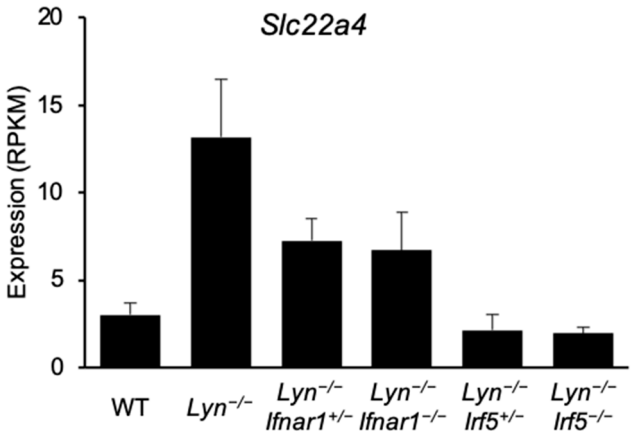
170　樹状細胞における転写因子IRF5の新規機能解明	藩　龍馬

【目的】Interferon regulatory factor-5（IRF5）は樹状細胞（dendritic cell：DC）などの自然免疫細胞で働く転写因子であり、自然免疫応答において重要な役割を果たすが、全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）などの自己免疫疾患の病態発症とも密接に関連する。著者らはこれまで、IRF5 の過剰な活性化は DC による I 型インターフェロン（interferon：IFN）などのサイトカイン産生を亢進させ SLE 様病態を引き起こすこと、そして IRF5 が SLE の有力な治療標的となる可能性を示した。一方で、I 型 IFN をはじめとするサイトカイン以外の IRF5 の標的遺伝子とその SLE における役割や、IRF5 が転写を活性化する詳細な分子機構についての解析は遅れている。そこで本研究では、ヒトおよびマウスの DC における IRF5 による新たな遺伝子発現制御機構を見出し、その SLE の病態形成への関与を解明することを目的とする。

【方法】自然免疫刺激を行った DC を用いて網羅的解析（マイクロアレイ、RNA-seq ならびに ChIP-seq）を行い、IRF5 による新規遺伝子発現制御機構の同定を試みた。また、それが SLE 病態形成において重要であるかを SLE モデルマウスあるいは SLE 患者パブリックデータの解析により検討した。

【結果】マウス骨髄由来樹状細胞（bone marrow-derived DC：BMDC）における遺伝子発現プロファイルを解析した結果、Toll 様受容体 （Toll-like receptor：TLR）刺激した BMDC では ion transport 関連遺伝子群の発現が IRF5 依存的に変動することが判明した。SLE モデルマウスの一つである *Lyn* 欠損マウスの末梢血細胞における遺伝子発現プロファイルを解析した結果、野生型マウスと比較して *Lyn* 欠損マウスで発現が亢進しており、かつそれが I 型 IFN 受容体欠損よりも *IRF5* 欠損によって有意に減弱するものとして ion transport 関連遺伝子群が抽出された。Ion transport 遺伝子のひとつである *Slc22a4* の発現制御について、IRF5 が DC において関与するかどうかをヒト形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid DC：pDC）株を用いて検討した結果、意外なことにこれらの遺伝子のプロモーター領域に TLR 刺激依存的な IRF5 の結合は生じなかった。以上の結果から、IRF5 は DC における TLR 刺激依存的な ion transport 関連遺伝子群の発現制御に関与しているが、SLE モデルマウスにおいて IRF5 依存的に変動する ion transport 遺伝子 *Slc22a4* の場合は TLR 刺激依存的ではない経路によりその発現制御に関与することが示唆された。Slc22a4 は炎症部位において多く発現することが知られており、SLE モデルマウスでは IRF5 依存的な炎症性サイトカイン産生を介して間接的にその発現が変動した可能性が考えられる。

