

令和元年6月12日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19161

研究課題名(和文) SLEの治療法開発に向けたIRF5選択的制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms of IRF5-selective regulation towards the development of novel SLE treatment

研究代表者

藩 龍馬 (Ban, Tatsuma)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50635357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では難治性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)の新規治療標的の同定を目指し、SLE病態発症に關与する転写因子IRF5の選択的制御メカニズムの解析を行った。その結果、MAPキナーゼ(MAPK)経路によって活性化される転写因子がIRF5選択的活性制御に關与することが示唆された。さらに、マウス生体においてMAPK阻害はIRF5依存的な自然免疫応答を抑制した。MAPK経路で活性化される転写因子によるIRF5制御メカニズムを明らかにすることで、SLEをはじめとするIRF5の關連する疾患の治療法開発につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であったMAPキナーゼ経路による選択的なIRF5活性制御機構が存在することを明らかにした。IRF5はSLEのみならず、シェーグレン症候群や全身性強皮症など他の自己免疫疾患の病態発症とも關連するため、IRF5選択的制御機構の解明はこれらの疾患の治療法開発にも繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, aiming to identify novel therapeutic targets for systemic lupus erythematosus (SLE), a refractory autoimmune disease, we analyzed the selective regulatory mechanism of the transcription factor IRF5, which is involved in the pathogenesis of SLE. As a result, it was suggested that transcription factors activated via the MAP kinase (MAPK) pathway are involved in selective control of IRF5 activity. Furthermore, inhibition of MAPK resulted in suppression of IRF5-dependent innate immune responses in mice. Clarifying the mechanism of IRF5 regulation by transcription factors activated via the MAPK pathway might lead to the development of therapy for SLE and other IRF5-related diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：転写因子 IRF5 自然免疫応答 全身性エリテマトーデス MAPキナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) は自己免疫疾患の一つで、未だ決定的な治療法が存在しない。その患者数は特に先進国において年々増加しており、日本における平成 25 年度での患者数は 6 万人を超える。治療の主流は副作用の多いステロイド療法であり、新たな治療法の開発が望まれている。Interferon regulatory factor 5 (IRF5) は自然免疫応答における I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの遺伝子誘導に重要な役割を果たす転写因子である。これまで、ヒトでは全ゲノム関連解析 (GWAS)、マウスでは SLE モデルマウスを用いた研究により IRF5 が SLE の病態発症に重要であることが多数報告されている。一方で、SLE の病態発症に関わる IRF5 の制御メカニズムの詳細は不明であり、IRF5 活性化経路を標的とした SLE 治療法は未だ開発されていない。

代表者らのこれまでの研究において、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) の阻害剤が IRF5 の活性化経路に対し選択的に阻害効果を示すことが判明した。この MAPK の阻害剤は関節リウマチの治療において副作用が出たことなどネガティブな結果に終わっており、この阻害剤自体は有効性が低い。しかし、上記の研究で IRF5 経路の活性化を選択的に制御する機構が存在することが示唆されており、MAPK 経路を掘り下げて解析することでより選択性の高い IRF5 抑制方法に繋がるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、自然免疫応答における IRF5 選択的な制御メカニズムを解明することを目的とする。さらに、SLE の治療法に繋がる新規の分子標的を同定するために、SLE モデルマウスを用いたバリデーションを行う。

3. 研究の方法

① IRF5 選択的な制御メカニズムの解明

責任分子の同定：

まず、IRF5 経路の選択的制御に関与する責任分子を同定する。MAPK の下流で働くキナーゼなどを対象とし、自然免疫細胞において阻害剤実験や遺伝子工学的手法などにより IRF5 経路の活性化が選択的に制御されるかどうかを検討する。

作用点の解析：

IRF5 経路の選択的制御を担う責任分子が IRF5 経路のどのステップで働くのかを決定する。上流の細胞質における複合体形成から下流の標的遺伝子誘導の各イベントの多くについて、アッセイ系を構築済みである。また、複合体解析により、IRF5 に直接作用するような分子を同定し、IRF5 経路に対する選択性がより高い分子標的を見出す。

② In vivo における標的分子のバリデーション

SLE モデルマウスなどを用い、SLE 病態の改善に必要な IRF5 経路の抑制条件を決定する (IRF5 をコンディショナル欠損させるタイミングなど)。さらに、阻害剤や RNA 干渉 (RNAi) などにより、IRF5 経路選択的制御に関与する分子を抑制することによる効果を評価する。

