

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791118

研究課題名(和文)全身性エリテマトーデスにおける自己抗原TRIM21の治療標的としての可能性の検討

研究課題名(英文)The autoantigen TRIM21 as a clinical target for systemic lupus erythematosus

研究代表者

吉見 竜介 (YOSHIMI, Ryusuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：70585265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SS)の発症機序は未だ不明である。本研究ではSLEやSSでみられる自己抗体の対応抗原TRIM21およびTRIM68の病態への関与の可能性について検討した。その結果、TRIM21が炎症性サイトカインの産生に重要なNF- κ B活性化経路に重要な蛋白であるTRAF6のユビキチン化やI型インターフェロンの産生の制御に関与することや、TRIM68がI型インターフェロンの産生に重要なIRFファミリー蛋白をユビキチン化することが明らかとなり、TRIM21およびTRIM68のSLE・SS病態への関与および治療標的としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The etiology of systemic lupus erythematosus (SLE) or Sjogren's syndrome (SS) still remains unknown. In this study, we investigated the role of TRIM21 and TRIM68, the autoantigens observed in the sera of patients with SLE and SS, in the pathogenesis of these diseases. We clarified that TRIM21 is involved in the ubiquitylation of TRAF6, an important factor for the NF-kappaB signaling and proinflammatory cytokine production, and that it plays a role in the negative regulation of type I interferon expression. We also observed that TRIM68 interacts with IRF family proteins and ubiquitylates them. These findings suggest that TRIM21 and TRIM68 play an important role for the pathogenesis of SLE and SS. They may have potential as a therapeutic target for these diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：免疫学 内科学 膠原病学

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SS)は“全身性自己免疫疾患”に属し、自己免疫により引き起こされる炎症が原因とされるものの発症機序は依然として不明である。これまでこれらの疾患ではリンパ球を主役とした獲得免疫の異常についてよく研究されてきたが、近年マクロファージや樹状細胞を中心とした自然免疫の果たす役割が重要視されつつある。例えば、Toll様レセプター(TLR)などのパターン認識受容体(PRR)を介したシグナルの異常が慢性炎症や自己免疫反応に関連することが明らかになってきた。

TRIM21(別名Ro52あるいはSS-A1)はSLEやSSで血中にその対応抗体が出現する自己抗原のひとつであり、血清抗SS-A抗体濃度の測定は現在に至るまで診断上大きな役割を担ってきた。近年、TRIM21遺伝子の多型性がこれらの疾患の感受性に関連すること、SLE患者の末梢血単核球中でTRIM21の発現が亢進していることなどが明らかにされ、TRIM21抗原自体も病態に関与している可能性がある。TRIM21分子はN末端側にRING、B-Box、coiled-coilの3つのドメインを有し、これら3ドメインを共通に有する蛋白群である“TRIMファミリー”に属する。RINGドメインはE3ユビキチンリガーゼ活性を持つことが多く、TRIM21も同活性を有することが*in vitro*で示されている。研究代表者らや他のグループはTRIM21が転写因子であるIRF3やIRF8をユビキチン化することにより線維芽細胞でのインターフェロン(IFN)- γ やIL-12p40の発現を制御していることを細胞レベルで明らかにしていた。さらに、研究代表者らはTRIM21が転写因子NF- κ Bの活性に関与して炎症性サイトカインを抑制的に制御していることを*Trim21*ノックアウトマウスの解析に明らかにしていた。

2. 研究の目的

以上の知見を踏まえ、本研究ではTRIM21の自然免疫系における生理的機能をさらに詳細に調べ、SLE・SSでの病態におけるTRIM21の役割を解明するとともに、炎症制御の新たな治療戦略の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞の炎症性サイトカイン産生能におけるTRIM21の役割

研究代表者らはこれまでの実験により*Trim21*ノックアウトマウスから得た線維芽細胞においてTLR刺激を加えた際のNF-

Bの活性化の程度が野生型と比較して高く、NF- κ B依存的炎症性サイトカインであるIL-1、IL-6、TNF等のmRNA誘導が亢進していることを明らかにしていた。本研究ではまず、TRIM21の基質となる標的蛋白の候補を絞り、TRIM21との相互作用を高発現系の免疫沈降法で確認した。得られた結合蛋白がTRIM21によってユビキチン化されるかを調べるためにユビキチン化試験を行った。

(2) SLE・SSの病態でのTRIM21の役割

*IRF5*や*IRF8*はgenome wide association study(GWAS)によりSLEの疾患感受性遺伝子として明らかにされており、いわゆる“IFNシグニチャー”との関連性が示唆されている。TRIM21の“IFNシグニチャー”における役割を調べるために、寛解期のSLE患者、SS患者、および健常者の末梢血単核球(PBMC)を分離してmRNAを精製し、定量RT-PCRによりTRIM21 mRNAの発現量を調べた。さらに、PBMC中のTRIM21蛋白の量をウェスタンブロット法で検討した。また、TRIM21の発現量とI型IFNの発現の関連、TRIM21の発現量とIRFファミリーの発現量の関連、あるいはTRIM21の発現量とIRFファミリーのユビキチン化の関連について調べた。

(3) TRIM68の機能解析

TRIM68はTRIM21と同様SLE・SSで見られる自己抗原の一つであり、TRIMファミリーに属する蛋白である。TRIM68とTRIM21の構造上の類似から、TRIM68もいくつかのIRFと結合してユビキチン化することによりIRF依存的なサイトカイン産生に影響を与えている可能性があった。そこで、TRIM68とIRFファミリーの相互作用を高発現系の免疫沈降法によって検討し、さらにTRIM68のIRFファミリーに対するユビキチン化能を検討した。さらに、TRIM68のIRF群を介した機能について調べた。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞の炎症性サイトカイン産生能におけるTRIM21の役割

