



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13439
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74255
Type	doctoral thesis
File Information	Michihiro_Kono.pdf



学位論文

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**)

2019 年 3 月

北海道大学

河野 通大

Michihiro Kono

学位論文

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**)

2019 年 3 月

北海道大学

河野 通大

Michihiro Kono

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
1. 要旨	3 頁
2. 略語表	5 頁
3. 諸言	7 頁
4. SLE 患者 T 細胞におけるシグナル異常に関する検討	8 頁
4.1 背景	8 頁
4.2 目的	12 頁
4.3 SLE 患者 T 細胞における発現解析	13 頁
4.3.1 対象	13 頁
4.3.2 方法	13 頁
4.3.3 統計学的解析	14 頁
4.3.4 結果	14 頁
4.3.4.1 対象患者背景	14 頁
4.3.4.2 T 細胞における発現解析結果	15 頁
4.4 健常人/SLE 患者 T 細胞サブセットにおける RasGRP1 発現解析	19 頁
4.4.1 対象と方法	19 頁
4.4.2 結果	21 頁
4.4.3 考察	22 頁
4.5 Jurkat 細胞を用いた SRSF1 ノックダウン実験	23 頁
4.5.1 方法	23 頁
4.5.2 Jurkat 細胞におけるトランスフェクション効率の検討	24 頁
4.5.3 結果	25 頁
4.5.4 考察	25 頁
4.5.5 再実験—方法	26 頁

4.5.6 再実験—結果	26 頁
4.6 Jurkat 細胞を用いた SRSF1、SRSF2 同時ノックダウン実験	28 頁
4.6.1 背景	28 頁
4.6.2 方法	29 頁
4.6.3 結果	29 頁
4.6.4 考察	30 頁
4.7 Jurkat 細胞におけるサイトカイン刺激実験	31 頁
4.7.1 方法	31 頁
4.7.2 結果	31 頁
4.8 Jurkat 細胞における T 細胞受容体刺激実験	35 頁
4.8.1 方法	35 頁
4.8.2 結果	35 頁
4.8.2 考察	36 頁
4.9 Jurkat 細胞における ceramide 刺激実験	37 頁
4.9.1 背景	37 頁
4.9.2 方法	37 頁
4.9.3 結果	38 頁
4.10 Crispr/Cas9 system を用いた SRSF1 ノックアウト Jurkat cell line の作成	39 頁
4.10.1 背景	39 頁
4.10.2 gRNA 設計	40 頁
4.10.3 ベクターの作成	41 頁
4.10.4 方法	43 頁
4.10.5 結果	43 頁
4.10.6 考察	43 頁
4.11 ヒト T 細胞を用いた SRSF1 および RasGRP1-exon11 RNA の結合解析	44 頁
4.11.1 背景	44 頁
4.11.2 方法	44 頁
4.11.2.1 T 細胞における核内蛋白質の抽出	44 頁
4.11.2.2 oligonucleotide の設計	45 頁

4.11.2.3 oligonucleotide pulldown assay	45 頁
4.11.3 結果	47 頁
4.12 健常人 T 細胞における ceramide 刺激実験	48 頁
4.12.1 方法	48 頁
4.12.2 結果	50 頁
4.13 健常人 T 細胞における SRSF1 ノックダウン実験	52 頁
4.13.1 方法	52 頁
4.13.2 結果	53 頁
4.14 SLE 患者 T 細胞における SRSF1 強制発現実験	55 頁
4.14.1 方法	55 頁
4.14.2 結果	55 頁
4.15 健常人/SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 強制発現実験	57 頁
4.15.1 方法	57 頁
4.15.2 結果	58 頁
4.16 RasGRP1-AS の機能解析	59 頁
4.16.1 方法	59 頁
4.16.2 結果	59 頁
4.16.3 考察	60 頁
4.17 SRSF1 蛋白によるクロマチン免疫沈降	61 頁
4.17.1 背景	61 頁
4.17.2 方法	61 頁
4.17.3 結果	62 頁
4.18 T 細胞における SRSF1 発現制御に関する検討	63 頁
4.18.1 背景	63 頁
4.18.2 方法	63 頁
4.18.3 結果	64 頁
4.19 SLE における <i>RASGRP1</i> 遺伝子の single nucleotide polymorphisms (SNPs)解析	

	65 頁
4.19.1 背景	65 頁
4.19.2 対象と方法	65 頁
4.19.3 結果	66 頁
4.19.4 考察	68 頁
5 考察	69 頁
6. 結論	72 頁
7. 謝辞	73 頁
8. 利益相反	75 頁
9. 引用文献	76 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Michihiro Kono, Takashi Kurita, Shinsuke Yasuda, Michihito Kono, Yuichiro Fuijieda, Toshiyuki Bohgaki, Takayuki Katsuyama, George C. Tsokos, Vaishali R. Moulton and Tatsuya Atsumi. Decreased expression of Serine/arginine-rich splicing factor 1 in T cells from patients with active systemic lupus erythematosus accounts for reduced expression of RasGRP1 and DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheumatol*, 2018 in press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Michihiro Kono, Takashi Kurita, Shinsuke Yasuda, Yuichiro Fujieda, Toshiyuki Bohgaki, Takayuki Katsuyama, Michihito Kono, George C. Tsokos, Vaishali R. Moulton, Tatsuya Atsumi. Decreased expression of Serine/arginine-rich splicing factor 1 in T cells from patients with active systemic lupus erythematosus contributes to reduced expression of RasGRP1. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal, 16-20 May 2018.
2. Michihiro Kono, Takashi Kurita, Shinsuke Yasuda, Yuichiro Fujieda, Toshiyuki Bohgaki, Takayuki Katsuyama, Michihito Kono, George C. Tsokos, Vaishali R. Moulton, Tatsuya Atsumi. Decreased expression of Serine/arginine-rich splicing factor 1 in T cells from patients with active systemic lupus erythematosus contributes to reduced expression of RasGRP1. 第62回日本リウマチ学会学術集会、東京、2018年4月26日-28日
3. Michihiro Kono, Shinsuke Yasuda, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tatsuya Atsumi. RASGRP1 polymorphism can contribute to clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. 20th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR 2018), Kaohsiung, Taiwan, 6-9 Sep 2018.
4. Michihiro Kono, Shinsuke Yasuda, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Tatsuya Atsumi. RASGRP1 polymorphism can contribute to clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. 5th International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Florence, Italy, 14-16 Mar 2019.

1. 要旨

【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 ζ 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 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 患者ともに CD4 陽性 T 細胞サブセット間で RasGRP1-WT 発現量や RasGRP1-AS/-WT 比に有意な差は認めなかった。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-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 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。

2. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

ACR	American College of Rheumatology
APC	Allophycocyanin
BAFF	B cell Activating Factor
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
BSA	bovine serum albumin
crRNA	crispr RNA
Cy	Cyanine
DNMT1	DNA methyltransferase 1
FcR γ	γ chain of the Fc receptor
FITC	fluorescein isothiocyanate
EULAR	European league Against Rheumatism
Gfi1	growth factor independence 1
GWAS	genome wide association study
IFN	Interferon
IL	Interleukin
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
OR	Odds Ratio
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PI	Propidium Iodide
PP1	protein phosphatase 1
PSL	Prednisolone
RA	rheumatoid arthritis
RasGRP1-AS	alternatively-spliced RasGRP1
RasGRP1-WT	wild-type RasGRP1
siRNA	small interfering RNA
SLE	systemic lupus erythematosus
SNP	single nucleotide polymorphism
SLEDAI-2K	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000

SRSF1	serine/arginine-rich splicing factor 1
Syk	spleen tyrosine kinase
TCR	T cell receptor
TBS	tris-buffered saline
Tfh	follicular helper T cell
Th0	naïve T cell
Th1	T helper type 1 cell
Treg	regulatory T cell
TNF α	Tumor necrosis factor α
V450	violet 450
ZAP-70	z-associated protein-70

3. 緒言

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は抗核抗体, 抗 DNA 抗体, 抗 Sm 抗体などの多彩な自己抗体産生および免疫複合体の沈着に特徴づけられ、妊娠可能年齢の女性に好発する原因不明の全身性自己免疫疾患である。SLE の症状や重症度は症例毎に異なっており、その臓器障害也多岐にわたる(Lisnevskaja et al., 2014; Yazdany and Dall'Era, 2013)。

SLE の発症過程では、遺伝的素因に加え、喫煙、ウイルス感染、性ホルモン、紫外線、薬物などの環境因子が加わり、過剰な自己免疫への応答が成立すると考えられている。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。その SLE の病態形成に重要な役割を果たす因子として、I 型インターフェロン (IFN) である IFN α の形質細胞様樹状細胞 (pDC) からの過剰産生が報告されている(Elkon and Wiedeman, 2012; Ronnblom and Elkon, 2010)。そして、SLE 患者ではこの IFN 誘導遺伝子群が高発現している(Baechler et al., 2003; Baechler et al., 2004)。IFN α により単球やマクロファージからの B cell Activating Factor (BAFF) 産生の誘導(Vincent et al., 2014)やエフェクター T 細胞の活性化が起こる。また、SLE では T 細胞におけるシグナル伝達異常も多く報告されている(Crispin et al., 2008)。さらに、核酸を含む免疫複合体により NETosis を起こした好中球から Neutrophil Extracellular Traps (NETs) が放出され、SLE の病態形成に関与することも報告されている(Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011)。これらの異常に、遺伝的要因、環境要因が複雑に絡み合うことで病態形成が促進されている。

このような多種多様な病態形成の関わる因子が報告されているものの、治療に関しては、副腎皮質ステロイドや各種免疫抑制剤など治療ターゲットが必ずしも明確でない非特異的治療薬が用いられてきた。近年では T 細胞, B 細胞, BAFF(Furie et al., 2011), IFN α (Kirou and Gkrouzman, 2013)を治療標的とした治療研究が行われてきているが、疾患の多様性やエンドポイント設定の難しさから、これまでに抗 BAFF 抗体である belimumab が承認に至るにとどまっている。SLE の heterogeneity という疾患特徴のため、各臓器障害における明確な重症度評価基準、治療判断基準は存在せず、治療に難渋する症例は少なくない。

本研究では SLE の病態形成の中心的な役割の一つを演じている T 細胞の細胞内シグナル異常に着目し、新たな治療ターゲットの探索を目標として、研究を行った。

4.

SLE 患者 T 細胞における シグナル異常に関する研究

4.1 背景

SLE の病態には先述の通り遺伝的素因に環境因子が加わることで、自己反応性 T 細胞が増殖・活性化し、活性化された B 細胞により多彩な自己抗体が産生され、自己抗体自体あるいは自己抗原と抗体による免疫複合体が組織沈着、補体活性化を引き起こし、多臓器障害を呈する。

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。SLE における T 細胞の機能異常については多くの研究が行われてきた。T cell receptor (TCR) を介した抗原刺激に対する閾値の低下、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の上昇により、細胞内シグナル伝達機能に関与する蛋白リン酸化の亢進が引き起こされている。CD3 ζ 鎖のスプライス異常などによる発現低下が起こり (Liou et al., 1998; Nambiar et al., 2001)、これに代替すべく $\text{Fc}\gamma$ (γ chain of the Fc receptor) が会合し (Duriagin et al., 2006; Enyedy et al., 2001)、通常の T 細胞シグナルにおける ZAP-70 (z-associated protein) のかわりに Syk (spleen tyrosine kinase) が活性化される。また、接着分子であるヒアルロン酸受容体 CD44 の細胞表面の発現も増強しており、炎症部位への T 細胞の接着や移動を亢進させ、病態形成に関与している (Crispin et al., 2007; Crispin et al., 2008)。結果的に、下流シグナルに変化が生じ、 Ca^{2+} イオン - calcineurin の下流にある NFAT (nuclear factor of activated T cells) の活性亢進が起こり (Crispin et al., 2008)、その他にも IL-2 産生を抑制する PP2A の亢進 (Katsiari et al., 2005)、CaMKIV の亢進、CREB/CREM ratio 異常も報告されている (Crispin et al., 2008)。その結果 T 細胞における IL-2 産生低下と IL-17 の産生亢進、T 細胞サブセットの変化、B 細胞の過剰な活性化等を介し病態形成へ関与することが示唆されている。

一方で、Ras/MAPK 系の活性低下も SLE 患者 T 細胞におけるシグナル異常の一つとして重要である。Ras/MAPK 経路に引き続き、Erk の活性低下およびその下流である AP-1 の減少が起こり、IL-2 産生の低下 (Moulton and Tsokos, 2015) ならびに DNA の

メチル化維持に必須の酵素である DNA methyltransferase 1 (DNMT1) の発現が低下する(Pan et al., 2010)。SLE 患者 T 細胞では全般的な DNA の低メチル化が認められるが(Richardson et al., 1992)、中でも ITGAL (CD11a), perforin (PRF1), TNFSF7 (CD70)や CD40LG (CD40L)などの autoimmune-related genes と呼ばれる領域の DNA の低メチル化が顕著であることが報告されている(Kaplan et al., 2004; Lu et al., 2007; Oelke et al., 2004; Richardson et al., 1992)。マウスにおいて 5-Azacitizine (5-AZA)を用いて DNMT1 阻害を行うと同領域の低メチル化を介した過剰な遺伝子発現が誘導され、lupus 様症状を呈することが知られている(Oelke et al., 2004; Richardson et al., 1992)。また、procainamide や hydralazine による薬剤誘発性ループス患者でも DNMT1 活性の低下を介して同領域の遺伝子低メチル化が認められることが知られている(Cornacchia et al., 1988)。

すなわち、Ras/MAPK 経路の活性低下の結果として生じる DNMT1 産生低下を介した autoimmune-related genes のメチル化の変化が SLE 患者 T 細胞における自己免疫異常および SLE 発症に大きな役割を演じていると考えられる。

当研究グループは、Ras の活性化因子である RasGRP1 に着目し研究を行ってきた。RasGRP1 は RasGRP ファミリーの一つで T 細胞に主に強発現している。T 細胞分化、特に胸腺細胞における negative selection において重要であり、RasGRP1 欠損マウスにおいて、single positive T 細胞が著減すること、高月齢では autoimmune lymphoproliferative disorder を呈することが報告されている(Dower et al., 2000; Priatel et al., 2002; Roose et al., 2005)。また B 細胞(Coughlin et al., 2005)や NK 細胞(Lee et al., 2009)などでの発現も近年確認され、さらに RasGRP1 を欠損したヒトでは T, B, NK 細胞の分化、増殖、機能不全により免疫不全を呈することが報告された(Salzer et al., 2016)。また Ras 結合ドメイン内の二か所のヘテロ変異を併せ持つヒトで autoimmune lymphoproliferative disorder 様の病態を呈した 2 症例も報告されており(Mao et al., 2017)、RasGRP1 と自己免疫病態との関連が示唆されている。

さらに近年のアジア人の Genome wide association study (GWAS)において *RASGRP1* は疾患感受性遺伝子の一つとして同定された(Sun et al., 2016)。

当研究グループではこれまでに、RasGRP1 のスプライス異常が SLE 患者 T 細胞において有意に高頻度であること、および蛋白発現レベルも低下していることを報告した(Yasuda et al., 2007)。SLE 患者 T 細胞では RasGRP1 の様々なスプライスバリエントが認められるが、主に exon11 を欠失する alternatively-spliced RasGRP1 (RasGRP1-AS)が高頻度に認められ、RasGRP1-AS 発現亢進に伴う wild-type RasGRP1 (RasGRP1-WT)の発現低下が、Ras/MAPK 経路の活性低下の一因と考えられた (Figure 1)。

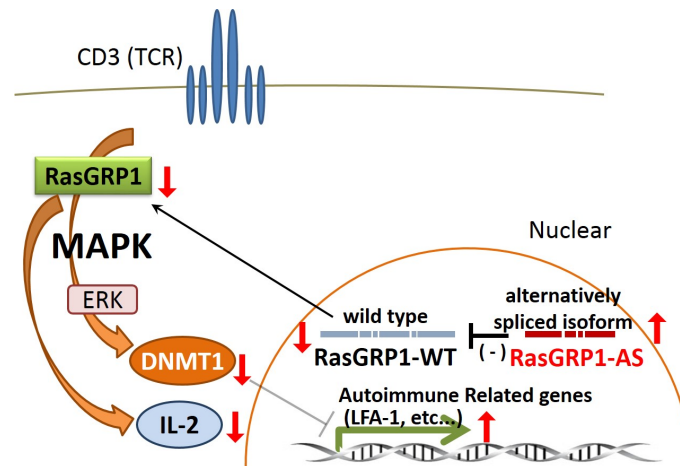


Figure 1. SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 スプライシング異常と Ras/MAPK 活性の低下

SLE 患者 T 細胞では RasGRP1 スプライシング異常に伴う RasGRP1-AS の増加、RasGRP1-WT の低下に伴い RasGRP1 蛋白発現が低下し、Ras/MAPK 経路の活性低下を介して DNMT1, IL2 産生が低下する。DNMT1 発現低下は、DNA の低メチル化を介して autoimmune related genes の発現の異常亢進を呈する。

今回私は、SLE 患者 T 細胞におけるスプライシング異常を調整する新たな治療の可能性を探るべく、RasGRP1 の転写において exon 11 を欠失する異常が起こる原因を探索した。SLE T 細胞において CD3 ζ のスプライシング異常がすでに報告されているが、SR 蛋白の一つである serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) が CD3 ζ のスプライシングを制御する因子として同定された(Moulton et al., 2015; Moulton and Tsokos, 2010)。米国の SLE 患者において、SLE 患者 T 細胞では有意に SRSF1 発現が低下しており、また活動性の SLE 患者においてその発現低下は顕著であった(Moulton et al., 2013)。興味深いことに、公共のデータベース ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>)を用いて解析を行ったところ、RasGRP1-exon11 RNA は SRSF1 との結合が予測される配列を有していた (Figure 2)。

4.2 目的

SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 スプライシング異常と SRSF1 発現との関連を解析する。

4.3 SLE 患者 T 細胞における発現解析

4.3.1 対象

45 例の SLE 患者、18 人の健常人および疾患コントロールとして 11 例の関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)患者を対象とした。SLE の診断はアメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology; ACR) の 1997 年改訂分類基準(Hochberg, 1997; Tan et al., 1982)を用いて行った。RA の診断は ACR / 欧州リウマチ学会 (European League Against Rheumatism: EULAR) 関節リウマチ分類基準 2010(Aletaha et al., 2010)を用いて行った。SLE の疾患活動性評価は Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) (Gladman et al., 2000)および British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) (Yee et al., 2009)を用いて行った

本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認 (承認番号: 012-0020) を得て行った。

4.3.2 方法

対象患者より採取した末梢血 10ml より、RosetteSep T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies)と LymphocyteSeparation Medium (Corning)を用いて製品プロトコールに準じて T 細胞を分離した。分離 T 細胞の純度が 95%以上であることを Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD3 抗体 (eBioscience)を用いて、FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences)にて確認した。純化した T 細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、Super Script VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Life Technologies)を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を RasGRP1、SRSF1、DNMT1、GAPDH 特異的なプライマー (RasGRP1: assay identifier Hs00183347_m1、DNMT1: assay identifier Hs00154749_m1、SRSF1: assay identifier Hs00199471_m1、GAPDH: assay identifier Hs02758991_g1) (Applied Biosystems)を用いて ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で初期変性 (95°C, 10 分) 後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル増幅した。各サンプルの mRNA の発現量を GAPDH mRNA 発現量で補正後、健常人の代表サンプル 1 検体を基準値

として $\Delta\Delta$ CT法による定量評価を行った。RasGRP1はexon11を欠失していないRasGRP1-WTを抽出するため、バリエントで欠失するRasGRP1 exon11を検出する特異的プライマーを使用した (figure 3)。

