

全身性エリテマトーデス患者 T 細胞における RasGRP1 および関連分子に関する研究

研究分担者 保田晋助 北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学 講師

研究要旨 全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 T 細胞における MAP キナーゼ経路を通じた DNA の低メチル化は病態形成に深く関わっていると考えられる。CD3 鎖のスプライシングを制御している代表的な SR 蛋白である SRSF1 (SF2) の発現量を検討したところ、健常人と比較して SLE 患者 T 細胞では有意に低値であった。SLE 患者 T 細胞において MAP キナーゼ経路の上流に位置する RasGRP1 の発現低下やスプライスバリエーションの増加が認められるが、SF2 の発現量は正常にスプライスされた RasGRP1 の発現量、さらには DNA メチル化酵素である DNMT1 の発現量と相関していた。SF2 は RasGRP1 exon 11 mRNA と直接結合し、RasGRP1 の蛋白レベルを正に調整することが分かった。SLE 患者 T 細胞において、SF2 の低発現が RasGRP1 スプライス異常および蛋白レベルの低下を来とし、病態に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE)患者 T 細胞において CD3 鎖が低発現であり、代表的な SR 蛋白である SF2 が CD3 鎖のスプライシングを制御していることが報告された (Moulton V and Tsokos G, *J Biol Chem* 2010)。また、米国人 SLE 患者由来 T 細胞において SF2 の発現が健常人と比較して低値であり、また疾患活動性が高い患者においてより SF2 の発現量が低いことが報告された (Moulton et al. *PNAS* 2013)。

RasGRP1 は T 細胞内で Ras を活性化する細胞内シグナル蛋白であり、我々は SLE 患者末梢血 T 細胞において RasGRP1 スプライス異常の頻度が健常人と比較して高く、これに関連して蛋白レベルが低下することを報告した (Yasuda S et al, *J Immunol* 2007)。SLE 患者 T 細胞では RasGRP1 の下流である MAP キナーゼ経路の活性低下が DNA メチル化の低下に繋がると考えられている。一方 RasGRP1 は転写因子である Gfi-1 による正の制御を受けるが、Gfi-1 の発現低下は Th17 細胞の分化に重要である。本研究では、SLE 患者 T 細胞において Gfi-1, RasGRP1, MAP キナーゼ, DNMT1 経路がどの段階で異常を来しているかを明らかにし、新たな治療ターゲットを探索することを目的とする。また、健常人・SLE 患者間で SF2 の発現に相違があるかどうか、また SF2 の発現が正常にスプ

ライシングされた RasGRP1 の発現と相関するかどうかについても検討する。

B. 研究方法

SLE 患者 45 名, 関節リウマチ (RA) 患者 11 名および健常人 27 名由来の末梢血より RosetteSep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies) を用いて T 細胞を単離し、RNA を抽出、RasGRP1 の上流である Gfi-1, また下流と考えられる DNMT1 の発現を検討した。また、RasGRP1 のスプライス異常にかかわる可能性のある SF2 についてもその発現を検討した。RasGRP1 スプライス異常の多くは exon 11 を欠損するため、正常スプライシングによる RasGRP1 の定量には exon 10-11 接合部を認識するプローブを、スプライスバリエーションも含んだトータルの RasGRP1 の定量には exon 2-3 接合部を認識するプローブを用いた。

SF2 と RasGRP1 exon 11 との相互作用を検討する目的で、FLAG タグ付加リコンビナント SF2, FLAG タグ付加リコンビナント疑似リン酸化 SF2 を作製した。RasGRP1 exon11 上の SF2 の結合が予測される部位に相当する RNA を合成し、biotin タグを付加した。ランダム配列 RNA をコントロールとした。SF2-FLAG, RasGRP1 exon 11 RNA-biotin, streptavidin ビーズを混和して免疫沈

