



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	原発性シェーグレン症候群の疾患関連遺伝子GTF2Iについての機能解析 [全文の要約]
Author(s)	中川, 育磨
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2341 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12837号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67474
Type	doctoral thesis
File Information	Ikuma_Nakagawa_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

原発性シェーグレン症候群の疾患関連遺伝子 *GTF2I* について
の機能解析

(A functional analysis of primary
Sjögren's syndrome-associated gene *GTF2I*)

2017 年 9 月

北 海 道 大 学

中 川 育 磨
Nakagawa Ikuma

【背景・目的】

原発性シェーグレン症候群 (Primary Sjögren's syndrome ; primary SS) は唾液腺・涙腺などの外分泌組織におけるリンパ球浸潤と腺房破壊・外分泌機能低下を主徴とする慢性炎症性の難治性自己免疫疾患であるが、その病態形成についてはいまだ不明な点が多い。SS としばしば合併する関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; RA) では TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカイン、あるいは細胞内シグナル伝達経路である JAK-STAT 経路を標的とした生物学的製剤や低分子化合物が治療に導入され、患者の関節機能予後・生命予後を大きく改善した。同じく SS に高頻度に合併がみられる全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus ; SLE) においても、近年、抗 IFN α 抗体や抗 BAFF 抗体などの有用性が臨床試験により示されている。一方 SS においてはその病態形成において炎症性サイトカインの関与を示唆する報告が多数存在するものの、RA や SLE など奏功している抗サイトカイン療法の有効性についてはいまだ確立していない。我々はこれまでに、局所における慢性炎症誘導の分子基盤として、IL-6 を中心として形成される「炎症回路 (炎症アンプ)」という機構を見出している。本機構においては、線維芽細胞・血管内皮細胞などの非免疫細胞において、NF- κ B 経路と STAT3 経路の同時活性化により炎症性メディエーターの発現・産生が相乗的に増加し、臓器特異的な慢性炎症性疾患や自己免疫性疾患の病態形成の起点となる。また、我々は約 16,000 遺伝子を標的とした shRNA ライブラリを用いたゲノムワイドスクリーニング解析を行い、炎症アンプを正に制御する 1,000 以上の遺伝子群、及び炎症回路の標的となる 500 以上の遺伝子群をそれぞれ炎症アンプの制御遺伝子、標的遺伝子として同定しており、更にこれらの遺伝子群の中には、実際に多くのヒト慢性炎症性疾患の関連遺伝子が含まれることを reverse direction 法により証明している。今回我々は、同遺伝子群の中から SS 関連遺伝子を検索し、既に報告されている 8 つの遺伝子を抽出した。その中から、慢性炎症の病態との関連についてこれまでに報告が無い唯一の遺伝子であった *GTF2I* (General transcription factor II-I) に注目し、*GTF2I* の機能解析をとおりて SS における慢性炎症の病態形成のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

【方法】

shRNA 及び siRNA の導入による *GTF2I* ノックダウン細胞、及び *GTF2I* ならびにその欠失変異体の発現ベクターを作出し、*GTF2I* の炎症アンプへの関与について *in vitro* で定量 PCR (Quantitative polymerase chain reaction ; qPCR) 、酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 、及びレポーターアッセイにより検討した。*in vivo* での検討としてマウス炎症モデル (F759 マウス) を用いた関節炎誘導実験を行った。さらに、炎症アンプの維持に重要な NF- κ B 経路及び STAT3 経路と *GTF2I* との関与について免疫沈降法 (Immunoprecipitation assay ; IP) およびクロマチン免疫沈降法 (Chromatin IP ; ChIP) により解析を行った。また SS 患者及び健常者の唾液腺組織を用いた免疫組織化学染色を行い *GTF2I* やリン酸化 p65、およびリン酸化 STAT3 の発現について検討した。最後に、SS 患者の唾液腺組織から抽

出したゲノム DNA、及び mRNA を用いて、SS 患者に高頻度に認められる、*GTF2I* に関連する一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism ; SNP) の有無と、*GTF2I* 及びそのスプライシングバリエーションの発現について検討した。

