

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08800

研究課題名（和文）iPS細胞による自己免疫疾患病態解明と新規創薬戦略の創出

研究課題名（英文）Establishment of iPS cell-based strategy for elucidating the pathogenesis of autoimmune diseases and discovery of therapeutic targets

研究代表者

庄田 宏文（Shoda, Hirofumi）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20529036

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）：iPS細胞技術の応用による自己免疫疾患病態解明と創薬のための基盤的技術、戦略の確立を目的とした課題である。全身性エリテマトーデス(SLE)患者より樹立したiPS細胞を活用し、新規に同定したOASL遺伝子のrare variantsについて機能解析を行った。特にゲノム編集により健常株・変異株の作成、修正を行った。OASL変異は樹状細胞からのdsRNA刺激に対するI型interferon(IFN)反応が亢進させることがわかり、SLE病態への寄与が想定された。本研究により、自己免疫疾患におけるrare variantsの関与を研究する技術的基盤が確立し、今後の創薬研究へとつながることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を活用した自己免疫疾患研究および創薬研究の技術的基盤の開発が本研究の最も重要な意義である。SLEに関連するOASL遺伝子変異の新規同定は、SLE病態の解明および新規創薬標的として、臨床応用につながる可能性がある。またOASL遺伝子変異はSLE患者においてOdds ratio 8と高頻度で認められたが、これは従来のSNPにおけるリスクよりかなり高い寄与が関与される。この結果は、特定の患者における自己免疫疾患の遺伝的メカニズムにおいてrare variantはより強く関与している可能性を示唆し、自己免疫性疾患を遺伝学的に理解するうえで重要な知見の可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the pathogenesis of autoimmune diseases and to establish basic technologies and strategies for drug discovery by applying iPS cells. Using iPS cells established from systemic lupus erythematosus (SLE) patients, we performed functional analysis of newly identified rare variants of OASL gene. In particular, we created wild type and mutated iPS cell strains by genome editing. OASL variants were found to enhance the type I interferon (IFN) response to dsRNA stimulation in dendritic cells, suggesting a contribution to SLE pathogenesis. This study is expected to establish a technical foundation for studying the involvement of rare variants in autoimmune diseases and lead to future drug discovery research.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス iPS細胞 インターフェロン

## 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)に代表される自己免疫疾患の治療は短期予後の改善は明らかであるが、ステロイド等の長期使用や、頻回の再燃などによる臓器障害の蓄積、生命予後の改善には至っておらず、新規治療薬を開発する必要性がいまだに高い状況である。また SLE の病態理解については、SLE は多様性のある疾患であり、未だ完全であるとはいいがたく、更なる研究の必要性がある。SLE は多因子疾患である、すなわち遺伝的要因と環境的要因により免疫の異常が生じ、発症に至ると考えられている。自己免疫疾患の病態解明や創薬研究における疾患特異的 iPS 細胞については、他の領域における疾患特異的 iPS 細胞ほど活用が進んでいない。ひとつには、単一遺伝子に起因する疾患の場合、疾患特異的 iPS 細胞により疾患形質を再現することは直接の病因解明につながりうるが、多因子疾患の場合はそれぞれのリスク遺伝子の影響が軽微かつ複雑な影響を及ぼすため iPS 細胞の活用が難しい点がある。また、免疫システムの異常は多彩であり、iPS 細胞による実験系では、自己免疫疾患の疾患形質をすべて再現することは不可能である。

一方で、自己免疫疾患におけるヒト研究は重要な課題である。マウスモデルは必ずしもヒト疾患の病因・病態と一致しないため、ヒト細胞を用いた研究がヒト疾患病態の理解には必須である。倫理的問題もありヒトからの検体採取には一定の制限があり、疾患特異的 iPS 細胞の活用が期待されてきた。そこで、本研究課題では、疾患特異的 iPS 細胞を活用した自己免疫疾患研究のプラットフォームを構築し、病態解明と新規創薬標的の同定につなげる戦略について検討を行った。

