



Title	全身性エリテマトーデス患者T細胞におけるSRSF1発現低下はRasGRP1スプライシング異常を引き起こす [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	河野, 通大
Description	配架番号 : 2453
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13439号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74253
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Michihiro_Kono_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 河野 通大

学 位 論 文 題 名

全身性エリテマトーデス患者 T 細胞における SRSF1 発現低下は RasGRP1 スプライシング異常を引き起こす

(SRSF1 regulates the alternative splicing of RasGRP1 in T cells from patients with systemic lupus erythematosus.)

【背景と目的】全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE)は、皮疹や血球障害、ループス腎炎などの多彩な臓器障害と、多様な自己抗体の産生を特徴とする全身性自己免疫疾患である。SLE の病態は 1 型インターフェロンの過剰産生とそれに伴う自己反応性 T 細胞の出現、多クローン性の B 細胞活性化、抗 DNA 抗体をはじめとする自己抗体産生、免疫複合体の形成、補体系の活性化などが炎症を惹起し、臓器組織障害をきたすと考えられ、それぞれの過程において遺伝的要因および環境要因が複雑に関与することが想定されているが、詳細な病態形成機序はいまだに不明な点が多い。

T 細胞は獲得免疫の制御において中心的役割を有し、SLE 病態形成にも重要な役割を担っている。これまでも T 細胞のシグナル異常について多くの報告がなされているが、なかでも SLE 患者 T 細胞では IL-2 発現の低下や、DNA methyltransferase 1 (DNMT1)発現低下にともなう DNA の低メチル化が病態形成の要因となることが報告されている。

T 細胞において Ras 活性化因子である RasGRP1 は Ras-MAPK 経路の活性化を介して IL-2 や DNMT1 の発現を促進する。RasGRP1 欠損マウスではループス様症状を含む多彩な自己免疫異常を呈することが知られており、また RASGRP1 は SLE の疾患感受性遺伝子の一つとして同定されている。本研究室では、SLE 患者 T 細胞において exon 11 を欠失する alternatively-spliced RasGRP1 (RasGRP1-AS) が高頻度に出現し、このスプライシング異常が RasGRP1 蛋白発現低下と関連することを報告した。そこで RasGRP1 スプライシング異常を介した Ras/MAPK 経路の活性低下が SLE T 細胞における機能異常の要因と考え、この RasGRP1 スプライシング異常のメカニズムに着目した。近年 SLE 患者 T 細胞において、スプライシング制御に重要な SR 蛋白の一つである serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1)の発現が低下しており CD3 のスプライシング異常を介して、病態と関連することが報告された。データベースを用いた解析により、SRSF1 と RasGRP1-exon 11 RNA の結合が予測されたことから、本研究では SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 スプライシング異常と SRSF1 との関連について検討した。

【方法】SLE 患者、健常人 T 細胞の CD3 陽性 whole T 細胞において、SRSF1, RasGRP1 wild type (RasGRP1-WT), DNMT1 の mRNA 発現量を解析した。続いて T 細胞各サブセットにおける RasGRP1 スプライシング異常の有無を確認するため、健常人および SLE 患者 CD4 陽性 T 細胞サブセットごとに RasGRP1-WT, -AS の mRNA 発現量を解析した。また SRSF1 と RasGRP1-exon11 RNA との結合を oligonucleotide-pulldown assay で検討した。さらに健常人 T 細胞における SRSF1 のノックダウン、SLE 患者 T 細胞における SRSF1 の強制発現を行い、RasGRP1 スプライシングや RasGRP1 発現量に与える影響を、RasGRP1-WT, -AS の mRNA 発現量、RasGRP1 蛋白発現量を解析することで検討した。さらに健常人、SLE 患者 T 細胞において RasGRP1-WT を強制発現し、CD3, CD28 刺激環境下での IL-2, DNMT1 の発現量を解析した。また SRSF1 蛋白に対するクロマチン免疫沈降法により SRSF1 と RasGRP1 promoter との結合を解析した。さらに T 細胞における SRSF1 の制御

因子を検索するため、腎細胞癌細胞において既報のある Sam 68, miR-10 の発現量を健常人、SLE 患者 T 細胞で解析した。

【結果】SLE 患者 T 細胞では SRSF1 の発現量は健常群と比べ有意に低下しており、活動性 SLE 患者では非活動性の SLE 患者と比較して SRSF1 発現の低下がより顕著であった。健常人に T 細胞において SRSF1, RasGRP1-WT mRNA 発現量の相関は認めなかったが、SLE 患者 T 細胞においては SRSF1, RasGRP1-WT, DNMT1 の mRNA 発現は互いに正の相関を示した。健常人、SLE 患者両者において CD4 陽性 T 細胞サブセット間で RasGRP1-WT 発現量や RasGRP1-AS/-WT 比に有意は認めなかった。Oligonucleotide pulldown assay により SRSF1 は RasGRP1-exon11 RNA と直接結合することが示された。健常人 T 細胞における SRSF1 のノックダウンにより RasGRP1 蛋白 RasGRP1-WT に対する RasGRP1-AS の比率が上昇し RasGRP1 蛋白発現は低下した。一方 SLE 患者 T 細胞における SRSF1 の強制発現により RasGRP1 蛋白の発現は亢進し、RasGRP1-AS の比率は低下した。さらに SLE 患者 T 細胞における RasGRP1-WT の強制発現により CD3, CD28 刺激下での IL-2, DNMT1 産生は有意に亢進した。クロマチン免疫沈降により SRSF1 と RasGRP1 promoter との結合は確認できなかった。また Sam 68 は T 細胞において検出できず、SLE 患者 T 細胞における miR-10a, b の発現量は健常人 T 細胞における発現量と有意差を認めなかった。

【考察】T 細胞において SRSF1 は RasGRP1 のスプライシング異常を制御しており、SLE 患者における RasGRP1 におけるスプライシング異常は特定の T 細胞サブセットにおける現象ではなく CD4 陽性 T 細胞サブセットに共通して認められる現象であった。SLE 患者 T 細胞において SRSF1 発現の低下が、RasGRP1 のスプライシング異常を介して RasGRP1 の発現低下、Ras/MAPK 経路の活性低下を引き起こし、IL-2 産生低下、DNA のメチル化低下といった T 細胞における自己免疫異常の要因となり得る。SRSF1 の発現低下は SLE における T 細胞特異的な治療ターゲットとなり得るが、現段階で SLE 患者 T 細胞における発現制御メカニズムは明らかになっておらず、今後さらなる研究が必要である。