

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08480

研究課題名(和文) ヒドロキシクロロキン新規作用機序から解明するSLEにおける自然炎症の関与

研究課題名(英文) Dissection of innate immune pathogenesis of SLE by identifying novel hydroxychloroquine's mode of action

研究代表者

河野 肇 (KONO, HAJIME)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60585074

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)：SLEの患者におけるヒドロキシクロロキンの投与前後の好中球をグラジエント法で分離し、そのmRNA解析(RNAシーケンス)を行った。全ゲノム57773遺伝子のうち、ペアワイズでedgeR解析、raw p-value <0.05かつ、fold changeの絶対値が2倍以上の遺伝子は575個。ヒドロキシクロロキン投与後に、遺伝子Xの有意な発現低下が認められた。この遺伝子はミトコンドリア膜に存在しアポトーシスを誘導するBax/Bak分子の抑制分子であり、今後は、ミトコンドリア機能からSLEにおけるNETosisの亢進とその制御の機構のメカニズムを解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒドロキシクロロキンはSLEのアンカードラッグであるが、その薬効を発揮するメカニズムについての検討は現代の分子生物学的手法を用いては行われてこなかった。SLEにおける自然免疫メカニズムとして重要と考えられているのは好中球のNETosisによる好中球由来の細胞外トラップ(NETs)産生である。NETosisは、抗菌タンパク質でコーティングされた脱凝縮クロマチンの細胞外への放出を伴う細胞死であり、ミトコンドリア機能が関与する。本研究により、SLEにおけるミトコンドリア機能に關与するヒドロキシクロロキンの作用点が明らかとなった。新規介入点へと繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils before and after hydroxychloroquine administration in patients with SLE were isolated by gradient method and their mRNA analysis (RNA sequencing) was performed. Of the 57773 genes in the whole genome, 575 genes had pairwise edgeR analysis, raw p-value <0.05 and absolute fold change >2-fold. Significant down-regulation of gene X was observed after hydroxychloroquine treatment. This gene is an inhibitory molecule of the Bax/Bak molecule, which is present in mitochondrial membranes and induces apoptosis, and future studies will elucidate the mechanism of the enhancement of NETosis and its regulation in SLE from mitochondrial function.

研究分野：リウマチ学

キーワード：SLE

1. 研究開始当初の背景

感染に対する生体防御の第一線において、自然免疫による炎症反応は重要な役割を果たしている。一方自然免疫による急性炎症反応の対象は病原体に限局されるものではないため、感染局所に遊走した白血球の活性酸素やプロテアーゼなどの分解酵素などが漏れだして自らの組織傷害をも引き起こす。生体内における通常以上の細胞死、特にネクロシスは急性炎症反応を引き起こす。虚血などの感染を伴わない細胞死においては、急性炎症は組織傷害のみ引き起こし、様々な炎症性疾患の原因となると考えられている。申請者はこの感染を伴わない細胞死についての研究を進め、その炎症反応のメカニズムのキープレーヤーを明らかにしてきた。

1950年代にステロイドが導入されて以降、SLEの生存率は改善が認められ

るようになった。その後自己免疫疾患の代表とし

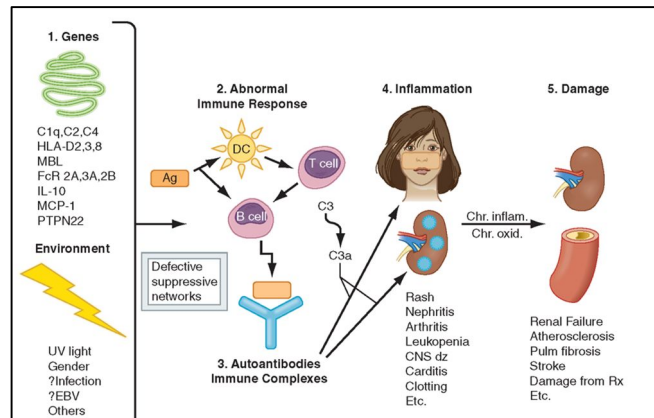
て、その自己抗体や自己反応性T細胞などの獲得免

疫系について詳細な検討が行われ、その成果はカルシニューリン阻害薬やB細胞活性化阻害薬として結実している。しかし、SLEが多臓器疾患でありヘテロな疾患群であることも一つの理由であると思われるが、治療におけるブレイクスルーは得られていない。SLEにおける自然免疫系の病態の探索は端緒についたばかりであり、現時点ではNETosisやNETsの関連が想定され、I型インターフェロンの関与から抗体治療やJAK阻害薬の治験が行われているが、その根本的な理解には程遠い状況である。SLEにおいて抗マラリア薬が1950年代より使用されているが、その作用機序についての研究は進んでいない。