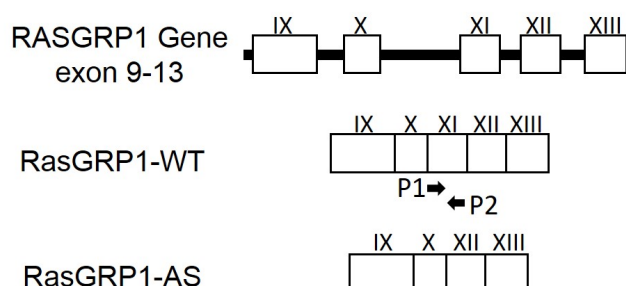


Figure 3. RasGRP1-WT 特異的プライマーの設計方法

exon 11 内にプライマーを設計し(Forward プライマーを P1、Reverse プライマーを P2 で示した)、RasGRP1-AS を検出せず RasGRP1-WT のみを検出する特異的プライマーとした。

4.3.3 統計学的解析

SLE 患者群と健常人群における各遺伝子発現量($\Delta\Delta$ CT 値)の比較は、Unpaired t-test により行った。また、各遺伝子発現量の相関については、Kolmogorov-Smirnov 検定を用いて正規性があることを確認し、Pearson の積率相関係数により解析した。

4.3.4 結果

4.3.4.1 対象患者背景

対象患者背景を Table 1 に示す。健常群、SLE 群、RA 群の年齢中央値 (四分位範囲)はそれぞれ 35 (31-48) 歳、27 (25-31) 歳、33 (26-42) 歳であった。SLE 患者の SLEDAI-2K、BILAG スコアの中央値 (四分位範囲) はそれぞれ 2 (2-4)、1 (0-1)であった。SLE 患者 45 例中 35 例 (77.8%)で血液検体採取時に Prednisolone (PSL)を投与されており、PSL 投与量の中央値 (四分位範囲) は 7 (4-11) mg/日であった。17 例(28.9%)

で免疫抑制剤が使用されており、その内訳は tacrolimus 13 例, azathioprine 2 例, mycophenolate mofetil 1 例, cyclophosphamide 1 例 methotrexate 1 例であった。

Table1 対象患者背景

	Healthy (n = 18)	SLE (n = 45)	RA (n=11)
背景			
性別 (男性 / 女性)	2 / 16	4 / 41	0 / 8
年齢, 中央値 (四分位範囲)	27 (25 – 31)	35 (31 – 48)	33 (26 – 42)
未治療患者 (%)	N/A	10 (22%)	2 (18.2%)
Disease activity			
SLEDAI-2K, 中央値 (四分位範囲)	N/A	2 (2 – 4)	N/A
BILAG index, median (四分位範囲)	N/A	1 (0 – 4)	N/A
Treatment			
prednisolone (%)	N/A	35 (77.8%)	6 (54.5%)
用量 (mg/日), 中央値 (四分位範囲)		7 (3-11)	1 (0-5)
tacrolimus (%)	N/A	13 (28.9%)	-
azathioprine (%)	N/A	2 (4.4%)	-
mycophenolate mofetil (%)	N/A	1 (2.2%)	-
cyclophosphamide (%)	N/A	1 (2.2%)	-
Methotrexate (%)	N/A	1 (2.2%)	6 (54.5%)
Biologics (%)	N/A	-	8 (72.7%)

4.3.4.2 T 細胞における発現解析結果

SLE 患者 T 細胞における SRSF1 の mRNA 発現量は健常群と比較して有意に低下していた (Figure 4)。

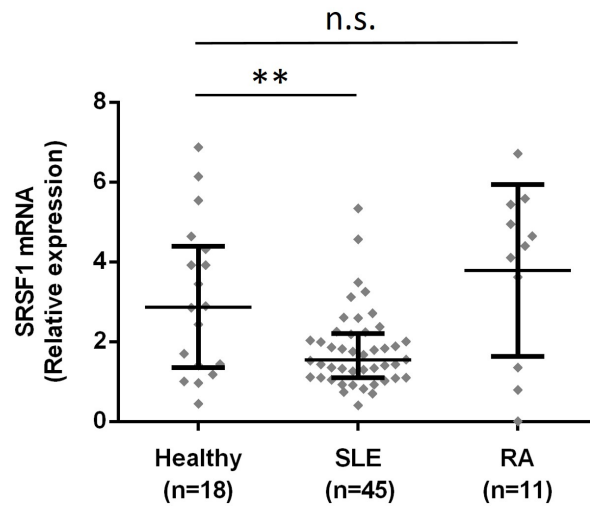


Figure 4. T 細胞における SRSF1 mRNA 発現量の解析

健常人(Healthy)、SLE 患者、RA 患者 T 細胞における SRSF1 mRNA 発現量を解析した。データは平均±標準偏差で示した。**: $p < 0.01$, n.s; not significant, t-test

また活動性 SLE 患者 (BILAG index スコア 1 点以上)と非活動性 SLE 患者 (BILAG index スコア 0 点)を比較すると活動性 SLE 患者において有意に SRSF1 発現が低値であった (Figure 5)。

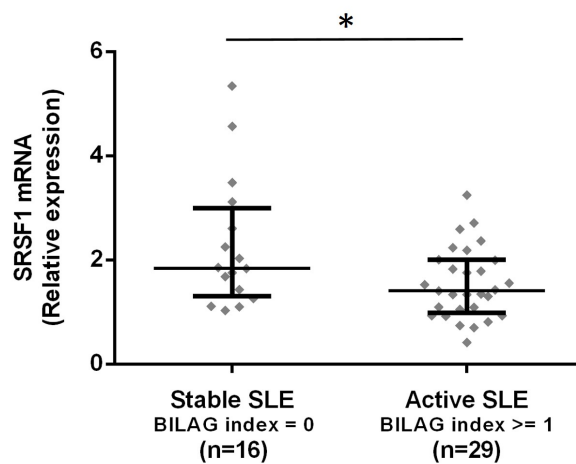


Figure 5. SLE の活動性と SRSF1 発現量についての解析

BILAG index が 1 以上の活動性 SLE と BILAG index 0 の非活動性 SLE 患者 T 細胞における SRSF1 mRNA 発現量を比較した。データは標準±標準偏差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

SLE 患者における SRSF1 を BILAG コンポーネント毎に検討したところ、いずれの臓器障害においても活動性を有する SLE 患者において SRSF1 発現量が低下する傾向を認めた (Figure 6)。

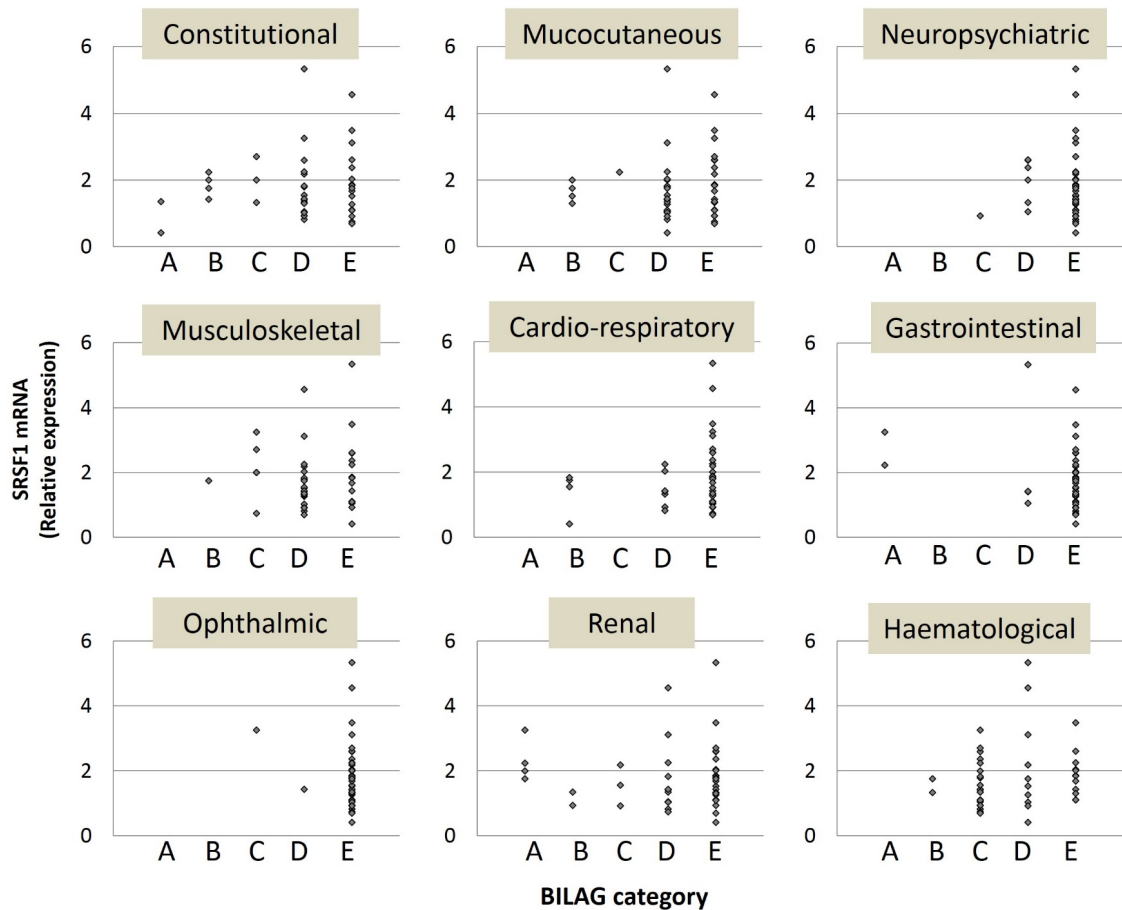


Figure 6. 臓器障害ごとの活動性と SRSF1 発現量との関連

BILAG 評価による各臓器コンポーネントにおける疾患活動性と SRSF1 発現量との関係を解析した。BILAG category A:重症、B: 中等症、C: 軽症、D: 非活動性、E:既往なし

さらに SRSF1、DNMT1、RasGRP1-WT の発現の相関を解析したところ健常群においては RasGRP1-WT と DNMT1 のみが相関を認めた(Figure 7)一方で、SLE 群では SRSF1、RasGRP1-WT、DNMT1 は互いに有意な正の相関関係を認めた (Figure 8)。

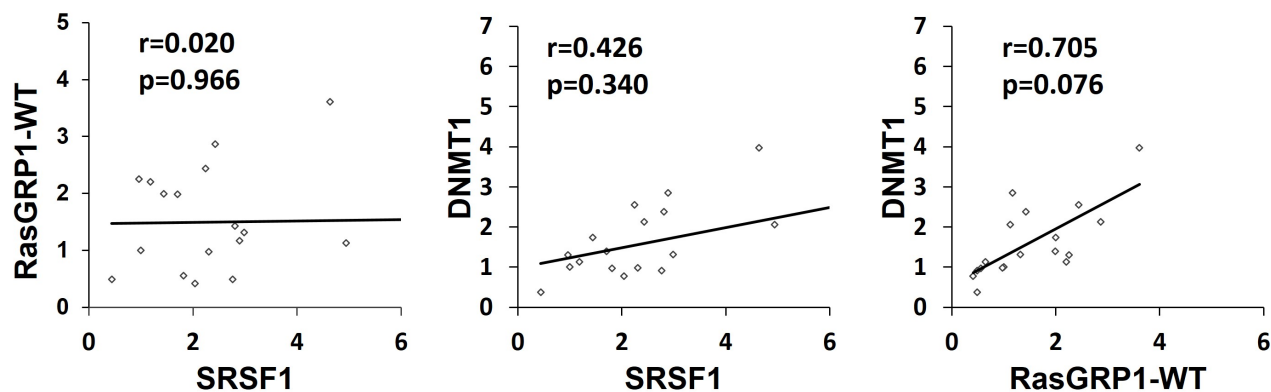


Figure 7. 健常人 T 細胞における SRSF1、RasGRP1-WT、DNMT1 発現量の相関
 健常人 T 細胞において SRSF1, RasGRP1-WT, DNMT1 mRNA 発現量のそれぞれの相関を解析した。

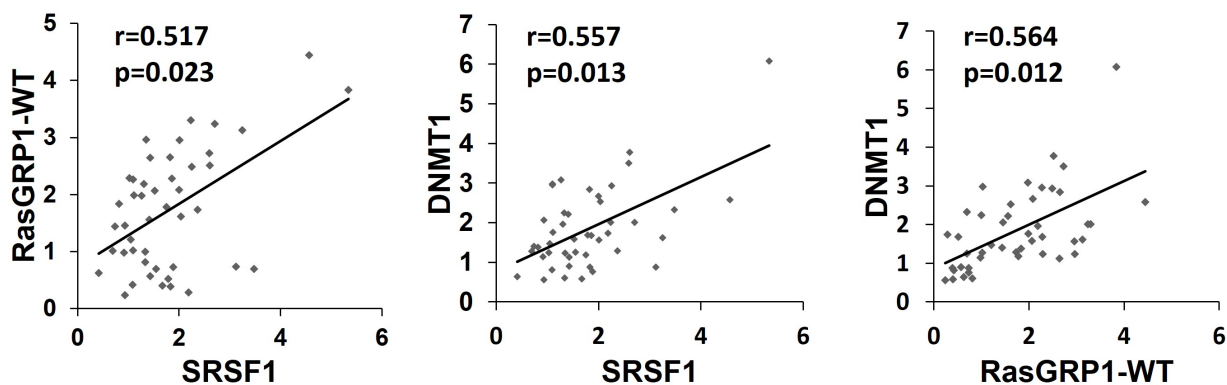


Figure 8. SLE 患者 T 細胞における SRSF1、RasGRP1-WT、DNMT1 発現量の相関
 SLE 患者 T 細胞において SRSF1, RasGRP1-WT, DNMT1 mRNA 発現量のそれぞれの相関を解析した。

4.4 健常人 / SLE 患者 T 細胞サブセットにおける

RasGRP1 発現解析

4.4.1 対象と方法

健常人 7 名および活動性 SLE 6 例より全血 20ml を採血し、Lymphocyte Separating Medium (Corning)を用いて、比重遠心により末梢血単核球細胞を分離した。得られた末梢血単核球細胞を Fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗 CD3 抗体、Violet 450 (V450)標識抗 CD3 抗体、peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5)標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 CCR6 抗体、PE 標識抗 CD25 抗体、PE-cyanine 7 (PE-Cy7) 標識抗 CCR7 抗体、PE-Cy7 標識抗 CXCR5 抗体、allophycocyanin (APC) 標識抗 CXCR3 抗体、APC 標識 CD127 抗体、APC-cyanine 7 (APC-Cy7) 標識 CD45RA を用いてそれぞれ標識した。CD4 陽性 T 細胞サブセットを既報(Maecker et al., 2012; Miyara et al., 2009; Morita et al., 2011)に基づき Table 2 のように定義し、BD FACS Aria™ II flow cytometer を用いてナイーブ T 細胞 (Th0)、T helper type1 細胞 (Th1)、Th2、Th17、濾胞性 T 細胞 (follicular helper T cell; Tfh)、制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg)に分類し、ソーティングによりそれぞれの CD4 陽性 T 細胞サブセットごとに回収した。

Table 2. 細胞表面マーカーを用いたサブセット分類

CD4 陽性 T 細胞 サブセット	表面マーカー
Th0	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁺
Th1	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻
Th2	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻
Th17	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺
Tfh	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CXCR5 ⁺
Treg	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}

回収した細胞から Quick-RNA Micro-Prep (Zymo Research)を用いて RNA を抽出し、SuperScript VILO (Invitrogen)を用いて逆転写し cDNA を合成した。得られた cDNA を RasGRP1-WT、RasGRP1-AS、Cyclophilin A 特異的プライマーおよび SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes (Applied Biosystems) を用いて ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で初期変性 (95℃, 10 分) 後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分を 1 サイクルとして 45 サイクル増幅した。各サンプルの mRNA の発現量を Cyclophilin A mRNA 発現量で補正後、健常人の Th0 サンプル 1 検体を基準値として $\Delta\Delta CT$ 法による定量評価を行った。RasGRP1-WT および RasGRP1-AS を特異的に検出するため、RasGRP1-WT プライマーは exon 11 内に設計し、RasGRP1-AS プライマーは exon 10 内に Forward プライマーを設計し、exon 10, 12 結合部位に Reverse プライマーを設計した (Figure 9)。使用したプライマー配列を Table3 に示す。

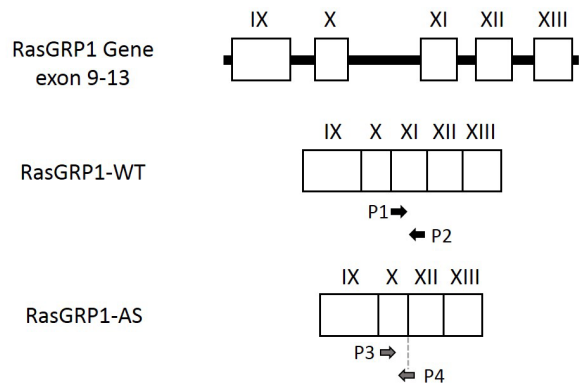


Figure 9. RasGRP1 プライマー設計方法

RasGRP1-WT 特異的プライマーとして exon 11 内へ Forward, Reverse プライマーを設計し(P1, P2)、RasGRP1-AS プライマーとして exon 10 内に Forward プライマーを (P3)、exon 10, 12 結合部位に Reverse プライマー (P4)を設計した。

Table 3 プライマー配列

標的分子	配列(5'>3')
Cyclophilin A	Forward: 5'-TTCATCTGCACTGCCAAGAC-3'
	Reverse: 5'-TCGAGTTGTCCACAG TCAGC-3'
RasGRP1-WT	Forward: 5'-GGACTGGGCTTCTGGAGTGT-3'
	Reverse: 5'-CCACCATCCTCTGGACGTGT-3'
RasGRP1-AS	Forward: 5'-CCCACCCTTGGAGGCTAACA-3'
	Reverse: 5'-GTTCTTGAAGACAGATGGAGCTCTG-3'

4.4.2 結果

健常群および SLE 患者群ともに、サブセット間での RasGRP1-WT mRNA、RasGRP1-AS/-WT 比に有意差は認めなかった (Figure 10)。

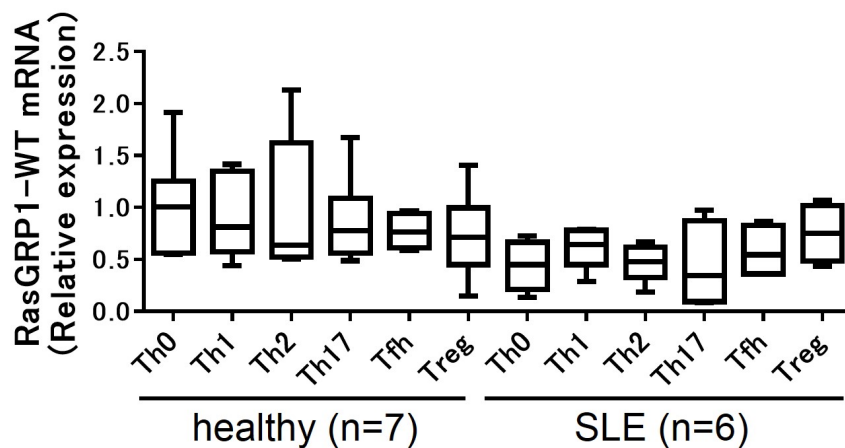
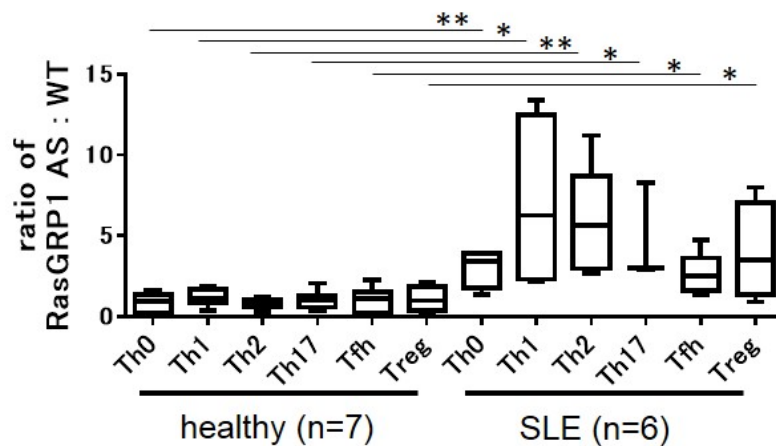


Figure 10. 健常人、SLE 患者 T 細胞各サブセットにおける RasGRP1-WT mRNA 発現量

健常人(Healthy, n=7), SLE 患者 (n=6)における各 T 細胞サブセットの RasGRP1-WT mRNA 発現量を解析した。データは平均±標準偏差で示した。

一方で健常群と SLE 群での RasGRP1-WT, AS の発現量をサブセット毎に比較するといずれのサブセットにおいても RasGRP1-WT 発現量は SLE 群で低下する傾向があり、一方 RasGRP1-AS/-WT 比は有意差をもって増加していた (Figure 11)。



Figuer 11. 健常人、SLE 患者 T 細胞各サブセットにおける RasGRP1-AS/-WT 比
健常人(Healthy, n=7), SLE 患者 (n=6)における各 T 細胞サブセットの RasGRP1-AS 発現量と RasGRP1-WT mRNA 発現量との比を解析した。データは平均±標準偏差で示した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, t-test.