Ion transport 関連遺伝子のひとつ *Slc22a4* のマウス末梢血における発現



170. 樹状細胞における転写因子 IRF5 の新規機能解明

藩　龍馬

横浜市立大学 大学院医学研究科 免疫学

Key words：転写因子，IRF5，樹状細胞，全身性エリテマトーデス

緒　言

全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）は難治性自己免疫疾患であり、様々な自己抗体が産生されることで皮膚や腎臓など全身の臓器で炎症が起こる。SLE では副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤を中心とした療法により生存率は高くなったものの、易感染症をはじめとする様々な副作用があるため、生活の質や長期予後を改善できる新たな治療法の開発が望まれている。SLE の病態は多様でありその発症機構は未だ不明な点が多いが、正常な免疫応答において抗原提示やサイトカイン産生などにより司令塔の役割を果たす樹状細胞（dendritic cell：DC）が SLE の病態形成に重要であることが知られている［1，2］。Interferon regulatory factor 5（IRF5）は DC などの自然免疫細胞で働く転写因子であり、Toll 様受容体 （Toll-like receptor：TLR）などを介した自然免疫応答において重要な役割を果たすが、SLE などの自己免疫疾患の病態発症と密接に関連していることが多数のヒトのゲノムワイド関連解析（genome-wide association study：GWAS）ならびにモデルマウスを用いた研究により示されている［3〜5］。

著者らは SLE モデルマウスを用いて、IRF5 の過剰な活性化は DC による I 型インターフェロン（interferon；IFN）などのサイトカイン産生を亢進させ SLE 様病態を引き起こすこと、そして IRF5 遺伝子の片アリル欠損のみでその発症が顕著に抑制されることを示した［6］。これらの結果は IRF5 が SLE の強力な治療標的である可能性を示している。一方で、DC における I 型 IFN をはじめとするサイトカイン以外の IRF5 の標的遺伝子とその SLE における役割や、IRF5 が転写を活性化する詳細な分子機構についての解析は遅れている。

そこで本研究では、ヒトおよびマウスの DC の網羅的解析により、DC における IRF5 による新たな遺伝子発現制御機構を見出し、その SLE の病態形成への関与を解明することを目的とする。

方　法

1. 細胞とマウス

TLR 刺激実験には形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid DC：pDC）細胞株である CAL-1 細胞を用いた［7］。CAL-1 細胞の TLR 刺激は 3 μM の R-848（Enzo Life Science）を用いた。*Lyn* 遺伝子欠損（*Lyn* $^{-/-}$）マウス［8］は *Ifnar1* $^{-/-}$マウス［9］あるいは *Irf5* $^{-/-}$マウス［10］と掛け合わせた。

2. mRNA sequencing （mRNA-Seq）ならびに chromatin immunoprecipitation sequencing（ChIP-seq）

CAL-1 細胞の RNA は NucleoSpin RNA（タカラバイオ）、マウス末梢血 RNA は RNeasy Protect Animal Blood Kit（キアゲン）を用いて精製した。mRNA-seq 用ライブラリーは SureSelect Strand Specific RNA ライブラリー調製キット（アジレント）を用いて作製した。CAL-1 細胞の ChIP は Richard Young らの手法を基本に行った。抗体はウサギ抗 IRF5 抗体（アブカム：ab21689）ならびにウサギ抗アセチル化ヒストン抗体（ミリポア：06-599）を用いた。ChIP-seq 用ライブラリーは TruSeq ChIP サンプル調製キット（イルミナ）を用いて作製した。シークエンシングは TG NextSeq 500/550 High Output Kit v2（75 cycles）（イルミナ）ならびに NextSeq 500 システム（イルミナ）により行った。

3. バイオインフォマティクス解析

過去のマイクロアレイデータの解析はGeneSpring ソフトウェア (アジレント) により行った。Gene ontology (GO) 解析はDAVID ソフトウェアを使用した。RNA-seq データはSTAR プログラムでマッピングを行った後、featureCounts プログラムならびに edgeR パッケージを用いて正規化された遺伝子発現量を求めた。ChIP-seq データは HOMER パッケージを用いてマッピングし、UCSC Genome Browser により可視化した。SLE 患者の RNA-seq データは公共データベースから取得した （アクセッション番号 : GSE72420)。

