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
Author(s)	中川, 育磨
Description	配架番号：2341
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12837号
Issue Date	2017-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12837
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87582
Type	doctoral thesis
File Information	Ikuma_Nakagawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

学位論文

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

目次

発表論文目録及び学会発表目録.....1

1. 緒言.....2
1-2 自己免疫疾患と炎症.....2
1-2 シェーグレン症候群と炎症.....3
1-3 炎症回路 (炎症アンプ) 4
1-4 炎症アンプ関連遺伝子の同定.....5
1-5 仮説及び本研究の目的.....5

2. 略語表.....6

3. 方法.....8
3-1 細胞及びマウス.....8
3-2 抗体及び試薬.....8
3-3 quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) 9
3-4 関節炎誘導モデルと関節炎スコアの評価.....11
3-5 Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay (ELISA) 11
3-6 MTT assay.....11
3-7 short hairpin RNA (shRNA) を用いたマウス *GTF2I* のノックダウン.....12
3-8 small interfereing RNA (siRNA) を用いたヒト *GTF2I* のノックダウン.....12
3-9 Western Blotting.....13
3-10 Luciferase Reporter Assay.....14
3-11 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内蛋白質の局在の観察.....14
3-12 免疫沈降法 (Immunoprecipitation Assay : IP) 14
3-13 クロマチン免疫沈降法 (Chromatin IP : ChIP) 14
3-14 液体クロマトグラフィー質量分析.....17
3-15 ヒト唾液腺組織を用いた免疫組織化学染色.....17
3-16 GTF2I の SNP シーケンス及び isoform 発現.....18
3-17 統計処理.....21

4. 結果.....22
4-1 GTF2I は炎症アンプを正に制御する.....22
4-2 GTF2I は NF-κB 経路に関与する.....28
4-3 GTF2I は細胞質においては NF-κB 経路の活性化には影響を及ぼさない.....31
4-4 GTF2I は核内において p65 のプロモーター領域への結合に関与する.....34
4-5 GTF2I は Leucine zipper domain を介して p65 分子と会合する.....40
4-6 GTF2I の Leucine zipper domain に存在するチロシン残基は p65 の転写活性に重要である.....47

4-7　GTF2I は STAT3αよりも STAT3βに優先的に会合する.....52
4-8　GTF2I はリン酸化 p65 及びリン酸化 STAT3 とともに SS 患者の唾液腺組織において高発現する.....54
4-9　GTF2I には 4 つの isoform が存在する.....59
4-10　GTF2I の isoform 2 は他の isoform と比べて p65 のプロモーター活性をより上昇させる.....64
4-11　SS 患者唾液腺組織における GTF2 及びその isoform の発現と SNP の有無.....67

5. 考察.....76

6. 総括及び結論.....80

7. 謝辞.....81

8. 参考文献.....82

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の内容の一部は、現在以下の学術雑誌に投稿中である。

Ikuma Nakagawa, Daisuke Kamimura, Yasunobu Arima, Jing-Jiang Jiang, Yuki Tanaka, Mitsutoshi Ota, Munezumi Fujita, Momoko Okawara, Tatsuya Atsumi, Masaaki Murakami

“Primary Sjögren’s sindrome-associated gene *GTF2I* regulates inflammation via NF-κB pathway in non-immune cells”

Scientce Translational Medicine

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Ikuma Nakagawa, Hidenori Bando, Momoko Okawara, Mariko Maenishi, Haruka Hiuchi, Mitsutoshi Ota, Sabharwal Lavannya, Jie Meng, Jing-Jing Jiang, Toru Atsumi, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, Tatsuya Atsumi, and Masaaki Murakami

“ A functional analysis of the inflammation amplifier-related gene *stf1* in primary Sjögren’s syndrome”

第 44 回日本免疫学会学術総会、 2015 年 11 月 18 日 ～ 20 日 札幌

2. Ikuma Nakagawa, Haruka Higuchi, Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Jing-Jing Jang, Toru Atsumi, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, Tatsuya Atsumi, and Masaaki Murakami

“A functional analysis of transcription factor gene *stf1* as a novel regulator of NF-κB pathway”