4. 研究成果

(1) MAPK シグナル伝達経路下流の解析

MAPK の下流で働くキナーゼ (MAPK-APK) に着目して解析を行った結果、MAPK-APK 阻害剤の一つが IRF5 の活性化経路に対し選択的に働くことを見出した。

(2) MAPK 阻害剤と MAPK-APK 阻害剤の作用機序解析

IRF5 の活性化に重要なイベントであるリン酸化、二量体化および核移行に与える影響を解析した結果、MAPK 阻害剤はこれらのイベントを阻害しなかった。したがって、MAPK 阻害剤は核移行以後の IRF5 活性化イベントにおいて作用していることが示唆された。一方で、MAPK-APK 阻害剤は IRF5 の二量体化と核移行を部分的に阻害した。MAPK-APK 阻害剤は IRF5 タンパク質の分解を誘導しており、これにより IRF5 の二量体化と核移行が部分的に阻害されていることが判明した。また、MAPK-APK 阻害剤も IRF5 の核移行以後のイベントで作用していることが示唆された。

(3) マウスにおける阻害効果の検討

MAPK 阻害剤と MAPK-APK 阻害剤のマウス生体における阻害効果は、自然免疫受容体である Toll-like receptor (TLR) のリガンド投与 (TLR 刺激) 時における IRF5 依存性サイトカイン産生に与える影響を評価し、いずれの阻害剤もこのサイトカイン産生を抑制することが判明した (図 1)。

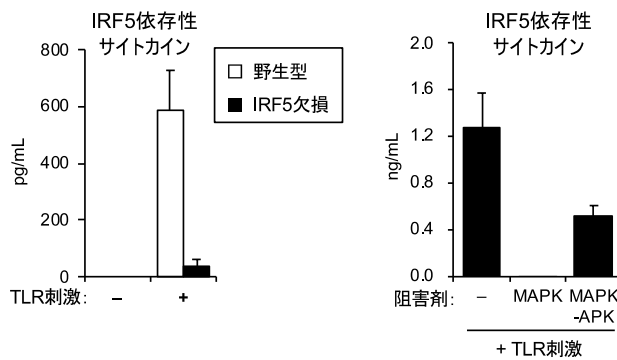


図 1. マウスにおける阻害効果

左図:野生型および IRF5 欠損マウスに TLR リガンドを投与 (TLR 刺激) した際の IRF5 依存性サイトカイン産生。
右図:野生型マウスの TLR 刺激時における IRF5 依存性サイトカイン産生に対する各阻害剤の抑制効果。

(4) MAPK 経路における IRF5 選択的制御メカニズムの解析

RNAi 実験の結果から、本研究で用いた MAPK-APK 阻害剤の標的分子をノックダウンしても IRF5 依存性サイトカイン産生は減弱しなかった。したがって、この MAPK-APK 阻害剤のオフターゲット効果の結果を見ていた可能性がある。そこで、本研究では MAPK の解析に重点を置き、その作用機序の詳細を解析した。

次世代シーケンサーを用い、IRF5 のゲノム DNA 結合ならびに遺伝子発現を網羅的に解析した。形質細胞様樹状細胞 (pDC) 株を用いて ChIP-seq ならびに RNA-seq 解析を行った結果、自然免疫刺激 (TLR 刺激) 依存的に生じる IRF5 のゲノム DNA 結合ピークのうちおよそ半数は MAPK 阻害剤により抑制され、その多くで近傍の遺伝子発現も減弱した。モチーフ解析の結果、これらのピークから IRF や MAPK 下流で活性化される AP-1 などの転写因子の結合モチーフが抽出された。したがって、MAPK 経路によって活性化される転写因子と IRF5 がゲノム DNA 上で共役しており、MAPK 阻害剤はこれを抑制することで IRF5 に対し選択的に働くことが示唆された (図 2)。

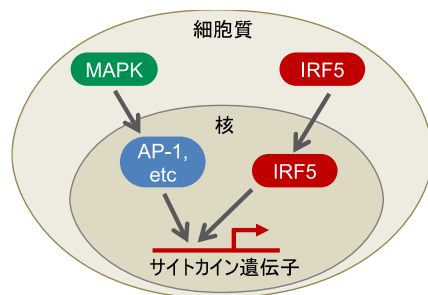


図 2. MAPK 経路による IRF5 活性制御モデル

IRF5 は自然免疫刺激によって細胞質から核に移行し、サイトカインなどの遺伝子の制御領域に結合する。MAPK によって活性化された転写因子群 (AP-1 など) は IRF5 と共役することにより IRF5 の活性制御に関与する。

