

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07482

研究課題名(和文)自己免疫性疾患における転写因子MafBの役割の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of transcription factor MafB in autoimmune diseases

研究代表者

財賀 大行(SAIGA, HIROYUKI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40752499

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)：形質細胞様樹状細胞(pDC)から過剰分泌されるインターフェロン(IFN)は、自己免疫疾患のひとつである尋常性乾癬の発症原因とされている。しかしながら、これまでpDCによるIFN産生を負に制御するメカニズムは不明であった。マウスを用いたIn vivo解析から、MafBがイミキモド誘発の乾癬様皮膚炎に対する抵抗性に関与していることが示された。これらの知見は、MafBがpDCにおけるIFN誘導の負のレギュレーターとして働き、免疫恒常性の維持に重要な役割を果たすことを実証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬における病態形成には、形質細胞様樹状細胞(pDC)の存在とインターフェロン(IFN)が極めて重要な因子であることが示唆されていたが、疾患の根本的な発症や病態形成メカニズムは不明であった。本研究において、pDCのIFN産生を抑制するシステムという、より根源的な部分が明らかになったことで、疾患の詳細な病態メカニズムの解明と根本的な治療法開発に大きく飛躍することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Interferon (IFN) over-secreted from plasmacytoid dendritic cells (pDCs) cause to the pathogenesis of the autoimmune disease psoriasis vulgaris. However, the mechanism of negative regulation of IFN by pDCs remains unknown. In vivo studies indicated that MafB is involved in resistance against imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation. These findings demonstrate that MafB acts as a negative regulator of IFN induction in pDCs and plays an important role in maintaining immune homeostasis.

研究分野：自然免疫

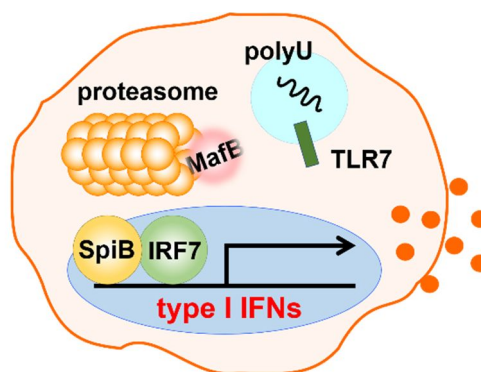
キーワード：自然免疫 形質細胞様樹状細胞 転写因子MafB 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞 (Plasmacytoid Dendritic cells; pDC) は、ウイルス感染初期に迅速かつ極めて大量に I 型インターフェロン (IFN α/β) を産生・分泌することができるユニークな自然免疫細胞である。pDC による IFN の分泌は、ウイルス拡散の抑止や排除といった生体防御に有利に働くが、一方で過剰な IFN の分泌は自己免疫疾患 (自己の抗原に対して過剰に起こる免疫反応) などを誘発する原因になっている。

これまで申請者らは、pDC による IFN 産生を負に制御するメカニズムの全貌を明らかにするために shRNA ライブラリーを用いた網羅的解析を行い、転写因子 MafB を同定した。

転写因子 MafB は pDC の核内に発現しており、IFN 産生を正に制御する分子群 SpiB/IRF7 の複合体形成を阻害することによって、pDC による IFN の産生を抑制していることを突き止めた。また、pDC に発現している転写因子 MafB の生理学的解析から、MafB mRNA が TLR 刺激の早い時期から発現量が減少することや MafB タンパク質のプロテアソームによるタンパク質分解を明らかにした。このように、いくつかの in vitro 解析によって転写因子 MafB が pDC の I 型 IFN 産生のブレーキ役として機能していることが示唆された (図)。