降法により両者の結合を検出した。

T細胞におけるSF2の発現がRasGRP1の蛋白レベルを調節しているかどうかを直接確認する目的で、Jurkat T細胞株に2種のSF2特異的siRNAまたはコントロールsiRNAを、Neon Transfection System (Life Technologies)を用いて遺伝子導入した。48時間後にセルライゼートを調整して抗SF2抗体、抗RasGRP1抗体および抗アクチン抗体を用いて免疫プロットを行い、それぞれの蛋白レベルを解析した。

本研究はヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改訂)を遵守して実施した。試料は被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者を特定できる情報を含まないよう配慮した。

C. 研究結果

SF2発現の検討; SLE患者末梢血T細胞におけるSF2の発現レベルは、健常人と比較して有意に低下していた($p < 0.001$, t検定)(Fig.1)。

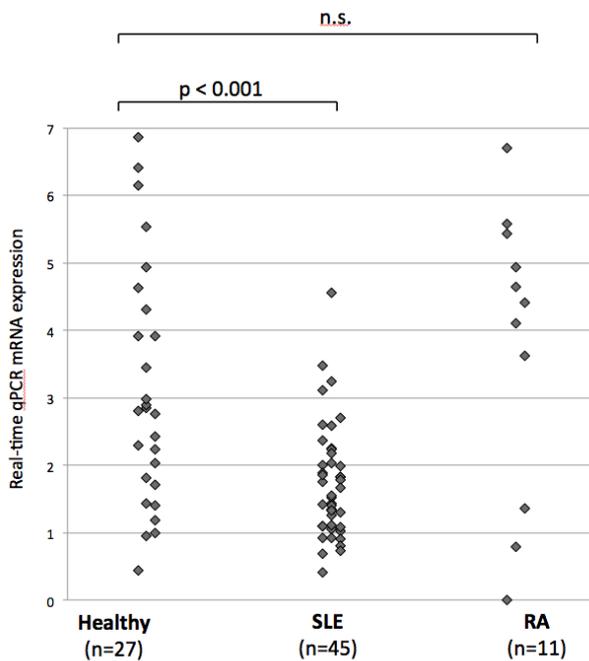


Fig.1; Expression levels of SF2 mRNA in peripheral blood T cells

RA患者では健常人とSF2発現レベルの差は認められなかった。SLE患者におけるSF2の発現レベルはRasGRP1(normal form)、DNMT1の発現と強い正の相関を示した(Fig.2)。

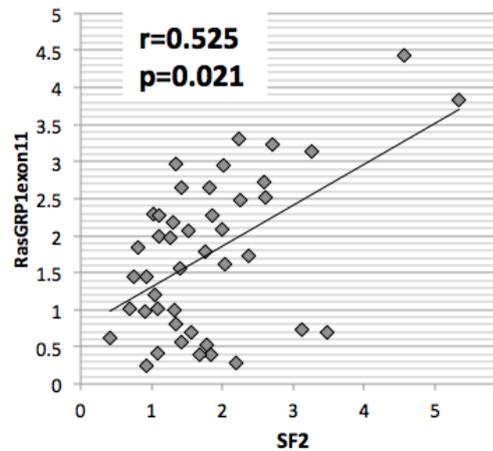


Fig.2 (A) Correlation between expression levels of SF2 and RasGRP1 (normal form) in lupus T cells

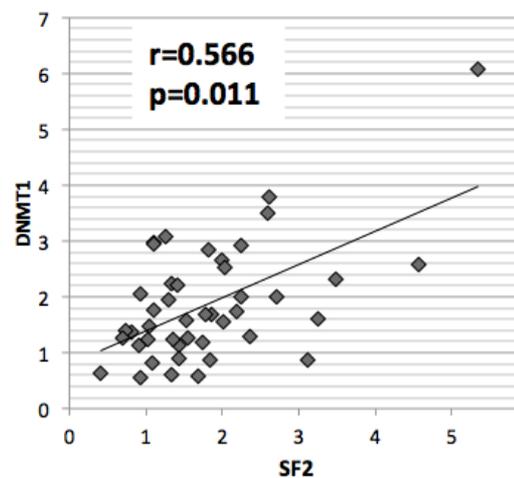


Fig.2 (B) Correlation between expression levels of SF2 and DNMT1 in lupus T cells

