

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10005

研究課題名(和文)自己免疫疾患の特異的免疫記憶の分子機構の解明と治療戦略の開発

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of specific immune memory and development of therapeutic strategy for autoimmune diseases

研究代表者

有馬 雅史(Arima, Masafumi)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00202763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：2本鎖RNA編集酵素ADAR1の自己免疫疾患の病態における役割を解明するために、活性化T細胞、B細胞、マクロファージ特異的ADAR1欠損マウスについてSLEモデルの解析を行った。活性化T細胞またはB細胞特異的ADAR1欠損マウスはSLEの病態(腎炎、抗dsDNA抗体価、リンパ組織胚における中心形成とTfh細胞分化)が軽減された。マクロファージにおけるADAR1の機能は明らかでなかった。以上よりADAR1はT細胞とB細胞で機能し、獲得免疫に関与することが明らかになった。ADAR1の機能異常、特に機能亢進は獲得免疫系における自己抗体産生増加がSLEなど自己免疫疾患の発症に繋がる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答におけるリンパ球の機能制御にはダイナミックな遺伝子発現とRNA修飾が関わっているが、その詳細なメカニズムは明らかでない。自己免疫疾患における疾患特異的獲得免疫機能の詳細も不明のままである。我々は、獲得免疫における機能が明らかでないADAR1に注目し、本研究により獲得免疫機能にADAR1が関与することを見出した。また、T細胞およびB細胞におけるADAR1の機能調節機能の解明が、今後の自己免疫疾患の病態研究に繋がる可能性を示した。本研究成果は、免疫システムの解明研究の発展に貢献する点に意義がある。またSLEなど難治性自己免疫疾患に対する新規治療薬の開発へとつながる点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of the double-stranded RNA editing enzyme ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA-1) in the pathology of autoimmune diseases, we analyzed the systemic lupus erythematosus (SLE) model in mice that specifically lack ADAR1 in activated T cells, B cells, and macrophages, respectively. Mice lacking ADAR1 specifically in activated T cells or B cells had reduced SLE pathologies (nephritis, anti-dsDNA antibody titers, germinal center formation and Tfh cell differentiation in lymphoid tissues). The function of ADAR1 in macrophages was not clear. These results revealed that ADAR1 functions in T cells and B cells and is involved in adaptive immunity. It is considered that the abnormal function of ADAR1 in the adaptive immune system, especially its increased function, may cause an increase in autoantibody production, leading to the development of autoimmune diseases such as SLE.

研究分野：免疫学 アレルギー・膠原病学 呼吸器学

キーワード：自己免疫疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

獲得免疫および自然免疫の複雑な共同連携による免疫機構の様々な段階において、正常な免疫系が持つ自己抗原に対するT細胞とB細胞の免疫トレランスの破綻が自己免疫疾患の病態に深く関わると考えられるが、その発症機構は十分に理解されていない。また、SLEを代表とする膠原病を中心とする多くの自己免疫疾患に対する根治的治療はまだまだ存在しないことから、自己免疫疾患の病態の解明・理解とそれに基づく新規の効果的治療の開発が望まれている。最近、2本鎖RNA編集酵素であるAdenosine Deaminases Acting on RNA-1 (ADAR1)が遺伝学的研究や臨床研究により自己免疫疾患の発症に関与することが報告されている。しかし、その免疫学および病理的役割の詳細は明らかでない。

獲得免疫において胚中心 (Germinal Center; GC) でB細胞は高親和性IgG抗体産生細胞としてメモリーB細胞や長期生存形質細胞に分化する。この過程進行に活性化follicular helper T (Tfh)細胞から分化するGC-Tfh細胞が必須である。SLEなど膠原病で検出される種々の高親和性自己抗体産生B細胞は自己トレランスの破綻が関与してGC依存性に抗体産生が促進すると考えられている。また、微生物由来の核酸成分がToll様受容体 (TLR7/9) を介して発動する自然免疫系も自己免疫疾患に関与する可能性があり、TLRシグナルは形質細胞様樹状細胞 (pDC) の抗原提示能やIL-6およびI型IFNの産生を亢進してポリクローナルなB細胞の活性化・増殖を促進して自己抗体産生を誘導すると考えられている。

