

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08766

研究課題名(和文)皮膚筋炎におけるI型インターフェロン発現上昇：LINE-1とウイルス感染の関与

研究課題名(英文) Elevated type I interferon expression in dermatomyositis: involvement of LINE-1 and viral infection.

研究代表者

清水 晶 (SHIMIZU, Akira)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70396638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患患者の末梢白血球よりRNAを抽出し、LINE-1などのレトロトランスポゾン、I型-III型IFN、ヤーンスキナーゼ(JAK)、シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)、IFN誘導遺伝子(ISG)の遺伝子発現を解析した。皮膚筋炎と自己免疫水疱症の治療中患者の末梢白血球ではI型IFNが上昇していた。各々の遺伝子発現の相関関係を、スピアマン相関係数を用いて解析し、皮膚筋炎、SLE、自己免疫水疱症いずれにおいてもI型IFNとLINE-1に正の相関を確認した。その下流のJAK、STAT、ISGの発現や相関については疾患毎に異なるパターンが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患は自己抗体を産生する慢性炎症疾患である。標的臓器が多臓器に及ぶ全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)や皮膚筋炎は有効な治療法に限られる難病であり、I型インターフェロン(IFN)が病態に関与するとされる。I型IFNは通常ウイルス感染に应答して産生されるが、代表的レトロトランスポゾンである長鎖散在反復配列(LINE-1)もI型IFN産生を誘導する。今回、皮膚筋炎、SLE、自己免疫水疱症などの自己免疫疾患においてLINE-1発現を起点としたI型IFNやその下流の経路が病態に関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：RNA was extracted from peripheral leukaemic cells of patients with autoimmune diseases and analysed for gene expression of retrotransposons such as LINE-1, type I-III IFN, Janus kinase (JAK), signal transduction cum transcription activator (STAT) and IFN-induced genes (ISG). Type I IFN was elevated in peripheral leukaemic cells of patients undergoing treatment for dermatomyositis and autoimmune bullous disease. The correlation between the respective gene expression was analysed using the Spearman correlation coefficient, which confirmed a positive correlation between type I IFN and LINE-1 in both dermatomyositis, SLE and autoimmune blistering. Different patterns were observed for downstream JAK, STAT and ISG expression and correlations in each disease.

研究分野：皮膚科学

キーワード：レトロトランスポゾン LINE-1 皮膚筋炎 インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)ではⅠ型インターフェロン(IFN)経路の活性化が病態形成で重要とされる(TypeⅠinterferonopathy)。近年、SLEと同様にⅠ型IFNの過剰産生が皮膚筋炎の病態に関与すると指摘されている。

Long interspersed nuclear elements: (LINE-1)はレトロトランスポゾン的一种であり、ヒトゲノムの約17%を占め、ヒトで唯一活性のある自己増殖する転位性遺伝因子である。ヒトゲノムでは約100の活性型のLINE-1があり、転写後細胞質内でORF1p:(LINE-1核酸に結合)とORF2p(エンドヌクレアーゼ+逆転写酵素)が翻訳される。通常LINE-1はメチル化や細胞内核酸分解酵素により制御されるが、SLEではLINE-1発現が上昇しⅠ型IFN産生亢進に関与するとされる。しかし、皮膚筋炎のⅠ型IFN過剰産生機序は不明でありLINE-1が関与するという報告もない。

2. 研究の目的

予備的検討で、皮膚筋炎患者の白血球および血清のⅠ型IFN上昇を確認した。次にⅠ型IFNに関連する経路の活性化と、Ⅰ型IFN上昇のトリガーとなるLINE-1の発現上昇を確認し皮膚筋炎の病態に迫る。