第 45 回日本免疫学会学術総会、 2016 年 12 月 5 日 ～ 7 日 宜野湾

1. 緒言

1-1 自己免疫疾患

免疫系は、生体内に侵入してきた異物を認識し排除するために備わっている重要な生体防御システムである。自己免疫疾患は、免疫系に異常が生じその結果として自分自身の細胞や組織に対して過剰な免疫反応が生じる、免疫寛容の破綻を背景とした疾患群である。自己免疫疾患には様々な疾患が存在し、またそれらはしばしば同一個体内で合併するといった、極めて複雑な病態を呈する。希少疾患と考えられがちであるが、例えば自己免疫疾患の中で最も多い関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; RA) は 30 歳以上の人口においてはじつに 1%程度の有病率となる。次に罹患率の高い疾患として、全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus ; SLE)、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome ; SS) が続く。

自己免疫疾患はその複雑な病態と多彩な臨床症状からしばしば難治性であるが、医学研究の進歩により近年は目覚ましい治療の成果を遂げている。特に関節リウマチにおいては、1990 年代に現れた生物学的製剤、すなわち炎症性サイトカインやそのシグナル伝達経路を標的とした治療が確立され、患者の関節機能予後・生命予後は劇的に改善した。腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor ; TNF) α、インターロイキン (Interleukin ; IL) -6、及び細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4 ; CTLA-4) をターゲットとした生物学的製剤が既に実臨床に用いられているほか、複数のサイトカインのシグナル伝達に関与する Janus kinase (JAK) – Signal transducers and activator of transcription (STAT) 経路を阻害する JAK 阻害剤 tofacitinib が 2013 年より投与可能になり、さらに治療選択肢の幅は拡がった。現在も他のサイトカイン、ケモカインなどをターゲットとした様々な新薬が臨床治験中である。難治性自己免疫疾患の代表である SLE においても長らく副腎皮質ステロイド剤による一辺倒の治療が行われる時代が続いたが、近年では有効な免疫抑制療法の使用により、その予後は大きく改善してきた。さらには、B 細胞の生存・分化・抗体産生に重要な役割を果たす B 細胞活性化因子 (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor Family ; BAFF) に対する中和抗体、あるいはインターフェロン (Interferon ; IFN) αをターゲットとした薬剤が SLE に有効であるということが近年になり報告されている。このように免疫学の発展に伴い、自己免疫疾患の治療は大幅に進歩している。

1-2 シェーグレン症候群と炎症

原発性シェーグレン症候群 (primary SS ; pSS) は、上述のとおり RA、SLE について発症率が高い自己免疫疾患である。本症候群は外分泌腺組織が系統的に障害される疾患で、特に慢性唾液腺炎と乾燥性角結膜炎に伴う乾燥症状が主徴である。病理学的には唾液腺・涙腺の導管、腺房周囲に著しいリンパ球浸潤を認め、これは腺房の破壊・萎縮と外分泌機能の破綻をきたす。一方、外分泌障害のみならず、精神神経症状や肺合併症、腎症、関節症状、血球異常など全身の諸臓器において腺外型 (extraglandular) の症状も呈し、その病態は複雑である。さらに、しばしば RA や SLE などとも合併する (二次性 SS) 。RA の約 20%に SS が合併すると報告されているほか、本邦においては SS 患者のおよそ 4 割が何らかの自己免疫疾患を合併する[1]。加えて、SS の主徴である乾燥症状のみを呈する場合、対症療法でのみ対応されている例も少なくなく、潜在的な有病率は現在の報告よりもはるかに多いであろうとも推測されている[2]。

SS の病態は非常に複雑であり、その発症原因が多因子によることは、多彩な臨床症状を呈すること、あるいは他の自己免疫疾患との合併が多いことからも想像に難くない。唾液腺組織における $CD4^+$ T 細胞の浸潤は SS の病態形成の中心的な役割を担う[3]。浸潤した T 細胞は IL-1β、IL-6、TNFα、あるいは 1 型 IFN などの Th1 サイトカインを産生し、外分泌組織の機能障害を誘導する[4]。Th17 細胞もまた重要な腺組織の炎症病変へ浸潤・集積することが報告されており[5]、実際に SS 患者の涙液中において TNFα、IL-6 並びに IL-17 などの炎症性サイトカインの濃度は健常人と比較して有意に高値を示すことが報告されている[6]。唾液腺炎の初期病巣では上述のとおり T 細胞の浸潤が目立つが、その後 B 細胞の浸潤が引き続く。B 細胞の生存と増殖に重要な BAFF が SS 患者の末梢血中あるいは唾液腺組織において発現が上昇しており、また疾患活動性との相関がみられることが報告されている[7][8]。BAFF が形質細胞様樹状細胞から主に産生される 1 型および 2 型 IFN により誘導されることを考慮すると[9][10]、ある種のウィルス感染などによって誘導される自然免疫の活性化が SS の病因となりうることは十分に想定されうる。しかしながら、実際に SS において Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) の活性化が報告されているものの、現時点で SS の発症に関与すると明確な根拠のある病原体は未だ同定されていない[11][12]。