SLE患者におけるSF2の発現量は、疾患活動性の高い患者では疾患活動性の無い患者と比較して有意に低値であった(Fig.3)。

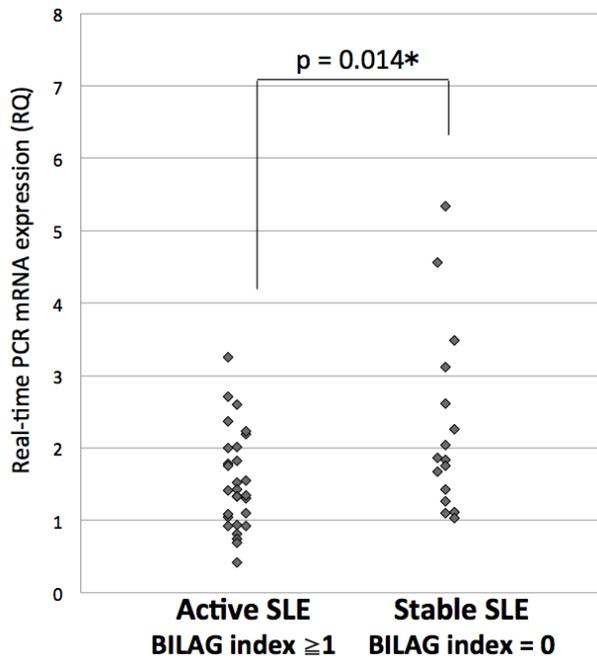


Fig.3; Comparison of SF2 expression in T cells from SLE patients according to their disease activity

リコンビナント SF2 の作製 ;

HEC293 細胞を用いて発現した疑似リン酸化 SF2 を FLAG 精製し、ウェスタンブロット法にて確認した (Fig.4)。

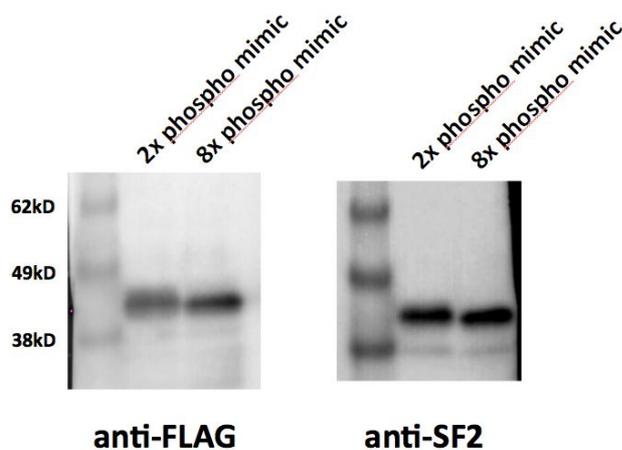


Fig.4; Expression and purification of recombinant phospho-mimic SF2

疑似リン酸化 SF2 と RasGRP1 exon 11 RNA との結合を、免疫沈降法にて確認した (Fig.5)。コントロール RNA に比較して、RasGRP1 exon 11 RNA はより多量の SF2 と結合することが示された。

