

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2021

課題番号：21K20753

研究課題名（和文）自己免疫疾患におけるLINE-1とI型インターフェロン相互制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Coordination of retrotransposons and type I interferon with distinct interferon pathways in dermatomyositis, systemic lupus erythematosus and autoimmune blistering disease

研究代表者

栗山 裕子（Kuriyama, Yuko）

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80910588

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：皮膚筋炎、全身性エリテマトーデス、自己免疫性水疱症において、I型インターフェロン（IFN）とその産生に寄与するレトロトランスポソンの発現と相関、IFN経路の下流のインターフェロン誘導遺伝子との相関を疾患毎に明らかにした。レトロトランスポソンとI型IFNの協調発現が健常者から自己免疫疾患まで広く観察され、相互に制御されている可能性が示唆された。皮膚筋炎患者では、I型IFNの高発現がレトロトランスポソンの高発現によって誘導されている可能性があり、SLEではSTAT1の異常高発現が特徴的であり、慢性的なIFN-シグナルが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

協調したレトロトランスポソンとI型IFNの発現は健常から自己免疫疾患まで広くみられ、I型IFNの発現とレトロトランスポソン発現は相互制御である可能性が示唆された。皮膚筋炎患者においてはI型IFN高発現がレトロトランスポソンの発現亢進によって誘導されることが示唆され、LINE-1発現を抑える5Aza-CやIFN経路の下流を抑えるJAK-STAT経路に関わるpan-JAK阻害薬は有用である可能性があり、今後の治療薬の開発につながる結果である。

研究成果の概要（英文）：The correlation between type I interferon (IFN) and retrotransposons contributing to its production in dermatomyositis, systemic lupus erythematosus, and autoimmune blistering, and the correlation with interferon-induced genes downstream of the IFN pathway were clarified for each disease. The expression of retrotransposons and type I IFNs in concert was widely observed from healthy to autoimmune diseases, suggesting that type I IFN expression and retrotransposon expression may be mutually regulated. In patients with dermatomyositis, high type I IFN expression may be induced by increased retrotransposon expression, and abnormal high expression of STAT1 is characteristic of SLE, suggesting that chronic IFN- signaling may be involved.

研究分野：ウイルス、インターフェロン

キーワード：インターフェロン 皮膚筋炎 全身性エリテマトーデス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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び全身性自己免疫疾患と単一の臓器のみが標的となる臓器特異的自己免疫疾患に分類される。全身性自己免疫疾患である SLE (全身性エリテマトーデス) や皮膚筋炎では I 型 IFN (インターフェロン) が病態に關与する。自己免疫水疱症は標的臓器が皮膚または粘膜の 1 つの臓器に局限した臓器特異的自己免疫疾患であり、これまでに I 型 IFN が關与するという報告はない。

I 型 IFN は通常ウイルス感染にตอบสนองして産生され抗ウイルス作用を持つ。ウイルスだけでなく内在性因子がトリガーとなって I 型 IFN を産生することも知られており、内在性因子の 1 つである LINE-1 も I 型 IFN 産生を誘導する。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 21% 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。レトロトランスポゾンには他にもヒト内在性ウイルス (HERVK14C など) や SINEs (SVA など) が知られている。レトロトランスポゾンの発現は通常プロモーター領域のメチル化によって抑制されており、わずかな一部のみが活性を持つ。SLE では LINE-1 発現が上昇し I 型 IFN 産生亢進に關与するとされる。これまでに皮膚筋炎において、健常人 10 人と比較し皮膚筋炎患者 28 人の白血球における IFN- γ , IL-1 の有意な mRNA 上昇と LINE-1 と I 型 IFN 発現の強い相関を見いだした (Kuriyama Y et al. J Am Acad Dermatol. 2021)。この結果を踏まえ、LINE-1 と I 型 IFN の相関が広く自己免疫疾患における I 型 IFN 産生に關与するか、さらに I 型 IFN の上昇が下流のシグナルに与える影響を明らかにすることを中心的な「問い」とした。

2. 研究の目的

SLE、皮膚筋炎、自己免疫水疱症の自己免疫疾患におけるレトロトランスポゾンと I 型 IFN の制御とその下流の IFN 経路を明らかにすることを目的とした。一方、自己免疫水疱症においては I 型 IFN が病態に關与するという報告は皆無であり、得られたデータは全て新規の所見となる。臨床検体で得られた知見をもとに複数の培養細胞 (接着細胞、浮遊細胞) を用いた実験も行う。これにより I 型 IFN 産生と LINE-1 発現の相関が培養細胞でも観察される一般的な現象であるかを解明する。同様の研究はなく新規性は極めて高い。

3. 研究の方法

1. 患者末梢血白血球、皮膚生検組織を用いた LINE-1 発現と IFN 経路活性化の解析

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。既に倫理委員会で承認され、皮膚筋炎 28 人、SLE 20 人、自己免疫水疱症 15 人、健常人 10 人の末梢血白血球、血清、生検組織を用いた解析を開始した。末梢血白血球より 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、ヤーヌスキナーゼ (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する。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、I 型 IFN より下流のシグナル活性化を明らかにする。また末梢血白血球より DNA も抽出し、パ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する。また皮膚生検組織を用いて IFN 誘導遺伝子のタンパク質である MxA と ISG15 の免疫染色を行い、皮膚における I 型 IFN 活性化を確認する。