SLEはその発症の機序に遺伝的素因と環境的素因があることが知られており、前述したFcγRIIb以外にもMHC領域を中心として多くの遺伝子多型との関連が報告されている。一方環境素因としてよく知られているのは紫外線である。その結果免疫異常をきたし、腎炎をはじめとする炎症が惹起され、臓器障害へとつながる。紫外線によるSLEの皮膚病変は急性皮膚ループス病変や蝶形紅斑などが知られており、そのメカニズムとしては紫外線によるDNA障害によるアポトーシスの誘導、アポトーシス貪食遅延に伴う二次的ネクロシス細胞のその細胞死の惹起に伴う炎症反応が想定されているが、その詳細なメカニズムは不明である。ヒドロキシクロロキンはSLEのアンカードラッグであるが、その薬効を発揮するメカニズムについての検討は現代の分子生物学的手法を用いては行われてこなかった。

2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス(SLE)は全身性自己免疫疾患のプロトタイプであり、その病態における獲得免疫の関与に関し精力的な研究がなされてきたが、自然免疫の関与についてはその解明



SLEの発症機序

Fauci AS et al, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition

は端緒についたところである。本申請では、SLE における自然免疫の関与を解明することを目標とする。特に本申請で解明する目標としては、1) ヒドロキシクロロキンの作用メカニズムとして同定されたミトコンドリア機能分子が関与する好中球 NETosis 亢進の分子機序の解明、2) NETs ならびに細胞死が I 型インターフェロンならびにインフラマソームのその関与を細胞死 (danger signal) に対する炎症から解明すること、である。これらの解明により SLE の病態における自然免疫機構が解明され、ヒドロキシクロロキンの代替となる新規介入点が発見される可能性を想定した。

生体内における通常以上の細胞死、特にネクロシスは急性炎症反応を引き起こす。虚血などの感染を伴わない細胞死においては、急性炎症は組織傷害のみ引き起こし、様々な炎症性疾患の原因となると考えられている。全身性エリテマトーデス (SLE) においては、紫外線暴露により皮膚障害が惹起される (細胞死が誘導される) と、皮膚所見のみならず全身的な SLE 疾患活動性の増悪につながる経験されており、細胞死に対する炎症反応が SLE の病態形成に重要であることが想定される。SLE は全身性自己免疫疾患の代表的存在であり、その抗核抗体を代表とする核抗原に対する自己抗体とともに、自己反応性 T 細胞についての研究が進んできた。その一方、近年、SLE の病態における自然免疫細胞と分子の重要性も明らかとなってきたが、その歴史は浅く、理解も十分ではない。T 細胞や B 細胞を標的とした治療戦略は部分的には効果が認められているが満足するべきものではなく、今後 SLE の自然免疫を標的とする治療戦略も対象となる可能性がある。

SLE における自然免疫メカニズムとして重要と考えられているのは好中球の NETosis による好中球由来の細胞外トラップ (NETs) 産生である。NETosis は、抗菌タンパク質でコーティングされた脱凝縮クロマチンの細胞外への放出を伴う細胞死であり、NETs により病原体が捕捉され処理される機構である。SLE では NETosis の亢進、NETs の分解の障害が報告されているが、その分子メカニズムは十分理解されていない。