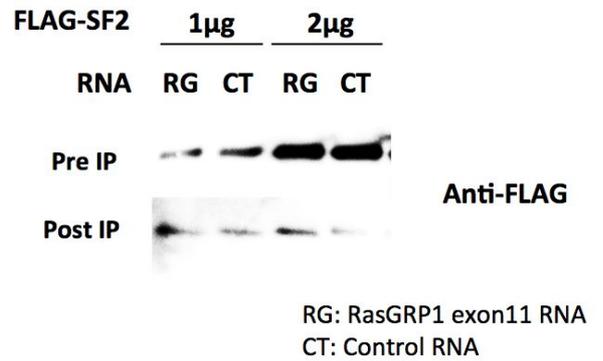


Fig.5; Binding between RasGRP1 exon 11 RNA and phosphor-mimic SF2

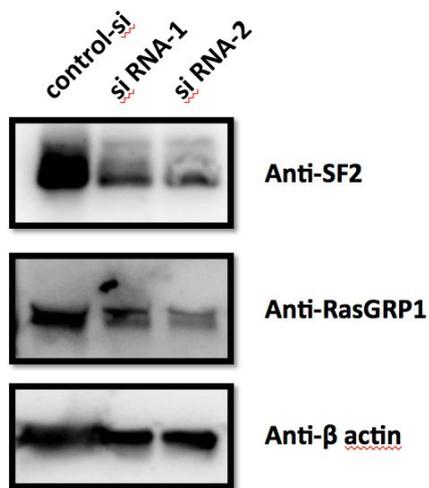


Fig.6; Knockdown of SF2 in Jurkat cells using siRNA

Jurkat T 細胞株を用いた SF2 ノックダウンの影響 ; SF2 特異的 siRNA を Jurkat 細胞に遺伝子導入した結果、コントロール siRNA を導入した場合と比較して SF2 蛋白レベルは低下していた (Fig.6)。SF2 のノックダウンにより、RasGRP1 の蛋白レベルは低下しており、SF2 が RasGRP1 の蛋白発現を調整していることが示された。

Gfi-1 発現の検討 ; SLE 患者における Gfi-1 の発現レベルは、健常人と比較して有意に亢進していた (Fig.7)。

健常人では Gfi-1 発現レベルと RasGRP1 (normal form) の発現レベルに正の相関が認められたが、SLE 患者でその傾向は認められなかった (Fig. 8)。

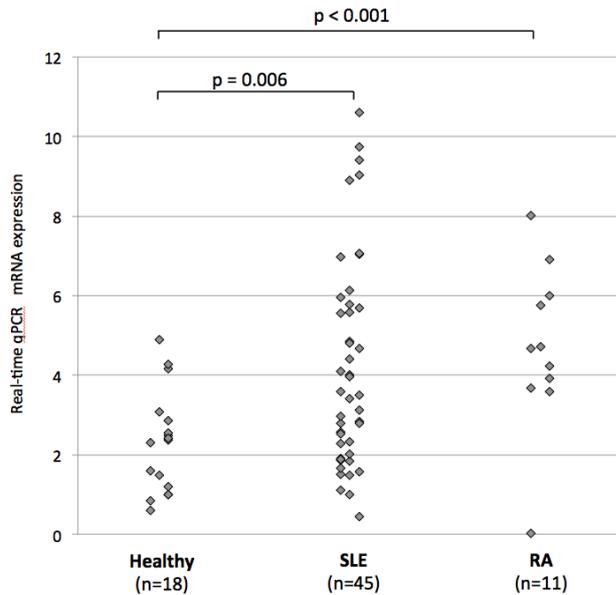


Fig. 7; Expression levels of Gfi-1 mRNA in peripheral blood T cells

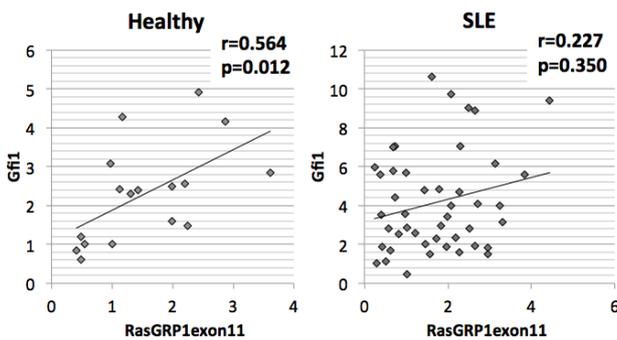


Fig. 8; Correlation between expression levels of Gfi-1 and RasGRP1 in peripheral blood T cells

D. 考察

SLE 患者 T 細胞では Gfi1 の発現亢進が認められるにも関わらずその下流である RasGRP1 の発現は亢進しておらず、既報の RasGRP1 スプライスバリエーションの増加が、Gfi1、MAP キナーゼ経路を通じた T 細胞の機能制御に支障をきたす原因となっている可能性が考えられる。Gfi1 が miR-21 を負にコントロールし、miR-21 が RasGRP1 の発現を負にコントロールするが、SLE 患者由来 CD4+ T 細胞では miR-21 が高発現すると報告されており、結果として Gfi1-RasGRP1 経路による RasGRP1 発現量の調節機構が SLE 患者においては破綻していることが示唆された。