4.4.3 考察

上記結果により、RasGRP1 のスプライシング異常については、少なくともある特定の subset のみに認められる現象ではなく、CD4 陽性 T 細胞において共通してみられる現象と考えられた。T 細胞における実験に際して、ヒト T 細胞は、whole T 細胞を用いても得られる細胞数は限られており、長期の培養にも不向きであることから、まずは T 細胞の代表的な cell line である Jurkat E6-1 (以下 Jurkat)細胞を用いて実験を行う方針とした。

4.5 Jurkat 細胞を用いた SRSF1 ノックダウン実験

4.5.1 方法

対数増殖期の Jurkat 細胞を 1 トランスフェクション当たり 5×10^6 細胞用意し、R-Buffer 100 μ L および 2 種類の SRSF1 特異的 small interfering RNA (siRNA) (Hs_SRSF1_1、Hs_SRSF1_5)(QUIAGEN) あるいはコントロール siRNA (終濃度 30 pmol/L) を加え Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) を用いてエレクトロポレーション方によるトランスフェクションを施行した。SRSF1 特異的 siRNA の target 配列を table 4 に示す。

Table 4. SRSF1 特異的 siRNA の target sequence

siRNA	target sequence
Hs_SFRS1_1	CAGTATTGACCTTATACTAAA
Hs_SFRS1_5	ATCCAACAAGATAGAGTATAA

トランスフェクション後、細胞は温めた RPMI メディウムで培養した。トランスフェクションから 24 時間、48 時間後に細胞を回収し、先述の方法で RNA を回収し、逆転写により cDNA 合成を行った。得られた cDNA に対して RasGRP1-WT、SRSF1、GAPDH 発現を特異的 Taqman MGB Probe を用いて Realtime qPCR 法により mRNA 発現量を解析した。

また回収した細胞は protease inhibitor (Sigma) 含有の cell lysis buffer (Wako) で処理を行い、15 分間氷上静置、15 分間遠心分離した後の上清を回収した。濃度調整した上清にドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) を加え 95°C で 5 分間加温した。次に 4-12% グラディエントアクリルアミドゲル(Bio-Rad) を用いて、サンプル中の蛋白質を電気泳動させた。その後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) に蛋白質を転写し、スキムミルクでブロッキングを行った。Solution 1 (Toyobo) で 1000 倍希釈した一次抗体を 4 度で一晩反応させ、洗浄後、二次抗体を反応させた。検出試薬には Amerisham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を使用した。抗体としてマウス抗ヒト SRSF1 抗体、ペルオキシダーゼ標識

ゴート抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) 、ラビット抗ヒト RasGRP1 抗体、ペルオキシダーゼ標識ゴート抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz) 、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト β -actin 抗体 (SIGMA-Aldrich) を使用した。

4.5.2 Jurkat 細胞におけるトランスフェクション効率の検討

Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific)には、エレクトロポレーション施行時の刺激条件に関して、24 条件のプログラムが内蔵されている。Jurkat 細胞に対して最も効率的にトランスフェクションが可能な刺激条件を検討するため、Jurkat 細胞に対して pmaxGFP ベクター (Thermo Fisher Scientific) を先述の方法で各 24 条件においてトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し Propidium Iodide (PI) 染色した後 FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) にて、死細胞や GFP 導入細胞の割合を検出した (Figure 12)。

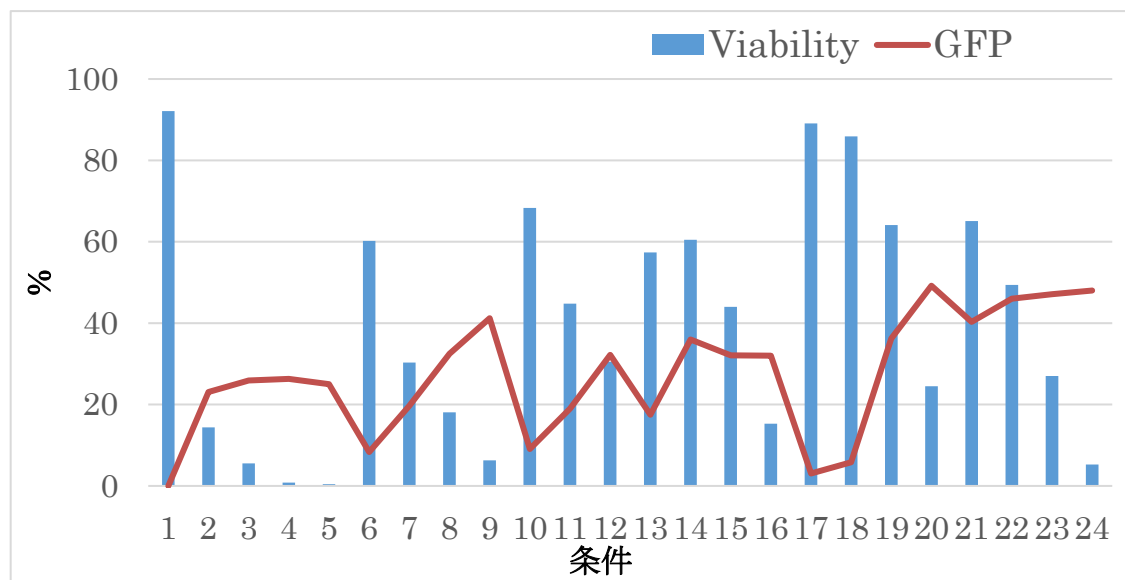


Figure 12. Jurakt 細胞に対するトランスフェクション条件検討

Neon Transfection System 内蔵の各条件 (1-24)を用いて Jurkat 細胞に GFP 発現ベクターをトランスフェクションし、フローサイトメトリーを用いて生存率、生細胞数中の GFP 細胞陽性率を示した (n=1)。

Jurkat 細胞は増殖能の極めて高い細胞であり、SRSF1 ノックアウト実験においては

トランスフェクション後に正常細胞のみが急速に増殖しノックダウン効率を低下させることが想定されたため、生存細胞内の GFP 導入効率が高い条件が望ましいと考え、条件 20 を Jurkat 細胞に対するトランスフェクション刺激条件として決定した。

4.5.3 結果

Jurkat 細胞に対して SRSF1 特異的 siRNA を用いて Neon Transfection System を用いて条件 20 でエレクトロポレーションを施行した。トランスフェクション後 24 時間の SRSF1 の発現量の低下を確認したところ mRNA レベルでの発現低下が不十分であり (Figure 13)。ウエスタンブロット解析においても SRSF1 蛋白発現量も変化を認めなかった。

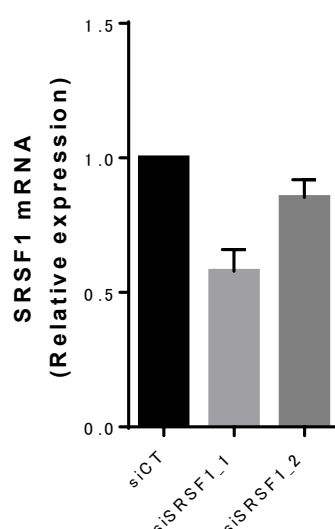


Figure 13. Jurkat 細胞における siRNA を用いた SRSF1 ノックダウン

2 種類の SRSF1 特異的 siRNA をそれぞれ Jurkat 細胞にトランスフェクションした群 (siSRSF1_1, siSRSF1_2) とコントロール siRNA 群 (siCT) における SRSF1 mRNA 発現量 (n=3)。データは平均±標準誤差で示した。

4.5.4 考察

SRSF1 の機能実験を施行するためにはノックダウン効率の向上が必須と考えられた。ノックダウン効率低下の原因として Jurkat 細胞への siRNA の導入効率自体が低い点、トランスフェクション時に残存した正常 Jurkat 細胞が細胞回収までにより優位に増殖しノックダウン効率を打ち消してしまう可能性を考えた。そこで Jurkat 細胞に対して、時間をあけて2度トランスフェクションを施行することで、siRNA 導入効率の上昇および正常 Jurkat 細胞の割合の低下が得られるのではないかと考えた。

4.5.5 再実験-方法

Jurkat 細胞に対して上述の通りコントロール siRNA (siCT)および SRSF1 特異的 siRNA を用いてトランスフェクションを施行し、48 時間後に細胞を回収した上で再度同様に同じ siRNA のトランスフェクションを施行した。2 回目のトランスフェクションから 24, 48 時間後に、細胞を回収し Realtime qPCR 法ならびにウエスタンブロットにより mRNA、蛋白発現量評価を施行した。

4.5.6 再実験-結果

Jurkat 細胞に対して2回トランスフェクションを施行することで SRSF1 のノックダウン効率は mRNA、蛋白レベルともに著明な改善を認めた(Figure 14)。

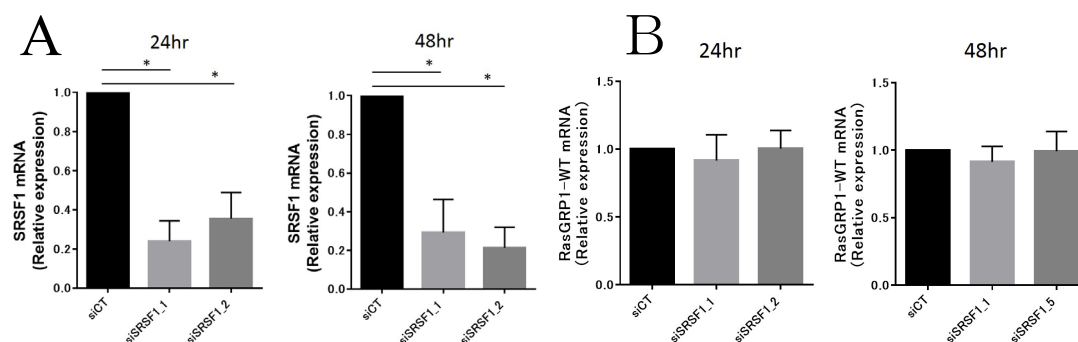


Figure 14. SRSF1 ノックダウン Jurkat 細胞における mRNA 発現量の解析

- A. 二回目のノックダウンから 24、48 時間後の SRSF1 mRNA 発現量
 B. 二回目のノックダウンから 24、48 時間後の RasGRP1-WT mRNA 発現量
 データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, t-test.

一方で SRSF1 ノックダウン Jurkat 細胞において RasGRP1-WT の mRNA 発現量および RasGRP1 蛋白発現量に有意な変化は認めなかった(Figure 15)。

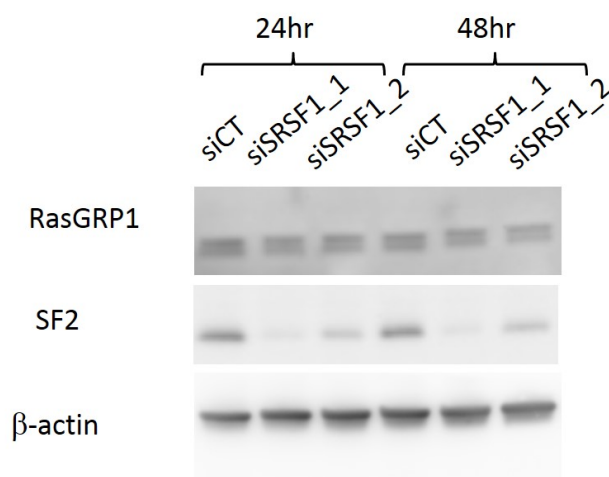


Figure 15. SRSF1 ノックダウン Jurkat 細胞における蛋白発現量の解析

二回目のトランスフェクションから 24、48 時間後の RasGRP1, SRSF1, β-actin 蛋白発現量。実験は 3 回施行し、その代表データを示す。

4.6 Jurkat 細胞を用いた SRSF1、SRSF2 同時ノック ダウン実験

4.6.1 背景

先述の Jurkat 細胞における SRSF1 ノックダウン実験において SRSF1 発現低下にも関わらず我々が仮説とした RasGRP1 の発現量変化を認めなかった。原因の一つとして他の SR protein による代償が働いている可能性を考慮した。先述のデータベースにおいて SRSF1 と同様に RasGRP1 の exon11 に結合が予測される SR 蛋白として SRSF2 が挙げられた (Figure 16)。

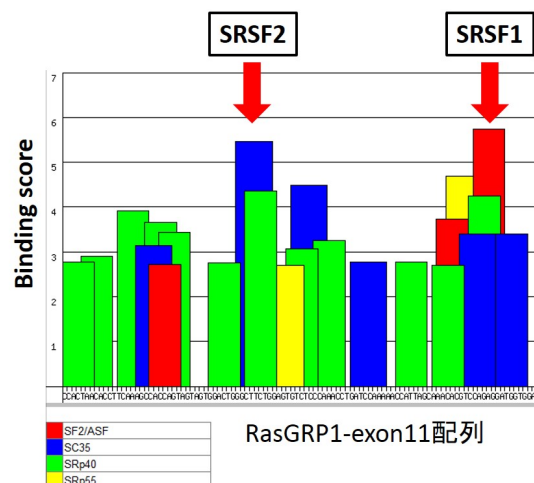


Figure 16. RasGRP1-exon11 と結合が予測される SR 蛋白

データベース ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>)を用いた RasGRP1 exon11 との結合が予測される SR 蛋白の解析。SRSF1 を赤の棒グラフで、SRSF2 を青の棒グラフで示す。

SRSF2 の発現を SRSF1 ノックダウン Jurkat 細胞で検討したところ、SRSF2 mRNA の発現亢進を認めた (Figure 17)。そのため、SRSF2 が SRSF1 ノックダウン時に SRSF1 の機能を代償している可能性を考え、両者を同時にノックダウンすることとした。

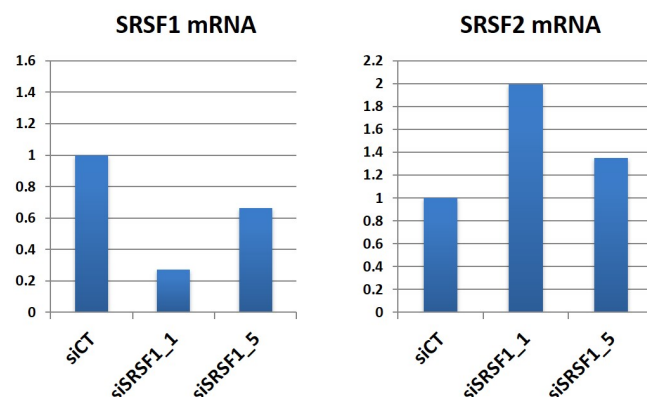


Figure 17. SRSF1 ノックダウン Jurkat 細胞における、SRSF1, SRSF2 mRNA 発現量の解析

SRSF1 特異的 siRNA をトランスフェクションし 24 時間後の SRSF1, SRSF2 mRNA 発現量を Realtime qPCR 法で解析した。

4.6.2 方法

4.6.1 に記載の通り Jurkat 細胞およびコントロール siRNA 群(siCT)および SRSF1 特異的 siRNA、SRSF2 特異的 siRNA(Hs_SRSF2_1, Hs_SRSF2_2)(QIAGEN)を組み合わせ (siSRSF1,2_1: siSRSF1_1 + siSRSF2_1、siSRSF1,2_2: siSRSF1_5 + siSRSF2_2) Neon Transfection system を用いてエレクトロポレーション法を行った。上述の 4.5.5 実験と同様に、Jurkat 細胞に対して 0, 48 時間後の 2 回トランスフェクションを行い、2 回目のトランスフェクションから 24, 48 時間後の mRNA、蛋白発現レベルを Realtime qPCR 法およびウエスタンブロットにより評価した。SRSF1、SRSF2 は分子量が近接しており別のメンブレンでの評価を行った。SRSF2 に対する抗体として anti-SC35 antibody (abcam)を使用した。

4.6.3 結果

Jurkat 細胞における SRSF1, SRSF2 同時ノックダウンにより mRNA、蛋白レベルで SRSF1, SRSF2 の発現が低下したことを確認したが (Figure 17)、RasGRP1-WT mRNA 発現量、RasGRP1 蛋白発現量の変化は認めなかった (Figure 18)。

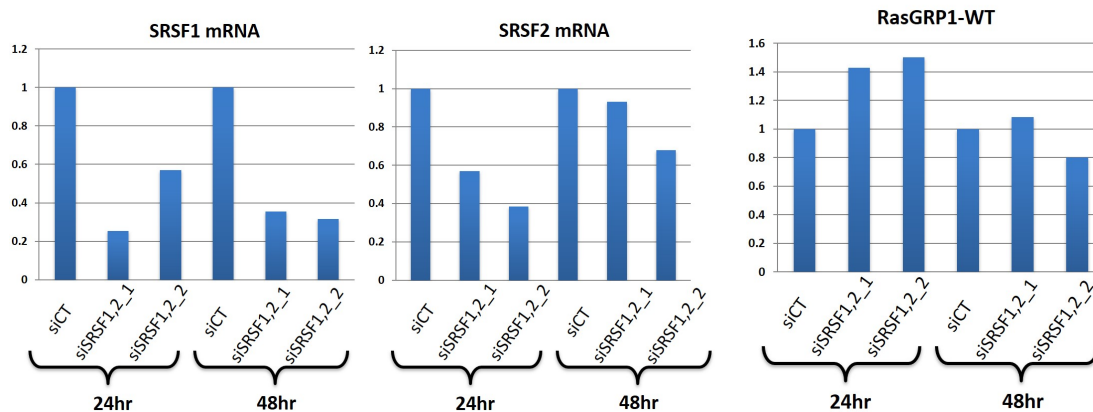


Figure 17. SRSF1, SRSF2 同時ノックダウン Jurkat 細胞における mRNA 発現量解析
SRSF1, SRSF2 特異的 siRNA を二回トランスフェクションし得られた SRSF1, SRSF2 ノックダウン Jurkat 細胞における SRSF1, SRSF2, RasGRP1-WT の発現量。