- (1) 皮膚筋炎発症におけるLINE-1の関与を明らかにする: SLE、シェーグレン症候群では患者組織(腎、唾液腺)におけるLINE-1発現上昇が報告されているが皮膚筋炎で同様の報告はない。申請者は、予備実験において皮膚筋炎白血球においても、qPCRによりLINE-1 mRNAの発現亢進を確認した。また、ピアソン解析によりLINE-1とⅠ型IFN発現には高い相関が見られた。本申請では予備実験を進展させ、IFN経路の分子群の発現変動もqPCRで詳細に調べたい。
- (2) 患者白血球を用いたLINE-1ノックダウンとⅠ型IFN減少の確認: 患者白血球を用いたRNAi法によりLINE-1をノックダウンし、Ⅰ型IFNの上昇がLINE-1発現によるかを明らかにする。また、LINE-1ノックダウン後にマイクロアレイを用いてIFN経路以外に変動する経路を解析する。これらの結果は、LINE-1をターゲットにした新規治療の開発にもつながる。
- (3) 皮膚筋炎を発症させるウイルスを明らかにする: 皮膚筋炎とウイルスの関与についてはパルボウイルス、コクサッキーウイルスなどの報告はあるが、系統的なウイルス感染の探索はない。皮膚筋炎、SLE患者の初診時血清、生検皮膚および治療過程での白血球、血清を用いてRNAおよびDNAを抽出し、群馬県内で流行したウイルスとこれまで皮膚筋炎と関連の指摘されたウイルスの検出をPCRで行う。PCRは多種のプライマーを必要とするため、ウイルスサーベイランスを業務とする群馬県衛生環境研究所(衛研)と共同で行い効率化を図る。PCRで検出できなければ、ウイルス学分野で行われる「ウイルス分離」を組み合わせた次世代シーケンスを試みる。

3. 研究の方法

- (1) LINE-1の皮膚筋炎病態形成に対する関与: 予備実験では皮膚筋炎白血球ではLINE-1発現が亢進しておりⅠ型IFNとの相関が見られた。患者白血球を用いた解析で主にIFN経路の遺伝子発現(IFN α , IFIH1, TBK1, MAVS, IRF3)およびインターフェロン誘導遺伝子(MxAなど)をqPCRで検討し、IFN経路の活性化を確認する。
- (2) 患者白血球を用いたLINE-1とIFN発現の解析: マクロファージ由来のTHP-1細胞、ヒト腎線維芽細胞由来HEK293T細胞を用いて、siRNAによるLINE-1のノックダウンとⅠ型IFN発現低下の有無を既報告に従い行う。また、LINE-1発現プラスミドを上記細胞株に導入しⅠ型IFNの発現亢進の有無も確認する。これらの実験により、培養細胞においてⅠ型IFN発現亢進がLINE-1発現によることを確認する。次に、皮膚筋炎患者白血球を採取し、siRNAを用いたLINE-1ノックダウンによるⅠ型IFN発現低下を確認する。さらにマイクロアレイを行い、IFN経路以外の変動遺伝子を網羅的に解析する。
- (3) 皮膚筋炎の白血球、皮膚、血清におけるウイルスの検出: 群馬県内で流行したウイルスと皮膚筋炎との関連が報告されているウイルス感染(DNAウイルス: パルボウイルスB19など8種、RNA: エンテロウイルスなど4種)の有無を、PCR(RNAはcDNA合成した後)でスクリーニングする。エンテロウイルスなどは多くの型があり、複数の型を検出するコンセンサスプライマーを用いる。

4. 研究成果

患者末梢白血球、皮膚生検組織を用いた LINE-1 と IFN 経路の解析

当科では年間約 50 人の皮膚筋炎患者、約 100 人の SLE 患者、約 120 人の自己免疫水疱症患者が通院している。倫理委員会で承認後、皮膚筋炎 28 人、SLE20 人、自己免疫水疱症 15 人、健常人 10 人の末梢白血球、血清、生検組織を用いた解析を実施した。

