

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461479

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおける炎症制御機構の破綻メカニズム

研究課題名(英文) The mechanism of dysregulation of inflammation in systemic lupus erythematosus

## 研究代表者

浅見 由希子 (ASAMI, Yukiko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：40644464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000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)は全身性自己免疫疾患に属し、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に注目し、患者検体を用いて病態での役割を検討した。その結果、TRIM21の発現は健常者群と比較してSLE群で有意に亢進しており、疾患活動性と関連していた。健常者群ではTRIM21 mRNA発現量とI型インターフェロン(IFN) mRNA発現量は逆相関していたが、SLE群では相関がみられなかった。以上から、SLEの病因としてTRIM21によるI型IFN発現抑制機構の破綻が考えられ、新規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 pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) or Sjogren's syndrome (SS) is still unknown. In this study, we investigated the role of autoantigen TRIM21 in SLE pathogenesis. The mRNA level of TRIM21 was higher in peripheral blood mononuclear cells from patients with SLE as compared to healthy controls (HC). TRIM21 mRNA levels correlated positively with SLE disease activity. Type I interferon (IFN) mRNA levels showed a negative correlation with TRIM21 mRNA levels in HC but not in patients with SLE. These results suggest that dysregulation of TRIM21 to function as a negative regulator for type I IFN expression is one of the cause of SLE pathogenesis. Thus TRIM21 may have potential as a therapeutic target for SLE.

研究分野：医歯薬学

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

全身性自己免疫疾患に分類される全身性エリテマトーデス (SLE) やシェーグレン症候群 (SS) においては、自己免疫反応によって生じる炎症が原因とされているが、その発症機序は依然として不明である。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これまで主に研究されてきたが、近年では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るようになった。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ている。

TRIM21 (別名 Ro52 あるいは SSA1) は SLE や SS で血中にその対応抗体が出現する自己抗原であり、血清抗 SSA 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いる。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や、SLE 患者の末梢血単核球 (PBMC) 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示唆される。

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、“TRIM ファミリー”に属する。一般に 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。TRIM21 の免疫学的機能についてはまず T 細胞の IL-2 産生能、B 細胞の増殖能等の獲得免疫系での役割を示唆する細胞レベルでのデータが報告された。また、生理的意義は不明であるが TRIM21 の C 末端側に存在する PRY/SPRY (B30.2) ドメインが免疫グロブリン IgG と強く結合することも報告されている。申請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 I 型インターフェロン (IFN) 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た。さらに、申請者らは *Trim21* ノックアウトマウスを用いて、TRIM21 が転写因子 NF- $\kappa$ 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明らかにしている。

TRIM21 は SLE・SS において認められる自己抗原であることは古くから知られていたが、それが病態にどのような役割を持っているかは依然として明らかではない。TRIM21 の生理的役割については申請者らや他のグループの最近の研究で少しずつ明らかになってきたが、病態に絡めた研究の報告はまだなされていなかった。

## 2. 研究の目的

以上の知見を踏まえ、本研究ではトランスレショナルリサーチとして TRIM21 の SLE・SS 病態における役割について SLE・SS 患者の検体を用いて解析し、TRIM21 を治療標的とした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。

具体的には、以下の 4 点について解析することを目的とした。

- (1) SLE・SS 患者における TRIM21 の発現。
- (2) SLE における TRIM21 の発現量と I 型 IFN 産生の関係。
- (3) TRIM21 の発現量と SLE の疾患活動性の関係。
- (4) IFN シグニチャーにおける TRIM21 の役割。

これら 4 点の検討によって TRIM21 の SLE・SS 病態での役割を探ることにより、得られた結果はおのずと SLE・SS 病態に関する新たな知見となり、ひいては新規治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