健康人において SF2 は、RasGRP1 exon 11 に結合することでその正常なスプライシングを促し、

exon 11 を含む正常な RasGRP1 の発現を亢進、その下流シグナルである DNMT1 の発現を増強することが示唆された (Fig.9A)。SLE 患者、なかでも疾患活動性の高い状態での T 細胞では特に SF2 の発現量が低く、RasGRP1 exon 11 のスプライシングに障害を来した結果として DNA の低メチル化を来す可能性が示唆された (Fig.9B)。SF2 と RasGRP1 exon 11 との直接結合が示され、また T 細胞株において SF2 をロックダウンすることによって RasGRP1 の蛋白レベルが低下したことから、SF2 は CD3 鎖のみならず RasGRP1 の発現を調節することが明らかになった。

活動性の高い SLE 患者では SF2 の発現レベルが低下することで SLE 患者由来 T 細胞のフェノタイプである CD3 鎖および RasGRP1 の低発現が誘導されると考えられた。SF2 発現の制御ができれば RasGRP1 および CD3 鎖のスプライシングを正常化が可能となり、その下流シグナルも正常化される事が期待される。

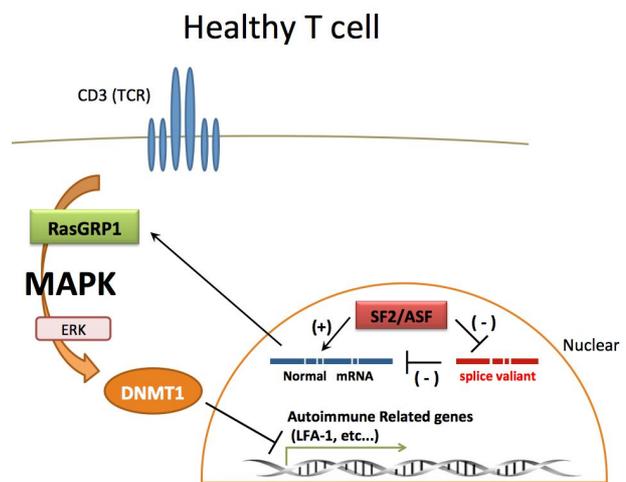


Fig.9 (A); SF2 regulates RasGRP1 splicing in healthy T cells

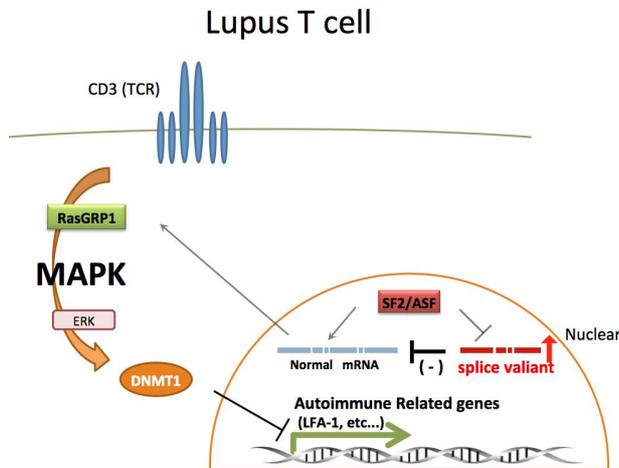


Fig.9 (B); Impaired SF2 expression results in abnormal splicing of RasGRP1 mRNA and lower protein levels