今後は MAPK 下流で活性化される転写因子 (特に AP-1 以外) について、IRF5 と共役するメカニズムを解析し、IRF5 の関連する疾患の分子標的となり得るかを検討したい。

(5) SLE モデルマウスの解析

まず、in vivo 解析に用いる IRF5 コンディショナル欠損マウス (*Irf5^{lox/flox} Cre^{ER}*) を作製した。そして、SLE モデルマウスの解析では、SLE 病態を発症させた後で IRF5 をコンディショナル欠損させる実験を行い、IRF5 の抑制が実際に SLE 治療にも有効であることを示唆する結果を得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T: Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity* 45: 319-332, 2016, 査読有 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.07.015
- ② Sato GR, Ban T, Tamura T: Phos-tag Immunoblot Analysis for Detecting IRF5 Phosphorylation. *Bio Protoc* 7: e2295, 2017, 査読有 DOI: 10.21769/BioProtoc.2295
- ③ 藩龍馬, 田村智彦: 転写因子 IRF5 の活性を選択的に阻害する分子 Lyn の同定と全身性エ

リテマトーデス. *臨床免疫・アレルギー科* 67: 532-538, 2017, 査読無

<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021211284>

- ④ 藩龍馬: 全身性エリテマトーデスの治療法開発に向けた自然免疫応答制御機構の解明. *横浜医学* 69: 59-65, 2018, 査読無
<http://id.nii.ac.jp/1246/00001346/>
- ⑤ Ban T, Sato GR, Tamura T: Regulation and role of the transcription factor IRF5 in innate immune responses and systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 30: 529-536, 2018, 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxy032
- ⑥ 藩龍馬, 田村智彦: TLR-MyD88 経路と全身性エリテマトーデスにおける転写因子 IRF5 の制御と役割. *医学のあゆみ* 265: 1185-1191, 2018, 査読無
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=286590>

[学会発表] (計 9 件)

- ① Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T: A critical link between Lyn-mediated suppression of the TLR-MyD88-IRF5 pathway and the development of SLE-like disease. The Annual Meeting of the American Association of Immunologists 2016, 2016 年
- ② Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Ichino M, Yanai H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T: IRF5 hyperactivation caused by Lyn deficiency is linked to the development of SLE-like disease. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年
- ③ 佐藤豪, 藩龍馬, 西山晃, 田村智彦: 免疫系転写因子 IRF5 による転写活性化の新規調節機構とその破綻による自己免疫疾患の発症. 新学術領域研究「転写サイクル」班会議, 2016 年
- ④ 藩龍馬, 佐藤豪, 田村智彦: Lyn は TLR-MyD88 経路において転写因子 IRF5 の活性化を抑制することで自己免疫の発症を阻止する. 第 13 回麒麟塾, 2017 年
- ⑤ Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Matsumoto Y, Hihara H, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Taniguchi T, Tamura T: Selective suppression of IRF5 activity by Lyn in the TLR-MyD88 pathway restrains the development of SLE-like disease. 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, 2017 年
- ⑥ 田村智彦, 藩龍馬, 西山晃, 吉松賢太郎, 塚原克平, 日原裕恵, 松本佳子, 井上篤: 免疫系転写因子群の翻訳後修飾と機能解析を基盤とした自己免疫疾患およびがんの病態解明と治療法開発. 文科省イノベーションシステム整備事業先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第 8 回国際公開シンポジウム, 2018 年
- ⑦ Kikuchi M, Ban T, Sato GR, Manabe A, Yoshimi R, Yanai H, Taniguchi T, Ito S, Tamura T: IRF5 as a potent target beyond type I interferons for the next stage SLE therapy. 第 2 回東京理科大・横浜市大合同シンポジウム, 2018 年
- ⑧ Nishiyama A, Ban T, Fushimi K, Nakabayashi J, Kurotaki D, Tamura T: Stepwise and mutual activation of enhancers and promoters during cell differentiation. 第 41 回日本分子生物学会, 2018 年
- ⑨ Kikuchi M, Ban T, Sato GR, Manabe A, Yoshimi R, Yanai H, Taniguchi T, Ito S, Tamura T: IRF5 as a potent target beyond type I interferons for the next stage SLE therapy. 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 田村 智彦

ローマ字氏名: (TAMURA, Tomohiko)

研究協力者氏名: 西山 晃

ローマ字氏名: (NISHIYAMA, Akira)

研究協力者氏名: 佐藤 豪

ローマ字氏名: (SATO, Go)

研究協力者氏名：菊地 雅子
ローマ字氏名：(KIKUCHI, Masako)

研究協力者氏名：真鍋 昭雄
ローマ字氏名：(MANABE, Akio)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。