

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16157

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおけるTRIMファミリーの役割について

研究課題名(英文) The role of the TRIM family in systemic lupus erythematosus

研究代表者

神山 玲光 (KAMIYAMA, Reikou)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10739527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Trim39ノックアウトマウスを作成し、TRIM39の免疫学的役割を解析した。その結果、Trim39^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べ胸腺と脾臓の重量が有意に大きく、脾臓の細胞数が有意に多かった。Trim39^{-/-}マウスのB細胞ではSTAT1の発現量が野生型と比較して有意に亢進していた他、Trim39^{-/-}マウスにおいて血中IL-27の濃度が有意に高く、血中のIgG1やIgAの濃度は有意に低かった。また、IgAについては糞便中のIgA量がTrim39^{-/-}マウスにおいて有意に低かった。Trim39^{-/-}マウスではDSS誘発腸炎が重症化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRIMファミリーは自然免疫と獲得免疫の両方において様々な役割を担っていることを示す様々な基礎的な報告がみられるが、SLEを含め膠原病疾患において病態への関与を示した報告はまだ少ない。本研究ではTRIM39の免疫学的な機能が明らかになった。SLEの病因が不明であることから根本的な治療はまだなく、ステロイドや免疫抑制薬による治療に依存している。今回の研究結果はTRIM39とその関連分子を標的とした全身性自己免疫疾患の新規治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Although TRIM proteins and related molecules are expected to be involved in a complex manner in systemic lupus erythematosus (SLE), the direct relationship between SLE pathogenesis and TRIM proteins remains unclear. In this study, we generated Trim39 knockout mice and analyzed the immunological role of TRIM39. We found that Trim39^{-/-} mice had significantly larger thymus and spleen weights and a significantly higher number of spleen cells compared to wild-type mice. The expression of STAT1 was significantly upregulated in the B cells of Trim39^{-/-} mice compared to wild-type mice, and the expression of IL-1 was significantly upregulated in the blood of Trim39^{-/-} mice compared to wild-type mice. Trim39^{-/-} mice had significantly higher levels of IL-27 and significantly lower levels of IgG1 and IgA in blood. The amount of IgA in feces was also significantly lower and DSS-induced enteritis was more severe in Trim39^{-/-} mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：全身性エリテマトーデス TRIMファミリー

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) の末梢血単核球 (PBMC) において I 型インターフェロン (IFN) で誘導される遺伝子群の発現が亢進していることが知られている。この現象は “IFN signature” と呼ばれ、末梢血中の I 型 IFN 濃度の上昇を反映していると考えられている。SLE 病態において何が IFN signature を誘導しているのかはまだ明らかではない。しかし、ウイルス性肝炎等の治療で I 型 IFN を使用した場合に自己抗体の産生や SLE 様の症状がみられることから、I 型 IFN の産生が SLE の病態に重要な役割を果たしている可能性が高い。実際に、SLE 患者において I 型 IFN に対する抗体製剤を用いた治療が現在行われている。

I 型 IFN の産生を制御する転写因子として interferon regulatory factor (IRF) ファミリーが重要である。申請者はユビキチン化によりこの IRF ファミリーの発現量を調節する E3 ユビキチンリガーゼである TRIM ファミリーに注目して先行研究を行ってきた。TRIM ファミリーは N 末端側に RING, B-Box, Coiled-coil の 3 つのドメインを共通に有する蛋白質ファミリーであり、ヒトでは約 70 種類の蛋白が含まれる。TRIM21 (別名 Ro52 あるいは SSA1) は SLE やシェーグレン症候群 (SS) の患者血清中にみられる抗 SS-A 抗体の対応抗原のひとつである。我々は Trim21 ノックアウトマウスを用いて、生体内で TRIM21 がいくつかの IRF ファミリー蛋白のユビキチン化に重要であることを明らかにした。また、SLE 患者の PBMC において TRIM21 の発現が健常者と比較して mRNA レベルでも蛋白レベルでも亢進していることを確認している。さらに、SLE 患者では健常者と比較して IRF ファミリーのユビキチン化が低下していることも明らかにしている。