## 3. 研究の方法

- (1) SLE・SS 患者における TRIM21 の発現

SLE・SS 患者の PBMC 中で TRIM21 mRNA の発現が亢進していることはすでに報告されているが、欧州の地域限定的データであり症例数も少なく、これを支持するその後の報告もなかった。また、蛋白レベルでの TRIM21 の発現量の変化についてはまだ報告がなかった。SLE や SS において TRIM21 遺伝子のイントロン部の多型性が数多く指摘されており、TRIM21 の発現量が SLE・SS 患者において健常者と比較して変化している可能性は十分あった。そこで、まず寛解期の SLE 患者、SS 患者、および健常者について 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 3 者で比較した。また、PBMC 中の TRIM21 蛋白の量をウェスタンブロット法で比較した。

- (2) TRIM21 の発現量と I 型 IFN 産生の関係

樹状細胞や線維芽細胞が分泌する I 型 IFN はその抗ウイルス作用により自然免疫系で重要な役割を持つサイトカインの一群である。同時に、SLE や SS 患者の末梢血中では“IFN シグニチャー”とよばれる I 型 IFN 誘導遺伝子群の発現亢進現象が認められ、SLE や SS の疾患形成における I 型 IFN の重要性が示唆されている。TRIM21 も I 型 IFN 誘導遺伝子の一つであることから、SLE・SS の寛解状態においては I 型 IFN の産生亢進に伴って TRIM21 mRNA の発現が増加していることが予想された。一方、申請

者らや他のグループが行ったこれまでの基礎研究の結果から、TRIM21 が炎症性サイトカインの産生において抑制的な役割を持つことが示唆されていた。そこで、寛解期の SLE 患者および健常者から得た PBMC より mRNA を精製し、定量 RT-PCR により TRIM21 mRNA の発現量と I 型 IFN mRNA の発現量の関連を調べた。

(3) TRIM21 の発現量と疾患活動性の関係  
これまでの報告では *Trim21* ノックアウトマウス由来の線維芽細胞において NF- $\kappa$ B 活性が野生型と比較して高く、NF- $\kappa$ B 依存的炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6 mRNA の発現が亢進していることが明らかにされていた。これらの炎症性サイトカインは SLE・SS における炎症に重要であるが、TRIM21 の発現量と SLE の疾患活動性の関連を示した臨床的報告はまだなかった。そこで、SLE 患者において発症期から治療経過中に経時的に PBMC を採取して mRNA を精製して cDNA を作成し、定量 RT-PCR により TRIM21 mRNA の発現量と疾患活動性の関連を調べた。疾患活動性の程度や有無については、日常臨床でもよく利用されている SLE 疾患活動性指数 (SLEDAI) を用いた。

(4) IFN シグニチャーにおける TRIM21 の役割

TRIM21 は N 末端側に RING ドメインを有しており、他の RING ドメインを持つ蛋白と同様 E3 ユビキチンリガーゼ活性を持っている。これまでに、TRIM21 が I 型 IFN の産生に関与する転写因子群である IRF ファミリーのユビキチン化に関与することが報告されていた。したがって TRIM21 が IRF 群のユビキチン化を介して I 型 IFN の産生を制御しており、その変調が SLE の病態形成に関与している可能性が考えられた。そこで、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 患者および健常者の PBMC を分離してプロテアソーム阻害薬 MG-132 の存在下および非存在下で培養し、ユビキチン化された IRF 蛋白群の量をウェスタンブロット法で比較した。

#### 4. 研究成果

(1) SLE・SS 患者における TRIM21 の発現  
TRIM21 の発現量が SLE・SS 患者において健常者と比較して変化している可能性を検討した。SLE・SS 群および健常者群から PBMC を採取して mRNA を抽出した後、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し qPCR 法を行った。その結果、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。さらに SLE 群と健常者群で PBMC 中の TRIM21 蛋白量をウェスタンブ

ロット法で比較した結果、SLE 群では健常者群と比較して TRIM21 蛋白が有意に多く発現していることが分かった。このことから SLE・SS 病態において TRIM21 が何らかの重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(2) TRIM21 の発現量と I 型 IFN 産生の関係