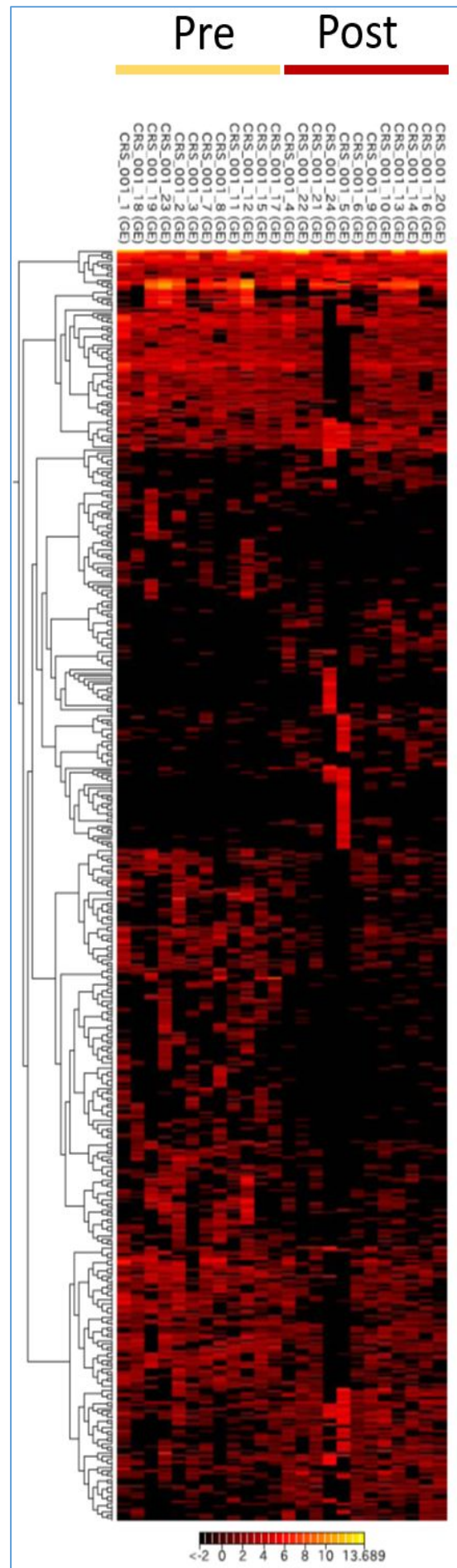
SLE において、好中球よりの NETosis が亢進していること、また NETs の除去効率の低下が認められている。この結果、免疫原性 DNA、ヒストン、好中球自己抗原の免疫系への提示へ繋がりが、自己抗体および炎症性サイトカインを通じて、SLE の病因を形成すると考えられている。ヒドロキシクロロキン投与前後における好中球の遺伝子発現を検討し、ヒドロキシクロロキンにより発現が変化し、ミトコンドリアにおいて NETosis に関連する分子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

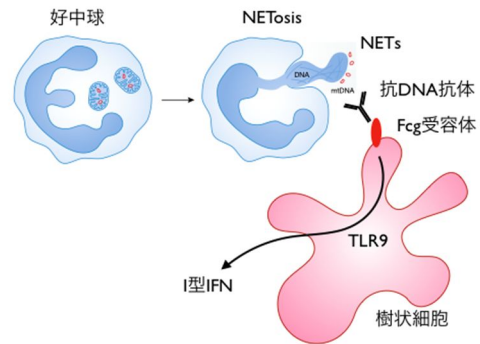
SLE の患者におけるヒドロキシクロロキンの投与前後の好中球をグラジエント法で分離し、その mRNA 解析 (RNA シークエンス) を行った。

4. 研究成果

全ゲノム 57773 遺伝子のうち、ペアワイズで edgeR 解析、raw p-value <0.05 かつ、fold change の絶対値が 2 倍以上の遺伝子は 575 個。Transcript per million reads の Log2 値でヒートマップを作成したのが右図である。本解析において、ヒドロキシクロロキンの投与後に、遺伝子 X の有意な発現低下が認められた。この遺伝子はミトコンドリア膜に存在しアポトーシスを誘導する Bax/Bak 分子の抑制分子であり、今後は、ミトコンドリア機能から SLE における NETosis の亢進とその制御の機構のメカニズムを解明する。NETosis により形成された NETs は、抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体の関与を介して形質細胞様樹状細胞 (pDCs) などを活性化する。酸化されたミトコンドリア DNA に濃縮された NETs は、DNA センサー STING との直接的な相互作用により、I 型 IFN の産生を刺激すると報告されている。また、NETs ならびに細胞死 (特にネクローシス) はインフラマソーム活性化をきたすことが報告されているが、これらの分子メカニズムは十分解明されていないため、今後の解明を要する。



特に、下記の点について検討を行う。好中球細胞質内に放出された mtDNA ならびに dsRNA は、細胞質内の DNA センサー、RNA センサーである cGAS-STING を活性化し、I 型インターフェロンの転写活性化をもたらすと想定される。この仮説を検証する。(c) NETosis により放出されたミトコンドリア DNA は抗 DNA 抗体や抗 LL-37 抗体などとともに複合体を形成し、形質細胞様樹状細胞(pDC)に Fc ガンマ受容体を介して捕捉され、TLR9 などの DNA センサーを活性化し、I 型インターフェロンの産生をもたらす(下図)。ミトコンドリアは細胞内寄生体由来であり、強く自然免疫の活性化を惹起する。遺伝子 X の低下、欠失により NETs 中のミトコンドリア由来のタンパクは減少することが想定され、その結果、NETs の樹状細胞活性化に影響をおよぼすことを想定している。遺伝子 X 欠失好中球と対照好中球より調製した NETs を樹状細胞株 DC2.4 に加え、その I 型 IFN 産生を検討する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	本田 浩章 (HONDA HIROAKI) (40245064)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
研究分担者	本田 善一郎 (HONDA ZEN ICHIRO) (70238814)	お茶の水女子大学・保健管理センター・客員教授 (12611)	

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