- (1) 末梢白血球より RNA を抽出し、cDNA に合成後、リアルタイム PCR を用いて、LINE-1 などのレトロトランスポゾン、I 型～III 型 IFN、ヤーンスキナーゼ (JAK)、シグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT)、IFN 誘導遺伝子 (ISG) の遺伝子発現を解析した。各々の遺伝子発現の相関関係を、スピアマン相関係数を用いて解析し、皮膚筋炎と自己免疫水疱症の治療中患者の末梢白血球では I 型 IFN が上昇していた。皮膚筋炎、SLE、自己免疫水疱症いずれにおいても I 型 IFN と LINE-1 のスピアマン相関係数を用いて正の相関を確認した。その下流の JAK、STAT、ISG の発現や相関については疾患毎に異なるパターンが見られた。SLE では ISG が高発現であり、ISG 同士にはスピアマン相関係数において強い正の相関を示した。
- (2) 末梢白血球より DNA を抽出し、バイサルファイト化を行い、LINE-1 プロモーター領域のメチル化レベルをパイロシークエンス法にて測定した。LINE-1 の発現が亢進しているサンプルではプロモーター領域のメチル化低下が確認され、LINE-1 の発現の亢進には LINE-1 プロモーター領域のメチル化低下によって転写の促進が起きていることが示唆された。
- (3) 治療前の皮膚生検組織を用いて IFN 誘導遺伝子である MxA や ISG15 の免疫染色を行い、その発現を調べることで、I 型 IFN より下流の IFN 経路の活性化が起きていることを確認した。健常では MxA や ISG15 は陰性であったが、皮膚筋炎、SLE、自己免疫水疱症の病変部の検体では陽性を示し、治療前皮膚では I 型 IFN が病変部で活性化したことで、ISG が産生された可能性を考えた。

皮膚筋炎患者検体におけるウイルスの検出

全身性エリテマトーデス、健常人と比較し、特徴的なウイルスは検出されなかった。

培養細胞における LINE-1 と IFN 発現の解析

複数の培養細胞株を用いて (A431、NP-2、G361、HaCaT 等) RNA を抽出し、レトロトランスポゾンや IFN の遺伝子発現についてヒトでの検体と同様に、リアルタイム PCR を用いて、LINE-1 などのレトロトランスポゾン、I 型～III 型 IFN、ヤーンスキナーゼ (JAK)、シグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT)、IFN 誘導遺伝子 (ISG) の遺伝子発現を解析し、白血球で得られた結果と矛盾しないことを示した。

以上より、LINE-1 発現を起点とし、I 型 IFN 発現やその下流の経路が自己免疫疾患の病態に関わる可能性があり、LINE-1 発現を抑える 5 Aza-C などが自己免疫性疾患の治療薬候補となるかもしれない。これらの研究内容は以下の英文雑誌に発表した (1、 2)。

< 引用文献 >

1. Kuriyama Y, Shimizu A*, Kanai S, Oikawa D, Motegi SI, Tokunaga F, Ishikawa O. Coordination of retrotransposons and type I interferon with distinct interferon pathways in dermatomyositis, systemic lupus erythematosus and autoimmune blistering disease. *Sci Rep.*30;11:23146. 2021
2. Kuriyama Y, Shimizu A*, Kanai S, Oikawa D, Tokunaga F, Tsukagoshi H, Ishikawa O. The synchronized gene expression of retrotransposons and type I interferon in dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol.* 84:1103-1105.2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Kuriyama Yuko, Shimizu Akira, Kanai Saki, Oikawa Daisuke, Tokunaga Fuminori, Tsukagoshi Hiroyuki, Ishikawa Osamu	4. 巻 84
2. 論文標題 The synchronized gene expression of retrotransposons and type I interferon in dermatomyositis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Academy of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1103 ~ 1105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaad.2020.05.051	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 Kuriyama Yuko, Shimizu Akira, Kanai Saki, Oikawa Daisuke, Motegi Sei-ichiro, Tokunaga Fuminori, Ishikawa Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 Coordination of retrotransposons and type I interferon with distinct interferon pathways in dermatomyositis, systemic lupus erythematosus and autoimmune blistering disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02522-6	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 晶、栗山裕子、金井早紀、石川 治 塚越博之（
2. 発表標題 皮膚筋炎病態形成に関するウイルスとレトロトランスポソンの探索
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------