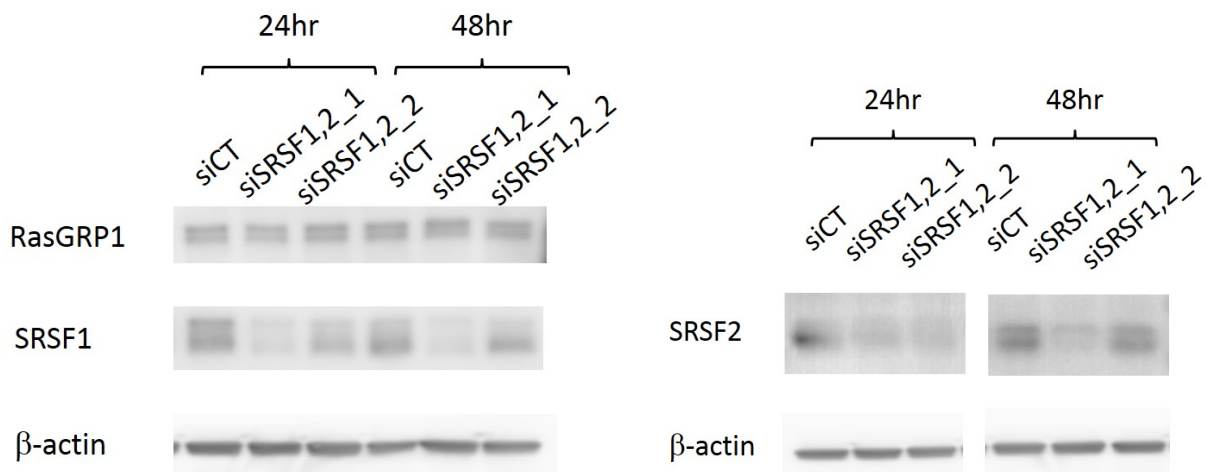


Figure 18. SRSF1, SRSF2 同時ノックダウン Jurkat 細胞における蛋白発現量解析
SRSF1, SRSF2 特異的 siRNA を二回トランスフェクションし得られた SRSF1, SRSF2 ノックダウン Jurkat 細胞における SRSF1, SRSF2, RasGRP1-WT の蛋白発現量。

4.6.4 考察

Jurkat 細胞を用いた SRSF1 ノックダウンおよび SRSF1, SRSF2 同時ノックダウンにより RasGRP1 スプライシングを介した RasGRP1 発現変化への影響を検討することは

困難であった。原因として、現在のノックダウン効率では十分な SRSF1, SRSF2 の機能欠失が誘導されない可能性、transient なノックダウンでは評価が不十分である可能性、エレクトロポレーション処置により細胞の活性が低下することが Ras 系を含めた細胞機能に影響する可能性、RasGRP1 mRNA の発現を亢進させるような刺激下でなければスプライシング異常が検出できない可能性を考えた。そこで Jurkat への様々なサイトカイン、T 細胞受容体刺激により SRSF1 や RasGRP1 発現変化を確認し、実験における新たな刺激環境を決定すること、ノックダウン以外の方法で SRSF1 機能を阻害する系を確立すること、SRSF1 のノックアウト cell line を作ることで、上記課題を解決できる可能性を考察した。

4.7 Jurakat 細胞に対するサイトカイン刺激実験

4.7.1 方法

Jurakat 細胞を 1 well 当たり 1×10^6 細胞とし、Interferon α (IFN α), Tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6) を添加した RPMI メディウムで 24~48 時間 (IFN α のみ 72 時間も実施) 培養後に細胞を回収し、SRSF1, RasGRP1-WT の mRNA ・ 蛋白発現量を先述と同様に SYBR Green 法による Realtime aPCR により解析した。

4.7.2 結果

IFN 刺激により SRSF1, RasGRP1 とともに mRNA 発現量の軽度の低下を認めた (Figure 19, 20)。

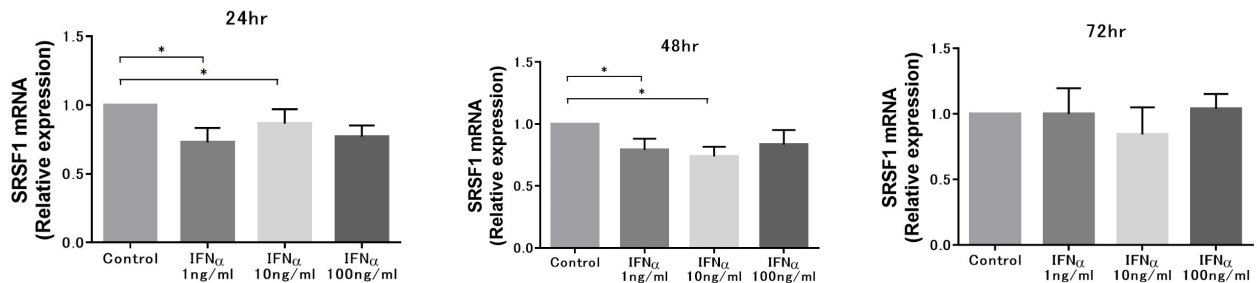


Figure 19. IFN α 刺激による Jurkat 細胞における SRSF1 mRNA 発現量の変化

IFN α 24, 48, 72 時間刺激後の SRSF1 mRNA 発現量 (n=3)。

データは平均±標準誤差で示した。*: p < 0.05, t-test.

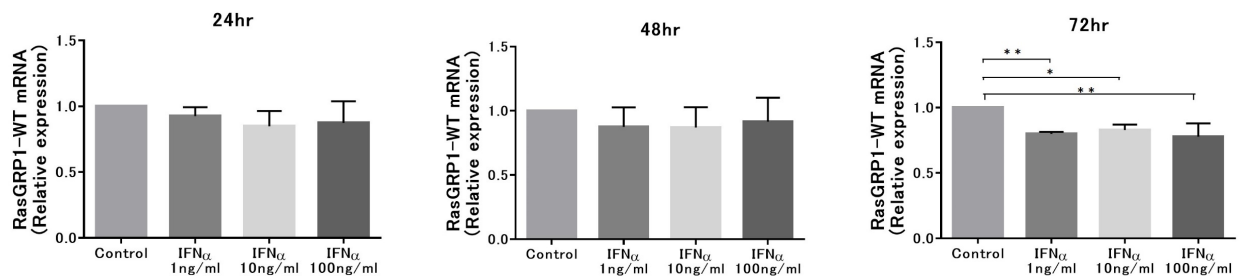


Figure 20. IFN α 刺激による Jurkat 細胞における RasGRP1-WT mRNA 発現量の変化
IFN α 24, 48, 72 時間刺激後の RasGRP1-WT mRNA 発現量 (n=3)。
データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。*: p < 0.05, t-test.

一方で IFN 刺激により SRSF1, RasGRP1 とともに蛋白発現量は大きく変化を認めなかった(Figure 21)。

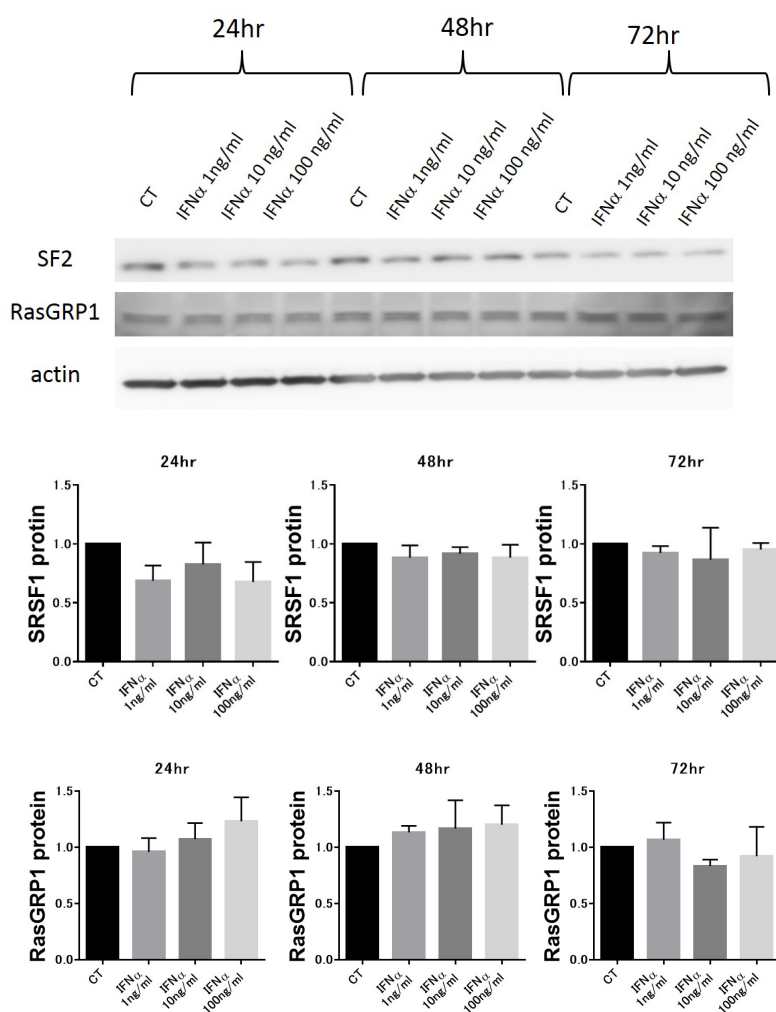


Figure 21. IFN α 刺激による Jurkat 細胞における SRSF1、RasGRP1-WT 蛋白発現量
IFN α 24, 48, 72 時間刺激後の SRSF1、蛋白発現量 (n=3)。ウエスタンブロットは3 実験のうち代表的なデータを示した。また3 回の実験における actin で標準化した SRSF1, RasGRP1 の band density の解析結果を示した。データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。

また TNF-および IL-6 の刺激では SRSF1, RasGRP1 とともに有意な mRNA 発現量の変化は認めなかった (Figure 22)。

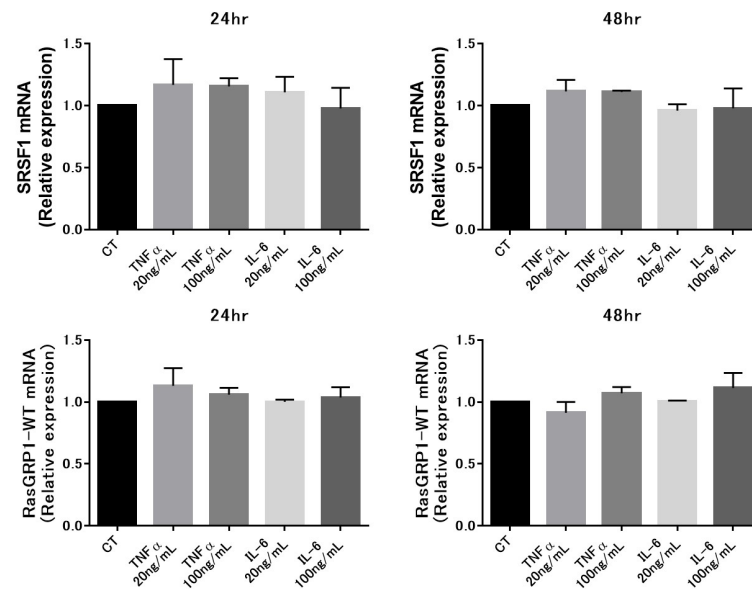


Figure 22. TNF- α , IL-6 刺激による Jurkat 細胞における mRNA 発現量の変化
TNF- α , IL-6 による 24, 48 時間刺激後の SRSF1, RasGRP1-WT mRNA 発現量 (n=3)。
データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。

4.8 Jurkat 細胞に対する T 細胞受容体刺激実験

4.8.1 方法

Jurkat 細胞を 1 well あたり 5×10^5 細胞用意し、抗ヒト CD3 抗体 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (BioXcell) 単独あるいは抗ヒト CD3 抗体 $2 \mu\text{g}/\text{nL}$ および抗ヒト CD28 抗体 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (BioLegend) を添加した RPMI メディウムで培養し、1, 3, 6 時間後に回収し、RasGRP1-WT、RasGRP1-AS, IL-2 の mRNA 発現量ならびに RasGRP1-AS/-WT 比を検討した。

4.8.2 結果

CD3 刺激および CD3+CD28 刺激いずれにおいても刺激初期から IL-2 の有意な発現亢進を認めた。RasGRP1 発現量については 3, 6 時間では RasGRP1-WT の有意な発現低下を認めた。RasGRP1-WT/-AS 比については刺激 3 時間後にやや増加を認めたが、6 時間時点では有意な変化は認めなかった (Figure 23)。

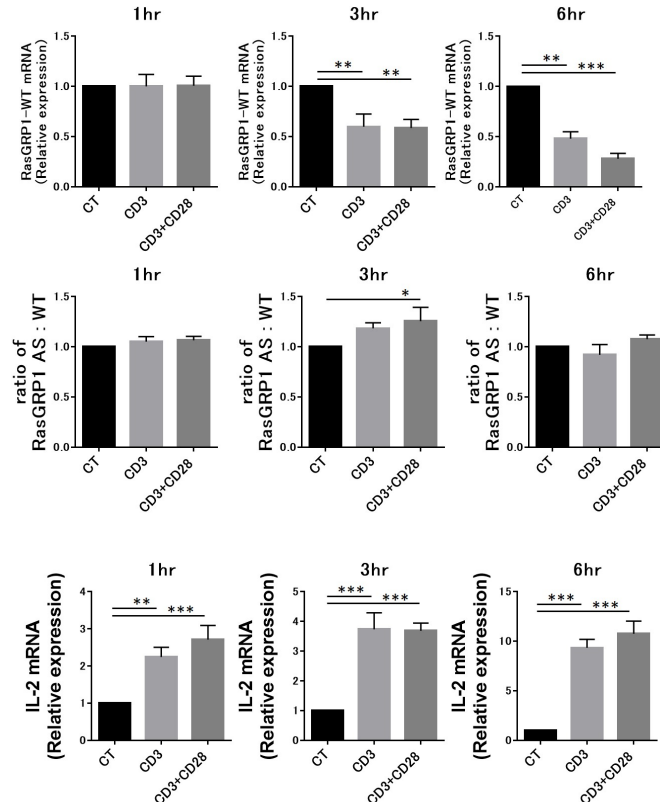


Figure 23. T 細胞受容体刺激による Jurkat 細胞における mRNA 発現量の解析

抗 CD3, CD28 抗体を用いた T 細胞受容体刺激時の RasGRP1-WT, IL-2 mRNA 発現量と RasGRP1-AS と-WT の発現量の比を解析した (n=3)。データは平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t-test.

4.8.3 考察

上記結果により TCR 刺激下では RasGRP1 mRNA の発現は誘導されず、むしろ IL-2 発現亢進に伴い発現が抑制されることを確認した。これは Th0, Th17 についてすでに報告されている既報(Yosef et al., 2013)においても同様の報告がなされており、過剰な Ras 経路の活性化による activation induced cell death を抑制する negative feedback の役割があると考えられた。このことから RasGRP1 のスプライシング異常の検討において、RasGRP1 の転写が抑制される TCR 刺激環境は好ましくないと考えられた。

4.9 Jurkat 細胞に対する ceramide 刺激実験

4.9.1 背景

ceramide はスフィンゴ脂質の合成・代謝における中心的脂質であり、生物学的には細胞死を含めた様々な細胞応答を制御するシグナル伝達分子として機能することが知られている。近年この ceramide が SRSF1 の脱リン酸化酵素である protein phosphatase 1 (PP1) の活性化に関与し、脱リン酸化 SRSF1 が増加することで splicing 異常を誘導することが報告された(Massiello and Chalfant, 2006)。T 細胞においても ceramide 刺激により CD3 ζ の 3'-UTR 領域のスプライシング異常が誘導され、CD3 ζ の発現が低下することが報告されている(Moulton and Tsokos, 2010)。

我々は Jurkat 細胞において、ceramide による SRSF1 の機能的な阻害を介して、RasGRP1 のスプライシング異常が誘導されるか実験を行うこととした (Figure 24)。

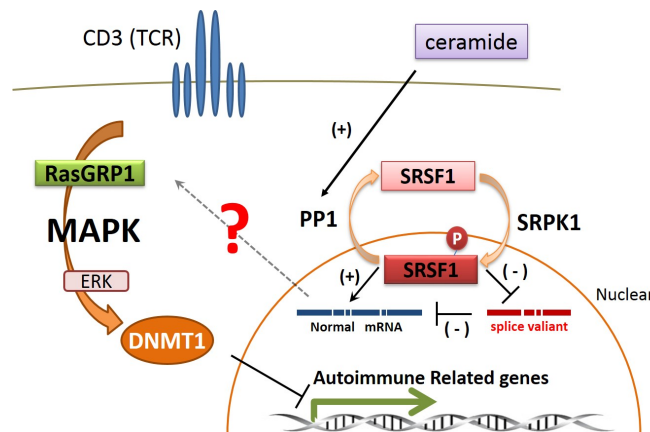


Figure 24. ceramide 刺激による PP1 の活性化と SRSF1 の脱リン酸化

ceramide は PP1 を活性化することで SRSF1 の脱リン酸化を起こし、SRSF1 の核内移行を抑制することで、SRSF1 によるスプライシング制御を阻害する。

4.9.2 方法

Jurkat 細胞 1×10^6 細胞を ceramide (20mM) を付加した RPMI メディウムで 24 時間培養し、細胞を回収し RasGRP1-WT, RasGRP1-AS の mRNA 発現量および RasGRP1-WT と RasGRP1-AS/-WT 発現量の比を SYBR Green による Realtime qPCR 法で解析した。

4.9.3 結果

ceramide 処理した Jurkat 細胞において RasGRP1-WT, RasGRP1-AS の発現量の有意な変化は認めず、また RasGRP1-WT と比較し RasGRP1-AS の相対的な増加も認めなかった (Figure 25)。

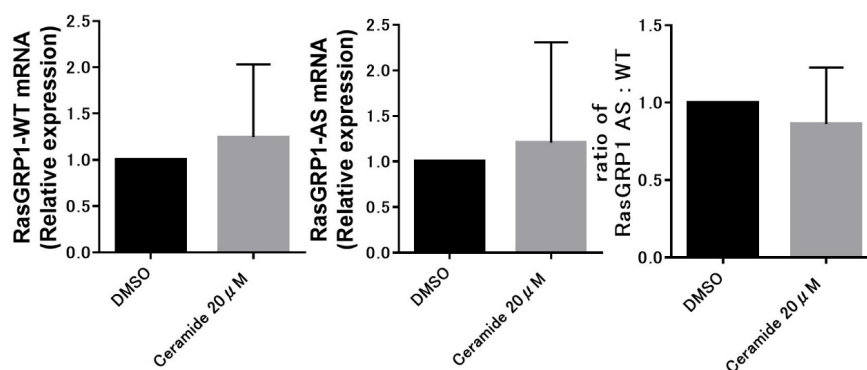


Figure 25. ceramide 刺激による Jurkat 細胞の RasGRP1 発現量の変化

ceramide による 24 時間刺激後の RasGRP-WT, RasGRP1-AS mRNA 発現量ならびに RasGRP1-AS/-WT 比 (n=3)。データは平均±標準誤差で示した。

