

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08412

研究課題名(和文)自己抗体産生におけるインターフェロン誘導性ヒストン修飾酵素SETDB2の機能解明

研究課題名(英文)Role of histon methyltransferase SETDB2 on the autoantibody production

研究代表者

北畠 正大 (Kitabatake, Masahiro)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60457588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、転写抑制に働くヒストンメチル化酵素SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) はLPS刺激によりI型インターフェロン依存的に発現誘導されること、自然発症型自己免疫疾患モデルマウスのB1a細胞で発現低下していることを見出した。CRISPR-Cas9システムを用いて作製したSETDB2欠損マウスの解析より、SETDB2はI型インターフェロンのオートクラインによるpositive feedbackを抑制し、形質細胞への分化を制御することが明らかとなり、SETDB2の発現異常は自己抗体産生ならびに自己免疫疾患発症と深く関連することが示唆された。

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などの全身性自己免疫疾患では、自己反応性B細胞が排除されずに活性化・増殖し、高親和性のIgG型自己抗体を産生して組織障害を引き起こす。この過程では、I型インターフェロンの産生亢進による免疫系細胞の活性化が関与していることが明らかとなっているが、その分子機構は未解明な点が多い。本研究成果は、I型IFNシグナルの異常亢進と自己抗体産生にSETDB2の発現低下が関与することを示すもので、自己免疫疾患発症の分子機構の解明に繋がる。また、SETDB2やその制御因子に対する分子標的薬の開発により、自己免疫疾患に対する新規の治療法や診断法の開発へと発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) was induced in B1a cells by the stimulation of lipopolysaccharide (LPS), which induces the proliferation, antibody production and type-I IFN production. We also showed that SETDB2 expression was lower in B1a cells from autoimmune prone mice. Thus, we have developed the SETDB2 deficient mice by improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (iGONAD) method, which bases on in situ electroporation of CRISPR/Cas9 complex to embryos. SETDB2 deficient B1a cells highly expressed the type-I IFN by LPS or IFN stimulation. In addition, expression of xbp1 and prdm1, which relate to plasma cell differentiation, was highly induced in SETDB2 deficient B cells. These results suggest that SETDB2 suppressed the positive feedback of type-I IFN signaling and plasma cell differentiation, and its abnormality might cause the autoantibody production thorough the excessive IFN signaling.

研究分野：免疫学

キーワード：インターフェロン ヒストン修飾酵素 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) に代表される全身性自己免疫疾患では、自己反応性 B 細胞が排除されずに活性化・増殖し、IgG 型の高親和性自己抗体を産生するようになり、組織障害を引き起こすことが知られている。一方、健康人においても IgM 型の低親和性自己抗体が検出されるが、多くの人は疾患発症には至らない。このことから、IgM 型の低親和性自己抗体産生 B 細胞を活性化・増殖させ、IgG 型の高親和性自己抗体産生細胞へと分化誘導する分子機構の異常亢進が疾患発症のトリガーと考えられる。

自己免疫疾患における自己抗体産生細胞の起源としては通常の B 細胞 (B2 細胞) とは異なる分化系に属する B1 細胞が候補としてあげられる。B1 細胞は、自己と交差反応性を示す IgM 型の抗体を自然産生し、SLE 患者や関節リウマチ患者、自己免疫疾患モデルマウスで異常に増加することが知られている。B1 細胞の異常増殖ならびに自己抗体産生の原因として、抗原受容体 (BCR) からの活性化シグナルの調節異常とともに I 型インターフェロン (IFN /) の過剰産生があげられる (図 1)

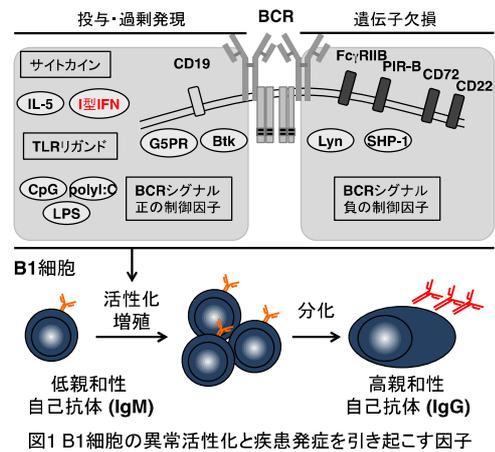


図1 B1細胞の異常活性化と疾患発症を引き起こす因子

(Nat Rev Immunol, 11:34, 2011)。実際に I 型 IFN の上昇は SLE 患者において観察され、末梢血では IFN 誘導性遺伝子群の発現上昇 " IFN signature " が認められる (J Exp Med, 197:711, 2003)。I 型 IFN は B 細胞を直接および間接的に活性化させ、双方とも発症促進に関与することが示唆されているが (J Exp Med, 213:733, 2015)、その分子機構は未解明の部分が多く残されている。これらの知見をもとに、申請者は自己反応性 B 細胞の異常活性化は B1 細胞の IFN シグナルの異常が原因となって起こるのではないかと想起した。