ADAR1は、アデノシンからイノシンに塩基編集するRNA編集酵素として同定された。ADAR1はmicroRNA(miRNA) プロセッシングに対し拮抗的に働きmiRNAの最終的に産生量を減少させるが、ADAR1-Dicerヘテロ2量体は2本鎖RNA切断を活性化し、miRNAの産生を促進する (Ota et al, *Cell* 2013) ことが報告されている。最近、Tfh細胞がmiRNA-155などmiRNA群により分化や機能制御が行われていることが報告され (Kang SG, et al. *Nat Immunol* 2013)、ADAR1は、Tfh細胞におけるmiRNAの質的・量的な機能調節を介した獲得免疫機構の制御が推測される。

細胞内ウイルスRNAセンサーであるMDA5はウイルス由来の2本鎖RNAを認識して感染時の自己RNAの保護や外来性RNAの排除に関与するために自然免疫応答を誘導する。MDA5点変異マウスでは、SLE様症状が発症することが報告されている。その機序として、pDCやマクロファージの持続的な活性化によるI型IFNや炎症性サイトカイン産生および形質細胞分化誘導促進による抗体の過剰産生が考えられている (Funabik et al, *Immunity* 2014)。さらに最近、ADAR1の生理的機能として、自己のRNAを塩基編集することによりMDA5による認識を回避して自然免疫発動後の自己免疫疾患発症を予防する可能性が示唆された (Deshan et al, *Cell Mol Immunol* 2015) ことから、ADAR1の機能異常が自己免疫疾患の病態に深く関与する可能性に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究はADAR1遺伝子改変マウスを用いた自己免疫疾患動物モデルを解析して、ADAR1の免疫系における役割を明らかにし、疾患特異的な免疫機構の解明に繋がる探索的研究を行うことにより、ADAR1に着目した治療応用の基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

膠原病性モデルにおける発症に対する ADAR1 の役割

(1) SLE マウスモデルは、TLR7 アゴニストである Imiquimod を耳介に経皮的に週3回、6週間反復塗布投与することによりモデルが成立し、抗DNA抗体が検出され、ループス様腎炎や肺病変を発症する。自己免疫疾患発症においてADAR1が関与する免疫系細胞を明らかにするために野生型マウスと共に以下のADAR1コンディショナル(c)KOマウスについてImiquimod投与開

始前から SLE モデル成立後において解析を行った。

① 活性化 T 細胞特異的 ADAR1cKO マウス

ADAR1flox/flox マウスと OX40 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させたマウスを交配して作製 (OX40-Cre-ADAR1-KO)。

② B 細胞特異的 ADAR1cKO マウス

ADAR1flox/flox マウスと CD20 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させたマウスを交配して作製 (CD20-Cre-ADAR1-KO)。

③ マクロファージ特異的 ADAR1cKO マウス

ADAR1flox/flox マウスと LysM 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させたマウスを交配して作製 (Lys-Cre-ADAR1-KO)。

(2) SLE モデル成立後に①腎糸球体病変および頸部リンパ節と脾臓における胚中心 (GC 形成) について病理組織学的解析。②腎糸球体における IgG および補体 C3 の沈着について免疫組織化学染色により解析。③尿中蛋白の判定量測定。

(3) SLE モデル成立まで継時的に血清中の抗 dsDNA 抗体の抗体価を ELISA 法での測定。

(4) SLE モデル成立後に頸部リンパ節と脾臓における GC-B 細胞、GC-Tfh 細胞、pDC を含む DC サブタイプ、形質細胞の出現についてフローサイトメトリー法による解析。