## 2. 研究の目的

SLE 患者由来疾患特異的 iPS 細胞(SLE-iPS 細胞)を活用し、自己免疫疾患の病態解明・創薬へつなげる研究戦略を構築することを目的とした。SLE-iPS 細胞は SLE 患者における遺伝的リスクを有する株と考えられ、SLE におけるリスク遺伝子変異が生物学的・免疫学的にどのような影響を免疫細胞に及ぼすかを検討することで、リスク遺伝子変異の SLE 病態における役割について研究し、新規創薬標的の同定につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- 疾患特異的 iPS 細胞の樹立：SLE 姉妹例の末梢血 CD34 陽性細胞より、エピソーマルベクターにより 4 因子を導入し iPS 細胞を樹立した。
- 樹状細胞(iPS-DC)への分化：iPS 細胞を Flt3 等のサイトカイン環境下で培養し、DC へ分化させた。
- interferon(IFN)産生能測定：DC を dsRNA で刺激後、培養上清を IFN-SEAP assay により 1 型 IFN 濃度を測定した。
- 全エキソン解析：SLE-iPS 細胞の全エキソン解析を行い、IFN pathway に関連し、exon 上にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異をスクリーニングすることで、リスク遺伝子変異候補を同定した。
- セルラインによる解析：293T に Wild type 遺伝子、変異遺伝子を導入することで、機能変化を解析した。また、CRISPR/Cas9 により遺伝子欠損を導入し、機能解析を行った。
- iPS 細胞のゲノム編集：CRISPR/Cas9 システムにより、iPS 細胞への遺伝子変異の導入・修正を行った。
- in silico による構造予測：同定した新規変異遺伝子について、既存の wild type の構造情報を基に in silico における構造予測を行った。

## 4. 研究成果

SLE-iPS 細胞由来 DC は IFN- $\gamma$  産生能が健常株より有意に高く、IFN 産生に関連する遺伝的リスクを有していることが推定された。全エキソン解析より、IFN 産生に関連した遺伝子変異 8 か所を同定し、in vitro における IFN 産生能を元にしたスクリーニングの結果、OASL 遺伝子変異が同定された。ゲノム編集により OASL 遺伝子変異を修正すると、SLE-iPS 細胞由来 DC は dsRNA 刺激による IFN- $\gamma$  産生が低下した。逆にゲノム編集により健常株に OASL 遺伝子変異を導入すると、iPS-DC からの dsRNA 刺激による IFN- $\gamma$  産生が亢進した。また OASL 欠損株では dsRNA 刺激による IFN- $\gamma$  産生は激減した。これらの結果より、OASL は RIG-I を介した dsRNA 刺激による IFN- $\gamma$  産生に必須の分子であり、SLE 患者における遺伝子変異は IFN- $\gamma$  産生能を亢進させる機能的変異であり、SLE 疾患発症・病態への関与が想定されるものであった。

In silico における変異 OASL の構造予測を行ったところ、変異は dsRNA 結合部位に存在し、極性の変化から dsRNA 結合を低下させる方向に作用する可能性が示唆された。また OASL における dsRNA 結合部位はポケットになっており、ここに結合阻害する低分子化合物は IFN 産生抑制に働く可能性が想定された。そこで in silico における化合物スクリーニングを行い、約 80 種類の低分子化合物候補が見つかった。