一方、SLE 患者や疾患モデルのゲノム解析から、自己免疫疾患の発症は複数の遺伝子発現異常が組み合わさって起こると考えられている。そこで、申請者らは包括的に遺伝子発現を調節することができるヒストン修飾によるエピジェネティクスに着目した。ヒストンメチル化酵素 SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) はこれまでに I 型 IFN により顕著に発現誘導することが

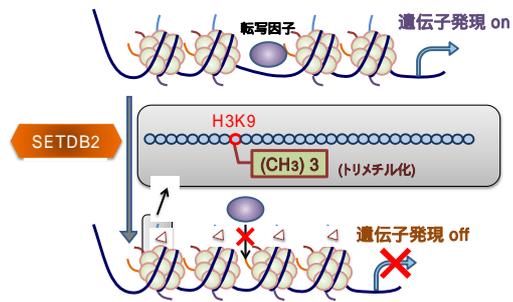


図2 ヒストンメチル化酵素SETDB2による転写抑制

知られている (PLoS Pathog, 11:e1005338, 2015)。SETDB2 はヒストン H3K9 (9 番目のリジン) のジメチル化/トリメチル化を引き起こし、標的遺伝子の転写を抑制する (図 2) (Genome Biol, 6:227, 2005)。SETDB2 遺伝子の存在する染色体 13q14 領域は、高率に自己抗体産生を引き起こす慢性 B リンパ腫や SLE 患者の抗体産生形質細胞で欠失していることが報告されている (Cancer Res, 61:2870, 2001; J Bone Marrow Res, 2:147, 2014)。これらの知見から、B 細胞における SETDB2 発現低下は自己反応性 B 細胞の異常活性化を引き起こすのではないかと考えた。

2．研究の目的

自己免疫疾患の発症とⅠ型 IFN の産生異常は関連することが明らかであるものの、その分子機構は未解明な点が多い。ヒストンメチル化酵素 SETDB2 はⅠ型 IFN によって発現誘導される転写制御因子であることから、本研究では、B 細胞において SETDB2 がどのような刺激により誘導されるか、B 細胞における SETDB2 がどのような遺伝子の発現を制御し、B 細胞の活性化や分化にどのような影響を与えているかを明らかにすることで、自己抗体産生と、それによって引き起こされる自己免疫疾患発症の機序の一端を解明することを目的とした。

3．研究の方法

(1) SETDB2 発現誘導機構の解析

雌性 C57BL/6 マウス、自然発症型自己免疫疾患モデル NZB x NZW F1(BWF1)マウスの腹腔および脾臓から B1a 細胞ならびに B2 細胞を分離、回収した。B 細胞の増殖に関連する種々の因子で刺激を行い、SETDB2 の発現変動ならびにその他の関連遺伝子の発現を定量性 PCR で解析し、SETDB2 の発現を上昇させる刺激・シグナルの検討を行なった。

(2) SETDB2 欠損マウスの作製

SETDB2 の機能を解析するために、CRISPR-Cas9 システムを基に開発された improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (iGONAD) 法により、SETDB2 欠損マウスを作製した。

(3) SETDB2 が B 細胞の活性化・分化に与える影響の解析

作製した SETDB2 欠損マウスより B1a 細胞および B2 細胞を分離、回収し、種々の B 細胞増殖因子により B 細胞を刺激して、B 細胞の活性化・分化に関連する遺伝子の発現変動を野生型 B 細胞と比較した。

4．研究成果

(1) SETDB2 発現誘導の解析

B 細胞の増殖に関連する刺激を行い、どのような刺激によって SETDB2 の発現誘導が行われるかを検討した。これまでの申請者らのマクロファージにおける研究結果と一致して、C57BL/6 マウスの B1a 細胞および B2 細胞においてもⅠ型 IFN が SETDB2 の発現を顕著に誘導することが確認された。また、B 細胞の著しい増殖と抗体産生を引き起こす LPS 刺激も、特に B1a 細胞において顕著に SETDB2 の発現を誘導できることが明らかとなった。一方、抗原受容体シグナルや CD40 シグナルを活性化させる刺激では、SETDB2 の明らかな発現誘導は起こらなかった。B1a 細胞における LPS 刺激では IFN- γ の発現も認められ、その発現は SETDB2 の発現よりも早期に誘導されていたことから、LPS 刺激による SETDB2 の発現上昇は、B1a 細胞自身が分泌する IFN- γ のオートクライン作用によるものであることが示唆された。また、自己免疫疾患を発症する加齢 BWF1 マウス由来の B1a 細胞ならびに B2 細胞において SETDB2 の発現を解析したところ、健康マウス (C57BL/6) の細胞と比較して発現が低下していたことから、SETDB2 発現低下と疾患発症との関連が示唆された。

(2) SETDB2 欠損マウスの作製

iGONAD 法は交配した雌性マウスの卵管内の受精卵に対して、電気パルスにより CRISPR-Cas9

を導入することで遺伝子改変マウスを作製する新技術である。SETDB2 遺伝子の Exon 領域を標的とする guide RNA を作製し、ribonucleoprotein complex を C57BL6/N マウスの卵管内受精卵に導入した。その結果、SETDB2 の Exon 領域に遺伝子欠損を持つ 2 系統のヘテロ欠損マウスの作製に成功した。このマウスを交配し、C57BL/6N 背景の SETDB2 ホモ欠損マウス樹立をし、以下の実験に使用した。