結果および考察

1. TLR 刺激した BMDC では ion transport 関連遺伝子群の発現が IRF5 依存的に変動する

マウス骨髄由来樹状細胞（bone marrow-derived DC : BMDC）におけるマイクロアレイデータ［7］を用い、野生型（WT）BMDC で TLR 刺激時に誘導される転写産物のうち IRF5 依存的であるものを 348 個抽出した（図 1a、b)。この転写産物に含まれる遺伝子の GO 解析を行った結果、予想通り"inflammatory response"のようにサイトカイン遺伝子を含む複数の GO term が上位になったが、一方で"proteolysis"や"ion transport"のようなサイトカイン遺伝子を含まない GO term も濃縮されることが判明した（図 1c)。Ion transport は濃縮された GO term の中でカウント数が最も多かった。

2. SLE モデルマウスの解析

SLE モデルマウスの一つである *Lyn* $^{-/-}$マウスの末梢血（peripheral blood : PB）における遺伝子発現プロファイルを RNA-seq により解析した。*Lyn* $^{-/-}$マウスでは、IRF5 の発現が半分になるだけで そのSLE 様病態が顕著に抑制される［6]。野生型（wild-type : WT）PB と比較して *Lyn* $^{-/-}$ PB で発現が亢進しており、かつ *Lyn* $^{-/-}$における I 型 IFN 受容体ヘテロ欠損（*Lyn* $^{-/-}$*Ifnar1* $^{+/-}$）あさよりも IRF5 ヘテロ欠損（*Lyn* $^{-/-}$*Irf* $^{+/-}$）によって有意に減弱するものとして transport ならびに ion transport 関連遺伝子群が抽出された（図 2a、b)。その中でも *Slc22a4* は両方の GO term に含まれており、*Lyn* $^{-/-}$*Ifnar1* $^{+/-}$ PB と *Lyn* $^{-/-}$*Irf5* $^{+/-}$PB の差が特に顕著であった（図 2c)。これらの結果から、SLE モデルマウスにおいて IRF5 は I 型 IFN の遺伝子誘導だけではなく、ion transport 関連遺伝子の誘導にも関与する可能性が示唆された。また、ヒト SLE 患者においても *SLC22A4* は健常者と比較して発現が亢進していた（図 2d)。

3. DC における IRF5 による *SLC22A4* の発現制御

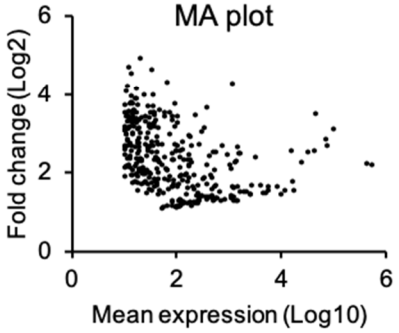
Lyn $^{-/-}$*Ifnar1* $^{+/-}$ PB と *Lyn* $^{-/-}$*Irf5* $^{+/-}$ PB の差が特に顕著であった *Slc22a4* についてさらに解析を行った。この解析ではプライマリーDC を用いる予定であったが、解析に十分な細胞数を得るのが困難であったため、ヒト形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid DC : pDC）株である CAL-1 細胞を用いた。CAL-1 細胞において IRF5 が *SLC22A4* の発現制御に関与するかどうかについて ChIP-seq により検討した。その結果、TLR 刺激において IRF5 依存的に発現誘導されることが知られている *IFNB1* についてはそのプロモーター領域において刺激依存的に IRF5 が結合し、かつアセチル化ヒストンが生じていた（図 3、左パネル)。一方で、意外なことに、*SLC22A4* のプロモーター領域においては TLR 刺激依存的な IRF5 の結合ならびにアセチル化ヒストンは生じなかった（図 3、右パネル)。なお、RNA-seq の結果から、CAL-1 細胞において *IFNB1* は TLR 刺激依存的に発現誘導されるが、*SLC22A4* はそうではなかった。

