

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09997

研究課題名(和文) STAT4による type I IFN シグナル制御機構の解析-SLEの病態解明へ-

研究課題名(英文) Investigation on type I IFN signal regulation by STAT4 -toward elucidation of SLE pathogenesis-

研究代表者

岩崎 由希子 (Iwasaki, Yukiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30592935

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)：SLEは代表的な全身性自己免疫疾患であり、これまでに50を超える疾患感受性多型が報告されているが、病態への関与機構は詳細不明なものが多い。本研究は代表的SLE GWAS SNPsであるSTAT4の病態解明に端を発したが、分子生物学的手法により解明を進めることに難渋した。その為、末梢血免疫担当細胞トランスクリプトーム解析結果から、注目すべきサブセットや分子を絞り込む方針とし、メモリーB細胞の病態形成における重要性と鍵分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLEの病態形成において、type I interferon (IFN)シグナルの重要性は広く認識されているが、その詳細なメカニズムは未解明である。当初、疾患感受性遺伝子であるSTAT4について、type I IFN signalとの関わりから研究を開始したが、ヒト検体による検証の難しさが高い障壁となった。次いで、ヒト末梢血免疫担当サブセットのトランスクリプトーム解析により、メモリーB細胞における酸化的リン酸化の重要性を同定した。全ゲノムシークエンスと組み合わせた解析により、その制御に重要と想定される分子の同定に至った。新規治療戦略に繋がる学術的・社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：SLE is a prototype of systemic autoimmune diseases. Although over 50 SNPs have been reported, the precise contributions to the pathogenesis remain unclear. At the beginning of this study, I focused on the role of STAT4, a famous signal transducer, in view of type I IFN signaling, but I faced some difficulties in proceeding my project by conventional molecular biology methods especially using human samples. I changed my strategy to using RNA-seq analysis from each immune cell subset of our SLE and HC cohorts. Memory B cell importance for the pathogenesis was revealed and I also identified a specific molecule which seems to be a key player for SLE B cells.

研究分野：膠原病、免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス STAT4 type I IFN B cell

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) Systemic Lupus Erythematosus (SLE)は、全身性自己免疫疾患であり、これまでに 50 を超える疾患感受性多型(single nucleotide polymorphisms (SNPs))が報告されている一方で、それらの病態における関与の詳細は不明である。とりわけ signal transducers and activators of transcription (STAT)4 の SNP は Human leukocyte antigen (HLA)以外の領域で最も強く SLE と関連している遺伝子であり、病態形成に重要な役割を担っている可能性がある。

(2) SLE の病態形成における type I IFN の重要性は古くから知られており、本来 STAT4 はサイトカイン IL-12 のシグナル伝達における役割が有名ではあるが、rs7574865 のリスクアレルをもつヒトの末梢血単核球では IFN-alpha に対する感受性が亢進していることも報告されており、SLE の病態形成機構の一端と予想された。

上記のことより、ヒト免疫担当細胞を用いて type I IFN シグナル下流における STAT4 の機能の詳細を解明することで SLE の病態機序に迫れるものと考えた。

### 2. 研究の目的

(1) Type I IFN のシグナル伝達には、STAT1、STAT2 が中心となることが以前から報告されているが、各種 STATs のリン酸化状態のバランスを詳細に評価した報告はない。このことから、type I IFN 刺激下で、特にヒトリンパ球サブセット特異的な各 STAT リン酸化状態のバランスの偏移がないかを検証し、リン酸化 pSTAT4 を介したシグナル伝達経路の存在について検証する。

(2) 特に自己抗体産生細胞である形質芽細胞(plasmablast)の分化に興味深いと考え、B 細胞における plasmablast の type I IFN signal を要する分化系において pSTAT4 を中心としてリン酸化 STATs のバランスについて評価する。

(3) SLE のモデルマウス(ループスモデルマウス)を用いた解析からは、STAT4 欠損によりループス腎炎を発症したという STAT4 の疾患抑制的な作用以外に、ループスに抵抗性であった、あるいは関係しなかったなど、マウスの系統により一致しない結果を得るものが散見されることや、T 細胞を type I IFN で刺激した際の STAT4 のリン酸化はヒトで認められるものの、マウスでは認められないことなどを踏まえ、ヒトの末梢血リンパ球サブセット(特に B 細胞)における STAT4 を中心とした type I IFN シグナル伝達調節機構の詳細を明らかにする

### 3. 研究の方法

(1) 初めに STAT4 のリン酸化状態が、SLE において変容している可能性があるかどうかを、短期間に誘導可能であり、また type I IFN が病態形成に重要と考えられている toll-like receptor (TLR)7 agonist である imiquimod 塗布によるループスモデルを STAT4 欠損マウスにおいて構築して検証する。