【結果】

GTF2I のノックダウンにより、NF- κ B 及び STAT3 経路の同時活性化条件下において IL-6 をはじめとした炎症性サイトカイン、ケモカインの発現・産生が有意に抑制され、*GTF2I* が非免疫細胞における炎症誘導に関与していることが明らかになった。また、マウスを用いた関節炎誘導実験においては、*GTF2I* に対する shRNA の関節腔内投与により関節炎の発症が有意に抑制された。*GTF2I* ノックダウン細胞ではサイトカイン刺激による NF- κ B 経路の標的遺伝子の発現誘導が有意に抑制される一方、STAT3 経路の標的遺伝子の発現は抑制されず、*GTF2I* は NF- κ B 経路に関与していることが示唆された。Western Blotting による TNF α 刺激後における p65 及び I κ B α のリン酸化、あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察における p65 の核内移行については *GTF2I* ノックダウン細胞及び MOCK 細胞の間で違いは認められず、*GTF2I* は細胞質内では NF- κ B 経路の活性化には関与していないと考えられた。ヒト唾液腺細胞やヒト滑膜細胞の免疫蛍光染色法による観察では、*GTF2I* は TNF α の刺激の有無によらず、その大部分が核内に存在していることが示され、核内における *GTF2I* と NF- κ B 経路の関与が示唆された。IP により *GTF2I* は実際に p65 と会合していることが示され、また、ChIP により、*GTF2I* の欠損により p65 分子の標的遺伝子プロモーター領域への結合が有意に抑制されることが示された。実際に SS 患者の唾液腺組織では、腺細胞の核内においてリン酸化 p65 やリン酸化 STAT3 とともに *GTF2I* が健常者に比べて有意に高発現していることが確認された。さらに興味深いことには、口腔乾燥症状と SS の疾患特異的自己抗体を有しながらも唾液腺組織へのリンパ球浸潤が認められないため病理学的に SS の分類基準に至らなかった症例においても、*GTF2I* は唾液腺組織において高発現していることを見出した。

GTF2I 及び p65 の欠失変異体を用いた IP により、*GTF2I* と p65 の会合においては p65 分子内の Rel homology domain、及び *GTF2I* 分子内の Leucine zipper domain (LZ) がともに不可欠であることを見出し、実際に *GTF2I* の LZ 欠失変異体は NF- κ B 経路の活性化を誘導しないことをレポーターアッセイにより確認した。*GTF2I* が基本転写因子としての活性を有するにはチロシンリン酸化が重要であることが既に報告されているが、LZ 内部に唯一存在するチロシン残基 (Y50) をフェニルアラニンに置換した変異体 (Y50F) は、p65 と会合する一方 NF- κ B 経路の活性化は引き起こさないことを明らかにした。

一方、*GTF2I* と STAT3 の会合も IP により確認されたが、*GTF2I* は STAT3 の 2 つのアイソフォーム (STAT3 α , STAT3 β) のうち STAT3 α よりも STAT3 β に選択的に会合することが示された。STAT3 β は STAT3 α の C 末端にある転写活性化ドメインが欠失しているため転写活性が低いことが既に報告されている。この結果は、上述のとおり *GTF2I* のノックダウンでは STAT3 経路の標的遺伝子の発現誘導に

変化が見られなかった事実に合致する。

GTF2I には 4 つのスプライシングバリエントが存在することがこれまでに報告されているが、そのバリエント間での機能の相違については詳細な検討はされていなかった。我々は、各バリエントの発現ベクターを作出し、同ベクターの強制発現下における NF- κ B 経路の活性化の相違を検討したところ、4 つのバリエントは NF- κ B 経路の活性化に与える影響が異なることを見出した。また、SS 患者の小唾液腺組織から mRNA 及びゲノム DNA を抽出し、それぞれ *GTF2I* ならびにその各バリエントの発現、及び SS 患者で報告されている *GTF2I* に関連する 2 つの SNP の有無を確認したところ、同 SNPs は *GTF2I* のスプライシングには影響を与えていないが、SNPs の存在は pan-*GTF2I* の発現を有意に増加させることが確認された。

【結論・今後の展望】

SS の唾液腺組織において GTF2I は、NF- κ B 経路を介して慢性炎症の形成・維持に関与していることが明らかになった。また、GTF2I 及び p65 の欠失変異体を作成することにより、GTF2I と p65 の会合に関与するドメインの同定を行うと同時に、GTF2I の活性化に重要な新規のチロシンリン酸化部位 (Y50) を同定した。また、実際に SS 患者の唾液腺組織においては健常者と比べて GTF2I がリン酸化 p65 及びリン酸化 STAT3 と共に有意に高発現していることを示し、GTF2I の SS における診断マーカーとしての有用性、あるいは将来における治療標的としての可能性が示唆された。また、SS 患者で高頻度にみられる *GTF2I* の SNPs が同遺伝子の発現制御に関与している可能性が示唆された。今後は、genotype (SNPs の有無) による GTF2I 発現制御の違いについて、更なる検討がのぞまれる。

(3767 字)