以上の結果から、IRF5 はマウス BMDC における TLR 刺激依存的な ion transport 関連遺伝子群の発現制御に関与しているが、SLE モデルマウス PB において IRF5 依存的に変動する ion transport 遺伝子 *Slc22a4* の場合は TLR 刺激依存的ではない経路によりその発現制御に関与することが示唆された。Slc22a4 は炎症部位に多く発現することが知られており、SLE モデルマウスの PB では IRF5 依存的な炎症性サイトカイン産生を介して間接的にその発現が変動した可能性が考えられる。今後はマウス PB の細胞種を分けた解析やヒトプライマリーDC の解析により、I 型 IFN や炎症性サイトカイン以外で IRF5 が直接的に制御する SLE 病態関連遺伝子を同定することが重要であると考えられる。

a

絞り込みの条件:
1. WT BMDCにおいてTLR刺激により誘導される (FC > 2, FDR < 0.05)
2. TLR刺激においてWT BMDCと比較して*Irf5*$^{-/-}$ BMDCで誘導が減弱する (FC > 2, FDR < 0.05)
3. 1と2で得られた348転写産物についてGO解析

b



c

Term	Count	%	P value
ion transport	13	5.6	1.8.E-02
inflammatory response	12	5.2	8.9.E-04
immune response	11	4.7	5.3.E-04
proteolysis	11	4.7	7.9.E-02
response to lipopolysaccharide	9	3.9	1.0.E-03

図 1. TLR 刺激した BMDC において IRF5 依存的に発現誘導される遺伝子群のプロファイル
TLR 刺激した BMDC において IRF5 依存的に誘導される転写産物 348 個の絞り込み条件（a）、MA プロット（b）ならびに濃縮された GO term のうち上位 5 個（c）を示す。
FC：fold change、FDR：false discovery rate。

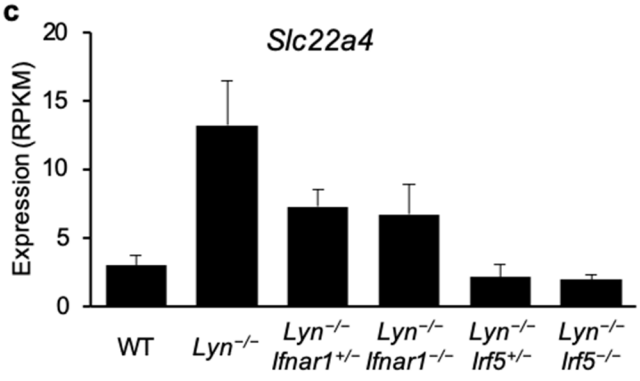
a

絞り込みの条件:
1. WT (正常) PBと比較して*Lyn*$^{-/-}$ (SLE) PBで発現が亢進する (FC > 2, FDR < 0.05)
2. *Lyn*$^{-/-}$*Ifnar1*$^{+/-}$ PBと比較して*Lyn*$^{-/-}$*Irf5*$^{+/-}$ PBで発現が減弱する (FC > 2, FDR < 0.05)
3. 1と2で得られた24遺伝子についてGO解析

b

Term	Count	%	P value
transport	5	0.2	7.0.E-02
ion transport	3	0.1	9.3.E-02

c



d

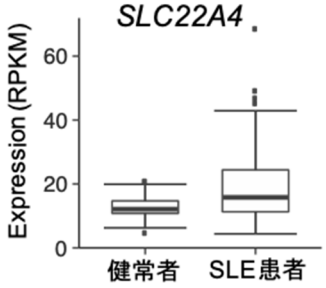


図 2. マウス PB ならびに SLE 患者 PB における遺伝子発現プロファイル
（a，b）WT PB と比較して *Lyn* $^{-/-}$マウスの PB で発現が亢進しており *Lyn* $^{-/-}$*Ifnar1* $^{+/-}$ PB と比較して *Lyn* $^{-/-}$*Irf5* $^{+/-}$ PB で減弱する 24 個の遺伝子の絞り込み条件（a）、濃縮された GO term 2 個（b）を示す。（c）マウス PB における *Slc22a4* 遺伝子発現（mean ± s.e.m., n = 4）。（d）SLE 患者 PB における *SLC22A4* 遺伝子発現のボックスプロット（健常者 n = 18、SLE 患者 n = 99、P = 0.012 [Wilcoxon rank-sum test]）。RPKM；reads per kilo base per million。