マウスEGFP-TRIM21融合蛋白をNIH3T3細胞株に高発現させ、NF- κ B関連蛋白の量的変化をウェスタンブロット法にて調べた結果、EGFP-TRIM21の発現量に依存的に内在性TRAF6の発現量が低下していた。免疫沈降法ではV5-p62の発現量依存的にEGFP-TRIM21とTRAF6の共沈を認め、p62が両者の相互作用に必要であることが明らかになった。また、TRIM21がp62の存在下でTRAF6をユビキチン化することを明らかにした。以上から、TRIM21がp62、TRAF6と複合体を形成することで、TRAF6のユビキチン化を促進し、NF- κ Bの活性に影響を

与えていることが示唆された。

(2) SLE・SSの病態でのTRIM21の役割

SLE・SS患者および健常者からPBMCを採取してqPCR法を行った結果、SLE群およびSS群では健常者群と比較してTRIM21の発現が有意に高かった。SLE群でIRF7, SS群でIRF3, IRF5, IRF7の発現量が健常者群と比べて有意に高かった。I型IFN誘導遺伝子群の発現量もSLE群およびSS群では健常者群と比較して有意に高かった。一方I型IFNのmRNA発現量はむしろSLE群およびSS群で有意に低かった。健常者ではTRIM21のmRNA量とI型IFNのmRNAの発現量は逆相関していたが、SLE患者ではこの逆相関はみられなかった。SLE患者においてはIRF蛋白群のユビキチン化が抑制されていた。以上から、TRIM21はSLE・SS病態においてIRF蛋白群をユビキチン化することによってI型IFNの産生を抑制しようとしている可能性が示唆された。

(3) TRIM68の機能解析

TRIM68 cDNAを用いてEGFP-TRIM68融合蛋白発現ベクターを作成し、Flag-IRF融合蛋白発現ベクターとともにHEK293細胞株に高発現して免疫沈降法を行った結果、IRF3およびIRF8とTRIM68の相互作用が示唆された。また、TRIM68がIRF3およびIRF8をユビキチン化することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Ryusuke Yoshimi, Atsuhisa Ueda, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system. *Clin Dev Immunol*. 査読有, 2012, 2012, 606195, DOI: 10.1155/2012/606195

Ryusuke Yoshimi, Yoshiaki Ishigatsubo, Keiko Ozato: Autoantigen TRIM21/Ro52 as a possible target for treatment of systemic lupus erythematosus. *Int J Rheumatol*. 査読有, 2012, 2012, 718237, DOI: 10.1155/2012/718237

[学会発表](計8件)

吉見竜介, 芳田祐子, 神山玲光, 吉居廣朗, 塚原利典, 尾里啓子, 石ヶ坪良明: 自己免疫疾患におけるTRIM21-IRF8系の役割. 第4回T-cell Camp. 小田原,

2014年5月31日.

吉見竜介: IL-6産生におけるユビキチン修飾系の役割. 第3回RAとIL-6学術講演会. 横浜, 2014年5月21日.

Reikou Kamiyama, Ryusuke Yoshimi, Toshinori Tsukahara, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: The dysfunction of the E3 ubiquitin ligase TRIM21 in systemic lupus erythematosus. *The American Association of Immunologists 101st Annual Meeting*: Pittsburgh, Pennsylvania, May 4, 2014.

神山玲光, 吉見竜介, 國下洋輔, 岸本大河, 峯岸薫, 浜真麻, 桐野洋平, 浅見由希子, 上田敦久, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: 全身性エリテマトーデスにおける自己抗原TRIM21の役割. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京, 2014年4月24日.

Ryusuke Yoshimi, Reikou Kamiyama, Toshinori Tsukahara, Kaoru Minegishi, Maasa Hama, Yohei Kirino, Yukiko Asami, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: Autoantigen TRIM21/Ro52 negatively regulates TRAF6 expression via TRIM21-p62-TRAF6 trimer formation. *12th International Symposium on Sjögren's Syndrome*: Kyoto, Japan, October 10, 2013.

Ryusuke Yoshimi, Toshinori Tsukahara, Reikou Watanabe, Maasa Hama, Atsushi Ihata, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: The E3 ubiquitin ligase TRIM21 promotes degradation of TRAF6 via TRIM21-p62-TRAF6 complex formation. *The Joint International Meeting of The 78th Meeting of The Japanese Society of Interferon and Cytokine Research and The 21st International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*: Tokyo, Japan, May 20, 2013.

Ryusuke Yoshimi, Reikou Watanabe, Toshinori Tsukahara, Maasa Hama, Atsushi Ihata, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo:

The E3 ubiquitin ligase TRIM21 forms a complex with p62 and TRAF6 and promotes degradation of TRAF6. *The American Association of Immunologists 100th Annual Meeting: Honolulu, Hawaii, May 6, 2013.*

渡邊玲光, 吉見竜介, 岳野光洋, 浜真麻, 岸本大河, 上原武晃, 浅見由希子, 井畑淳, 上田敦久, 石ヶ坪良明: 全身性エリテマトーデスではI型インターフェロンの発現制御機構が破綻している. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会: 京都, 2013年4月20日.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉見 竜介 (YOSHIMI, Ryusuke)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号 : 7 0 5 8 5 2 6 5