#### 4. 研究成果

(1) SLEモデルにおいて野生型マウスで認められる頸部リンパ節と脾臓におけるGC形成、糸球体係蹄の肥厚、メサンギウム細胞増多、および半月体形成などの腎糸球体病変はOX40-Cre-ADAR1-KOマウス、CD20-Cre-ADAR1-KOマウスいずれにおいて軽減する傾向を示した。またメサンギウムにIgGやC3の沈着、および尿蛋白量も同様にいずれのcKOマウスで軽減しており、腎病変の軽症化が示唆された。一方、Lys-Cre-ADAR1-KOマウスでは野生型と比べて腎病変の差を認めなかった。以上よりADAR1はT細胞およびB細胞において機能し、その機能異常は自己免疫疾患の発症に関与することが示唆された。マクロファージにおけるADAR1の機能は明らかでなかった。

(2) SLE成立後まの期間における継時的な抗dsDNA抗体価はOX40-Cre-ADAR1-KOマウス、CD20-Cre-ADAR1-KOマウスいずれにおいても野生型と比較して著しく減少した。一方、Lys-Cre-ADAR1-KOマウスでは野生型と比べて差を認めなかった。また、SLEモデル成立後の野生型マウスで認められた頸部リンパ節と脾臓におけるGC-B細胞、GC-Tfh細胞、形質細胞、pDCの出現頻度増加もOX40-Cre-ADAR1-KOマウス、CD20-Cre-ADAR1-KOマウスいずれにおいても減少した。以上よりADAR1はT細胞およびB細胞において機能しており、その機能異常は獲得免疫系機能に影響を与えることが示唆された。マクロファージにおけるADAR1は明らかでなかった。