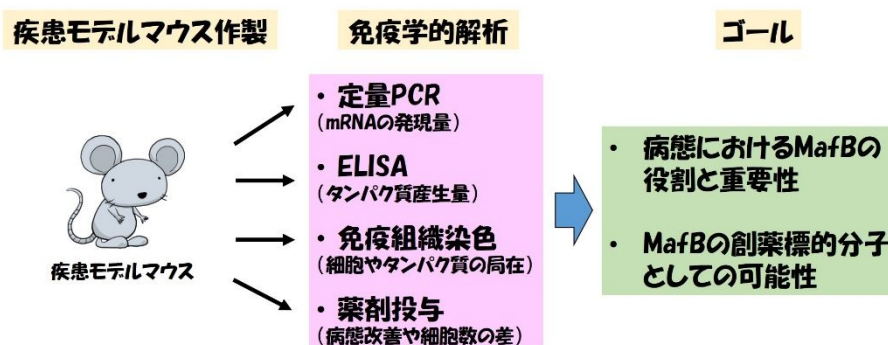
plasmacytoid dendritic cells

2. 研究の目的

これまでの申請者らの細胞を用いた in vitro 解析によって、pDC には IFN を産生するアクセルとその産生を抑制するブレーキが備わっていることが明らかになった。そこで本研究課題では、pDC の IFN 抑制システムに注目し、pDC による過剰な IFN 産生が原因で誘発される尋常性乾癬 (Psoriasis Vulgaris; PV) の発症や病態形成に対して転写因子 MafB がどのように関与しているか疾患モデル動物を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PV に対する疾患モデル動物として、市販のイミキモド (IMQ) を塗布して作製する IMQ 誘発 PV モデルマウスが多くの研究で使用されていることから、本研究では当疾患モデルマウスを用いて、PV の発症や病態形成における転写因子 MafB の機能解析を行った (図)。



(1) 疾患モデルマウスの作製

PV の発症や病態形成における転写因子 MafB の役割を明らかにするために、まず疾患モデルマウスを作製した。剃毛した C57BL/6 マウスの背部皮膚に IMQ クリームを 1 日 1 回塗布し、IMQ 誘発 PV モデルマウスを作製した (対照群にはワセリンを塗布したマウスを使用)。

(2) 定量 PCR を用いた遺伝子発現の解析

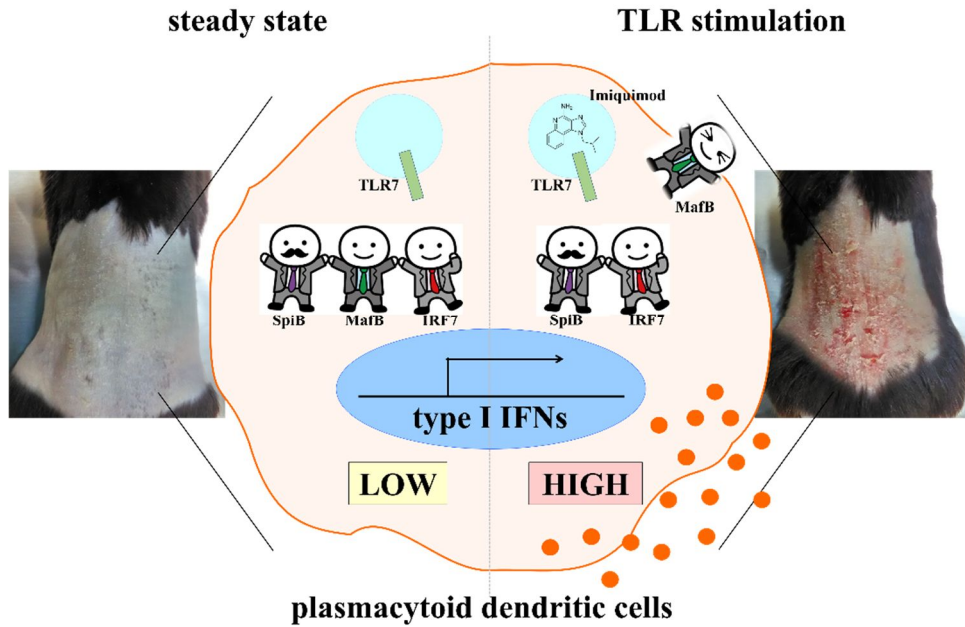
疾患モデルマウスおよび対照マウスの遺伝子発現の動向を比較するために、各マウス皮膚患部を採取し RNA を抽出した。cDNA に逆転写後、定量 PCR を用いて転写因子 MafB や IFN α / β 、PV 病態形成への関与が報告されているインターロイキン(IL)-17、IL-22、IL-23 など mRNA の発現量について解析をした。