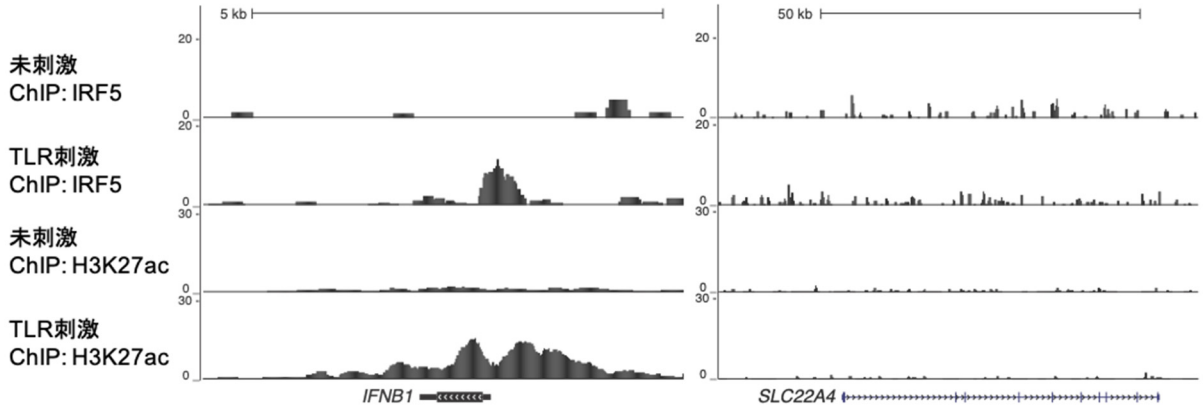


図 3. CAL-1 細胞における IRF5 のゲノム DNA 結合とヒストンアセチル化

未刺激あるいは TLR 刺激（R-848 刺激）した CAL-1 細胞における、*IFNB1* あるいは *SLC22A4* 遺伝子とそれらの近傍の IRF5 のゲノム DNA 結合（ChIP : IRF5）とアセチル化ヒストン（ChIP : H3K27ac）を UCSC Genome Browser で表示した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科免疫学教室の田村智彦教授ならびに西山晃准教授である。*Lyn* ⁻/⁻マウスは沖縄科学技術大学院大学細胞シグナルユニットの山本雅教授、*Ifnar1* ⁻/⁻マウスならびに *Irf5* ⁻/⁻マウスは東京大学生産技術研究所炎症・免疫制御学社会連携研究部門の谷口維紹教授より分与いただいた。最後に、本研究に多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. Nat Med. 2007;13(5):543-51. Epub 2007/05/05. doi: 10.1038/nm1590. PubMed PMID: 17479100.

2) Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2013;13(8):566-77. Epub 2013/07/06. doi: 10.1038/nri3477. PubMed PMID: 23827956; PubMed Central PMCID: PMCPMC4160805.

3) Ban T, Sato GR, Tamura T. Regulation and role of the transcription factor IRF5 in innate immune responses and systemic lupus erythematosus. Int Immunol. 2018;30(11):529-36. Epub 2018/06/04. doi: 10.1093/intimm/dxy032. PubMed PMID: 29860420.

4) Eames HL, Corbin AL, Udalova IA. Interferon regulatory factor 5 in human autoimmunity and murine models of autoimmune disease. Transl Res. 2016;167(1):167-82. Epub 2015/07/25. doi: 10.1016/j.trsl.2015.06.018. PubMed PMID: 26207886.

5) Harley IT, Kaufman KM, Langefeld CD, Harley JB, Kelly JA. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. Nat Rev Genet. 2009;10(5):285-90. doi:10.1038/nrg2571. PubMed PMID: 19337289; PubMed Central PMCID: PMC2737697.

6) Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, et al. Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. Immunity. 2016;45(2):319-32. Epub 2016/08/16. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.015. PubMed PMID: 27521268.

7) Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, et al. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. Int J Hematol. 2005;81(2):148-54. Epub 2005/03/16. PubMed PMID: 15765784.

8) Nishizumi H, Taniuchi I, Yamanashi Y, Kitamura D, Ilic D, Mori S, et al. Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in *lyn*-deficient mice. Immunity. 1995;3(5):549-60. PubMed PMID: 7584145.

9) Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature. 2003;424(6948):516-23. Epub 2003/07/23. doi: 10.1038/nature01850. PubMed PMID: 12872134.

10) Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature. 2005;434(7030):243-9. doi: 10.1038/nature03308. PubMed PMID: 15665823.