

博士論文（要約）

全身性エリテマトーデス患者由来人工多能性幹細胞を
用いた免疫病態研究

夏本 文輝

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE) は多彩な臓器障害を示す自己免疫疾患であり、免疫学的な異常としては、I 型 interferon (IFN) signature の亢進と抗 dsDNA 抗体に代表される自己抗体産生を特徴としている。SLE は多因子疾患として知られており、遺伝的要因としてはゲノムワイド関連解析の結果、現在までにおよそ 50 の原因遺伝子座が報告されている。これらの遺伝子群には自己免疫応答において重要な機能を有する遺伝子も多く含まれていることから、SLE の病態において自己免疫異常の関与が重要であることの大きな根拠となっている。

SLE は腎臓、皮膚、肺、神経など多様な臓器に障害をもたらし、患者の QOL を大きく低下させると共に生命予後を脅かすことも多い。一方で、病態の全容は解明されておらず、治療薬の選択肢は未だ十分ではない。ステロイド (prednisolone: PSL) やシクロホスファミドシクロホスファミド (cyclophosphamide: CyA) などといった病因非特異的な免疫抑制剤が用いられているのが現状であり、長期間のステロイド投与による感染症などの副作用は SLE 患者の第一の死因となっている。

2011 年に約 50 年ぶりに SLE の新規治療薬として、自己抗体産生 B 細胞への分化を阻害するベリムマブ (Belimumab) がアメリカで認可された。既存の治療薬と併用することにより治療効果を 10%程度高めることができた。しかし有効率は 50%程度であり、B 細胞を標的とした SLE 治療戦略の限界とも考えられる。これらの経験を踏まえると、SLE に対する更なる治療戦略を構築するには、より深い病態の理解が必要であると考えられた。

SLE 患者血中の IFN- α 上昇が報告されている。近年網羅的な遺伝子発現解析によって SLE 患者末梢血中の IFN signature の亢進が報告され、病勢との関連が指摘されている。形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDC) は Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 7/9、retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) や interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) といった自然免疫系の受容体刺激を介して IFN- α を高産生し、SLE における IFN- α の主要な供給源であると報告され、SLE 病態への関与は数多く報告されている。また慢性 C 型肝炎患者において IFN- α 治療中に SLE を発症したとの報告が数多くあることから、IFN- α の病態への関与が示唆され、pDC および I 型 IFN を標的とした SLE の新規治療戦略の可能性が示唆されている。

SLE の病因及び病態が不均一であること、研究対象となる SLE 患者の重要な免疫担当細胞の絶対数が少ないこと、かつ治療及び環境などの背景因子の不均一性によると思われる研究結果の相違などが SLE の病態解明を難しくしていると考えられた。我々は宿主のゲノムを引き継ぎ、環境及び治療の影響が少なく、無限のリソースとなりうる人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) に注目した。

本研究では遺伝的要因が強いと考えられる家族歴をもつ SLE 患者 5 人より iPS 細胞 (SLE-iPS) を樹立し、健常人由来 iPS 細胞 (H-iPS) との比較を行った。樹立の過程において、SLE-iPS と H-iPS は効率及び特性において差を認めなかった。

Sac 法を用いた単球系細胞や樹状細胞への分化誘導の詳細な検討により、単球系細胞や pDC

様細胞への分化誘導法を確立した。pDC 様細胞は他の細胞種に比べ IFN- α を高産生した。

SLE-iPS 由来 DC と H-iPS 由来 DC の RNA-Seq による遺伝子発現の比較において、SLE-iPS-DC において、lipopolysaccharide (LPS) 刺激後の炎症関連遺伝子の発現亢進を認めた。SLE-iPS の全エクソームデータと健常データベースの比較により 34 の variants を特定した。これらはミトコンドリア機能異常と酸化的リン酸化に関連したものであり、SLE-iPS-DC の刺激後炎症関連遺伝子発現亢進の原因である可能性が示唆された。