Jurkat 細胞において ceramide 処理による SRSF1 脱リン酸化に伴う RasGRP1 スプライシング異常の誘導は確認できなかった。

4.10 Crispr/Cas9 system を用いた RasGRP1 ノックアウト cell line の作成

4.10.1 背景

Crispr/Cas9 とは元来真正細菌や古細菌などが持つ外来 DNA 排除機構である。これらの細菌ではウイルスやプラスミドなどの外来 DNA が侵入すると、Cas という蛋白が PAM 配列と呼ばれる宿主 DNA には含まれない特定の塩基配列を認識し、その上流数十塩基を切断し自らの CRISPR 領域に挿入する。これらがリピート配列とともに RNA として転写されそれぞれ切断されると、外来 DNA 配列に対応した成熟した crispR RNA(crRNA)となる。再度外来DNAが侵入した際に、Cas および crRNA と transactivating crispR-RNA の結合体が複合体を形成して速やかに外来 DNA 部位に移動し DNA を切断する。

近年この Crispr/Cas9 system を用いて標的ゲノムの編集が可能となった。先述の Cas9 蛋白と標的 DNA の相補鎖を有する短鎖ガイド RNA を任意の細胞にトランスフェクションすることで特定の配列を認識し、切断することができる (Figure 25)。

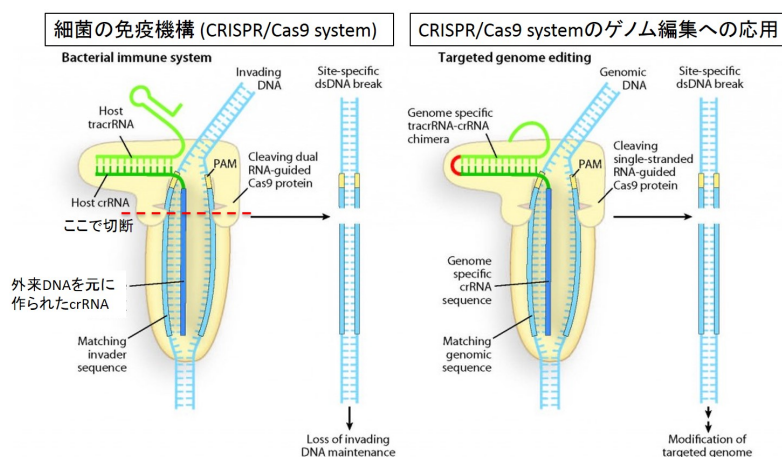


Figure 25. 細菌における Crispr/Cas system とゲノム編集のための Crispr/Cas9 system (文献 48 より改編)

一度切断された DNA が修復される際の非相同末端連結修復時の修復エラーを利用することで遺伝子のノックアウトが、相同組み換え修復を利用し任意の遺伝子配列を

指定することで遺伝子のノックインが可能となる (Mali et al., 2013)。

我々はこの Crispr/Cas9 system を利用し、SRSF1 ノックアウト Jurlat cell line を作成し、それを用いて RasGRP1 スプライシング異常の検討を行うこととした。

4.10.2 gRNA の設計

公共のデータベース CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) を用いて SRSF1 (RefSeq: NM_001078166) 内でオフターゲット効果が少ない PAM 配列 (5'-NGG-3')を含む配列を算出し、gRNA を 3 つ設計した (Table 5)

Table 5. SRSF1 に対する gRNA 設計

Ranking	Target sequence	Genomic location	Exon	Strand	GC (%)	Efficiency
1	CGGGTCCTCGAACTC AACGAAGG	chr17:58006946	1	+	61	0.74
2	CATGGCGGTGACGAA AAGCGCGG	chr17:58007135	1	+	65	0.72
3	CTCGAACTCAACGAA GGCGAAGG	chr17:58006952	1	+	57	0.72

4.10.3 ベクターの作成

指定した gRNA 配列およびその相補配列に BbsI 制限酵素サイトを付加したオリゴ配列を作成した(北海道システムサイエンス)。得られたオリゴ配列を T4 ligation buffer ならびに T4 PNK (Takara)を用いてアニーリングおよびリン酸化を行い、pCas9-2A(BB)-Puro buffer を BbsI (Thermo Fisher Scientific)で切断し、gRNA 配列を挿入した。得られたベクターを大腸菌コンピテントセル (JM 109)(Takara) に形質転換し培養し、生着したコロニーに対して下記プライマー (Table 8) を用いてコロニーPCR を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動 (Figure 26) した。

Table 8. コロニーPCR 用プライマー

目的のベクター	配列(5'>3')
gRNA 配列 1	Forward: 5'-TGGACTATCATATGCTTACC-3'
	Reverse: 5'- TCGAGTTGTCCACAG TCAGC -3'
gRNA 配列 2	Forward: 5'-TGGACTATCATATGCTTACC-3'
	Reverse: 5'- AAACCGCTTTTCGTCACCGCCATG -3'
gRNA 配列 3	Forward: 5'-TGGACTATCATATGCTTACC-3'
	Reverse: 5'- AAACTCGCCTTCGTTGAGTTCGAG -3'

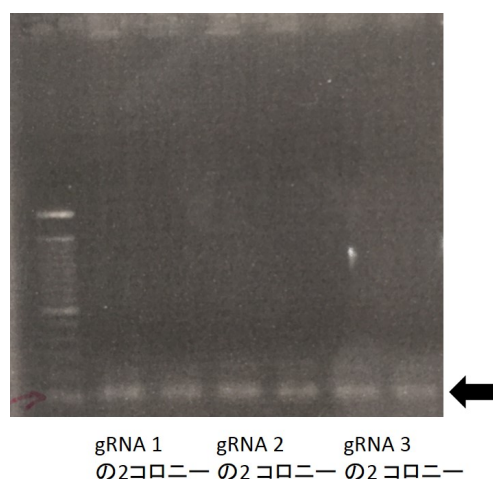


Figure 26. コロニーPCR の電気泳動

pCas9-2A(BB)-Puro に gRNA1,2,3 を挿入したベクターを形質転換したコロニーで施行したコロニーPCR の電気泳動結果を示す。目的の PCR 産物サイズ 100bp (図の黒矢印)

目的のバンドが得られたコロニーを液体培地でさらに培養し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドベクターの単離、精製を行った。完成したプラスミドベクターは、下記プライマー (Table 9) を用いてシーケンスを行い、いずれのベクターについても目的の gRNA が挿入されていることをそれぞれ確認した (Figure 27)。

Table 9. シーケンス用プライマー

シーケンス	Forward: 5'-TGGACTATCATATGCTTACC-3'
プライマー	Reverse: 5'-TTACGGTAAACTGCCCCACTT-3'

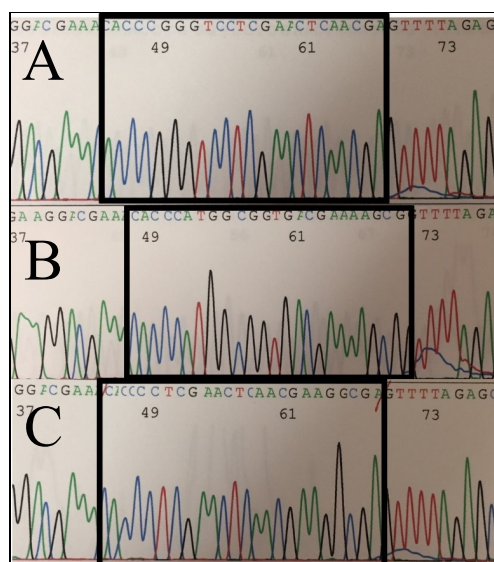


Figure 27. ベクターのシーケンス結果

SRSF1 に対する gRNA 1, 2, 3 を挿入したベクターの Forward プライマーを用いたシーケンス結果を示す。四角で囲んだ部位が挿入された gRNA 配列。

A: gRNA1 を挿入したベクター

B: gRNA2 を挿入したベクター

C: gRNA3 を挿入したベクター

4.10.4 方法

前項で得られたベクターを、先述と同様に Jurkat 細胞に Neon Transfection System を用いてエレクトロポレーション法によりトランスフェクションし、RPMI メディウムで 48 時間培養した後、Puromycin 1mg/mL (Thermo Fisher Scientific) 入りの RPMI メディウムで 5 日間培養した。Puromycin 濃度は、事前に Jurkat 細胞が 5 日程度で死滅する濃度を検討し、設定した。puromycin 選択後に、生存細胞をカウントし、1 well 当たり 0.5 細胞となるように限界希釈を行い、96 well plate で培養を行った。培養開始時に各 well を光学顕微鏡で確認し、細胞が 2 個以上含まれている well は除外した。

4.10.5 結果

上述する単細胞培養を繰り返し試みたが、すべての well において細胞の増殖は認めなかった。Jurkat 細胞における単細胞培養の既報はすでに存在することから(Liang et al., 2015)、選択時の puromycin 濃度の変更、選択期間の短縮などを行ったが、増殖は確認できなかった。

SRSF1 遺伝子変異株が増殖しない可能性や、puromycin 耐性ベクターの導入効率が不十分である点などが可能性として考えられた。

4.10.6 考察

Jurkat 細胞を用いた siRNA による一時的な SRSF1 ノックダウン系、ceramide を用いた SRSF1 の機能的な阻害を用いても、RasGRP1 のスプライシング異常の検討が困難であった。トランスフェクション効率や安定変異株での評価が必要という課題を解決するため SRSF1 ノックアウト cell line の作成を試みたが、単細胞培養に成功できなかった。

Jurkat 細胞は T 細胞の代表的な cell line として知られているものの、腫瘍細胞であり特に増殖能などに関与する Ras 系に関しては T 細胞とは活性・制御は異なる可能性が考えられ、ヒト T 細胞を用いて SRSF1 のノックダウン実験を行い RasGRP1 について検討することが望ましいと考えられた。

4.11 ヒト T 細胞を用いた SRSF1、RasGRP1 exon11 の結合解析

4.11.1 背景

先述のデータベースより SRSF1 蛋白と RasGRP1-exon11 RNA との結合が予測された。SRSF1 は SR ドメインがリン酸化され核内移行することで RNA 結合蛋白として機能するため、SRSF1 を含むヒト T 細胞の核蛋白を用いて結合解析を行うこととした。

4.11.2 方法

4.11.2.1 T 細胞における核内蛋白質の抽出

健康人から全血採血を行い先述の通り negative selection により CD3 陽性 T 細胞を抽出した。5x10⁶ 個の T 細胞を Buffer A (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA) で溶解し 15 分氷上で冷却した後、Nonidet P-40 (Panreac Applichem) 25ml を加えて、10 秒 vortex し、13200rpm で 1 分間遠心した。上清を細胞質蛋白として回収し、ペレットを Buffer A で洗浄した。その後 50 μ l の Buffer C (20mM Hepes, pH 7.9, 0.4mM NaCl, 1mM EDTA)を加え、rotator で 4°C、15 分間攪拌し、遠心後に上清を核蛋白として回収した。

4.11.2.2 oligonucleotide の設計

先述した SRSF1 との結合が予測される RasGRP-exon11 配列のうち、最も強く結合される部位に 3'末端に biotin を標識した oligonucleotide を設計した (北海道システムサイエンス)(Figure 28)。

RasGRP1-exon11 mRNA	
5'- CCACUAACAC CUUCAAGCC ²⁰ ACCAGUAGUA	2.72
GUGGACUGGG CUUCUGGAGU GUCUCCCAAACCUGAUCCAA	
AAACCAUUAG CA ⁸³ AACACGUC ⁹¹ CAGAGGAUGG UGGAU -3'	3.73 5.74

Figure 28. RasGRP1-exon11 RNA 配列と SRSF1 結合予測部位

RasGRP1-exon 11 RNA の全配列を 5'から 3'へ記載した。SRSF1 との結合予測配列を下線で示し、その下に binding score を示した。配列上の数字は 5'末端からの position を示す。黒字の配列を結合実験に用いる RasGRP1-exon11 RNA の oligonucleotide とした。

コントロールとしてランダム配列で同様に 3'末端に biotin を標識した oligonucleotide を設計した (北海道システムサイエンス)。各配列を Table 6 に示した。

Table 6. oligonucleotide の配列

RNA	配列
Control RNA	AAGAUGUCA AUGUCACUGUCUGAAC
RasGRP1-exon11 RNA	AACACGUCCAGAGGAUGGU

4.11.2.3 Oligonucleotide pulldown Assay

Dynabeads-M280 (Invitrogen) 30 µl を Hepes-buffered saline (HBS-P) wash buffer (0.01 M Hepes buffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Surfactant P-20, and 5 mM MgCl₂) (Biacore) で 3 回洗浄した後、binding buffer (wash buffer, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 2mM 4-(2-aminoethyl)) 100µl および 60 pmol のビオチン標識 oligonucleotide、dithiothreitol (1mM), protease inhibitor cocktails (Roche) を加え 30 分間室温で静置し、ビーズと oligonucleotide を結合させた。oligonucleotide の結合したビーズを magnetic particle separator (Pure-Biotech)を用いて分離し、そこに 100 µg のヒト T 細胞より抽出した核内蛋白質を binding buffer で希釈し、16 units の RNasin (Promega)を加えて 15 分間培養した。Oligonucleotide と蛋白を結合したビーズを magnetic particle separator で分離し、binding buffer で洗

返し洗浄し非結合蛋白を取り除き、oligonucleotide-蛋白複合体を 20 μ l の LDS sample buffer を加え加熱し (95°C、5 分)、溶出させた。得られた oligonucleotide-蛋白複合体をウエスタンブロット法で抗ヒト SRSF1 抗体 (Invitrogen)を用いて検出した。oligonucleotide pulldown assay の概要を Figure 29 に示す。

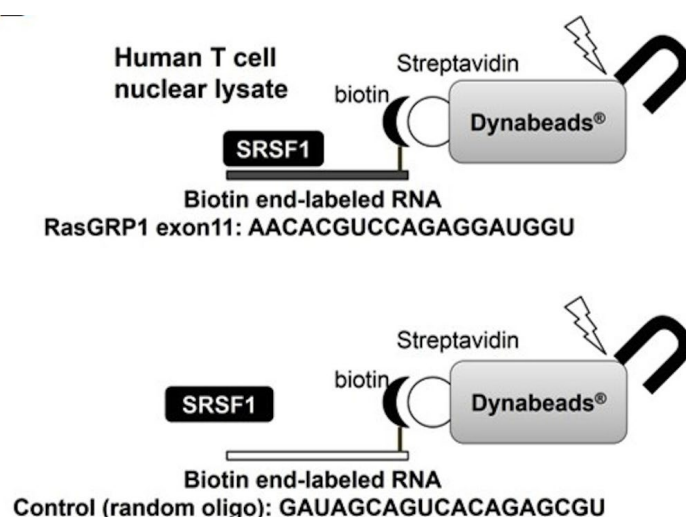


Figure 29. Oligonucleotide pulldown assay の方法

ビオチン標識した RasGRP1-exon11 RNA もしくはランダム配列の control RNA をストレプトアビジン付 Dynabeads と結合させ、oligo-beads complex に SRSF1 を含むヒト T 細胞より抽出した核蛋白を加え、非結合蛋白を洗浄する。得られた oligo-protein-beads complex から oligo-protein complex を熱変性により溶出させ、ウエスタンブロット法により SRSF1 の結合の有無を確認する。

4.11.3 結果

control RNA を用いて溶出した蛋白では SRSF1 が検出されないのに対して、RasGRP1-exon11 RNA を用いて溶出した蛋白において SRSF1 が強く検出された(Figure 30A)。band density の解析において、RasGRP1-exon11 群の方が有意に、SRSF1 蛋白を強く検出した (Fig 30B)。以上により RasGRP1-exon 11 RNA と SRSF1 蛋白との結合が示唆された。

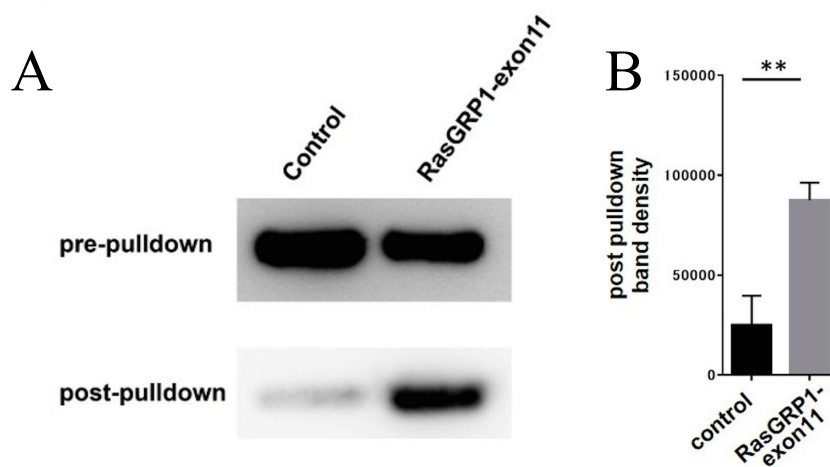


Figure 30. Oligonucleotide pulldown assay

A. コントロール RNA および RasGRP1-exon11 RNA を用いて行った pulldown 前後の蛋白における SRSF1 蛋白量をウエスタンブロットにより解析した。3 回施行した実験の代表データを示す。B. pulldown 後の SRSF1 の band density を control 群と RasGRP1-exon11 RNA 群で比較した (n=3)。データは平均±標準偏差で示した。**: p<0.01, t-test

4.12 健常人 T 細胞における ceramide 刺激実験

4.12.1 方法

先述の実験で Jurkat 細胞において施行した ceramide 刺激をヒト T 細胞において検討することとした。健常人から全血採血を行い前述と同様の方法で negative selection により CD3 陽性 T 細胞を分離した。1x10⁶ 個の細胞を、ceramide (20mM, 30mM, 40mM) 添加した PRMI で 24 時間培養した後、細胞を回収し RNA を抽出した後、逆転写反応で cDNA を合成した。

得られた cDNA を用いて、RasGRP1 のスプライシング異常が増加するか、conventional PCR と電気泳動、ならびに SYBR Green 法による Realtime qPCR により解析した。conventional PCR に用いる RasGRP1 のプライマーは RasGRP1-WT および RasGRP1-AS を同時に検出するものと RasGRP1-AS を特異的に検出するプライマーを設計した (Table 7)。

Table 7. conventional PCR に使用したプライマー

目的分子	配列(5'>3')	プライマー位置	Product length
RasGRP1-WT, -AS	F: TGGGTGTGCATCTCAAGGAC	exon 9	WT 676
	R: TGACAGTTCATCCCGCAGTC	exon 14	AS 571
RasGRP1-AS	F: CCACAGAGCTCCATCTGTCTT	exon 10-12	341
	R: TCTGTGGGAGCTACTGGGTT	exon 14	
CD3 zeta	F: CAGCCAGGGGATTTCACCACTCAAAG	3'-UTR	WT 876
	R: CCCTAGTACATTGACGGGTTTTTCCTG	3'-UTR	AS 315
GAPDH	F: TGGACTATCATATGCTTACC	exon1	416
	R: AAACTCGCCTTCGTTGAGTTCGAG -	exon2	

また同時に ceramide ですでにバリエーションが増加することが報告されている CD3ζ についても ceramide 刺激検体の positive control として確認することとした。プライマーの確認のため、SLE 患者 T 細胞、健常人 T 細胞および Jurkat 細胞から得られた cDNA を

