

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16300

研究課題名（和文）患者由来iPS細胞を用いた自己免疫疾患の病態解明・創薬研究

研究課題名（英文）Elucidating the pathogenesis and discovering drugs for autoimmune diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells

研究代表者

夏本 文輝 (Natsumoto, Bunki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20837653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：rs7197475-TはSLEのrisk SNPとして報告されており、我々のeQTL解析により、単球でのGene Yの高発現がリスクであると判明した。Gene Yの機能としてdsDNA repairやNFkB活性化、apoptosisの抑制などが報告されている。我々はGene Yをレンチウイルスベクターで単球細胞株のTHP1に恒久的に強制発現させた。dsRNAやdsDNA刺激により、コントロールに比較し有意にI型IFNやTNF-αの産生が亢進した。現在RNA seqによる病態解明、また強制発現株を用いて薬剤スクリーニングを通してSLEの治療ターゲットを検索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はOmics解析と生物学的実験を組み合わせることにより、SLEの病態の一端をin vitroに再現した。Gene YをレンチウイルスベクターでTHP1に恒久的に強制発現させ、dsRNAやdsDNAで刺激したところ、コントロールに比較しGene Y強制発現株において有意にI型IFNやTNF-αの産生亢進が認められた。特にGene YとI型IFNとの関連はこれまで報告されておらず、新規の発見となった。今後は刺激/未刺激サンプルのRNA-seqや薬剤スクリーニングを通してSLEの病態解明/治療ターゲットの検索を行っていく予定である。

研究成果の概要（英文）：rs7197475-T has been reported as a risk SNP for systemic lupus erythematosus (SLE), and our eQTL (expression quantitative trait loci) analysis revealed that high expression of Gene Y in monocytes is associated with the risk. Gene Y has been reported to be involved in functions such as dsDNA repair, NFkB activation, and inhibition of apoptosis. We enforced the permanent overexpression of Gene Y in 293T and THP1 cells using lentiviral vectors. Upon stimulation with dsRNA or dsDNA, there was a significant increase in the production of type I IFN and TNF-alpha compared to the control. We are currently searching for therapeutic targets for SLE through RNA seq and drug screening.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：全身性エリテマトーデス 自己免疫疾患 I型インターフェロン 単球

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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 (systemic lupus erythematosus; SLE) は多彩な臓器障害を示す自己免疫疾患であり、免疫学的な異常としては、I 型 interferon (IFN) signature の亢進と抗 dsDNA 抗体に代表される自己抗体産生を特徴としている (Tsokos, G. N. *Engl J Med* 365, 2011)。SLE は腎臓、皮膚、肺、神経など多様な臓器に障害をもたらし、患者の QOL を大きく低下させると共に生命予後を脅かすことも多い (Pons-Estel, G. J. et al. *Semin Arthritis Rheum* 39, 2010)。一方で、病態の全容は解明されておらず、治療薬の選択肢は未だ十分ではない。ステロイド (prednisolone; PSL) やシクロホスファミド (cyclophosphamide; CyA) などといった病因非特異的な免疫抑制剤が用いられているのが現状であり、長期間のステロイド投与による感染症などの副作用は SLE 患者の第一の死因となっている (Bertsias, G. K. et al. *Ann Rheum Dis* 69, 2010)。

SLE の病態において、核心となる治療ターゲットはどこか。B 細胞 (自己抗体産生)、T 細胞 (獲得免疫の制御)、DC (I 型 IFN 産生) などの免疫細胞に対して治療ターゲットの検討、創薬そして臨床試験が行われてきたが、期待する効果は得られていない。2011 年にアメリカ食品医薬品局は約 50 年ぶりに SLE の新規治療薬として、ヒトモノクローナル抗体のベリムマブ (Belimumab) を認可した。しかし既存の治療薬と併用することにより、重症腎炎患者を除いた患者への治療効果 (主要項目達成率) を 10% 程度高める (Navarra, S. V. et al. *Lancet* 377, 721-731, 2011) ことはできたものの、有効率は 50% 程度であった。

自然免疫側の免疫抑制薬で有効性が期待されるものとしてヒドロキシクロロキン (ARD 2019 *Ann Rheum Dis*. 2019 Jun;78 (6):736-745)、baricitinib (Daniel J Wallace et al. *Lancet* 2018; 392: 222-31)、aniflumumab (E.F. Morand et al. *N Engl J Med* 2020 Jan 16;382 (3):211-221) などが挙げられるが、重大な副作用 (網膜症、帯状疱疹など) があり、臨床上使用しにくい場合が多々ある。

現在までに 100 以上の SLE 疾患関連 risk loci が報告され (Nina Oparina et al. *Curr Opin Rheumatol* 2019, 31:659-668)、効果発現機序 (結果) も細胞質内核酸センサーを介した I 型 IFN 産生亢進、B 細胞の抗体産生、T-B corporation、免疫複合体-組織沈着など多数挙げられる。一方で中間形質 (eQTL; expression quantitative trait loci) による影響の解明はあまり進んでいない。SLE の多様な原因・中間形質・結果に比較し、治療薬の多様性は圧倒的に不足しており、既存薬剤による合併症が出現した際の治療法選択はさらに困難を極める。SLE に対する治療の不十分な現状が申請者の本研究課題に対するモチベーションである。より有効で副作用の少ない SLE の治療ターゲットはどこなのか。それが本研究の核心をなす学術的な問いである。

