

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16265

研究課題名（和文）SLE皮疹におけるオートファジー/LAPバランスを標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Novel therapy targeting autophagy/LAP balance in SLE skin eruption

研究代表者

冬野 洋子（Fuyuno, Yoko）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30529855

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：NHEKに、オートファジーを誘導、阻害、もしくはLAP阻害した際のAHR経路、NRF2経路、EGFR経路の活性化動態について検討を行った。オートファジー/LAPに関係なくCYP1A1は上昇傾向となり、試薬の特性によるものと考えられ、オートファジーの誘導/阻害剤、LAP阻害剤では、オートファジー/LAPバランスとAHRの活性化の評価はできないと判断した。合成核酸とIFNによるケラチノサイトへの刺激で、SLE皮疹様のシグナル発現を確認できた。さらにAHRリガンドを処理したところ、上記の一部のSLE様皮疹のシグナルの抑制を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性エリテマトーデス（SLE）の治療は、これまでステロイド内服などの免疫抑制剤が治療の主体であったが、近年ステロイドを減薬させることができるような、長期的に安全な新規治療薬の開発が望まれている。炎症性皮膚疾患の新たな治療ターゲットとして、AHR（Aryl hydrocarbon receptor；芳香族炭化水素受容体）が注目されている。本研究で初めてSLE皮疹に対するAHRの活性化の効果の可能性について検討を行い、SLE皮疹に対する新たな治療の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The activation kinetics of the AHR, NRF2, and EGFR pathways were examined in NHEK when autophagy was induced, inhibited, or LAP inhibited. It was determined that CYP1A1 tended to increase regardless of autophagy/LAP, which may be due to reagent characteristics, and that autophagy/LAP balance and activation of the AHR could not be evaluated with autophagy inducers/inhibitors or LAP inhibitors. Stimulation of keratinocytes with synthetic nucleic acid and IFN resulted in the appearance of SLE skin rash-like signals. Further treatment with AHR ligand showed suppression of some of the above SLE-like skin rash signals.

研究分野：Dermatology

キーワード：SLE AHR

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) の皮疹の治療は、オートファジー阻害薬であるヒドロキシクロロキンにより進歩したものの、網膜症などのリスクもあり、長期的に安全な新規治療薬の開発が望まれている。SLE の皮疹では、細胞死の亢進に加えて、死細胞のクリアランスが低下していることが知られている。また、SLE の病態において、オートファジーの亢進ならびに、オートファジー因子 LC3 を用いる特殊な貪食作用 (LAP; LC3-associated phagocytosis, LC3 関連貪食作用) の低下の重要性が示唆されている。すなわち、SLE 皮疹ではオートファジーと LAP のバランスが不均衡な状態となっておりと考えられるが、その制御機構は不明である。ところで、AHR (Aryl hydrocarbon receptor; 芳香族炭化水素受容体) は皮膚組織の恒常性維持に不可欠であるが、最近マクロファージ特異的な AHR 欠損マウスでは SLE 腎症の病態が増悪することが報告された。そこで、SLE 皮疹の病態増悪に AHR の不活性化が関与し、表皮のバリア機能低下やオートファジーと LAP の不均衡をもたらすという仮説をたてた。本研究では、SLE 皮疹の患者検体を用いた解析と、表皮細胞と貪食細胞の共培養による *in vitro* の SLE 皮疹モデルの解析により、オートファジーと LAP のバランス制御における AHR の役割を解明すること、AHR 活性化がオートファジーと LAP のバランスを改善させ、死細胞のクリアランスを亢進させることを明らかにすることを目標とした。これらの検討を通じて、AHR 活性化が SLE 皮疹を改善させる作用を解明し、SLE 皮疹に対する新たな治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

オートファジーと LAP (LC3 関連貪食作用) のバランス不均衡を利用した *in vitro* の SLE 皮疹モデルを作製し、オートファジーと LAP のバランス制御における AHR の役割を解明すること、AHR 活性化がオートファジーと LAP のバランスを改善させ、死細胞のクリアランスを亢進させることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1.) ヒト SLE 皮疹における AHR 経路と NRF2 経路、オートファジーおよび LAP 特異的タンパク質の発現の検討。

・SLE 患者の生検皮膚組織を用いて、AHR、NRF2、オートファジー特異的な分子 (ULK1)、LAP 特異的な分子 (Rubicon、NOX2)、オートファジーと LAP 共通の分子 (ATG5、LC3B) の免疫染色を行い、ヒト SLE 皮疹でのオートファジーと LAP の活性化動態を解明する。