用いて、conventional PCR、電気泳動を行い RasGRP1 のスプライシング異常が検出できることを予め確認した (Figure 31)。

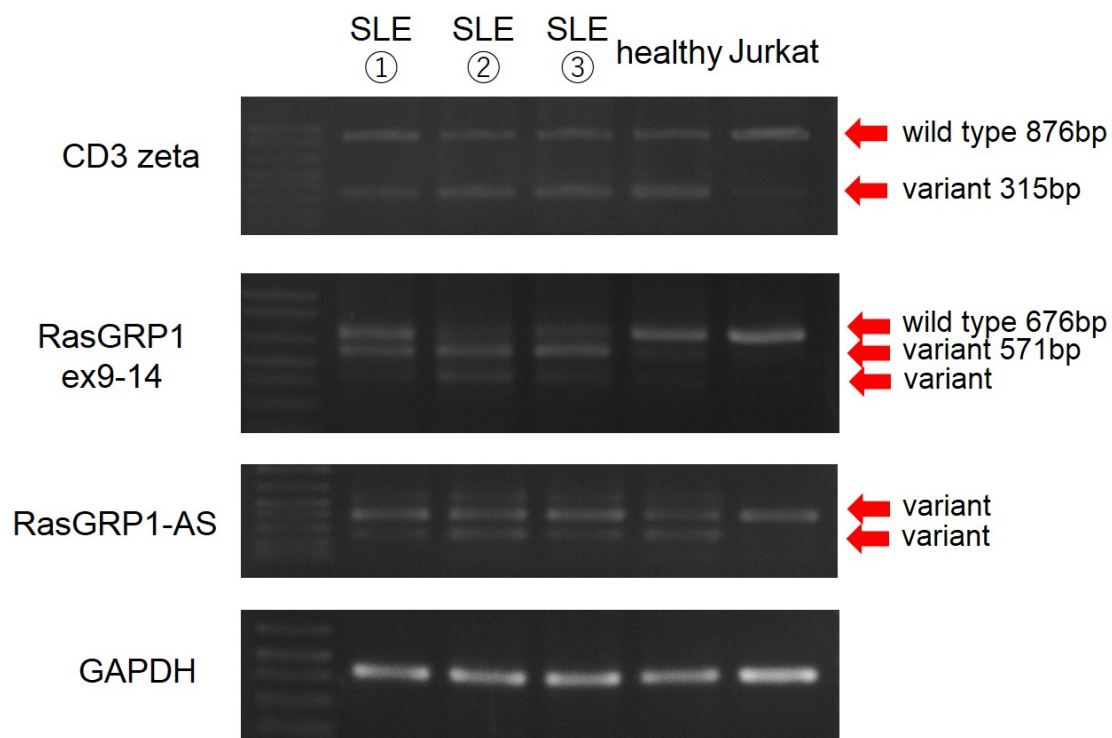


Figure 31. T 細胞における conventional PCR および電気泳動結果

3名のSLE患者、健常人T細胞ならびにJurkat細胞におけるRasGRP1, CD3 zeta, GAPDHのmRNA発現をconventional PCRおよび電気泳動により検出した。SLE患者においてCD3 ζ , RasGRP1ともにバリエーション発現が亢進していることを確認した。

4.12.2 結果

ceramide 刺激 (30mM)を行った T 細胞において、CD3 ζ のバリエーション(CD3 zeta-AS)が増加することを確認したが、RasGRP1 については conventional PCR および電気泳動では RasGRP1-AS の増加は確認できなかった (Figure 32)。

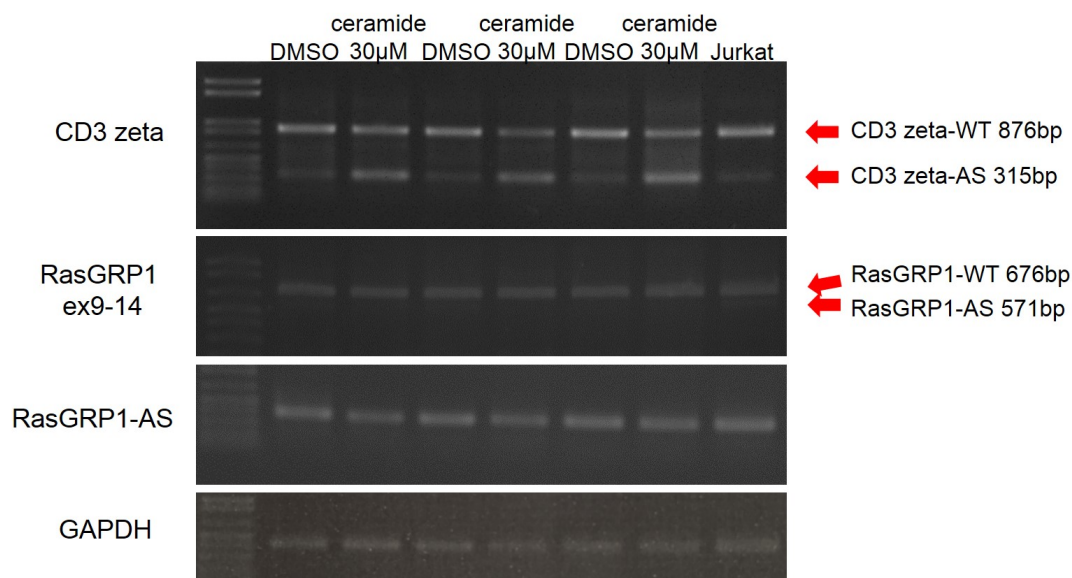


Figure 32. ceramide 刺激を行った T 細胞における RasGRP1 mRNA 発現の conventional PCR および電気泳動による解析

ceramide 刺激から 24 時間後の T 細胞の cDNA を用いて、CD3 ζ , RasGRP1 exon9-14, RasGRP1-AS, GAPDH をそれぞれのプライマーで PCR を行い、PCR 産物を電気泳動により検出した。

Realtime qPCR において ceramide 30mM 刺激では RasGRP1-WT, -AS とともに発現が増加する傾向があり、ceramide 40mM 刺激ではやや RasGRP-AS/-WT 比が増加する傾向を認めたが、検体間での差が大きく RasGRP1 のスプライシングへの影響を判断することが困難であった (Figure 33)。

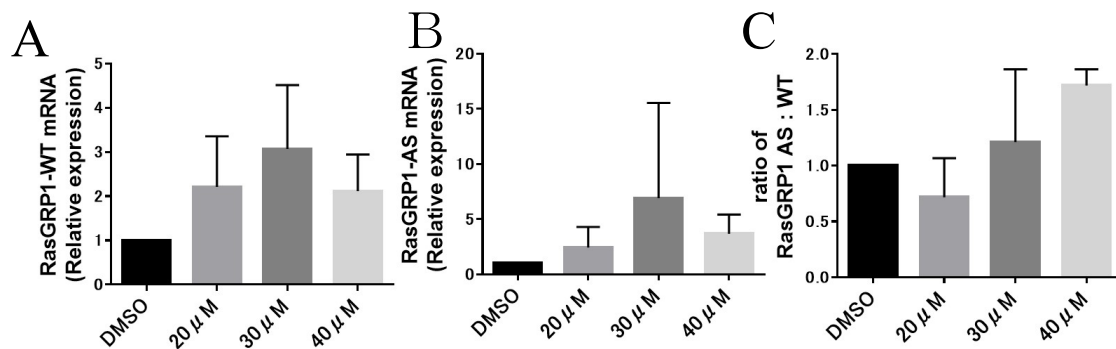


Figure 33. ceramide 刺激を行った健常人 T 細胞における mRNA 発現量の Realtime qPCR による解析

A. RasGRP1-WT 発現量、B. RasGRP1-AS 発現量、C. RasGRP1-AS/-WT の比
データは平均±標準偏差で示した

4.13 健常人 T 細胞における SRSF1 ノックダウン実験

4.13.1 方法

健常人から採取した 20ml 全血より、先述の方法で T 細胞を抽出した。1 Reaction 当たり 5×10^6 細胞の T 細胞に Nucleofector 100 μ L, siRNA を添加し、Amaza Nucleofectoer System (Lonza)を用いて、U-014 プログラムでトランスフェクションを行った。Jurkat を用いた実験において、使用する siRNA に本実験に影響を与えるオフターゲット効果がないことを確認したため、siRNA についてはコントロール群 (siControl)ではコントロール siRNA (終濃度 60 pmol/L)を添加し、SRSF1 ノックダウン群 (siSRSF1)では、先述の 2 種類の SRSF1 特異的 siRNA 両者を混合して添加した (それぞれ終濃度 30 pmol/L)。トランスフェクション施行後 10% FBS 入り RPMI メディウムを用いて 12 well plate で 24 から 48 時間培養した。24 時間後の SRSF1、RasGRP1-WT、RasGRP1-AS、Cyclophilin A の mRNA 発現量を SYBER Green 法による Realtime qPCR で、48 時間後の蛋白発現量をウエスタンブロットにより解析した。Realtime qPCR には下記のプライマーを用いた (Table 8)。

Table 8. プライマー配列

標的分子	配列(5'>3')
Cyclophilin A	Forword: 5'-TTCATCTGCACTGCCAAGAC-3'
	Reverse: 5'-TCGAGTTGTCCACAG TCAGC-3'
RasGRP1-WT	Forword: 5'-GGACTGGGCTTCTGGAGTGT-3'
	Reverse: 5'-CCACCATCCTCTGGACGTGT-3'
RasGRP1-AS	Forword: 5'-CCCACCCTTGGAGGCTAACA-3'
	Reverse: 5'-GTTCTTGAAGACAGATGGAGCTCTG-3'
SRSF1	Forword: 5'- TCTCTGGACTGCCTCCAAGT -3'
	Reverse: 5'- GGCTTCTGCTACGACTACGG -3'

4.13.2 結果

健康人 T 細胞において SRSF1 ノックダウンにより RasGRP1-WT の発現量は有意に低下し、同時に RasGRP1-AS/-WT の上昇を認めた(Figure 33)。

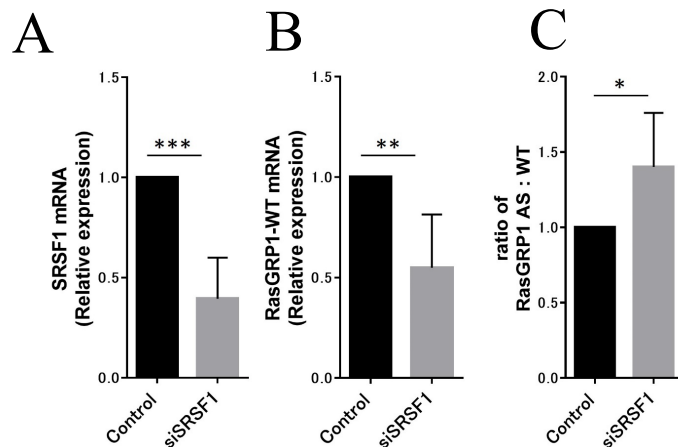


Figure 33. SRSF1 ノックダウン T 細胞における mRNA 発現量の解析

A: SRSF1 mRNA 発現量

B: RasGRP1-WT mRNA 発現量

C: RasGRP1-AS/-WT 比

データは平均±標準偏差で示した (n=6)。*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, t-test

蛋白発現量においても SRSF1 ノックダウン T 細胞において RasGRP1 蛋白発現量は低下した (Figure 34)。

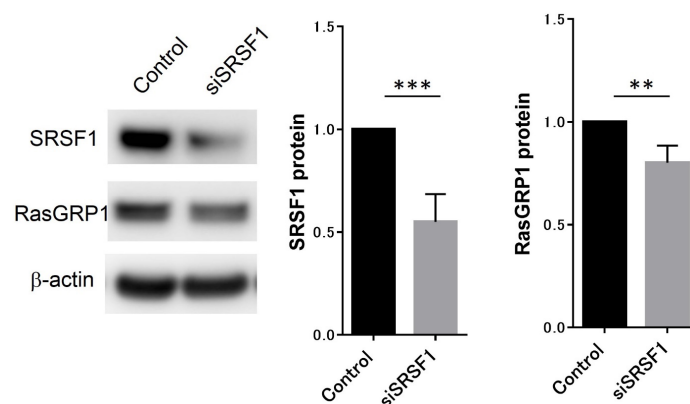


Figure 34. SRSF1 ノックダウン T 細胞における蛋白発現量の解析

SRSF1, RasGRP1 のウエスタンブロットならびに SRSF1, RasGRP1 蛋白についてβ-actin

により標準化した band density 解析結果を示す。データは平均±標準偏差で示した (n=6)。 **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, t-test

4.14 SLE 患者 T 細胞における SRSF1 強制発現実験

4.14.1 方法

健康人から採取した 20ml 全血より、先述の方法で T 細胞を抽出した。1 Reaction 当たり 5×10^6 細胞の T 細胞に Nucleofector $100 \mu\text{L}$ および $2.5 \mu\text{g}$ の pcDNA3.1 empty ベクター (pcDNA) あるいは SRSF1 expression ベクター (pc SRSF1) を加え、Amaxa Nucleofector System (Lonza) を用いて、U-014 プログラムで transfection を行った。なお pcDNA, pcSRSF1 ベクターは VR. Moulton から供与を受けた。トランスフェクション施行後 10% FBS 入り RPMI メディウムを用いて 12 well plate で 24 から 48 時間培養した。24 時間後の SRSF1、RasGRP1-WT、RasGRP1-AS、CyclophilinA の mRNA 発現量を SYBER Green 法による Realtime qPCR で、48 時間後の蛋白発現量をウェスタンブロットにより解析した。

4.14.2 結果

SLE 患者 T 細胞における SRSF1 の強制発現により RasGRP1-WT mRNA 発現量は増加し、RasGRP1-AS/-WT 比は低下した (Figure 35)。

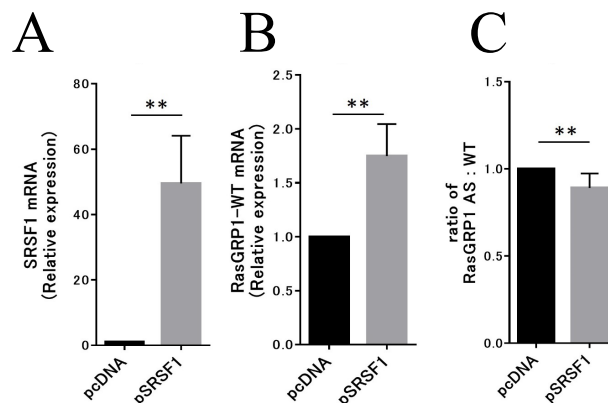


Figure 35. SRSF1 強制発現 T 細胞における mRNA 発現量の解析

A: SRSF1 mRNA 発現量

B: RasGRP1-WT mRNA 発現量

C: RasGRP1-AS/-WT 比

データは平均±標準偏差で示した (n=5)。 **: p<0.01, t-test

蛋白レベルでも SRSF1 強制発現により RasGRP1 蛋白発現量は増加した (Figure 36)。

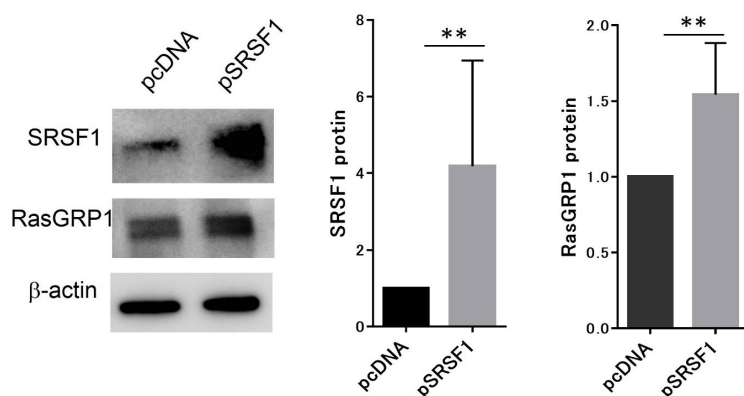


Figure 36. SRSF1 強制発現 T 細胞における蛋白発現量の解析

SRSF1, RasGRP1 のウエスタンブロットならびに SRSF1, RasGRP1 蛋白についてβ-actinにより標準化した band density 解析結果を示す。データは平均±標準偏差で示した (n=5)。 **: p<0.01, t-test

4.15 健常人/SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 強制発現実験

4.15.1 背景

前述の通り T 細胞では RasGRP1 を介した Ras-MAPK 経路の活性化により IL-2, DNMT1 の発現を制御していることが知られている。RasGRP1-WT の発現を増加させることで SLE 患者における IL-2、DNMT1 産生が回復するかどうかを確認することとした。

4.15.2 方法

5 名の健常人および 5 名の SLE 患者 T 細胞を抽出し、1 Reaction 当たり 5×10^6 細胞の T 細胞に Nucleofector 100 μ L および 2.5 μ g の pcDNA3.1 empty ベクター (pcDNA) あるいは RasGRP1-WT expression ベクター (pcRasGRP1-WT) を加え、Amaxa Nucleofector System (Lonza) を用いて、U-014 プログラムで transfection を行った。なお pcRasGRP1-WT ベクターは当研究室からの既報(Yasuda et al., 2007)で作成したものを使用した。トランスフェクション施行後 10% FBS 入り RPMI メディウムを用いて 12 well plate で 45 時間培養した。45 時間後に抗ヒト CD3 抗体 (2 μ g/mL)、抗ヒト CD28 抗体 (2 μ g/mL) を事前にコーティングした 48 well plate で 3 時間培養し、細胞を回収した。IL-2, DNMT1 の mRNA 発現量を SYBER Green 法による Realtime qPCR で、48 時間後の蛋白発現量をウエスタンブロットにより解析した。PCR には下記のプライマーを用いた (Table 9)。

Table 9. プライマー配列

標的分子	配列(5'>3')
Cyclophilin A	Forword: 5'-TTCATCTGCACTGCCAAGAC-3'
	Reverse: 5'-TCGAGTTGTCCACAG TCAGC-3'
IL-2	Forword: 5'- CTCAAACCTCTGGAGGAAGTGC -3'
	Reverse: 5'- TCAAGTCAGTGTTGAGATGATGCT -3'
DNMT1	Forword: 5'- CCCATCCTCAGGGACCACAT -3'
	Reverse: 5'- GGAGGACCCACCTTCCACG -3'

4.15.3 結果

健常人の T 細胞において RasGRP1-WT の強制発現群では CD3, CD28 刺激によりコントロール群と比較して有意に IL-2 発現亢進を認めるが DNMT1 発現量は変化しなかった。一方で SLE 患者 T 細胞において RasGRP1-WT の強制発現群ではコントロール群と比較し IL-2, DNMT1 ともに有意に発現が亢進した (Figure 37)。

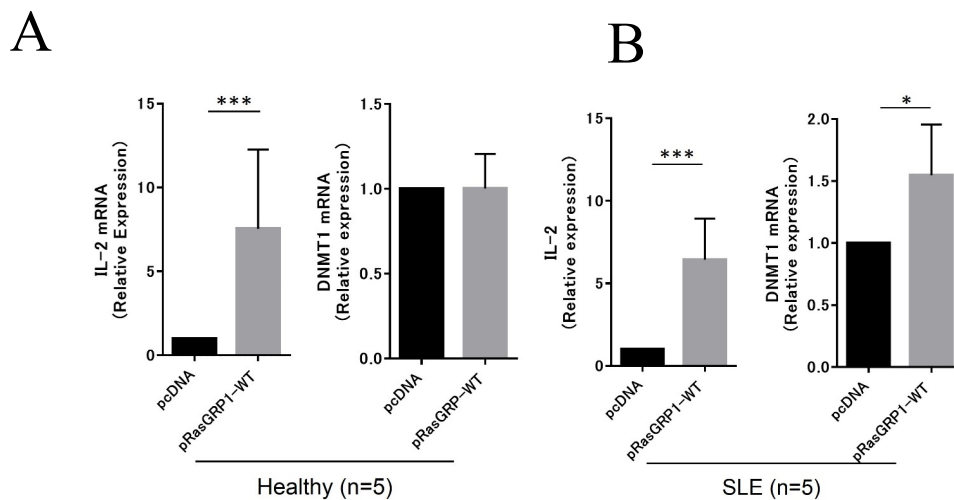


Figure 37. 健常人/SLE 患者 T 細胞における RasGRP1-WT 強制発現による T 細胞受容体刺激に対する反応

A. 健常人 T 細胞 (n=5) における RasGRP1-WT 強制発現群とコントロール群の比較
 B. SLE 患者 T 細胞 (n=5) における RasGRP1-WT 強制発現群とコントロール群の比較。
 データは平均±標準偏差で示した。*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$. t-test.