このように SS の病態と臨床像は非常に複雑かつ未解明な部分が多く、それは同時に治療戦略をしばしば困難にする。また、SS の治療において重要な点は、上述したような RA あるいは SLE で奏功する免疫抑制療法あるいは抗サイトカイン療法の有効性が十分には確認されていないという点である。これまでいくつかのランダム化比較試験において pSS の治療における生物学的製剤の有効性が検証されてきたが、それらの結果は SS の治療における生物学的製剤の積極的使用に踏み出す根拠としてはやや不

十分と言わざるをえない。Infliximab や etanercept は pSS の治療においてその有効性が認められなかったほか[13 14]、例えば SS の病態に十分関与しているであろう B 細胞を標的とした rituximab の使用においてもその有効性は極めて限定的である[15,16]。これらの結果はすなわち、SS がある特定のサイトカインやその下流のシグナルカスケードを抑制する、あるいは B 細胞を特異的に抑制することで改善するといった単純な病態ではないことを示唆する。

1-3 炎症回路 (炎症アンプ)

近年、我々は、自己免疫疾患の発症において中心的な役割を果たす炎症誘導機構である『炎症回路 (炎症アンプ) 』を発見した[17]。本機構は、『F759 マウス』と命名された、慢性炎症性の関節炎を自然発症するノックインマウスの解析を通して明らかになった[18]。IL-6 は細胞表面上の IL-6 受容体複合体 (IL-6 受容体と信号伝達サブユニットである gp130 の 2 つの分子から構成される) に結合すると、細胞内に STAT3 依存性の正のシグナルと Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 依存性の負のシグナルを伝達する。F759 マウスでは、gp130 上の 759 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換させた mutation (F759Y) をノックインすることにより、gp130 上の SOCS3 の結合サイトが失われることで IL-6 シグナルのネガティブフィードバック機構が破綻し、結果として慢性的な STAT3 活性化が引き起こされる[18]。本マウスでは過剰な IL-6 – STAT3 信号の結果として生後 1 年ほどで関節炎を自然発症する他、脾腫、自己抗体の産生などの自己免疫病態を発症する。この F759 マウスの病態解析の結果、免疫細胞ではなく血管内皮細胞、線維芽細胞、アストロサイトなどの 1 型コラーゲン陽性の非免疫系細胞において、NF-κB と STAT3 が同時に活性化することで、炎症性サイトカイン、ケモカインが相乗的に発現することが明らかとなった[19]。特に、活性化した病原性ヘルパーT 細胞から産生される IL-17A と IL-6 の共刺激による NF-κB と STAT3 の同時活性化は、効率良く局所の炎症回路を誘導・活性化し、様々な細胞の局所へのリクルートメントを促し、その場の恒常性の破綻、ひいては慢性炎症・自己免疫疾患の病態を形成した[17]。さらに、これらの研究の過程で、過剰な IL-6 シグナルが肝臓などの非免疫細胞に導入されると T 細胞生存・増殖因子である IL-7 が産生され、活性化ヘルパーT 細胞が増加し、自己免疫疾患のリスクとなることも示された[20]。これらの事実は、これまで単に免疫細胞の標的と考えられてきた非免疫細胞が、逆に免疫細胞の中心であるヘルパーT 細胞の状態を規定することを意味する。

1-4 炎症アンプ関連遺伝子の同定

炎症アンプの発見に引き続き、同機構に関与する遺伝子の網羅的な解析として、shRNA を搭載したレンチウィルスを用いたゲノムワイドスクリーニングおよび DNA アレイ解析が行われた。その結果、炎症アンプの正の制御遺伝子、及び標的遺伝子の候補群をそれぞれ 1300 遺伝子、500 遺伝子ほど同定できた[21]。これらの遺伝子の中には、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 method により証明できた[21]。すなわち、マウス疾患モデルから発見された炎症アンプは、実際にヒトにおいて発症する慢性炎症性疾患・自己免疫疾患の病態形成の重要な分子基盤であると言える。実際に、炎症アンプの制御遺伝子かつ標的遺伝子である Epiregulin-ErbB1 経路の解析を行うことで、Epiregulin の血中濃度は RA、多発性硬化症及び動脈硬化症の患者において健常人よりも有意に高値であることが明らかとなった[21]。さらに、Epiregulin のほかにも Amphiregulin や Transforming growth factor (TGF) αなどの増殖因子群の血中濃度も RA および多発性硬化症患者において高値であり、そして炎症アンプによって誘導される Epiregulin を介してこれら増殖因子群の発現が亢進することがわかった[22 23]。