TRIM ファミリーの中には TRIM21 と構造上非常に類似した蛋白質が多い。ほとんどの TRIM ファミリー蛋白に共通して存在する RING ドメインは一般的に E3 ユビキチンリガーゼ活性を有することが多い。したがって、多くの TRIM ファミリー蛋白がこの E3 活性を用いて IRF ファミリーの発現量や機能を調節し、それによって I 型 IFN の産生制御に関与している可能性がある。TRIM27 は TRIM21 と構造上非常に類似しているが、IRF3 をリン酸化するキナーゼ TBK1 をユビキチン化することが知られており、その発現の制御因子として miR-27a というマイクロ RNA (miRNA) が報告されている。我々は予備実験により、SLE 患者において TRIM27 mRNA の発現が健常者と比較して低下していることを明らかにしている。TRIM39 は、ベーチェット病や皮膚エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子の 1 つとして報告されている。しかし、TRIM39 の免疫学的役割に関する報告は限られており、特に TRIM39 のノックアウトマウスを用いた研究は報告がない。

以上の知見から、SLE における過剰な I 型 IFN 産生に TRIM 蛋白群とその関連分子が複合的に関与していることが予想されるが、SLE 病態と TRIM 蛋白群の直接的な関連性については臨床データや検体ではまだ証明されていない。この点を明らかにできれば、SLE において I 型 IFN を抑制するための新たな治療戦略を見いだすことが可能となる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、TRIM 蛋白群とその関連分子について SLE 病態における役割を広く解明するとともに、炎症を制御するための新たな治療標的としての可能性を検討するために、Trim39 ノックアウトマウスを作成し、TRIM39 の免疫学的役割を解析した。また、TRIM21 欠失ループモデルマウスの解析も行った。

TRIM ファミリーは自然免疫と獲得免疫の両方において様々な役割を担っていることを示す様々な基礎的な報告がみられるが、SLE を含め膠原病疾患において病態への関与を示したトランスレーショナルリサーチの報告はまだ少ない。“IFN signature” の原因としてユビキチン修飾系の機能異常を想定し、それを新規治療標的とする点は世界的に見ても新しい視点である。

3. 研究の方法

(1) TRIM39 のノックアウトマウスの作製

C57BL/6 マウスをバックグラウンドとして Trim39 遺伝子の exon3 部分を EGFP レポーターで置換することにより、Trim39 ノックアウトマウス (Trim39^{-/-} マウス) を作製した。

(2) TRIM39 の免疫学的役割

上記(1)で作製した Trim39^{-/-} マウスと野生型マウスを用いて表現型解析を行うことで、TRIM39 の免疫学的役割を解析した。TRIM39 のノックアウトがマウスの成長や寿命に影響を及ぼすかどうかを調べるために、Trim39^{-/-} マウスと野生型マウスの体重を測定し、54 週時点で

の生存率を調べ、両マウスで比較した。TRIM39 のノックアウトが免疫系細胞の頻度や数に影響を及ぼすかどうかを調べるために、マウスから免疫系臓器（胸腺、脾臓、骨髄、体表リンパ節）を摘出し、その重量や細胞数を両マウスで比較した。また、フローサイトメトリーを用いて免疫細胞の頻度を調べ、両マウスで比較した。TRIM39 のノックアウトが免疫系細胞におけるタンパク発現に影響を及ぼすかどうかを調べるために、B 細胞や T 細胞を磁気細胞分離により分離し、mRNA を精製して cDNA を作製し、定量 RT-PCR により転写因子やシグナル伝達関連タンパクの mRNA の発現量を調べ、両マウスで比較した。TRIM39 のノックアウトがサイトカインや免疫グロブリン産生に影響を及ぼすかどうかを調べるために、マウスより血液及び糞便を採取し、サイトメトリックビーズアレイや ELISA を用いて血中や糞便中のサイトカインや免疫グロブリン濃度を調べ、両マウスで比較した。

上記研究の結果により、*Trim39*^{-/-} マウスでは血中および便中 IgA 量が低いことが明らかとなってきた。IgA 産生が低下しているマウスでは腸内細菌叢の変化やデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発腸炎の重症化を来すことが報告されている。よって、*Trim39*^{-/-} マウスにおいても腸内細菌叢や DSS への反応性に変化が生じている可能性があったため、これらを検証することとした。T-RFLP 法により腸内細菌叢を解析し、1% DSS 水を 7 日間飲水させることで DSS 腸炎を誘発させ、体重の推移と大腸の長さを調べた。

(3) TRIM21 欠失ループモデルマウスの解析

Trim21 欠失 MRL/lpr マウスを作製し、尿蛋白、血清抗 dsDNA 抗体価を調べた。*Trim21* 欠失マウス由来の B 細胞の形質芽細胞への分化能や抗体産生能を調べ、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) TRIM39 のノックアウトマウスの作製