- (3) ELISA によるタンパク質産生量の測定
疾患モデルマウスおよび対照マウスより皮膚患部を採取し、IFN α などのタンパク質を ELISA によって測定・比較した。これによって疾患モデルマウスにおける I 型 IFN の増加を確認。
- (4) pDC の局在および MafB の発現の解析
疾患モデルマウスおよび対照マウスの pDC の局在と MafB の発現量・発現場所の違いを明らかにするために、皮膚患部を採取し組織切片を作製した。各組織切片と pDC 特異抗体を用いて、pDC の局在や数を比較、また MafB タンパク質の発現量や局在についても免疫染色法を用いて明らかにした。
- (5) 薬剤投与による pDC および MafB の動向の解析
PV の治療薬として知られる Am80 は合成レチノイドであり、レチノイン酸は MafB mRNA の発現を誘導することが報告されている[Exp Cell Res. 2012, 18, 2407-2416.]。そこで、これら既存の薬剤が生体内で転写因子 MafB にどのような影響を与えているのかを明らかにするために、疾患モデルマウスおよび対照マウスの皮膚患部に薬剤を投与し、疾患病態が改善されるのか、またその際の MafB mRNA やタンパク質産生の動向、pDC をはじめとした免疫細胞の数などを解析した。

4. 研究成果

- (1) 疾患モデルマウスの作製
まず剃毛した C57BL/6 マウスの背部皮膚に IMQ クリームを塗布して PV 様の炎症がみられるかを確認した。その結果、ワセリンを塗布したコントロールマウスに比べて、IMQ クリームを塗布したマウスの背部皮膚では視覚的に明らかな炎症反応が確認された。また各マウスの皮膚切片を HE 染色したところ、IMQ マウスでは乾癬の特徴である表皮の顕著な肥厚が認められた。これらの結果から、IMQ 誘発 PV モデルマウスとして以降の実験に採用した。
- (2) 遺伝子発現の解析
(1)で作製した IMQ マウスおよびコントロールマウスの皮膚患部より RNA を抽出し、関連遺伝子の mRNA の発現量を解析した。その結果、*Mafb* のみ IMQ マウスで発現量が減少しており、それ以外の関連遺伝子群では増加が確認された。
- (3) タンパク質の解析
(1)で作製した IMQ マウスおよびコントロールマウスの皮膚患部よりタンパク質を抽出し、IFN α の産生量を比較した。その結果、IMQ マウスでは IFN α の産生量が有意に増加することが明らかになった。このことは、乾癬患者で IFN 産生が高くなることと一致する結果であった。
- (4) pDC の局在と MafB の発現量の解析
各マウスの皮膚患部の切片を作製し免疫染色を行った。マウス pDC 特異的に発現している Siglec-H 陽性細胞は真皮や皮下組織に多く集積しており、同時に MafB も発現していた。一方、IMQ マウスでは Siglec-H 陽性細胞の数に違いはなかったが、MafB の発現量が顕著に減少していた。つまり、PV 様炎症下では pDC による MafB タンパク質の発現減少や MafB mRNA の減少、および IFN α 産生量の増加が確認された。
- (5) Am80 投与における MafB の解析
転写因子 MafB の発現を上昇させる Am80 を事前に投与させた IMQ マウス (Am80 マウス) と Am80 を投与しない IMQ マウス (IMQ マウス) を比較して、転写因子 MafB の乾癬における重要性や役割を解析した。その結果、Am80 マウスでは IMQ マウスに比べて *Mafb* の発現量や pDC における MafB タンパク質の発現が高く、逆に IFN α の産生量は減少していた。また表皮の肥厚も認められなかった。以上のことから、IMQ 誘発 PV モデルマウスにおいて、転写因子 MafB の発現量 (特に pDC における) が乾癬の発症原因や病態形成に大きく関与していること、また同時に I 型 IFN 産生にも影響することを生体内で明らかにした。

- (6) ヒト pDC 細胞株 (CAL-1) を用いた in vitro 解析
マウス細胞や個体を用いた解析結果がヒトでも同様の結果が得られるのかを確認するために、ヒト pDC 細胞株である CAL-1 を用いて in vitro 解析を行った。CAL-1 細胞を TLR7/9 リガンドで刺激し、転写因子 MAFB の発現の動向や MAFB ノックアウト CAL-1 での I 型 IFN 産生量を解析したところ、これまでのマウスを用いた結果と同様の結果が得られた。このことは、本研究で得られた知見がヒトでも応用できることを示唆させる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroyuki Saiga, Masaki Ueno, Takashi Tanaka, Tsuneyasu Kaisho, Katsuaki Hoshino	4. 巻 34
2. 論文標題 Transcription factor MafB-mediated inhibition of type I interferons in plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 159-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------