(3) SETDB2 が B 細胞の活性化・分化に与える影響の解析

SETDB2 欠損マウス由来の B1a 細胞ならびに B2 細胞を B 細胞増殖因子により刺激した。LPS 刺激した SETDB2 欠損 B 細胞は、形質細胞分化に重要な因子である *xbp1* および *prdm1* の発現が亢進していた。また、SETDB2 欠損 B1a 細胞は *ifnb* を高発現しており、LPS ならびに I 型 IFN 刺激によって顕著に発現量が増加した。一方、体細胞突然変異やクラススイッチに必須の分子である *aicda* の発現は SETDB2 欠損 B 細胞で低下していた。以上の結果より、SETDB2 は I 型 IFN や形質細胞分化に関連する因子の発現を抑制し、自己抗体産生形質細胞への分化の制御に働くことが示唆された。また I 型 IFN により誘導され、自己抗体産生細胞への分化の促進に働く因子として、申請者はこれまでに脱リン酸化酵素制御因子 G5PR を見出しているが、SETDB2 欠損 B1a 細胞は IFN 刺激による G5PR 発現亢進が認められ、G5PR が SETDB2 の標的分子の 1 つである可能性が示唆された。

以上の結果より、自己抗体産生細胞の供給源である B1a 細胞において、SETDB2 は LPS 刺激などにより I 型 IFN 依存性に発現が誘導され、オートクラインによる I 型 IFN シグナルの positive feedback を抑制し、抗体産生細胞への分化を制御することが明らかとなった。これらの結果は、I 型 IFN の過剰産生によって起こる自己免疫疾患を SETDB2 の発現制御によりコントロールできる可能性を示唆しており、今後、SETDB2 やその制御因子に対する分子標的薬の開発により、自己免疫疾患に対する新たな治療法や診断法確立へと発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kitabatake M, Matsumura Y, Ouji-Sageshima N, Nishioka T, Hara A, Kayano SI, Ito T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Persimmon-derived tannin ameliorates the pathogenesis of ulcerative colitis in a murine model through inhibition of the inflammatory response and alteration of microbiota.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86608-1.	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 -
1. 著者名 Terada-Ikeda C, Kitabatake M, Hiraku A, Kato K, Yasui S, Imakita N, Ouji-Sageshima N, Iwabuchi N, Hamada K, Ito T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Maternal supplementation with Bifidobacterium breve M-16V prevents their offspring from allergic airway inflammation accelerated by the prenatal exposure to an air pollutant aerosol.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0238923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0238923. eCollection 2020.	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 -
1. 著者名 Kawara A, Mizuta R, Fujisawa M, Ito T, Li C, Nakamura K, Sun C, Kuwabara M, Kitabatake M, Yoshimura T, Matsukawa A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Spred2-deficiency enhances the proliferation of lung epithelial cells and alleviates pulmonary fibrosis induced by bleomycin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73752-3.	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 -
1. 著者名 Imakita N, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Hara A, Morita-Takemura S, Kasahara K, Matsukawa A, Wanaka A, Mikasa K, Ito T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Abrogated Caveolin-1 expression via histone modification enzyme Setdb2 regulates brain edema in a mouse model of influenza-associated encephalopathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36489-8	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 -

1. 著者名 Morita-Takemura S, Nakahara K, Hasegawa-Ishii S, Isonishi A, Tatsumi K, Okuda H, Tanaka T, Kitabatake M, Ito T, Wanaka A.	4. 巻 16
2. 論文標題 Responses of perivascular macrophages to circulating lipopolysaccharides in the subfornical organ with special reference to endotoxin tolerance.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-019-1431-6.	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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Sonobe S, Kitabatake M, Imakita N, Hara A, Furukawa R, Nishimura T, Ouji-Sageshima N, Ito T.
2. 発表標題 Histon modification enzyme SET domain bifurcated 2 (Setdb2) regulates acute inflammation in murine model of acute respiratory distress syndrome (ARDS)
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 Hara A, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Sonobe S, Imakita N, Furukawa R, Oda A, Ito T.
2. 発表標題 The contribution of histone-lysine N-methyltransferase Setdb2 in high mortality of secondary bacterial pneumonia via regulating cytokines and chemokines in macrophages
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 伊藤利洋、今北菜津子、王寺典子、北畠正大
2. 発表標題 エピジェネティクスによる重症インフルエンザウイルス感染症の病態解明から創薬展開へ
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sonobe S, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Imakita N, Ito T
2. 発表標題 The critical role of epigenetic regulation by Setdb2 in acute respiratory distress syndrome (ARDS) model.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imakita N, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Ito T
2. 発表標題 Histone modification enzyme Setdb2 plays critical role in a murine model of influenza associated encephalopathy.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	伊藤 利洋 (Ito Toshihiro) (00595712)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

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