Trim39 遺伝子の exon3 部分を EGFP レポーターで置換することで、*Trim39* ノックアウトマウスを作製した。

(2) TRIM39 の免疫学的役割

Trim39^{-/-} マウスと野生型マウスの体重を測定し、54 週時点での生存率を調べ、両マウスで比較した結果、いずれも両マウス間で有意差はなく、SPF 環境下においては、TRIM39 をノックアウトしても成長や寿命への影響は少ないことが示唆された。

胸腺および脾臓の重量や細胞数を両マウスで比較した結果、胸腺と脾臓の両方において、野生型マウスに比べ *Trim39*^{-/-} マウスで重量が有意に大きかった。細胞数については、脾臓の細胞数が野生型マウスよりも *Trim39*^{-/-} マウスにおいて有意に多かった。フローサイトメトリーを用いて免疫細胞の頻度を調べ、両マウスで比較した結果、*Trim39*^{-/-} マウスの脾臓において未成熟 B 細胞の割合が少なかった。一方、骨髄においては未成熟 B 細胞の割合が *Trim39*^{-/-} マウスで大きかった。

B 細胞や T 細胞における転写因子やシグナル伝達関連タンパクの発現量を定量 RT-PCR によって調べた結果、*Trim39*^{-/-} マウスの B 細胞において STAT1 の発現量が有意に亢進していた。また、T 細胞においては *Trim39*^{-/-} マウスにおいて T-bet の発現量が有意に低下していた。

マウスの血中および糞便中のサイトカインや免疫グロブリン濃度を調べた結果、*Trim39*^{-/-} マウスにおいて血中 IL-27 の濃度が有意に高く、血中の IgG1 や IgA の濃度は有意に低かった。また、IgA については糞便中の IgA 量が *Trim39*^{-/-} マウスにおいて有意に低かった。

マウス腸内細菌叢を調べた結果、*Trim39*^{-/-} マウスにおいて *Bacteroides* の割合が有意に低下していた。また、DSS により腸炎を誘発させた結果、野生型マウスと比較し *Trim39*^{-/-} マウスで有意に体重が減少し、大腸の長さが短かった。したがって、*Trim39*^{-/-} マウスでは DSS 誘発腸炎が重症化することが示唆された。

(3) TRIM21 欠失ループモデルマウスの解析

Trim21 欠失 MRL/lpr マウスは野生型マウスと比較して、尿蛋白の増加、抗 dsDNA 抗体の上昇を示した。*Trim21* 欠失マウス由来の B 細胞では野生型と比較して形質芽細胞への分化能や抗体産生能が亢進していた。また、ヒトの抗 TRIM21 抗体陽性 SLE 患者由来 B 細胞において、健常者や抗 TRIM21 抗体陰性 SLE と比較して形質芽細胞への分化能の亢進や抗体 Ig 産生能が亢進がみられた。

< 引用文献 >

- Yoshimi R et al.: Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts. *J Immunol.* **182**(12):7527-7538, 2009.
- Zheng Q et al.: Siglec1 suppresses antiviral innate immune response by inducing TBK1

degradation via the ubiquitin ligase TRIM27. *Cell Res.* **25**(10):1121-1136, 2015.

Zheng Q et al.: Type I IFN-Inducible Downregulation of MicroRNA-27a Feedback Inhibits Antiviral Innate Response by Upregulating Siglec1/TRIM27. *J Immunol.* **196**(3):1317-1326, 2016.

Kurata R et al.: TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B*51 and -A*26. *Biochem Biophys Res Commun.* **401**(4):533-537, 2010.

Kunz M et al.: Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* **24**(7):510-515, 2015.