(2) 定常状態における SLE 患者および健常人の末梢血リンパ球サブセットにおける各 STAT のリン酸化状態を細胞内染色法にて比較検討することで、STAT4 の絶対的なリン酸化状態に加え、他の STATs のリン酸化状態とのバランスを見ることで、これらのシグナル伝達分子を用いた経路が SLE 患者でどのように健常人と比べて変化しているのか検討する。

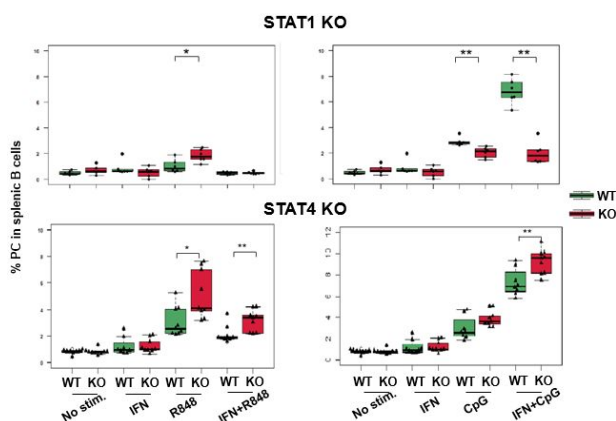
(3) 特にヒトにおける抗体産生細胞、plasmablast 分化における STAT4 の影響を検討するため、健常人由来の末梢血 B 細胞を分取し、IFN-alpha 刺激により STAT4 などのシグナル伝達分子の時系列のリン酸化状態などの詳細を評価し、STAT4 の作用の分子メカニズムについて詳細を詰めていく。

### 4. 研究成果

(1) まず、STAT4 欠損が代表的なループスモデルマウスに及ぼす影響を検討するため、imiquimod 塗布により誘導されるループスモデルマウスの実験系を用い、STAT4 欠損マウスが野生型マウスと比較し、imiquimod 塗布開始後の血清中の抗 ds-DNA 抗体価が上昇傾向にあることを確認した。加えて、SLE および健常人の末梢血リンパ球サブセット毎に、STAT1, 3, 4, 5 のそれぞれのリン酸化状態を検討したところ、多くのサブセットで既報から予想されるように STAT1 のリン酸化亢進を SLE の検体において認め、興味深いことに、B 細胞においては STAT4 のリン酸化が相対的に特に低下傾向にあることが明らかとなった。また、各 STATs のリン酸化強度(MFI: mean fluorescence intensity)とその強度比(pSTAT4/pSTAT1 など)を数値パラメータとして用い、機械学習(Random Forest)の手法により SLE と健常人の弁別に有用なパラメータを計算させたところ、B 細胞における pSTAT4/pSTAT1 比が有用であるとの出力結果を得た。これらのことから、SLE の B 細胞において STAT4 は type I IFN シグナル伝達下で STAT1 のリン酸化に対して抑制的に働いていることが示唆され、これは、ヒト B 細胞を用いた検討において、新しい STAT4 の機能の位置づけになるものと考えられた。また、imiquimod 誘導性ループスモデルマウスにおける STAT4 欠損の影響を鑑みると、SLE の病態形成において、TLR7

のような innate immune system を介する type I IFN 産生から、B 細胞において STAT4 がシグナル伝達に対して抑制的に作用することで、SLE の病態に対して protective に働いている可能性が示唆された。

(2) imiquimod 誘導性ループスモデルマウスにおいて、STAT4 欠損による自己抗体産生の上昇傾向を認めたことから、マウス B 細胞を用いて *in vitro* における TLR7 or TLR9 刺激+type I IFN による plasmablast 分化能について検討した。比較対照として STAT1 欠損マウスの B 細胞も使用した。下図のように、TLR7 (R848)・TLR9 (CpG)刺激ともに、type I IFN とのコンビネーションによって plasmablast 分化を誘導する中で、特に TLR9 と type I IFN のコンビネーションによる誘導が強く、この系において STAT1 欠損 B 細胞では plasmablast 分化が抑制されるのに対し、STAT4 欠損細胞では促進され、想定した STAT4 の plasmablast 分化における innate immune + type I IFN signaling における抑制的作用をサポートする結果を得た。

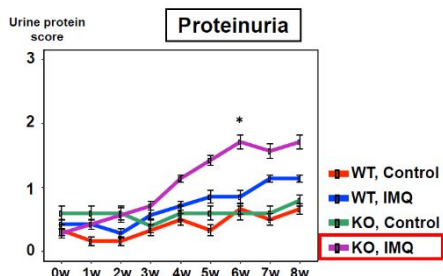


(3) ヒトナীব B 細胞を type I IFN で刺激した際に、STAT1 のリン酸化の強さが刺激後 1 時間程度でみられるのに対し、STAT4 のリン酸化のピークは 12 時間頃となるという既報があることから (*PLoS One*. 2011;6:e19366)、こうした時間軸による両者のリン酸化の調節の違いが、type I IFN シグナルの制御に重要な可能性があると考えられた。初めにヒト B 細胞セルラインである Ramos、Raji の 2 種類を使用し、type I IFN 刺激による時系列の pSTAT1、pSTAT4 の推移を評価したところ、pSTAT1 については刺激後 1~4 時間の範囲内でリン酸化のピークを迎え、以降