2. 培養細胞における LINE-1 と IFN 発現の解析

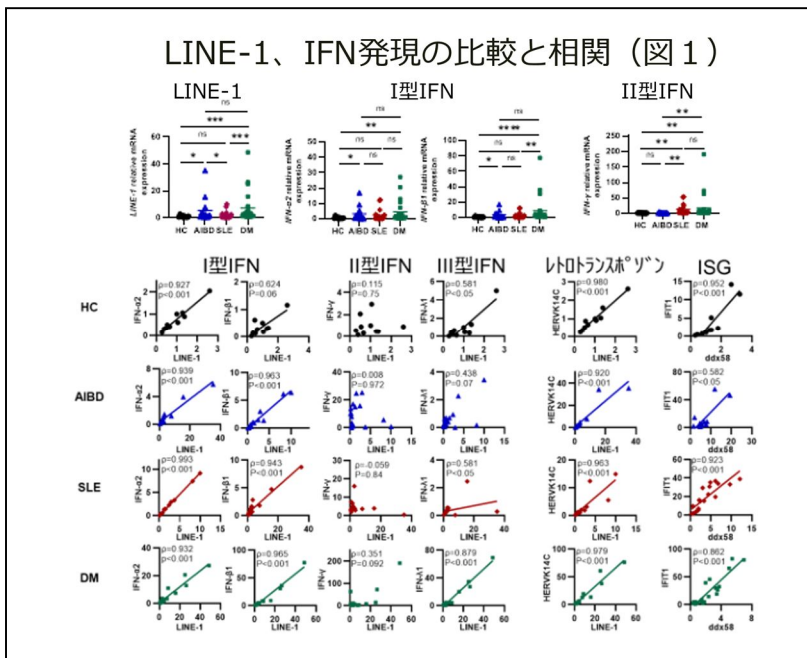
複数の培養細胞株を用いて (A431、NP-2、G361、HaCaT 等) RNA を抽出し、レトロトランスポゾンや IFN の遺伝子発現について解析する。マクロファージ由来の THP-1 細胞、ヒト腎線維芽細胞由来 HEK293T 細胞を用いて、siRNA による LINE-1 のノックダウンと I 型 IFN 発現低下の有無を既報告に従い行う (Zhao Z et al. J Autoimmun. 2018)。また、LINE-1 発現プラスミドを上記細胞株に導入し I 型 IFN の発現亢進の有無も確認する (Shimizu A. et al. Sci Rep 2014)。これらの実験により、培養細胞において I 型 IFN 発現亢進が LINE-1 発現によるかを確認する。最後に、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。

4. 研究成果

患者末梢血白血球、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。既に倫理委員会で承認され、皮膚筋炎 28 人、SLE 20 人、自己免疫水疱症 15 人、健常人 10 人の末梢血白血球、血清、生検組織を用いた解析を実施した。

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。(図 1)



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ケ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。

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 が病変部で活性化することで、ISG が産生された可能性を考えた。

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た。末梢白血球と同様に I 型 IFN と LINE-1 のスピアマン相関係数は正の相関を示した。メチル化阻害薬である 5 Aza-C を用いた NP-2 と A431 に刺激したところ LINE-1 の発現のみならず、I 型 IFN も発現が亢進した。IFN 誘導薬である PolyI:C を用いた刺激試験では I 型 IFN のみならず LINE-1 の発現も亢進した。双方の発現が共に亢進する結果を得た。

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 発現低下の有無の確認を既報告に従い行った (Zhao Z et al. J Autoimmun. 2018)。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したが (Shimizu A et al. Sci Rep 2014)、再現性のある結果は得られなかった。

協調したレトロトランスポゾンと I 型 IFN の発現は健常から自己免疫疾患まで広くみられ、I 型 IFN の発現とレトロトランスポゾン発現は相互制御である可能性が示唆された。STAT1 の異常な高発現は SLE に特徴的であり、IFN- α の応答につながり、慢性的な IFN- α シグナルを生じている可能性が考えられた。また皮膚筋炎患者においては I 型 IFN 高発現がレトロトランスポゾンの発現亢進によって誘導されることが示唆され、LINE-1 発現を抑える 5 Aza-C や IFN 経路の下流を抑える JAK-STAT 経路に関わる pan-JAK 阻害薬は有用である可能性があり、今後の治療薬の開発につながる結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuko Kuriyama
2. 発表標題 Coordinated expression of retrotransposon and type I interferon with distinct interferon pathways in autoimmune diseases
3. 学会等名 46th The Japanese society for investigative dermatology（国際学会）
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
研究協力者	徳永 文穂 (Tokunaga Fuminori) (00212069)	大阪市立大学・分子病態学・教授 (24402)	
研究協力者	及川 大輔 (Oikawa Daisuke) (20455330)	大阪市立大学・分子病態学・准教授 (24402)	

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
---------	---------