2. 研究の目的

本研究の目的は SLE の病態解明及び創薬である。Omics 解析と分子生物学的手法を組み合わせることにより SLE の病態を *in vitro* に再現、原因-結果の signal pathway の解明し、SLE の新たな治療ターゲットの発見に繋がたいと考えている。

例として Gene X と Gene Y を例に挙げる。Gene X の発現は cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-Stimulator Of Interferon Response cGAMP Interactor 1 (STING) 経路を抑制すると報告されている。STING は dsDNA センサーであり、I 型 IFN の産生亢進に寄与し、ヒト、マウスにおいて SLE の病態に重要であると報告されている (Kato Y et al. *Ann Rheum Dis*. 2018 Oct; 77 (10):1507-1515. Ahn J et al, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19386-91. Gao D et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:E5699-E5705. Baum R et al, *J Immunol* 2015;194:873-7. Gall A et al, *Immunity* 2012; 36: 120-31. Liu Y et al. *N Engl J Med* 2014; 371: 507-18. Jeremiah N et al. *J Clin Invest* 2014; 124: 5516-20)。申請者らのこれまでの検討において、Gene X に姉妹 SLE-iPS 細胞共通の rare variant があり、また SLE 症例 67 例と Health control 105 例の全ゲノム解析において、SLE 患者の Gene X に rare variants が有意に enrich していた ($p=0.03$ 、オッズ比 8)。我々はプラスミドに Gene X の Wild type (WT) と variant (Va) を挿入し、reporter cell line への強制発現、核酸の添加刺激 (STING 以外の核酸センサーを刺激) により、Va の強制発現により有意に I 型 IFN の産生亢進が見られることを発見した。本研究において、Gene X の STING における詳細な機序を検討したいと考えている。

rs7197475-T は SLE の risk SNP であり、eQTL 解析により、単球での Gene Y の高発現がリスクであると報告されている。Gene Y の機能として dsDNA repair や NFkB 活性化、apoptosis の抑制などが報告されている。Gene Y は主に dsDNA repair に関与すると報告されている。本研究において、eGene としての Gene Y の機能を詳細に検索したいと考えている。

3. 研究の方法

レンチウイルスベクターを用いて、Gene X WTやVaをヒト細胞株（293TやTHP1）に恒久的に強制発現させる。dsRNAやdsDNAで刺激し、その網羅的な遺伝子発現（特にSTING pathwayに関して）やサイトカイン産生能などの解析を行う。また薬剤スクリーニングの系としての活用を想定している。

Gene Yをプラスミドに挿入し cell lineに一時的に強制発現させ、網羅的な遺伝子発現解析を行う。治療ターゲットになりうると考えられた場合にはGene YをレンチウイルスベクターでTHP1（ヒト単球系細胞株）に恒久的に強制発現させ、dsRNAやdsDNAで刺激し、その遺伝子発現、サイトカイン産生能など検索する。また薬剤スクリーニングの系としての活用を想定している。

4. 研究成果

Gene X null(蛍光マーカーのみ導入) / WT / Vaをヒト細胞株（293TやTHP1）に恒久的に強制発現させた細胞株においてdsRNAで刺激したところ、null / WTに比較し、Va導入株で有意にI型IFNの発現亢進が見られた。Gene X null(蛍光マーカーのみ導入) / WT / VaをTHP1に恒久的に強制発現させた細胞株においてdsDNAで刺激したところ、WTはnullに比較しIFN産生を抑制、VaはWTに比較しIFN産生の抑制が弱い傾向にあったが、実験間のばらつきもあり、明確な結論が得られなかった。

Gene Yをプラスミドに挿入し293Tに一時的に強制発現させ、網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、多くのI型IFN遺伝子の発現上昇が認められた。一方でcGAS遺伝子は強力に抑制されていた。Gene YをレンチウイルスベクターでTHP1に恒久的に強制発現させ、dsRNAやdsDNAで刺激したところ、コントロールに比較しGene Y強制発現株において有意にI型IFNやTNF-αの産生亢進が認められた。特にGene YとI型IFNとの関連はこれまで報告されておらず、新規の発見となった。今後は刺激/未刺激サンプルのRNA-seqや薬剤スクリーニングを通してSLEの病態解明/治療ターゲットの検索を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 庄田宏文、夏本文輝	4. 巻 29
2. 論文標題 免疫疾患の感受性多型のゲノム編集	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫.	6. 最初と最後の頁 68-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 1. 夏本 文輝、2. 庄田 宏文、3. 永渕 泰雄、4. 大津 真、5. 山本 一彦、6. 谷口 英樹、7. 藤尾 圭志。
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 5 回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1. 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 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1. 夏本 文輝、2. 庄田 宏文、3. 永渕 泰雄、4. 大津 真、5. 山本 一彦、6. 谷口 英樹、7. 藤尾 圭志。
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総会
4. 発表年 2021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
---------	---------