4.16 RasGRP1-AS の機能解析

4.16.1 方法

T 細胞における RasGRP1-WT と RasGRP1-AS の機能の差異を検討するため、健常人の T 細胞に pcDNA の empty vector および RasGRP1-WT、RasGRP1-AS の発現ベクターをそれぞれ強制発現し、CD3, CD28 刺激下での IL-2 の発現量を比較検討した。健常人の全血 20ml より T 細胞を抽出し、3 群に分け、 1×10^6 細胞当たり $0.5 \mu\text{g}$ のベクターと Nucleofector 100 μl (Lonza) を加え Amaxa Transfection System の U-016 プログラムによりエレクトロポレーション方によりトランスフェクションを行った。トランスフェクション後速やかに細胞を回収し 10% FBS 入り RPMI で培養した。トランスフェクションから 45 時間後に細胞を回収し、抗ヒト CD3 抗体(2mg/mL)、抗ヒト CD28 抗体(2mg/mL)を予めコーティングした well で刺激を行った。刺激 3 時間後に細胞を回収し、先述の方法で mRNA 発現量を解析した。

4.16.2 結果

RasGRP1-WT, -AS を強制発現した T 細胞はいずれもコントロール群と比較して有意に IL-2 産生の亢進をみとめた。また RasGRP1-AS を強制発現した T 細胞では RasGRP1-WT を強制発現した T 細胞と比較し有意差は認めないものの、IL-2 発現が亢進する傾向を認めた (Figure 38)。

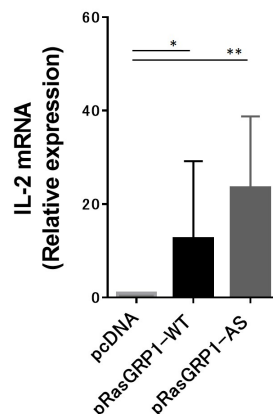


Figure 38. RasGRP1-WT, -AS 強制発現 T 細胞における CD3, CD28 刺激下での IL-2 発現量の検討

健常人 T 細胞に対して RasGRP1-WT, -AS 発現ベクターおよび empty ベクターをそれぞれトランスフェクションし、45 時間後に CD3, CD28 刺激を行い、3 時間後の mRNA 発現量を解析した。データは平均±標準偏差で示した。*: $p<0.05$, **: $p<0.01$. t-test

4.16.3 考察

本実験において RasGRP1-AS 強制発現においても IL-2 の発現亢進を認めたことから、RasGRP1-AS においても Ras/MAPK 活性化機能があると考えられた。しかし本実験では、RasGRP1-WT を元々発現する細胞を使用していることから、RasGRP1-AS 単独での機能の解析は困難と考えられる。そのため今後は RasGRP1 ノックアウトセルラインに対する RasGRP1-AS の強制発現実験を検討する必要がある。

4.17 SRSF1 蛋白によるクロマチン免疫沈降

4.17.1 背景

前述の通り T 細胞における SRSF1 のノックダウンで RasGRP1-AS が相対的に増加し RasGRP1-WT 発現が低下し、SRSF1 強制発現により RasGRP1-AS が相対的に低下し RasGRP1-WT 発現が亢進した。そこで SRSF1 がスプライシング異常の制御だけではなく、直接 RasGRP1 のプロモーター領域に関与することで発現制御を行っている可能性を検討するため SRSF1 によるクロマチン免疫沈降を施行し RasGRP1 プロモーター領域との結合を確認することとした。

4.17.2 方法

Jurkat 細胞に前述の方法で Flag タグ付き SRSF1 発現ベクターを強制発現し 24 時間後に細胞を回収した。クロマチン免疫沈降は Thermo Fisher Scientific 社の Chromatin Immunoprecipitation Assay kit を用いて、抗ヒト SRSF1 抗体 (Invitrogen)、抗 FLAG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) および positive control として抗ヒストン抗体、negative control としてヒト IgG 抗体を用い、プロトコール通り施行した。

RasGRP1 の promoter として既報(Zhang et al., 2018b)として報告されている配列 (RasGRP1 promoter 1 とする) および公共のデータベース Eukaryotic Promoter Database (<https://epd.vital-it.ch/index.php>)で予測された配列 (RasGRP1 promoter 2 とする) を検討することとしプライマーを設計した。さらに RasGRP1 intron 1 を標的とするプライマーをコントロールプライマーとして設計した (Table 10)。

Table 10. クロマチン免疫沈降に使用したプライマー配列

標的分子	配列(5'>3')
RasGRP1 promoter 1	Forward: 5'- CATCAGCGTGTCTCAGGTGGTT -3'
	Reverse: 5'- GCACCGCAGGCACAAACTT -3'
RasGRP1 promoter 2	Forward: 5'- CATCCTCAGACATCCGCCAA -3'
	Reverse: 5'- CTCACCTCACTGGGTCTAAGGC -3'
RasGRP1 intron	Forward: 5'- AGTCTTGCCTCTGCCATTCC -3'
	Reverse: 5'- TCAGGGTTGCAACTAGTGCTC -3'

抗ヒストン抗体でクロマチン免疫沈降したDNAに対して RLP 30 gene を positive control として PCR を行った。

PCR の定量法として SYBR Green の Realtime PCR を行い下記式により % input を測定した。

$$\% \text{ Input} = 2\% \times 2^{(\text{Ct } 2\% \text{ input sample} - \text{Ct IP sample})}$$

4.17.3 結果

FLAG 付き SRSF1 を強制発現した Jurkat 細胞に対して、抗ヒストン抗体でクロマチン免疫沈降を施行した検体においては、RPL 30 発現 % input 0.5 以上が得られていたが、FLAG 抗体ならびに SRSF1 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を施行した検体では、RasGRP1 promoter1, 2 および RasGRP1 intron いずれにおいても、PCR での検出はできなかった。本実験系において SRSF1 と RasGRP1 promoter の関与は示されなかった。

4.18 T 細胞における SRSF1 発現制御に関する検討

4.18.1 背景

上述の実験において、われわれは T 細胞において SRSF1 が RasGRP1 のスプライシング異常を制御しており、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た発現低下により IL-2 産生低下、DNMT1 発現低下をきたすことを示した。

SLE 患者 T 細胞において SRSF1 発現が低下する要因として、SLE 患者 T 細胞において SRSF1 の ubiquitination の亢進が関与している可能性が示唆されているものの (Moulton et al., 2014)、その発現制御方法については不明な点が多い。

一方で一部の腫瘍細胞において、SRSF1 の発現制御を行う分子が明らかになっている。近年腎細胞癌細胞において RNA 結合蛋白である Sam68 (Src-associated in mitosis, 68 kDa) が SRSF1 の発現を制御していることが報告された (Zhang et al., 2009)。また同様に腎細胞癌細胞において miR-10 が SRSF1 の転写後制御にかかわっていると報告された (Chen et al., 2017)。

そこで私は SLE 患者 T 細胞における Sam68 や miR-10 の発現量を解析することとした。

4.18.2 方法

健常人 7 名および SLE 患者 14 名から T 細胞を前述の方法で抽出した。RNeasy mini kit, miRNeasy Mini kit および RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を利用してプロトコール通り small RNA および large RNA をそれぞれ別々に抽出した。large RNA は SuperScript VILO (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応により cDNA を合成し Sam68 発現量を SYBER Green 法による Realtime qPCR を施行した。

small RNA は house keeping genes として RNU48 および標的 miRNA として miR10-a, b 特異的なプライマーを用いて逆転写を行い、得られた cDNA に対して Taqman MGB Probe による Realtime qPCR 法で発現量を解析した。

4.18.3 結果

健康人、SLE 患者 T 細胞いずれにおいても Sam68 の発現は確認できなかった。一方 miR-10a, 10b 発現については健康人と SLE 患者において発現量に有意な差は認めなかった (Figure 39, 40)。

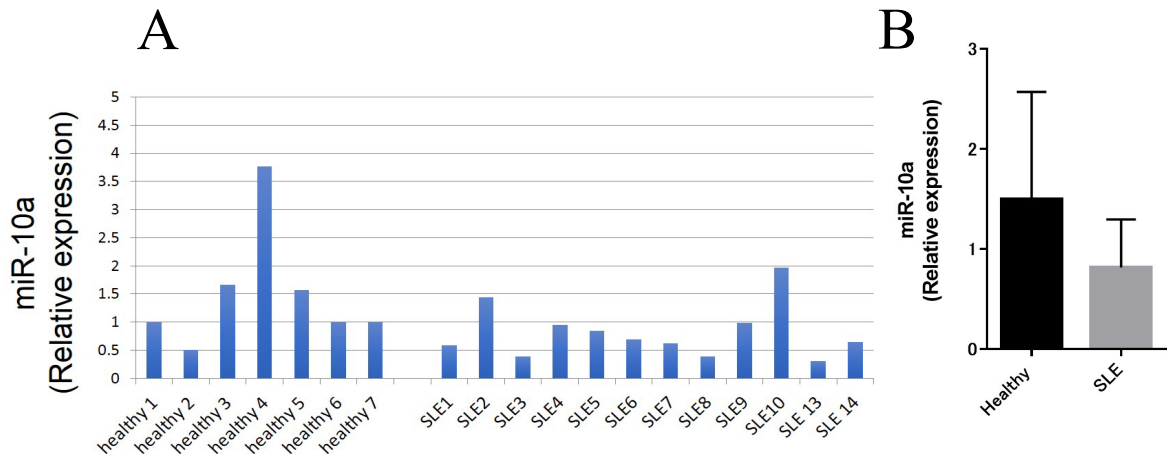


Figure 39. 健康人および SLE 患者 T 細胞における miR-10a 発現量の解析

A. 各健康人、SLE 患者 T 細胞における miR-10a 発現量

B. 健康群および SLE 患者群における miR-10a 発現量の解析、データは平均±標準偏差で示した。

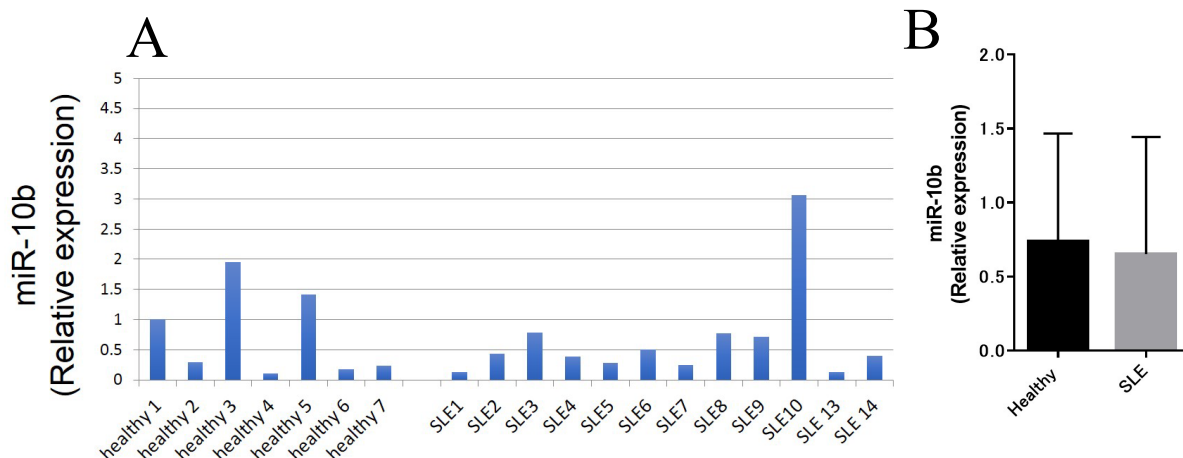


Figure 40. 健康人および SLE 患者 T 細胞における miR-10b 発現量の解析

A. 各健康人、SLE 患者 T 細胞における miR-10b 発現量

B. 健康群および SLE 患者群における miR-10b 発現量の解析、データは平均±標準偏差で示した。

4.19 全身性エリテマトーデス患者における *RASGRP1* single nucleotide polymorphisms の解析

4.19.1 背景

ヒトゲノムプロジェクトが 2003 年に完了して以降、個人の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNPs) を SNP アレイなどの新たなテクノロジーによってゲノム規模で調べられるようになった。そこで疾患に共通する SNPs などの遺伝子変異を全ゲノム領域にわたって関連解析するゲノムワイド関連解析 (Genome-Wide Association Study : GWAS) が様々な疾患に対して施行され、すでに、多くの疾患において疾患感受性遺伝子が同定されている。

SLE ではアジア人の 10000 人を超える患者を対象として行われた GWAS により *RASGRP1* 遺伝子の SNP である rs12900339-G が疾患感受性アレルとして同定された (Maecker et al., 2012)。また *RASGRP1* 遺伝子については、アジア人ループス腎炎を対象とした GWAS により、有意差は得られていないものの rs7170151 と疾患発症との関連が示唆されている (Zhou et al., 2016)。また自己免疫疾患との関連では rs8032939 は関節リウマチと rs8043085 は 1 型糖尿病との関連が報告されている (the NHGRI-EBI GWAS Catalog: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>)。

一方で SLE 患者にはその重症度や臓器障害など多彩な臨床症状を呈するにも関わらず、個々の SNP がどのような臨床的特徴と相関するについての報告は極めて少ない。そこで我々は日本人 SLE 患者において上述する 4 つの SNP が SLE の発症と関連するか、また SLE 患者における特定の臨床徴候や検査データと SNP との関連があるか検討することとした。

4.19.2 対象と方法

遺伝子研究の同意の得られた SLE 患者 250 名から全血採血 10 ml を行い、ドナクイック II (セルサイエンス) を用いて DNA を精製した。精製した DNA は各 SNP 特異的な TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。健常人データとして Tohoku Medical Megabank Organization により公表されているデータベース

Integrative Japanese Genome Variation Database (<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>) 内の 3554 名のアレルデータを使用した。得られた SNP アレル頻度を健常人と SLE 患者で比較し、疾患発症への関連性を解析するとともに、SLE 患者において、以下に示す臨床的特徴 (蝶形紅斑, 感情紅斑, 日光過敏, 口腔内潰瘍, 関節炎, 漿膜炎, 白血球減少, リンパ球減少, 溶血性貧血, 血小板減少, 腎炎, 神経障害, 抗 DNA 抗体陽性)の有無とアレル頻度との関連性を解析した。

本研究は北海道大学大学院医学研究院の承認を得て研究を行った。統計はそれぞれの allele あるいは genotype と、疾患発症や臨床徴候の有無をカイ 2 乗検定を用いて行い、多重比較に対して Bonferroni 調整を行った。

4.19.3 結果

SLE 患者 250 名の臨床的特徴を Table 11 示す。

Table 11. 対象 SLE 患者の臨床的特徴

臨床的特徴	n=250
蝶形紅斑	141 (56.4%)
環状紅斑	89 (35.6%)
日光過敏	119 (47.6%)
口腔内潰瘍	71 (28.4%)
関節炎	168 (67.2%)
漿膜炎	53 (21.2%)
白血球減少	131 (52.4%)
リンパ球減少	183 (73.2%)
溶血性貧血	32 (12.8%)
血小板減少	77 (30.8%)
腎炎	144 (57.6%)
神経障害	53 (21.2%)
抗 DNA 抗体陽性	232 (89.2%)

上述する 4 つの SNP について日本人 SLE 患者と健常人において解析した結果、SLE の疾患発症と各 SNP との関連は認められなかった (Table 12)。

Table 12. 各 SNP と SLE 発症との関連

SNP	locus	M/m	MAF	OR (95%CI)	Bonferroni corrected p-value
rs12900339	9kb from 5'	A/G	0.39/0.30	1.00 (0.74 - 1.09)	0.33
rs8043085	intron 2	T/G	0.39/0.36	1.13 (0.93 - 1.35)	0.60
rs8032939	intron 2	T/C	0.38/0.36	1.10 (0.90 - 1.32)	0.37
rs7170151	intron 2	T/C	0.39/0.36	1.14 (0.94 - 1.38)	0.17

一方で、すでにアジア人で疾患発症との関連が報告されている rs12900339 と各臨床的特徴との関連を検討したところ、risk allele である rs12900339-GG は溶血性貧血と有意に関連した。また、白血球減少とも関連する傾向を認めた(Table 13)。

Table 13. rs12900339-GG と SLE の臨床的特徴との関連

	GG genotype		OR (95%CI)	p-value	Bonferroni corrected p-value
	+	-			
蝶形紅斑	0.47	0.63	0.50 (0.23 - 1.08)	0.07	
環状紅斑	0.33	0.41	0.70 (0.31 - 1.57)	0.38	
日光過敏	0.53	0.54	0.98 (0.45 - 2.10)	0.94	
口腔内潰瘍	0.38	0.32	1.26 (0.56 - 2.84)	0.57	
関節炎	0.80	0.76	1.20 (0.46 - 3.11)	0.70	
漿膜炎	0.27	0.22	1.30 (0.54 - 3.12)	0.56	
白血球減少	0.75	0.55	2.41 (1.03 - 5.64)	0.03	0.419
リンパ球減少	0.84	0.77	1.60 (0.58 - 4.13)	0.36	
溶血性貧血	0.34	0.12	3.80 (1.63 - 8.84)	0.002	0.028
血小板減少	0.44	0.32	1.66 (0.77 - 3.54)	0.19	
腎炎	0.55	0.65	0.65 (0.30 - 1.40)	0.27	
神経障害	0.25	0.26	0.92 (0.39 - 2.20)	0.86	
抗 DNA 抗体陽性	0.93	0.88	2.01 (0.45 - 9.00)	0.34	

4.19.4 考察

本研究では患者群の n 数が極めて少ないこともありいずれの SNP においても SLE 発症との関連は認められなかったが、溶血性貧血と rs12900339-GG genotype との関連が示唆された。

一方で本研究において各 SNP における expression Quantitative Trait Locus (eQTL) 効果は明らかではなく、それぞれの SNP の機能については解析できていない。公共のデータベース GTEx (<https://gtexportal.org/home/>)を用いると、欧米人においては皮膚など一部の細胞においては rs12900339 の eQTL 効果が示唆されており、今後は特に血球細胞における各 SNP の eQTL 効果や Ras 活性化機能への影響についても日本人において解析する必要がある。

5. 考察

本研究で私は、T 細胞において SRSF1 が RasGRP1 スプライシング異常を制御しており、SLE 患者 T 細胞における SRSF1 の発現低下がスプライシング異常を介し RasGRP1 発現の低下を引き起こすことを初めて見出した。

これまでに RasGRP1 の発現量を制御する因子として、好中球における growth factor independence 1 (Gfi1) (de la Luz Sierra et al., 2010)、肝細胞癌細胞における Sp-1(Zhang et al., 2018a)、T 細胞における miR-21(Pan et al., 2010)が報告されてきたが、これらは転写調節あるいは転写後修飾として RasGRP1 を制御する因子である一方、スプライシングとの関連は示されておらず、SLE 患者 T 細胞における RasGRP1 発現低下を説明し得る機序ではなかった。

SRSF1 は多くの分子のスプライシングを制御する SR 蛋白の一つとして報告され、SLE 患者 T 細胞においても T 細胞受容体関連分子である CD3 ζ のスプライシング制御を介した発現維持に重要であることがすでに示されている(Moulton and Tsokos, 2015)。