I 型 IFN 誘導遺伝子である *MX1*、*SIGLEC1*、*IFI44*、*IFI27* の発現量を SLE 群と健常者群で比較した。その結果、SLE 群では健常者群と比較してこれらの I 型 IFN 誘導遺伝子群の発現が有意に高く、これまで報告されている SLE における IFN シグニチャーが実際に確認された。一方 I 型 IFN の mRNA 発現量を調べたところ、健常者群と比較して SLE 群でむしろ有意に低かった。そこで、定量 RT-PCR により TRIM21 mRNA の発現量と I 型 IFN mRNA の発現量の関連を調べたところ、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。一方、SLE 患者では相関はとくにみられなかった。このことから TRIM21 は生理的には I 型 IFN の産生を抑制するが、SLE 病態においてはその抑制機構が作用していない可能性が示唆された。

(3) TRIM21 の発現量と疾患活動性の関係

SLE 患者において発症期から治療経過中に経時的に PBMC を採取して mRNA を精製し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。さらに、得られた cDNA を用いて定量 RT-PCR を行い、TRIM21 mRNA の発現量と疾患活動性の関連を調べた。その結果、治療に伴って疾患活動性指数 SLEDAI は低下したが、それとともに TRIM21 mRNA の発現量も低下しており、SLEDAI 値と TRIM21 mRNA の発現量には正の相関がみられた。この結果からも、SLE の病態における TRIM21 の関与が示唆された。

(4) IFN シグニチャーにおける TRIM21 の役割

寛解期の SLE 患者および健常者の血液から PBMC を分離し、MG-132 の存在下および非存在下でこれを培養した後、細胞溶解液を作成した。得られた細胞溶解液を用いてウェスタンブロット法を行い、細胞溶解液中に存在するユビキチン化された IRF 蛋白群の量を SLE 群と健常者群で比較した。その結果、健常者においては MG-132 非存在下と比較して MG-132 の存在下で IRF3 や IRF5 の蛋白量が増加していることが分かった。それに対して、SLE 患者においては MG-132 非存在下と MG-132 の存在下では IRF3 や IRF5 の蛋白量に差がみられなかった。このことから、生理的には TRIM21 は IRF 群の蛋白量をユビキチン化によりコントロールしているのに対して、SLE 病態ではこれが正

常に行われていないことが示唆された。

以上(1)～(4)の研究成果より，TRIM21 の IRF のユビキチン化による I 型 IFN 産生の制御が SLE では破綻している可能性が示唆された。

日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50236494

上田 敦久 (UEDA, Atsuhisa)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：60295483

## 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)

[学会発表](計3件)

神山玲光, 吉見竜介, 土田奈緒美, 杉山裕美子, 峯岸薫, 田村真麻, 桐野洋平, 上原武晃, 浅見由希子, 関口章子, 出口治子, 井畑淳, 大野滋, 川井孝子, 五十嵐俊久, 長岡章平, 石ヶ坪良明, 上田敦久: 強皮症における抗 SS-A 抗体やリウマチ因子の臨床的意義. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016 年 4 月 22 日.

吉見竜介, 渡邊俊幸, 小林幸司, 神山玲光, 峯岸薫, 浜真麻, 桐野洋平, 浅見由希子, 山崎哲, 関口章子, 須田昭子, 出口治子, 井畑淳, 上田敦久, 大野滋, 岳野光洋, 川井孝子, 五十嵐俊久, 長岡章平, 石ヶ坪良明: 強皮症において抗 SS-A 抗体は指尖潰瘍の発現と関連する. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区), 2014 年 4 月 26 日.

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. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区), 2014 年 4 月 24 日.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

浅見 由希子 (ASAMI, Yukiko)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員  
研究者番号：40644464

### (2)研究分担者

吉見 竜介 (YOSHIMI, Ryusuke)  
横浜市立大学・附属病院・助教  
研究者番号：70585265

岳野 光洋 (TAKENO, Mitsuhiro)