2.) 表皮細胞と THP1 貪食細胞の共培養での *in vitro* SLE モデルの作製。

In vitro で表皮細胞におけるオートファジーと、LAP 分子の発現、AHR-NRF2、AHR-EGFR 経路の相関関係の解明。

・ヒト表皮細胞にオートファジーを誘導もしくは阻害時の LAP 特異的な分子 (Rubicon、NOX2) の発現のバランスについて、ウエスタンブロットで解析し明らかにする。

・ヒト表皮細胞にヒドロキシクロロキン/ULK inhibitor を処理することによりオートファジーを阻害、ラパマイシン/メトホルミンを処理することによりオートファジーを誘導し、それぞれ AHR 経路、NRF2 経路、EGFR 経路の活性化を q-PCR、蛍光免疫染色、ウエスタンブロットで解析し明らかにする。

・ヒト表皮細胞で LAP 特異的な分子である Rubicon の発現を siRNA でノックダウンし、オートファジーを誘導、阻害した際の AHR 経路、NRF2 経路、EGFR 経路の標的遺伝子の発現を q-PCR、ウエスタンブロットで解析しこれらの経路の活性化状態を明らかにする。

THP1 貪食細胞における LAP とオートファジー、AHR-EGFR 経路の相関関係の検討。

・THP1 細胞を用いて、ヒト表皮細胞と同様の解析を行いシグナル経路の相関を解明する。

In vitro で LAP 特異的な分子 (Rubicon や NOX2) の発現をノックダウンさせた THP1 ヒト貪食細胞と、ヒト表皮細胞を共培養することによる *in vitro* SLE 皮膚モデル作製の検討。

・THP1 ヒト貪食細胞とヒト表皮細胞を共培養し、紫外線照射や IFN を処理し、表皮細胞の細胞死、THP1 細胞による貪食を観察できる条件を設定し、さらに IL10 の低下、IL6、IL18、caspase3 の上昇という SLE 病態が観察される条件を検討し SLE 皮膚モデルを作製する。

4. 研究成果

(1). SLE 患者および正常コントロール患者の生検皮膚組織の免疫染色で検討を行った。患者表皮における AHR の活性動態については、コントロール群と比較して、AHR の活性化のマーカーである CYP1A1 の発現は減少傾向がみられた。また、患者群で酸化酵素 NRF2 の発現が減少傾向にあり、酸化ストレスが上昇している可能性が考えられた。患者表皮におけるオートファジー/LAP バランスについては、ATG5 の発現が患者群の表皮で上昇傾向であり、LAP 特異的な分子であるオートファジー抑制因子の Rubicon の発現は減少傾向だった。死細胞シグナルについては、caspase7,8 発現が、患者群の表皮で有意に上昇しており、死細胞のシグナルは患者群で上昇していた。炎症性シグナルとして、型 IFN、IFN 関連ケモカインである CXCL10 は患者群の表皮

で増加傾向を示した。

(2). LAP/オートファジーバランス不均衡を利用した *in vitro* の SLE 皮膚モデルとして、Rubicon をノックダウンした NHEK に UV を照射したところ、マイクロアレイで Si control + UV 照射群と比較して、SLE の重症度と相関する IRF5 の有意な上昇を認めた。Rubicon をノックダウンした NHEK に IFN の刺激を加えたところ、IFN 、 IFN 、 CXCL9,10 は上昇傾向を認めた。

LAP/オートファジーバランスに着目した *in vitro* SLE 皮疹モデルの作製を目標に、NHEK に、オートファジーを誘導（ラパマイシン/メトホルミン）、阻害（ヒドロキシクロロキン/ULK1 inhibitor）もしくは LAP 阻害（NOX2 inhibitor; GSK2795039）した際の AHR 経路、NRF2 経路、EGFR 経路の活性化動態について qPCR で検討を行った。オートファジー/LAP に関係なく CYP1A1 は上昇傾向となり、抗酸化経路は活性化されたが、試薬の特性によるものと考えられ、オートファジーの誘導/阻害剤、LAP 阻害剤では、オートファジー/LAP バランスと AHR の活性化の評価はできないと判断した。

そこで、IFN に着目した SLE 皮疹モデルの作成と、AHR の活性化が SLE 皮疹モデルを改善し得るのか、AHR を活性化させた際の Rubicon の発現について検討を開始した。

(3). 合成核酸と IFN でケラチノサイトへ刺激し、型 IFN を始めとする炎症性サイトカイン、獲得免疫誘導能、および、死細胞の発現において評価を行ったところ、SLE 皮疹様のシグナル発現を確認でき、投稿中である。さらに AHR リガンドを処理したところ、上記の一部の SLE 様皮疹のシグナルの抑制を認め、その機序について検討途中である。

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

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