Matsuo K et al.: CCL28-Deficient mice have reduced IgA antibody-secreting cells and an altered microbiota in the colon. *J Immunol.* **200**(2):800-809, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamiyama Reikou, Yoshimi Ryusuke, Takeno Mitsuhiro, Iribe Yasuhiro, Tsukahara Toshinori, Kishimoto Daiga, Kunishita Yosuke, Sugiyama Yumiko, Tsuchida Naomi, Nakano Hiroto, Minegishi Kaoru, Tamura Maasa, Asami Yukiko, Kirino Yohei, Ishigatsubo Yoshiaki, Ozato Keiko, Nakajima Hideaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Dysfunction of TRIM21 in interferon signature of systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 993 ~ 1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1436028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunishita Yosuke, Yoshimi Ryusuke, Kamiyama Reikou, Kishimoto Daiga, Komiya Takaaki, Sakurai Natsuki, Sugiyama Yumiko, Takase-Minegishi Kaoru, Kirino Yohei, Nagaoka Shouhei, Nakajima Hideaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Anti-TRIM21 antibody is associated with aberrant B-cell function and type I interferon production in systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 2054 ~ 2065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/09612033211042293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Natsuki Sakurai, Ryusuke Yoshimi, Chiharu Hidekawa, Masaki Mitsuhashi, Yumiko Sugiyama, Yosuke Kunishita, Daiga Kishimoto, Yuki Iizuka, Takaaki Komiya, Hideto Nagai, Naoki Hamada, Naomi Tsuchida, Yutaro Soejima, Reikou Kamiyama, et al.
2. 発表標題 The clinical feature of late-onset systemic lupus erythematosus: The LUNA registry study.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三橋正季, 國下洋輔, 吉見竜介, 秀川智春, 櫻井菜月, 杉山裕美子, 岸本大河, 飯塚友紀, 小宮孝章, 永井秀人, 濱田直樹, 土田奈緒美, 副島裕太郎, 神山玲光, 小林幸司, 浅見由希子, 桐野洋平, 矢嶋宣幸, 佐田憲映, 一瀬邦弘, 大野滋, 中島秀明
2. 発表標題 LUNAレジストリを用いた全身性エリテマトーデスにおけるタクロリムス使用患者の臨床像の検討.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Kunishita, Ryusuke Yoshimi, Reikou Kamiyama, Daiga Kishimoto, Takaaki Komiya, Yumiko Sugiyama, Yohei Kirino, Hideaki Nakajima
2. 発表標題 Dysfunction of Trim21 promotes aberrant B cell differentiation in systemic lupus erythematosus.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本大河, 吉見竜介, 國下洋輔, 秀川智春, 櫻井菜月, 三橋正季, 杉山裕美子, 飯塚友紀, 小宮孝章, 永井秀人, 濱田直樹, 土田奈緒美, 副島裕太郎, 神山玲光, 小林幸司, 浅見由希子, 桐野洋平, 矢嶋宣幸, 佐田憲映, 一瀬邦弘, 大野滋, 中島秀明
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスにおいてLLDAS達成に影響を与える因子の探索- LUNAレジストリを用いた横断研究.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山裕美子, 吉見竜介, 國下洋輔, 秀川智春, 櫻井菜月, 三橋正季, 岸本大河, 飯塚友紀, 小宮孝章, 永井秀人, 濱田直樹, 土田奈緒美, 副島裕太郎, 神山玲光, 小林幸司, 浅見由希子, 桐野洋平, 矢嶋宣幸, 佐田憲映, 一瀬邦弘, 大野滋, 中島秀明
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスにおけるヒドロキシクロロキン使用患者の臨床像について LUNAレジストリを用いた横断研究.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉見竜介, 國下洋輔, 秀川智春, 櫻井菜月, 三橋正季, 杉山裕美子, 岸本大河, 飯塚友紀, 小宮孝章, 永井秀人, 濱田直樹, 土田奈緒美, 副島裕太郎, 神山玲光, 小林幸司, 浅見由希子, 桐野洋平, 矢嶋宣幸, 佐田憲映, 一瀬邦弘, 宮本俊明, 大野滋, 中島秀明
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスにおけるニューモシスチス肺炎予防の現状 - 多施設共同レジストリLUNAより.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秀川智春, 國下洋輔, 吉見竜介, 櫻井菜月, 三橋正季, 杉山裕美子, 岸本大河, 飯塚友紀, 小宮孝章, 永井秀人, 濱田直樹, 土田奈緒美, 副島裕太郎, 神山玲光, 小林幸司, 浅見由希子, 桐野洋平, 矢嶋宣幸, 佐田憲映, 一瀬邦弘, 大野滋, 中島秀明
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスにおける感染症既往の実態について - LUNAレジストリによる横断研究.
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Kunishita, Ryusuke Yoshimi, Reikou Kamiyama, Daiga Kishimoto, Koji Yoshida, Eijin Hashimoto, Yumiko Sugiyama, Takaaki Komiya, Natsuki Sakurai, Yohei Kirino, Hideaki Nakajima
2. 発表標題 Dysfunction of TRIM21 promotes aberrant plasmablast differentiation in systemic lupus erythematosus due to the reduction of TRIM21-mediated ubiquitylation of IRF5
3. 学会等名 American College of Rheumatology 83rd Annual Meeting (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------