

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17452

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおけるインターフェロン 過剰産生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of interferon alpha overproduction in systemic lupus erythematosus

研究代表者

村山 豪 (Murayama, Goh)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80850908

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)：全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)病態で重要な役割を果たすサイトカインとしてIFN (Interferon)が注目されている。我々は細胞内核酸受容体であるcyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) 経路を介して単球からもIFN が産生されることを初めて見出した。

そこで、STING経路を刺激したSLE患者のIFN 産生単球を用いてRNAシーケンスで解析した。その結果、細胞老化に関わるGATA4遺伝子の発現が亢進していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GATA4は酸化ストレスにより損傷DNAが蓄積することで誘導される細胞老化(senescence)で発現が亢進する。損傷DNAがcGASに感知されると炎症性サイトカイン産生が亢進するSASP(senescence-associated secretory phenotype)が生じる。GATA4はSASPにおけるNF- κ Bを介したIL-1 α 、IL-6などのサイトカイン産生に関与することが示されているが、IFN 産生への関与についての報告は国内外で確認されていない。本研究において、GATA4がIFN 産生を亢進させていること初めて示したものであり、SLEの新規治療に進展しうる発見である。

研究成果の概要(英文)：IFN (Interferon) is the most important cytokine in the pathology of systemic lupus erythematosus (SLE). We have found for the first time that SLE-monocytes produced IFN by the intracellular nucleic acid receptor cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) -stimulator of interferon genes (STING) pathway.

Therefore, we analyzed the RNA sequence by using IFN -producing monocytes of SLE patients stimulated with the STING pathway. As a result, it was found that the expression of the GATA4 gene involved in cell aging was enhanced in SLE-monocytes.

研究分野：膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス cGAS STING 単球 インターフェロン GATA4 senescence SASP

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) においては、出現する多彩な自己抗体や免疫複合体によりループス腎炎などの多臓器病変が進展すると考えられている。SLE 病態においてインターフェロン α (IFN α) 等の I 型 IFN は自然免疫応答の活性化や自己反応性 B 細胞の自己抗体産生性形質細胞への分化成熟を促すなど、広範な免疫応答を引き起こす。IFN α は核酸受容体を介した刺激により活性化した自然免疫細胞により産生され、IFN α 産生能が最も高い細胞は plasmacytoid dendritic cell (pDC) である。我々は核酸受容体である cGAS を介した cGAS-STING 経路を刺激すると pDC だけでなく単球からも IFN α が産生されることを見出し、SLE 患者の単球で IFN α 産生能が亢進しており、その産生能は SLE の疾患活動性と相関することを報告した (Rheumatology (Oxford). 2020)。末梢血単核球中の割合では pDC は 0.5% 程度と少ないが単球は 5% 程度を占める大きな細胞集団であることから、IFN α 産生単球の増加が SLE 病態に関与すると考え、次に cGAS-STING 経路を刺激した SLE 患者及び健常人由来の単球を IFN α 産生細胞/IFN α 産生非細胞に分離しそれぞれの発現遺伝子を RNA シークエンス (RNA-seq) で比較した。その結果、IFN α 産生する SLE 単球において GATA4 が有意に上昇していることが判明した。GATA4 発現が SLE における IFN α 過剰産生に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

GATA4 は老化や酸化ストレスなどにより、損傷 DNA が蓄積した際に細胞が増殖を停止する細胞老化 (senescence) で発現が誘導される。損傷 DNA が cGAS などの核酸受容体に感知されると炎症性サイトカイン産生が亢進する SASP (senescence-associated secretory phenotype) が起こる。GATA4 は SASP における NF- κ B を介した IL-1 α 、IL-6 などのサイトカイン産生に関与することが示唆されているが、GATA4 による IFN α の産生経路への関与についての報告は国内外で確認されていない。本研究計画では、GATA4 が転写因子として働き IFN α 産生を亢進させているとの仮説の実証と、その標的遺伝子を対象とした新規治療戦略の樹立を目指した。

3. 研究の方法

GATA4 過剰発現により IFN α 産生が亢進することを機能的に証明するために計画した。
 (1) GATA4 の過剰発現が実際に IFN α 産生の亢進に寄与することを明らかにするため、単球系細胞株 (U937) に GATA4 プラスミドを導入し GATA4 を過剰発現させた状態で、STING アゴニストである 2'3'-cGAMP を用いて STING 経路の刺激を行い IFN α 産生量が増加するか評価した。
 (2) RNA-seq の解析では全てのサンプルで SLE 患者、健常人の単球に対して STING 刺激を行っていた。そこで STING 刺激を行っていない SLE 患者、健常人の単球における senescence のマーカー遺伝子である CDKN2A や GATA4 の発現量を RT-PCR で比較した。