減弱するのに対し、pSTAT4 については、1 時間頃にピークとなり、以後減弱なくプラトーとなりリン酸化が維持される結果となった。これらの結果を受けて、セルラインという特殊な B 細胞の性質が、生理的な作用を変えている可能性を考慮し、次に健常人末梢血由来 B 細胞を用い、同様の検証を行ったところ、セルラインと同様の結果となった。一方で、pSTAT4 の MFI の変動に関しては、pSTAT1 に比べてごく僅かな上昇にとどまり、実験回数を重ねることで、データの一貫性をもった解釈が困難であった。特にこの観点において、ヒトサンプルを用いた pSTAT1 と pSTAT4 の作用機構を分子細胞生物学的手法により検証を進めることは難しいと判断し、研究の方針を修正することとした。

(4) “SLE の疾患感受性遺伝子多型が意味することの解明” という研究の動機の原点に立ち寄り、当研究室における竹島および申請者らの SLE および健常人の各末梢血免疫担当細胞サブセットの RNA-seq 結果を用い、B 細胞に注目して SLE の病態形成に重要と考えられる遺伝子・分子の同定という切り口に研究を展開する方針とした。発現変動遺伝子数の多さはメモリー B 細胞に顕著であり、そのパスウェイ解析から、酸化リン酸化 (Oxidative phosphorylation: OXPHOS) ・ミトコンドリア機能が重要であることが示唆された。これらのトランスクリプトーム解析結果と、申請者らの研究室における太田らが別途中心となって進めている全ゲノムシークエンス結果を用いた expression Quantitative Trait Locus (eQTL) の結果を組み合わせることで、SLE の B 細胞において、OXPHOS に関連しながら病態制御の鍵となっていることが期待される候補分子 PRDX6 を同定した。PRDX6 は SLE の疾患感受性遺伝子であり、eQTL 効果として、リスクアレルで発現が低下することから、SLE の病態形成に関して抑制的に作用している分子であると想定された。

(5) そこで申請者らは、Prdx6 の遺伝子欠損マウスを作成し、imiquimod 誘導性ループスモデルマウスで *in vivo* における検証を行った。下図のように、尿タンパクの出現は、ノックアウトマウスで促進され、かつ血清中の ds-DNA もノックアウトマウスで上昇する傾向が示された。興味深いことに、ミトコンドリアの OXPHOS の機能を評価する Flux Analyzer を用いた実験系において、ミトコンドリア酸素消費量は、ノックアウトマウスで亢進していることも示され、PRDX6 が OXPHOS ・代謝の制御を介して、疾患に抑制的に働いていることが実験的にサポートされる結果となった。



SLE の病態形成において、type I IFN の重要性が歴史的にもよく知られているが、その詳細な調節機構は不明である。Type I IFN の代表的な分子 IFN-alpha に対する阻害剤が SLE の治療の臨床応用として注目はされているが、依然 3 割ほどの患者に対しては無効であり、新しい治療標的探索については、常に望まれている状況である。本研究は、当初の STAT4 の機能解析を中心とした研究からは方針転換となったものの、SLE 患者および健常人のトランスクリプトーム解析結果等を取り入れることで、SLE の病態形成にメモリーB 細胞が重要であること、特にミトコンドリア機能、OXPHOS を介した機構が重要であり、さらにその鍵となる分子を同定してノックアウトマウスで機能検証まで進めたところに、今後の SLE 研究において、特に新規治療標的探索としての意義は大きいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹島雄介、岩崎由希子、太田峰人、永淵泰雄、住友秀次、高地雄太、岡村僚久、山本一彦、藤尾圭志
2. 発表標題 Immune cell-type specific multi-omics analysis revealed contribution of mitochondria in B cells to systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白井晴己
2. 発表標題 STAT4によるtype I interferonシグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第4回内科学専攻大学院セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野正博、岩崎由希子、竹島雄介、太田峰人、永淵泰雄、住友秀次、岡村僚久、藤尾圭志
2. 発表標題 Immune cell profiling of systemic lupus erythematosus reveals a key regulator of its pathogenesis and contributes to patient stratification
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎由希子
2. 発表標題 末梢血免疫担当細胞サブセットのマルチオミックス解析からみるSLEにおけるtype I IFN signature
3. 学会等名 第3回日本免疫不全自己炎症学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【著書】  
解説 “SLEの病態形成におけるミトコンドリアの関与”  
臨床免疫・アレルギー科（科学評論社） 第73巻 1号p96-103 (2020)  
竹島雄介, 岩崎由希子, 藤尾圭志

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	竹島 雄介  (Takeshima Yusuke)		
研究協力者	白井 晴己  (Shirai Harumi)		
研究協力者	中野 正博  (Nakano Masahiro)		