SLE は遺伝的要因が関与する疾患であることは明らかであり、本研究に用いた SLE 患者由来 iPS 細胞においても、詳細は未検証ながら SLE 疾患感受性の高い遺伝子背景を有している可能性が高いことが想定される。以上より、SLE-iPS 細胞を用いることで、SLE に関連する免疫異常をより鋭敏に反映する系を確立しうる可能性を想定し、SLE-iPS 細胞株を用いた研究を進めた。

次に、SLE の risk 遺伝子の機能評価を SLE-iPS 細胞を用いた系で行うため、ゲノム編集による SLE risk 遺伝子型の導入を行った。対象として、interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) 遺伝子変異に着目した。IFIH1 は細胞質に存在する自然免疫系の受容体で内因性および外因性の double-strand RNA (dsRNA) を認識し、interferon regulatory factor 3 (IRF3) を介した I 型 IFN 発現を誘導することが知られている。IFIH1 variant c.2336G-A はエクソーム上にあり、p. R779H の蛋白変異を伴う機能獲得性の variant として報告され、SLE 患者やアイカルディエグチェール症候群患者での保有が確認されている。患者での保有は hetero 変異のみであるが、患者では I 型 IFN 反応の明らかな亢進がみられる。また我々の別の検討では SLE 患者において IFIH1 は pDC における expression quantitative trait locus (eQTL) として同定されており、SLE 病態において重要な遺伝子であると考えられる。

本研究では SLE-iPS 細胞に IFIH1 variant (c.2336G-A, p. R779H) のシームレスな 1 塩基変異導入を行った。健常 (H-G/G) 株、未編集 SLE (SLE-/G/G) 株及び編集後 (SLE-G/A, SLE-A/A) 株を pDC 様細胞に分化誘導し比較した結果、編集後 SLE-G/A, A/A 株由来 pDC 様細胞の variant dose dependent な IFN- α 産生上昇及び細胞数減少を認めた。細胞死の原因を精査したところ、編集後細胞の variant dose dependent なアポトーシスの亢進、ミトコンドリアにおける酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) の亢進及び活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の上昇を認めた。

編集後細胞の細胞数減少は IFN- α / β 受容体抗体の添加により部分的に改善した。未編集 SLE-G/G 株由来 pDC 様細胞への IFN- α 添加により、pDC 様細胞のアポトーシスが有意に亢進し、また OCR も有意に上昇した。

以上より、未編集 SLE-G/G 株由来 pDC 様細胞におけるミトコンドリア代謝亢進、アポトーシス亢進については I 型 IFN の影響が考えられた。また、IFIH1 ゲノム編集後株におけるこれらの表現型についても、一部は I 型 IFN 産生亢進の影響があることが想定された。

多因子疾患研究における iPS 細胞の有用性は議論されるところである。本研究は、多因子疾患である SLE 患者由来 iPS 細胞の疾患研究における有用性について、H-iPS との比較及び

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いることによってアプローチしえた初めての研究となる。自己免疫疾患における疾患特異的 iPS 細胞の疾患研究への有用性が示されるとともに、SLE risk 遺伝子 IFIH1 の pDC における生物学的機能の解析が可能となり、SLE における pDC 制御に関する新たな知見が得られたと考えている。従来の手法では研究が困難であった pDC におけるミトコンドリア代謝の変化、細胞死の亢進が明らかとなり、SLE 病態の一部を明らかにするとともに、pDC 代謝を標的とした SLE 新規治療戦略の可能性が示唆された。今後エクソーム解析、トランスクリプトーム解析を行うことで、更なる治療標的分子、pathway の同定を目指すとともに、本研究で開発した手法を用いて他の疾患感受性変異のゲノム編集による機能解析を進める予定である。また我々が今回確立した系は、薬剤スクリーニングとしてのリソースとして活用できると考えている。本研究の成果は SLE 病態の解明および創薬につながりうるものであると考えている。