4. 研究成果

(1) GATA4 は STING 刺激で誘導され SLE で発現が亢進した

STING アゴニストである 2'3'-cGAMP で SLE/健常人の単球を刺激し、フローサイトメーターを用いて IFN α 陽性単球と IFN α 陰性単球を単離・回収し、RNA-seq で解析した。その結果、SLE/健常人ともに STING 刺激で IFN1、GATA4 の発現亢進が誘導され、健常人と比較して SLE 患者で有意に発現亢進が見られた。また SLE 単球においても、IFN α 陽性単球で有意に GATA4 の発現亢進が見られた (図 1)。

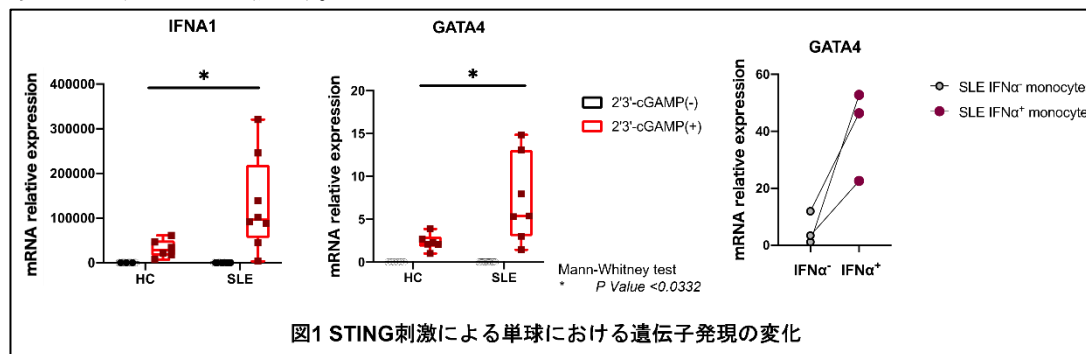


図1 STING刺激による単球における遺伝子発現の変化

(2) GATA4 過剰発現により I 型 IFN 産生が亢進した

GATA4 と I 型 IFN (IFN α/β) 産生の直接的な関係を明らかにするため、ヒト単球細胞株である U937 を用いて GATA4 過剰発現実験を行った。U937 細胞株に plasmid GATA4 を導入し、2'3'-cGAMP で刺激を行い、誘導される IFN1 および IFN β の mRNA 量を比較した。GATA4 を過剰

発現させることで STING 刺激に対する I 型 IFN mRNA の発現量が増加した。

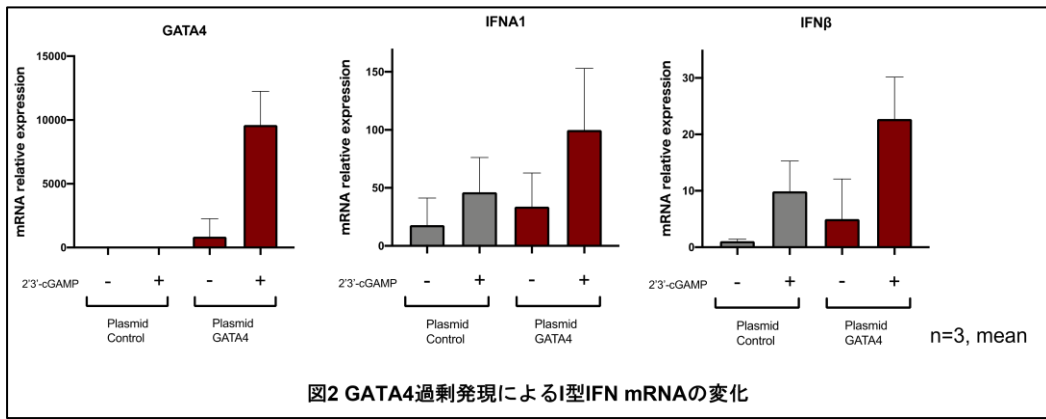


図2 GATA4過剰発現によるI型IFN mRNAの変化

(3)細胞老化の代表的マーカーの発現は SLE 単球で高く、STING 刺激で発現が亢進した
 上述の結果から STING 経路の刺激に伴い SLE 単球では高い発現量の GATA4 が誘導されることで IFNα 産生が亢進する可能性が見いだされた。GATA4 は酸化ストレスなどにより、損傷 DNA が蓄積した際に細胞が増殖を停止する細胞老化(senescence)で発現が誘導される。また、損傷 DNA が cGAS などの核酸受容体に感知されると炎症性サイトカイン産生が亢進する SASP(senescence-associated secretory phenotype)が生じることから、SASP によって IFNα 産生が誘導されている可能性が考慮された。さらに上記(1)RNA-seq における pathway 解析の結果から、SLE 患者単球では senescence 関連の遺伝子の他に、DNA damage response 関連の遺伝子発現が亢進していた (図 3)。損傷 DNA によって GATA4 発現亢進や SASP が生じている可能性が示唆された。