E. 結論

SLE 患者における SF2 の低下が RasGRP1 スプライス異常を通じて SLE の病態形成に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka M, Koike R, Sakai R, Saito K, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Hara M, Kawaguchi Y, Tohma S, Takasaki Y, Dohi M, Nishioka Y, Yasuda S, Miyazaki Y, Kaneko Y, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Miyasaka N, Harigai M. Pulmonary infections following immunosuppressive treatment during hospitalization worsen the short-term vital prognosis for patients with connective tissue disease-associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol. in press*
2. Oku K, Amengual O, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. An independent validation of the global anti-phospholipid syndrome score in Japanese cohort of patients with autoimmune diseases. *Lupus in press*
3. Yamazaki H, Sakai R, Koike R, Miyazaki Y, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yasuda S, Kurita T, Kaneko Y, Tanaka Y, Nishioka Y, Takasaki Y, Nagasaka K, Nagasawa H, Tohma S, Dohi M, Sugihara T, Sugiyama H, Kawaguchi Y, Inase N, Ochi S, Hagiyaama H, Kohsaka H, Miyasaka N and Harigai M. Assessment of risks for pulmonary infection during 12 months after commencing or intensifying immunosuppressive treatment for active connective tissue diseases: A report from a large-scale prospective cohort study. *J Rheumatol in press*
4. Watanabe K, Yasuda S, Noguchi A, Horita T, Atsumi T. Coronary and mesenteric involvement in polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheumatol. in press*
5. Kono M, Yasuda S, Stevens RL, Koide H, Kurita T, Shimizu Y, Kanetsuka Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Shimizu T, Majima T, Koike T, Atsumi T. RasGRP4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation. *Arthritis Rheumatol. in press*
6. Kurita T, Yasuda S, Amengual O, Atsumi T. The efficacy of calcineurin inhibitors for the treatment of interstitial lung disease associated with polymyositis/dermatomyositis. *Lupus*. 2015;24:3-9
7. Kurita T, Yasuda S, Oba K, Odani T, Kono M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amenguak O, Horita T, Atsumi T. The effect of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015; 54:39-44
8. Kataoka H, Yasuda S, Fukaya S, Oku K, Horita T, Atsumi T, Koike T. Decreased expression of Runx1 and lowered production of Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2015;25:90-95

9. Sakai R, Cho SK, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Amano K, Tanaka Y, Sumida T, Ihata A, Yasuda S, Nakajima A, Sugihara T, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Miura Y, Miyasaka N, Harigai M. The risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors decreased over time; a report from the registry of Japanese rheumatoid arthritis patients for long-term safety (REAL) database. *Rheumatol Int*. 2014;34(12):1729-36.
 10. Kono M, Yasuda S, Kato M, Kanetsuka Y, Kurita T, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Oba K, Kondo M, Mukai M, Yanai M, Fukasawa Y, Atsumi T. Long-term outcome in Japanese patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2014; 23, 1124–1132
 11. Amengual O, Horita T, Binder W, Norman GL, Shums Z, Kato M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Atsumi T. Comparative analysis of different enzyme immunoassays for assessment of phosphatidylserine-dependent antiphospholipid antibodies. *Rheumatol Int*. 2014; 34(9):1225-30.
 12. Cho SK, Sakai R, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Tanaka Y, Nakajima A, Yasuda S, Ihata A, Ezawa K, Won S, Choi CB, Sung YK, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Miyasaka N, Bae SC, Harigai M; for the RESEARCH investigators; the REAL Study Group. A comparison of incidence and risk factors for serious adverse events in rheumatoid arthritis patients with etanercept or adalimumab in Korea and Japan. *Mod Rheumatol*. 2014; 24(4):572-9.
 13. Jin H, Arase N, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Tanimura K, Matsuoka S, Ebina K, Shi K, Toyama-Sorimachi N, Yasuda S, Horita T, Hiwa R, Takasugi K, Ohmura K, Yoshikawa H, Saito T, Atsumi T, Sasazuki T, Katayama I, Lanier LL, Arase H. Autoantibodies to IgG/HLA class II complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(10):3787-92
2. 学会発表
1. Kurita T, Yasuda S, Moulton VR, Shimizu Y, Kono M, Koide H, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Tsokos GC, Atsumi T. Decreased Levels of Splicing Factor 2 / Alternative Splicing Factor (SF2/ASF) induced Lower Levels of RasGRP1 in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. ACR meeting, Boston, USA Nov 15-18, 2014
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特記事項無し