性が高いと考えられている関節の滑膜細胞を刺激し、この細胞の増殖を促すとともに炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導する。もしくはTNF- α の作用は滑膜細胞に直接的なものだけではなく、単核球、好中球などを活性化させ、滑膜組織に浸潤させることにも寄与しているかもしれない。いずれにせよ、こうしてTNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインが、互いに互いの産生を増幅しあうサイトカインストームと呼ばれる状態が関節に形成されて炎症は増悪化し、最終的に骨破壊に至る重篤な関節炎を導くと結論した。TNF- α のみならず、IL-6、IL-1 β のブロックも発症を抑制する可能性が十分考えられ、今後、詳細に検討を行っていきたい。

DNase II欠損マウスはヒト関節リウマチの理解に貢献するか

今回の結果より、成体においても、DNAの分解が生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにできた。この結果は、われわれが提唱してきた、「DNAは遺伝情報を担う重要な分子である一方、分解されるべき局面で分解されないと生体に害を及ぼす」という考えに、さらに1つの証拠を加えた。また、根本原因がいまだ明らかでない関節炎において、DNAの分解異常という思いもよらない現象が、発症の原因となりうる可能性を示した。DNase II欠損マウスは、C57BL/6、C57BL/6および129の混在、Balb/cなど複数の遺伝背景 (系統) で発症が観察される。これまでに報告されている関節炎モデルマウスでは、発症が遺伝背景に依存する事例が多いことを考えると、DNase IIの欠損は、発症に対する強いリスクファクターといえることができる。

最近、ドイツのグループが、ヒトDNase II遺伝子近傍領域のsingle nucleotide polymorphism (SNP) を解析したところ、DNase II遺伝子の5'領域に存在するSNPをホモで持つ確率が、RA患者において非RA対照群の2倍高頻度でみられるという結果を報告した¹⁴⁾ことは注目に値する。RA患者において、DNAの分解異常やマクロファージの活性化が、発症のリスクファクターの1つとなっているかどうか、今後慎重に検討する必要があるだろう。そして、DNase II欠損マウスでの関節炎は獲得免疫非依存的で、サイトカイン依存的であることがわかった。T細胞、B細胞の関与が重要と考えられているRAにおいて、実はマクロファージや自然免疫の活性化のみでも関節炎が発症しうるという可能性を示唆している。近年、自己抗原が存在せず、自然免疫やサイトカインの異常により発症する免疫疾患がクローズアップされ、自己炎症性疾患という枠組みが提唱されている¹⁵⁾。RAは、多様な原因および機序により発症する、ヘテロな疾患の集合体と考えられている。RAの中の一部の群が、自己炎症性疾患の基準を満たす可能性があるのではないかと、RAの原因や発症機序については、未だに不明な点が多く残されている。DNase II欠損マウスは、ヒトのRAと類似した特徴を持つ、優れた疾患モデル動物として、発症機構の解明や新規治療法の開発に貢献することが期待される。

この解析は、当研究室の大谷真弓さん、三輪桂子さん、田中博美さんと協力して行いました。また、大阪大学大学院医学系研究科整形外科学講座の木澤卓嗣先生、吉川秀樹先生、岩手医科大学先端医療研究センターの吉岡芳親先生、神原芳行先生との共同研究によって行われました。この場をお借りしまして御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nagata S: DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, 23: 853-875, 2005.
- 2) Kawane K, Fukuyama H, Yoshida H, Nagase H, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Okada K, Iida T, Nagata S: Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol*, 4: 138-144, 2003.
- 3) Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, Takeda J, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S: Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*, 292: 1546-1549, 2001.
- 4) Yoshida H, Okabe Y, Kawane K, Fukuyama H, Nagata S: Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat Immunol*, 6: 49-56, 2005.
- 5) Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S: Toll-like receptor-independent gene induction program activated

- by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med*, 202: 1333-1339, 2005.
- 6) Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H, Nagata S: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 443: 998-1002, 2006.
 - 7) Firestein GS: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423: 356-361, 2003.
 - 8) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN: Rheumatoid arthritis. *Cell*, 85: 307-310, 1996.
 - 9) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J*, 10: 4025-4031, 1991.
 - 10) Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T: DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 448: 501-505, 2007.
 - 11) Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J: The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 452: 103-107, 2008.
 - 12) Ishikawa H, Barber GN: STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 455: 674-678, 2008.
 - 13) Nagata S: Rheumatoid polyarthritis caused by a defect in DNA degradation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19: 295-302, 2008.
 - 14) Rossol M, Pierer M, Arnold S, Keyszer G, Burkhardt H, Baerwald C, Wagner U: Homozygosity for DNASE2 single-nucleotide polymorphisms in the 5' regulatory region is associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, Sep 23, 2008.
 - 15) Samuels J, Ozen S: Familial Mediterranean fever and the other autoinflammatory syndromes: evaluation of the patient with recurrent fever. *Curr Opin Rheumatol*, 18: 108-117, 2006.
 - 16) Nijenhuis S, Zendman AJ, Vossenaar ER, Pruijn GJ, van Venrooij WJ: Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clin Chim Acta*, 350: 17-34, 2004.