今回私の解析では米国患者での既報(Moulton et al., 2013)と同様に日本人 SLE 患者 T 細胞においても、SRSF1 mRNA 発現は低下しており、活動性 SLE 患者 T 細胞においてその発現低下は顕著であった。また SRSF1 発現量と SLE 患者における臓器障害との関連はこれまで明らかとされていなかったが、今回の解析により BILAG で規定されるいずれの臓器障害コンポーネントにおいても、活動性の臓器障害を有する患者 T 細胞で SRSF1 発現が低下することが明らかとなった。

また健常人 T 細胞において SRSF1, RasGRP1-WT mRNA 発現量の相関を認めなかったが、SLE 患者 T 細胞において SRSF1, RasGRP1-WT, DNMT1 の発現は互いに正の相関を示していた。さらに SLE 患者において各 T 細胞サブセットにおいて同様に RasGRP1-AS/-WT 比が増加していた。

このことから SLE 患者 T 細胞における SRSF1 発現低下は人種差を越えて存在すること、特定の臓器障害との関連はなく活動期の SLE 患者において SRSF1 発現が低下すること、RasGRP1 スプライシング異常が特定の T 細胞サブセットにおこる現象ではなく、少なくとも CD4 陽性 T 細胞には共通して起こる現象であること、健常人と SLE 患者 T 細胞において RasGRP1 発現制御のメカニズムが異なっており、SLE 患者では SRSF1 発現が RasGRP1 の発現量を規定する重要な要因であることが示された。

さらに我々は SRSF1 が RasGRP1-exon 11 RNA と直接結合すること、健常人 T 細胞における SRSF1 ノックダウンで RasGRP1 スプライシング異常が誘導され、SLE 患者 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が制御され、RasGRP1 発

現が亢進することを示した。また RasGRP1-WT を強制発現することにより、IL-2 産生、DNMT1 産生が亢進することも示した。

上記結果から我々は SLE 患者における T 細胞シグナル異常の一つを以下のように考察した

健康人 T 細胞において、正常の SRSF1 発現により RasGRP1 のスプライシング異常は制御され、RasGRP1 が正常に発現するため、Ras/MAPK 経路ならびに Erk のリン酸化を介して、AP-1 発現の亢進とその構成因子の cFos の動員により IL-2 産生が促進する。さらに DNMT1 発現が亢進することで autoimmune related genes のメチル化が維持され、これら遺伝子領域の発現が制御され、自己免疫異常の発症を抑制する。一方 SLE 患者 T 細胞では、SRSF1 発現が低下することで RasGRP1 のスプライシング異常を介して RasGRP1 の発現が低下し、Ras/MAPK 経路の活性低下を引き起こす。そのため下流の IL-2、DNMT1 産生の低下が起こり、autoimmune related genes の低メチル化、発現亢進を引き起こし、自己免疫異常を引き起こすと考えられる。(Figure 41)。

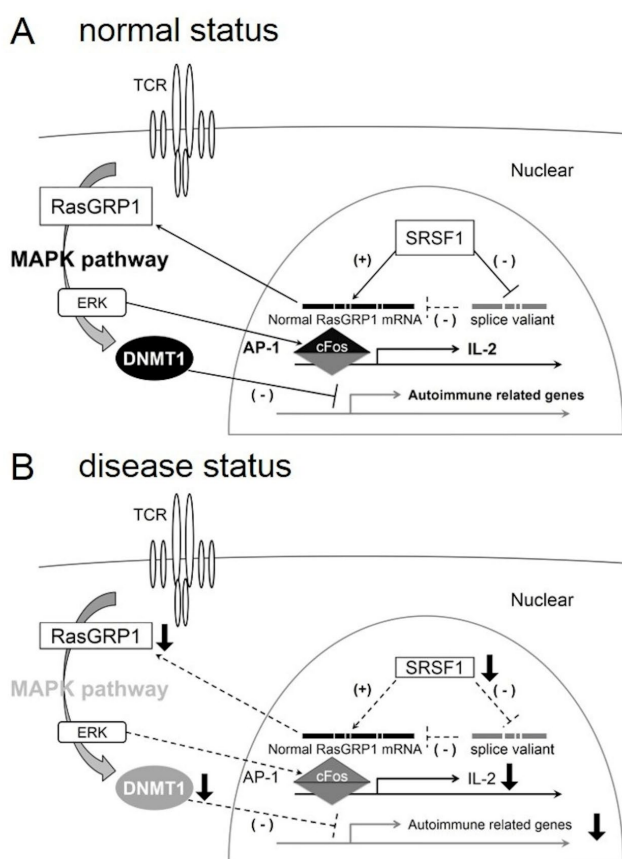


Figure 41. SLE 患者 T 細胞で想定される RasGRP1 を介した Ras/MAPK 経路の活性制御メカニズム

A. 健康人 T 細胞、B. SLE 患者 T 細胞における Ras/MAPK 経路制御

SLE 患者では、その臨床的多様性により、非特異的な免疫抑制治療に頼らざるを得ない現状があるが、その中心的な役割を演じている T 細胞のシグナル異常をスプライシング制御を介して抑制するという点から、特異的な治療ターゲットの一つとなる可能性が考えられる。

そこで私はさらに SLE 患者において SRSF1 発現が低下する要因を検討したが、これまで他の腫瘍細胞で明らかになっている SRSF1 制御因子 (Sam68 や miRNA) については、SLE 患者 T 細胞における関与は否定的であった。すでに SLE 患者 T 細胞における翻訳後修飾による SRSF1 発現制御が報告されている(Moulton et al., 2014)が、我々が示した mRNA レベルでの発現低下の要因は明らかになっておらず、治療ターゲットの探索という点からも SRSF1 発現制御のメカニズムを明らかにしていく必要があると考える。

また RasGRP1 スプライシング異常の結果生じる RasGRP1-AS の機能についても未だ不明な点が多い。スプライシングにより除去される exon 11 は RasGRP1 の活性化および不活化に関与する二つの Ca^{2+} binding domain である EF hands の linker domain に位置すると考えられている(Iwig et al., 2013)。RasGRP1-AS の強制発現により IL-2 の発現亢進が認められることから、RasGRP1-AS 自体にも Ras を活性化させる RasGRP1 本来の機能が存在することが想定されるが、RasGRP1-WT との構造・機能的差異や、SLE 病態における関与については未だ明らかになっていない。

本研究では SLE 患者 T 細胞における新たなシグナル異常の発現機序を明らかにした。一方でそのシグナル異常を制御する要因として重要な SRSF1 の発現調節メカニズムや RasGRP1-AS の機能は未だ明らかとなっていない。さらに SRSF1 がスプライシングを制御している分子は、CD3 ζ や RasGRP1 の他にも数多く存在する可能性が示唆されており、すでに報告されている様々な T 細胞シグナル異常との関連についても更なる検索が必要である。

今後は SRSF1 ノックダウン T 細胞における次世代シーケンサーを用いた網羅的な発現解析、SRSF1 promoter に結合する新たな発現調節転写因子の検索、RasGRP1 ノックアウト細胞の作成と RasGRP1-AS 強制発現による RasGRP1-AS の機能解析、構造解析を行い、SLE 患者 T 細胞におけるシグナル異常の更なる解明、治療ターゲットの探索を予定している。

6. 結論

SLE 患者 T 細胞において SRSF1 発現低下は RasGRP1 のスプライシング異常を介して SLE の病態形成に関わる T 細胞機能異常の誘因となり得る。

7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ保田晋助准教授には本研究の遂行にあたり、終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

Beth Israel Deaconess Medical Center の George C. Tsokos 教授、Vishali R. Moulton 先生、勝山隆行先生には、研究室への受け入れならびに T 細胞実験の手技・手法を丁寧に指導いただき、本研究進展の大きなきっかけを与えて頂きました。ここに深く感謝の意を示します。

本研究室坊垣暁之先生には研究手技のみならず研究結果における解釈や実験計画の立て方など、研究者としての真摯な姿勢を教えて頂きました。Olga Amengual 助教、奥健志診療講師、加藤将助教にはカンファレンスを通じて常に前向きな励ましとご指導をいただきました。藤枝雄一郎助教には研究への助言のみならず基礎研究の楽しさや各領域のトップ研究者にお会いする機会を設けていただき、常に研究へのモチベーションを高めて頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

河野通仁助教は、上司として時には家族として、また最も身近な手本として常に温かい励ましと厳しい指導をいただきました。清水裕香先生、神田真聡先生、大村一将先生には基礎実験の基本的な手技について懇切丁寧なご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。そして同じ研究グループとしていつも温かい励ましを与えてくれた嶋村抄苗先生、中村浩之先生にも深い感謝の意を示します。

久田諒先生は論文の revision 投稿に際して最も必要な実験となったフローサイトメトリー手技について大変丁寧に親切にご指導を賜りました。菅原恵理先生は研究が行き詰まるときなど、常に温かい言葉をかけていただきました。工藤友喜大学院生、Lee Wenshi 大学院生、曾若櫻大学院生はいつもよき研究の相談相手となってくれました。谷村瞬先生、柴田悠平先生、大西直樹先生には同じ大学院の仲間として、研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言をいただき、心より深く感謝を申し上げます。当科実験助手の下道真由美さん、金子由美子さん、山田あや香さん、石倉唯さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。

この他にもこの論文作成にあたり、ここには記載できないほど多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。

何より筆者の研究は多くの患者様から供与いただいた検体を使用しており、患者様たちの協力なしには成り立たないものです。研究の趣旨に御理解と御協力をいただき、研究の遂行を可能にしてくれた多くの患者様たちに心より感謝申し上げます。最後に医師を志すきっかけを与え、常に私の憧れであり模範であり続ける亡き父、どんなときも温かく見守ってくれた母親、常に努力することの大切さを教えてくれる兄姉と、何よりいつも仕事に大きな理解を示し優しく支え続けてくれた妻と息子に心から感謝致します。

8. 利益相反

本研究に際し、開示すべき利益相反状態はない。

8. 参考文献

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62, 2569-2581.

Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., et al. (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2610-2615.

Baechler, E.C., Gregersen, P.K., and Behrens, T.W. (2004). The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 16, 801-807.

Chen, C., Xue, S., Zhang, J., Chen, W., Gong, D., Zheng, J., Ma, J., Xue, W., Chen, Y., Zhai, W., et al. (2017). DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 141, 1867-1878.

Cornacchia, E., Golbus, J., Maybaum, J., Strahler, J., Hanash, S., and Richardson, B. (1988). Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol* 140, 2197-2200.

Coughlin, J.J., Stang, S.L., Dower, N.A., and Stone, J.C. (2005). RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J Immunol* 175, 7179-7184.

Crispin, J.C., Kyttaris, V., Juang, Y.T., and Tsokos, G.C. (2007). Systemic lupus erythematosus: new molecular targets. *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3, iii65-69.

Crispin, J.C., Kyttaris, V.C., Juang, Y.T., and Tsokos, G.C. (2008). How signaling and gene transcription aberrations dictate the systemic lupus erythematosus T cell phenotype. *Trends Immunol* 29, 110-115.

de la Luz Sierra, M., Sakakibara, S., Gasperini, P., Salvucci, O., Jiang, K., McCormick, P.J., Segarra, M., Stone, J., Maric, D., Zhu, J., et al. (2010). The transcription factor Gfi1 regulates G-CSF signaling and neutrophil development through the Ras activator RasGRP1. *Blood* 115, 3970-3979.

Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 317-321.

Duriagin, S., Ofori, H., and Jagodzinski, P.P. (2006). Flow cytometric analysis of CD4+ T cell receptor zeta chain deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Med Sci* 51, 181-183.

Elkon, K.B., and Wiedeman, A. (2012). Type I IFN system in the development and manifestations of SLE. *Curr Opin Rheumatol* 24, 499-505.

Enyedy, E.J., Nambiar, M.P., Liossis, S.N., Dennis, G., Kammer, G.M., and Tsokos, G.C. (2001). Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44, 1114-1121.

Furie, R., Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D.J., Tegzova, D., Sanchez-Guerrero, J., Schwarting, A., Merrill, J.T., Chatham, W.W., et al. (2011). A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 63, 3918-3930.

Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3, 73ra20.

Gladman, D.D., Goldsmith, C.H., Urowitz, M.B., Bacon, P., Fortin, P., Ginzler, E., Gordon, C., Hanly, J.G., Isenberg, D.A., Petri, M., et al. (2000). The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol* 27, 373-376.

Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40, 1725.

Iwig, J.S., Vercoulen, Y., Das, R., Barros, T., Limnander, A., Che, Y., Pelton, J.G., Wemmer, D.E., Roose, J.P., and Kuriyan, J. (2013). Structural analysis of autoinhibition in the Ras-specific exchange factor RasGRP1. *Elife* 2, e00813.

Kaplan, M.J., Lu, Q., Wu, A., Attwood, J., and Richardson, B. (2004). Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells. *J Immunol* 172, 3652-3661.

Katsiari, C.G., Kyttaris, V.C., Juang, Y.T., and Tsokos, G.C. (2005). Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 115, 3193-3204.

Kirou, K.A., and Gkrouzman, E. (2013). Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clin Immunol* 148, 303-312.

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Riccieri, V., et al. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3, 73ra19.

Lee, S.H., Yun, S., Lee, J., Kim, M.J., Piao, Z.H., Jeong, M., Chung, J.W., Kim, T.D., Yoon, S.R., Greenberg, P.D., et al. (2009). RasGRP1 is required for human NK cell function. *J Immunol* 183, 7931-7938.

Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., et al. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* 208, 44-53.

Liossis, S.N., Ding, X.Z., Dennis, G.J., and Tsokos, G.C. (1998). Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 101, 1448-1457.

Lisnevskaja, L., Murphy, G., and Isenberg, D. (2014). Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 384, 1878-1888.

Lu, Q., Wu, A., Tesmer, L., Ray, D., Yousif, N., and Richardson, B. (2007). Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol* 179, 6352-6358.

Maecker, H.T., McCoy, J.P., and Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 12, 191-200.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.

Mao, H., Yang, W., Latour, S., Yang, J., Winter, S., Zheng, J., Ni, K., Lv, M., Liu, C., Huang, H., et al. (2017). RASGRP1 mutation in autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease. *J Allergy Clin Immunol*.

Massiello, A., and Chalfant, C.E. (2006). SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J Lipid Res* 47, 892-897.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and

differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899-911.

Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34, 108-121.

Moulton, V.R., Gillooly, A.R., Perl, M.A., Markopoulou, A., and Tsokos, G.C. (2015). Serine Arginine-Rich Splicing Factor 1 (SRSF1) Contributes to the Transcriptional Activation of CD3zeta in Human T Cells. *PLoS One* 10, e0131073.

Moulton, V.R., Gillooly, A.R., and Tsokos, G.C. (2014). Ubiquitination regulates expression of the serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) in normal and systemic lupus erythematosus (SLE) T cells. *J Biol Chem* 289, 4126-4134.

Moulton, V.R., Grammatikos, A.P., Fitzgerald, L.M., and Tsokos, G.C. (2013). Splicing factor SF2/ASF rescues IL-2 production in T cells from systemic lupus erythematosus patients by activating IL-2 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1845-1850.

Moulton, V.R., and Tsokos, G.C. (2010). Alternative splicing factor/splicing factor 2 regulates the expression of the zeta subunit of the human T cell receptor-associated CD3 complex. *J Biol Chem* 285, 12490-12496.

Moulton, V.R., and Tsokos, G.C. (2015). T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *J Clin Invest* 125, 2220-2227.

Nambiar, M.P., Enyedy, E.J., Warke, V.G., Krishnan, S., Dennis, G., Wong, H.K., Kammer, G.M., and Tsokos, G.C. (2001). T cell signaling abnormalities in systemic lupus erythematosus are associated with increased mutations/polymorphisms and splice variants of T cell receptor zeta chain messenger RNA. *Arthritis Rheum* 44, 1336-1350.

Oelke, K., Lu, Q., Richardson, D., Wu, A., Deng, C., Hanash, S., and Richardson, B. (2004). Overexpression of CD70 and overstimulation of IgG synthesis by lupus T cells and T cells treated with DNA methylation inhibitors. *Arthritis Rheum* 50, 1850-1860.

Pan, W., Zhu, S., Yuan, M., Cui, H., Wang, L., Luo, X., Li, J., Zhou, H., Tang, Y., and Shen, N. (2010). MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 184, 6773-6781.

Priatel, J.J., Teh, S.J., Dower, N.A., Stone, J.C., and Teh, H.S. (2002). RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* 17, 617-627.

Richardson, B.C., Strahler, J.R., Pivrotto, T.S., Quddus, J., Bayliss, G.E., Gross, L.A., O'Rourke, K.S., Powers, D., Hanash, S.M., and Johnson, M.A. (1992). Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35, 647-662.

Ronnlblom, L., and Elkon, K.B. (2010). Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6, 339-347.

Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J., and Weiss, A. (2005). A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* 25, 4426-4441.

Salzer, E., Cagdas, D., Hons, M., Mace, E.M., Garncarz, W., Petronczki, O.Y., Platzer, R., Pfajfer, L., Bilic, I., Ban, S.A., et al. (2016). RASGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics. *Nat Immunol* 17, 1352-1360.

Sun, C., Molineros, J.E., Looger, L.L., Zhou, X.J., Kim, K., Okada, Y., Ma, J., Qi, Y.Y., Kim-Howard, X., Motghare, P., et al. (2016). High-density genotyping of

immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nat Genet.*

Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25, 1271-1277.

Vincent, F.B., Morand, E.F., Schneider, P., and Mackay, F. (2014). The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 10, 365-373.

Yasuda, S., Stevens, R.L., Terada, T., Takeda, M., Hashimoto, T., Fukae, J., Horita, T., Kataoka, H., Atsumi, T., and Koike, T. (2007). Defective expression of Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 179, 4890-4900.

Yazdany, J., and Dall'Era, M. (2013). Definition and Classification of Lupus and Lupus-Related Disorders. In DUBOIS' Lupus Erythematosus and Related Syndromes, D.J. Wallace, and B.H. Hahn, eds. (Philadelphia), pp. 1-7.

Yee, C.S., Farewell, V., Isenberg, D.A., Griffiths, B., Teh, L.S., Bruce, I.N., Ahmad, Y., Rahman, A., Prabu, A., Akil, M., et al. (2009). The BILAG-2004 index is sensitive to change for assessment of SLE disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 48, 691-695.

Yosef, N., Shalek, A.K., Gaublomme, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., et al. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496, 461-468.

Zhang, X., Zhuang, H., Han, F., Shao, X., Liu, Y., Ma, X., Wang, Z., Qiang, Z., and Li, Y. (2018a). Sp1-regulated transcription of RasGRP1 promotes hepatocellular carcinoma (HCC) proliferation. *Liver Int* 38, 2006-2017.

Zhang, X., Zhuang, H., Han, F., Shao, X., Liu, Y., Ma, X., Wang, Z., Qiang, Z., and Li, Y. (2018b). Sp1-regulated transcription of RasGRP1 promotes hepatocellular

carcinoma (HCC) proliferation. *Liver Int.*

Zhang, Z., Li, J., Zheng, H., Yu, C., Chen, J., Liu, Z., Li, M., Zeng, M., Zhou, F., and Song, L. (2009). Expression and cytoplasmic localization of SAM68 is a significant and independent prognostic marker for renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 2685-2693.

Zhou, X.J., Nath, S.K., Qi, Y.Y., Sun, C., Hou, P., Zhang, Y.M., Lv, J.C., Shi, S.F., Liu, L.J., Chen, R., et al. (2016). Novel identified associations of RGS1 and RASGRP1 variants in IgA Nephropathy. *Sci Rep* 6, 35781.