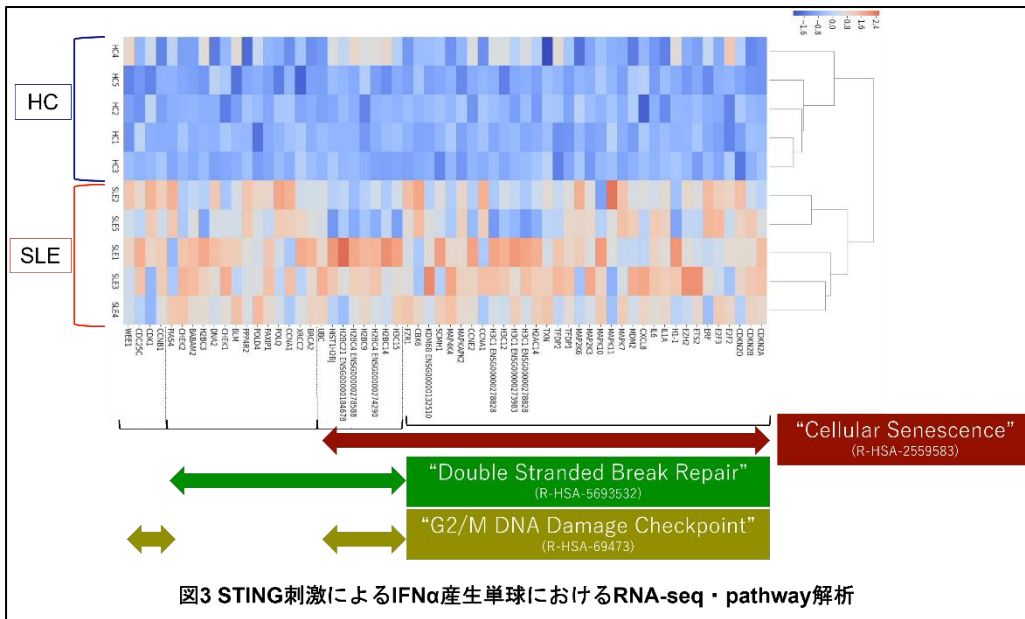


図3 STING刺激によるIFNα産生単球におけるRNA-seq・pathway解析

そこで GATA4 発現亢進や損傷 DNA が SLE 単球における特徴かを確認するため、STING 刺激を行っていない SLE 患者、健康人の単球における senescence のマーカー遺伝子である CDKN2A の発現量を RT-PCR で比較した (図 4)。その結果、STING 刺激を行っていない単球において健康人と比較して有意に CDKN2A 発現が亢進していることが示された。

以上から、SLE 単球では細胞老化様の特徴を持っており、STING 経路のシグナルが亢進した時に細胞老化の促進、GATA4 発現が誘導され IFNα の産生が亢進し、SLE 病態悪化の一因になっている可能性が示唆された。

今後は、GATA4 の発現抑制により過剰な IFNα 産生を制御する新規治療戦略の樹立を目指し研究を推進する予定である。

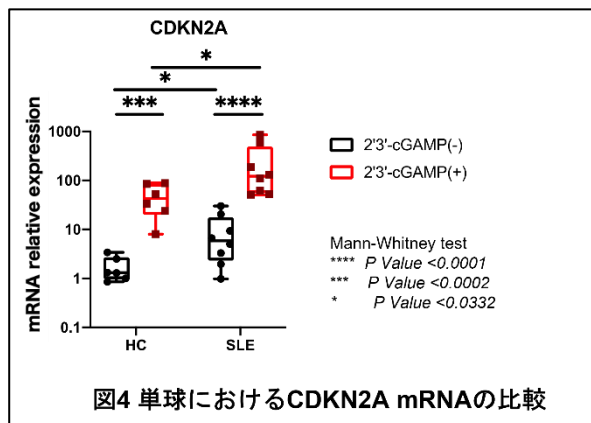


図4 単球におけるCDKN2A mRNAの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久我 大雅, 千葉 麻子, 村山 豪, 草生 真規雄, 山路 健, 田村 直人, 三宅 幸子
2. 発表標題 SLE単球におけるcGAS-STING経路を介したIFN 産生亢進機序の解析
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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