



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 河野 通代

主査 教授 村上 正晃
審査担当者 副査 准教授 北村 秀光
副査 教授 渡利 英道
副査 教授 有川 二郎

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.)

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) 患者 T 細胞において Ras の活性化因子 RasGRP1 の exon11 を欠損するスプライシング異常が高頻度に認められ、SLE 患者 T 細胞におけるシグナル異常の一つとして報告されている。RasGRP1 のスプライシング異常の要因として、様々な分子のスプライシングに関わる SR 蛋白の一つである SRSF1 との関与を検討することを本研究の目的とした。SLE 患者 T 細胞において SRSF1 の発現は低下しており、SRSF1 と wild-type RasGRP1 (RasGRP1-WT)、下流である DNMT1 の mRNA 発現量は互いに正の相関を認めた。RasGRP1 のスプライシング異常は SLE 患者 CD4 陽性 T 細胞各サブセットに共通して認められた。pull-down assay により SRSF1 蛋白と RasGRP1 exon11 mRNA の結合が示された。また、健常人 T 細胞における SRSF1 の knockdown により RasGRP1 スプライシング異常が誘導され、SLE T 細胞における SRSF1 の強制発現によりスプライシング異常の制御および RasGRP1 発現の増加を認めた。さらに SLE 患者 T 細胞において RasGRP1-WT を強制発現することで CD3, CD28 刺激下での IL-2, DNMT1 の発現亢進を認めた。

上記結果により SLE T 細胞において SRSF1 発現低下は RasGRP1 のスプライシング制御を介した T 細胞機能異常の要因であることが示唆された。

以上の研究内容について、主査および副査の審査担当者より、下記の質問や意見があった。

- ① SLE 患者の性差ならびに本研究で注目した分子について性差はあるのか
- ② SLE の一般的な人種差について、および本研究結果にも人種差があるのかについて
- ③ スプライシング異常についてのサブセット解析において、n を増やすことでサブセット間での差が出現する可能性について
- ④ CD4 陽性 T 細胞サブセットのみに着目しているが、CD8 陽性 T 細胞においてはどうか
- ⑤ DNMT1 以外の DNMT が SLE 発症に関与している可能性
- ⑥ その他の DNMT についても Ras-MAPK 経路を用いて発現制御されているのかどうか
- ⑦ SRSF1 の他疾患での報告について
- ⑧ SRSF1 を制御する因子について
- ⑨ RasGRP1 欠損と変異では RasGRP1 変異でより自己免疫異常が強いことについて
- ⑩ マウスなどを用いた今後の研究の可能性について
- ⑪ 診断・治療を含めた本研究の臨床的意義について

上記質問や意見に対して申請者は以下のように説明した。

- ① SLE では男女比が 1:9 と女性に多い疾患男性の方が重症度は高いとされるが、その詳細な機序はわかっていない。本研究は実臨床に合わせてほぼすべての検体を女性患者から得て行っているため男性検体は限られるが、測定した範囲では男性と女性との差は特に認めていない。
- ② SLE では人種により発症率・重症度・薬剤への治療反応性が異なることが知られている。本研究では日本人患者で検討を行っているが、SRSF1 の低下については、すでに米国の SLE 患者において同様の報告があり人種を越えた減少であると考えている。
- ③ SLE ではリンパ球減少が起こる患者が多く、かつその中で各サブセットの RNA 抽出は非常に困難となるため、検討できた研究検体が限られた。n を重ねることでスプライシング異常の頻度に有意差を持つサブセットが存在する可能性はあるが、このスプライシング異常という現

- 象がすべての CD4 陽性 T 細胞サブセットで起こっている、すなわち分化の段階ですでに起こっている現象であると推測される点が興味深いと考えている。
- ④ 今回は獲得免疫への関与という観点から CD4 陽性 T 細胞サブセットで実験を行ったが、CD8 陽性 T 細胞機能においても RasGRP1 は必須分子であることから、今後解析を検討する。
 - ⑤ DNMT1 以外にも DNMT3A, 3B も SLE における発現低下はすでに報告されており、病態に寄与している可能性が高い。一方で DNMT1 のみの阻害により lupus 様病態が誘導されることが知られており DNMT1 の発現経路に注目した。
 - ⑥ DNMT3A, 3B については Ras-MAPK 経路により発現制御がなされているという既報はこれまでは検索したところ報告されていない。
 - ⑦ SRSF1 はいくつかの癌種により、すでに発現が亢進していることが報告されている。またアルツハイマー病などの病因となる tau 蛋白の蓄積は SRSF1 の介在する選択的スプライシングの変化により引き起こされることがすでに報告されている。
 - ⑧ SRSF1 の発現制御として、転写後・翻訳後修飾による発現調節はすでに報告されている。すでに報告された miRNA や RNA 結合蛋白については SLE 患者 T 細胞においてすでに検索済みであるが、現段階では有意な発現変化をきたしている分子は見つかっていない。また本研究では mRNA レベルで SRSF1 の発現低下を認めており、SRSF1 promoter へ interact する蛋白やメチル化の異常などが要因と考えられるが、現段階で候補となる分子は見つかっていない。
 - ⑨ RasGRP1 は TCR シグナルの下流であり、positive selection で重要であることがすでに知られており、完全欠損により多くの T 細胞が分化できず、フェノタイプとしては免疫不全に近くなる。一方で機能変異の場合は RasGRP1 を介した TCR シグナルが残存するため positive selection では除去されず、かつ negative selection 時に自己抗原と反応した細胞がシグナルの減弱により除去されきらないことで、自己反応性 T 細胞として分化してしまうと考えられ、このため完全欠損よりも部分的な欠損や変異で自己免疫フェノタイプが強くなるのではないかと考えている。同様の機序が ZAP70 の変異でおこる SKG マウスでも想定されている。
 - ⑩ SRSF1 は ubiquitous に発現しており欠損マウスは胎生致死となるためノックアウトマウスの解析はできないが、一方で T 細胞のコンディショナルノックアウトマウスを用いた研究がすでに学会において発表されている。RasGRP1 についても欠損マウスの報告はすでにあるが、exon11 は種間で広く conserve されている領域であるためマウスにおいても重要なドメインである可能性が高く、RasGRP1 exon11 欠失マウスの研究は今後検討してみたい。
 - ⑪ 診断という点では、現在の採血・画像などの評価尺度で診断に難渋する中枢神経ループス患者では、既存のツールでは異常がない場合に、他の神経・精神疾患との鑑別に SRSF1 の発現低下が診断に有用である可能性がある。また治療の観点からは SRSF1 を制御する因子が見つかった場合には同部位を target とすることで、新たな T 細胞特異的治療となる可能性がある。現在すでに使用されている、あるいは治験中の薬剤との関連では、SRSF1 発現が低下している T 細胞ではカルシニューリン活性が高いこと、および IL-2 発現が低下していることが推測されることから、カルシニューリン阻害薬および low dose IL-2 therapy が SRSF1 発現低下患者には有効である可能性が高いと考えられ、治療選択基準の一つとなる可能性がある。

いずれの質問に対しても申請者の返答は概ね適切な回答であると判断した。
審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。