本研究により、疾患特異的 iPS 細胞の活用による自己免疫疾患病態解明・創薬戦略について、

いくつかの点で重要な進展があった。自己免疫疾患のリスク遺伝子は、ゲノムワイド関連解析で同定される寄与度の低い SNPs のほかに、家族例・若年発症例などで同定される rare variants があるが、rare variants の寄与度は SNPs よりも高いことが知られている。本研究課題では、rare variants を有する疾患特異的 iPS 細胞を用いて rare variants の機能解析・病態への関与を解析する実験手法、特に iPS 細胞における一遺伝子変異のゲノム編集技術を確立した。またこれらの iPS 細胞株は創薬スクリーニングへの直接の応用も可能であると考えられる。以上のように疾患特異的 iPS 細胞を用いることで、従来手法では解明が難しかった rare variants による SLE 病態への影響についての包括的な検討が可能となった。本研究で確立した戦略により、更なる SLE の病態解明及び創薬への発展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ota Mineto, Nagafuchi Yasuo, Hatano Hiroaki, Shoda Hirofumi, et al.	4. 巻 184
2. 論文標題 Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3006 ~ 3021.e17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2021.03.056	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 Yanaoka Haruyuki, Nagafuchi Yasuo, Hanata Norio, Takeshima Yusuke, Ota Mineto, Suwa Yuichi, Shirai Harumi, Sugimori Yusuke, Okubo Mai, Kobayashi Satomi, Hatano Hiroaki, Yamada Saeko, Tsuchida Yumi, Iwasaki Yukiko, Sumitomo Shuji, Shoda Hirofumi, Okada Masato, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Fujio Keishi	4. 巻 119
2. 論文標題 Identifying the most influential gene expression profile in distinguishing ANCA-associated vasculitis from healthy controls	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102617 ~ 102617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2021.102617	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 Hanata Norio, Nagafuchi Yasuo, Sugimori Yusuke, Kobayashi Satomi, Tsuchida Yumi, Iwasaki Yukiko, Shoda Hirofumi, Fujio Keishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Serum Amphiregulin and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor as Biomarkers in Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3730 ~ 3730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10163730	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 Kobayashi Satomi, Nagafuchi Yasuo, Okubo Mai, Sugimori Yusuke, Shirai Harumi, Hatano Hiroaki, Junko Maeda, Yanaoka Haruyuki, Takeshima Yusuke, Ota Mineto, Iwasaki Yukiko, Sumitomo Shuji, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Shoda Hirofumi, Fujio Keishi	4. 巻 116
2. 論文標題 Integrated bulk and single-cell RNA-sequencing identified disease-relevant monocytes and a gene network module underlying systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102547 ~ 102547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2020.102547	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 Kobayashi S, Nagafuchi Y, Okubo M, Sugimori Y, Shirai H, Hatano H, Junko M, Yanaoka H, Tateshima Y, Ota M, Iwasaki Y, Sumitomo S, Okamura T, Yamamoto K, Shoda H, Fujio K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Integrated bulk and single-cell RNA-sequencing identified disease-relevant monocytes and a gene network module underlying systemic sclerosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2020.102547	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 Hanata N, Shoda H, Hatano H, Nagafuchi Y, Komai T, Okamura T, Suzuki A, Gunarta IK, Yoshioka K, Yamamoto K, Fujio K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Peptidylarginine Deiminase 4 Promotes the Renal Infiltration of Neutrophils and Exacerbates the TLR7 Agonist-Induced Lupus Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01095	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 Yoshihara R, Komai T, Shoda H, Fujio K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Elevation of cytomegalovirus antigenemia predicts serious infection and death in patients receiving immunosuppressive therapies for autoimmune diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 1534-1540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13990	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 Shimizu T, Nagafuchi Y, Harada H, Tsuchida Y, Tsuchiya H, Hanata N, Tateishi S, Kanda H, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K, Fujio K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Decreased peripheral blood memory B cells are associated with the presence of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a case-control study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 127-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1719596	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄田宏文
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞による臨床免疫研究
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 夏本文輝、庄田宏文
2. 発表標題 SLE患者由来iPS細胞を用いたrare variantsの探索と免疫学的機序の解明
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bunki Natsumoto, Hirofumi Shoda, Yasuo Nagafuchi, Makoto Otsu, Kazuhiko Yamamoto, Hideki Taniguchi, Keishi Fujio
2. 発表標題 Functional analysis of rare variants associated with SLE using patients derived iPS cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庄田宏文
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞による全身性エリテマトーデス研究
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 夏本文輝、庄田宏文、藤尾圭志
2. 発表標題 Identification and functional analysis of SLE rare variants using patients-derived iPS cells
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会学術集会
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