(まとめ) 本研究よりADAR1はT細胞およびB細胞において機能しており、獲得免疫に関与することが明らかになった。ADAR1の機能は生理的な免疫応答に働く一方、その機能異常、特に機能亢進による獲得免疫系における自己抗体産生増加がSLEなど自己免疫疾患の発症に繋がる可能性が考えられた。また、本研究でSLEモデルの発症にT細胞とB細胞いずれもが深く関与することが示されたことから、自己免疫疾患の病態コントロールに獲得免疫機能制御の重要性が確認された。ADAR1はRNAとDNAのクロストークによるゲノム機能調節因子として重要な役割を果たしている可能性があると考えられることから、本研究の成果は将来、免疫系細胞の機能制御機構の解明と新規の治療開発へとつながる点に意義があると思われる。今後、自己免疫疾患における疾患特異的免疫ネットワーク形成メカニズムの解明を目指し、更にADAR1の研究を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ogasawara Takashi, Kohashi Yuko, Ikari Jun, Taniguchi Toshibumi, Tsuruoka Nobuhide, Watanabe-Takano Haruko, Fujimura Lisa, Sakamoto Akemi, Hatano Masahiko, Hirata Hirokuni, Fukushima Yasutsugu, Fukuda Takeshi, Kurasawa Kazuhiro, Tatsumi Koichiro, Tokuhisa Takeshi, Arima Masafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Allergic TH2 Response Governed by B-Cell Lymphoma 6 Function in Naturally Occurring Memory Phenotype CD4+ T Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurasawa Kazuhiro, Arai Satoko, Namiki Yumeko, Tanaka Ayae, Takamura Yuta, Owada Takayoshi, Arima Masafumi, Maezawa Reika	4. 巻 57
2. 論文標題 Tofacitinib for refractory interstitial lung diseases in anti-melanoma differentiation-associated 5 gene antibody-positive dermatomyositis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2114~2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/key188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Hirokuni, Yukawa Tatsuo, Tanaka Ayae, Miyao Tomoyuki, Fukuda Takeshi, Fukushima Yasutsugu, Kurasawa Kazuhiro, Arima Masafumi	4. 巻 49
2. 論文標題 Th2 cell differentiation from naiveCD4+T cells is enhanced by autocrineCCchemokines in atopic diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Allergy	6. 最初と最後の頁 474~483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.13313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Tanaka A, Kurasawa K, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Owada T, Maezawa R, Arima M
2. 発表標題 Risk Factors of Newly Developing/Worsening Pulmonary Abnormalities in Rheumatoid Arthritis
3. 学会等名 American College of Rheumatology's Annual Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka A, Namiki Y, Yamazaki R, Okada H, Arai S, Owada T, Maezawa R, Arima M, Kurasawa K
2. 発表標題 Cluster analysis of pulmonary lesions in rheumatoid arthritis (RA); Airway disease is shared and critical pulmonary abnormality in RA
3. 学会等名 European League Against Rheumatism (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arima M
2. 発表標題 The role of B-cell lymphoma 6 (Bcl6) in the pathogenesis of allergic and autoimmune diseases
3. 学会等名 The Annual Meeting of Rheumatism and Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka A, Kurasawa K, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Owada T, Maezawa R, Arima M
2. 発表標題 The risk factors for severe exacerbation of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis under bDMARDs
3. 学会等名 European League Against Rheumatism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka A, Kurasawa K, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Owada T, Maezawa R, Arima M
2. 発表標題 Analysis of Sequential Development of Pulmonary Lesions in Patients with Rheumatoid Arthritis
3. 学会等名 American College of Rheumatology 's Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurasawa K, Arai S, Takamura Y, Miyao T, Tanaka A, Yamazaki R, Owada T, Maezawa R and Arima M
2. 発表標題 Relationship between autoantibodies and cytokine profiles in patients with myositis
3. 学会等名 European League Against Rheumatism (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 彩絵, 高村 雄太, 宮尾 智之, 山崎 龍太郎, 新井 聡子, 大和田 高義, 前澤 玲華, 有馬 雅史, 倉沢 和宏
2. 発表標題 関節リウマチの関節外病変 生物学的製剤投与下における関節リウマチ肺病変の増悪危険因子の解析
3. 学会等名 62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 並木 夢子, 倉沢 和宏, 新井 聡子, 高村 雄太, 宮尾 智之, 田中 彩絵, 山崎 龍太郎, 大和田 高義, 前澤 玲華, 有馬 雅史
2. 発表標題 筋炎合併間質性肺炎の肺内サイトカイン動態解析 ARSと抗MDA5抗体陽性者の相違
3. 学会等名 62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉沢 和宏, 新井 聡子, 田中 彩絵, 高村 雄太, 宮尾 智之, 山崎 龍太郎, 大和田 高義, 前澤 玲華, 有馬 雅史
2. 発表標題 治療抵抗性抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎合併間質性肺炎へのTofacitinibの効果と安全性
3. 学会等名 62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉沢 和宏, 新井 聡子, 高村 雄太, 宮尾 智之, 山崎 龍太郎, 田中 彩絵, 大和田 高義, 前澤 玲華, 有馬 雅史
2. 発表標題 筋炎患者における自己抗体と血清サイトカインプロファイルの関連
3. 学会等名 63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福島 康次  (Fukushima Yasutsugu)  (00254996)	獨協医科大学・医学部・教授   (32203)	
研究分担者	幡野 雅彦  (Hatano Masahiko)  (20208523)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	
研究分担者	谷口 俊文  (Taniguchi toshibumi)  (20724826)	千葉大学・医学部附属病院・講師   (12501)	
研究分担者	倉沢 和宏  (Kurasawa Kazuhiro)  (30282479)	獨協医科大学・医学部・教授   (32203)	
研究分担者	杉山 公美弥  (Sugiyama Kumiya)  (30364582)	獨協医科大学・医学部・教授   (32203)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大和田 高義  (Owada Takayoshi)  (30456016)	獨協医科大学・医学部・講師    (32203)	
研究 分 担 者	平田 博国  (Hirata Hirokuni)  (60326890)	獨協医科大学・医学部・准教授    (32203)	