1-5 仮説及び本研究の目的

今回、上述したように未だ有効な抗炎症療法・免疫抑制療法の治療戦略が確立されていない SS に着目し、炎症アンプ関連遺伝子群の中から、既報により明らかになっている同疾患の関連遺伝子を検索した結果、8 つの SS 関連遺伝子 (*BLK*、*CXCR5*、*GTF2I*、*IL12A*、*IRF5*、*STAT4*、*TNFAIP3*、*TNIP*) が抽出された。さらに、それら 8 遺伝子の中で、既報において非免疫細胞における NF-κB 経路、及び JAK-STAT 経路、あるいは炎症との関連がこれまで報告されていない遺伝子として唯一見つかった遺伝子である *GTF2I* (General Transcription Factor 2 I) に着目した。

すなわち、SS の炎症病態形成において炎症アンプが重要な役割を担っているという仮説のもと、炎症アンプ関連遺伝子かつ SS の疾患関連遺伝子の一つである GTF2I がどのように SS の炎症病態を制御するかを明らかにすることを今回の研究目的とした。

2. 略語表

本文中、及び図中で使用した略語は以下の通りである。

BAFF	B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GTF2I	General transcription factor 2-I
GTF2IRD1	General transcription factor repeat domain containing 1
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HRP	Horseradish peroxidase
HSG	Human salivary gland cells
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor of κB
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
IP	Immunoprecipitation
LPS	Lipopolysaccharide
LZ	Leucine zipper domain
MTT	3-(4,5-dimethylthial-2-yl)-2,5-diphenyltetrazalium bromide
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NF-κB	Nuclear factor-kappa B kinase
NS	Not significant
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PEI	Polyethyleneimine
pSS	Primary Sjögren's syndrome
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RA	Rheumatoid arthritis

RHD	Rel homology domain
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SLE	Systemic lupus erythematosus
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SS	Sjögren's syndrome
STAT3	Signal transducers and activator of transcription 3
TNFα	Tumor necrosis factor α

3. 方法

3-1　細胞及びマウス

本研究で用いた 1 型コラーゲン陽性マウス血管内皮細胞 BC-1 は大阪大学大学院医学研究科・感染免疫学講座の宮坂昌之教授より御供与いただいた。human synoviocyte は ScienCell Research Laboratories より購入した。 human salivary gland cell (HSG) は筑波大学医学医療系内科 (膠原病・リウマチ・アレルギー) の松本功先生より御供与いただいた。いずれの細胞も Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies) に 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) (Thermo Scientific) を添加したものを用いて、37℃かつ 5%CO_2 の条件下において継代、培養した。また、培養に使用した器具類はすべてオートクレーブによる滅菌処理を施し、すべての操作をクリーンベンチ内で無菌的に行った。

野生型マウス (C58BL/6) は日本 SLC 株式会社より購入して用いた。関節炎モデルマウスとして、 gp130 の 759 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 gp130 (F759) を全身で発現する F759 マウス ($gp130^{F759/F759}$ ノックインマウス) を使用した [18]。マウスは、北海道大学遺伝子病制御研究所において室温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。実験には 6-8 週齢のマウスを用いた。

3-2 抗体及び試薬

以下に示す抗体は Western Blotting、免疫沈降法 (Immunoprecipitation ; IP) 、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation ; ChIP) 、共焦点顕微鏡観察、蛍光組織化学染色、及び免疫組織化学染色に用いた。

抗 p65 抗体 (C-20、Santa Cruz) 、抗 GTF2I 抗体 (abcam) 、抗リン酸化 p65 (Ser536) 抗体 (93H1、Cell Signaling Technology) 、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology) 、抗リン酸化 IκBα抗体 (Cell Signaling Technology) 、抗 IκBα抗体 (Cell Signaling Technology) 、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich) 、抗 c-Myc 抗体 (Sigma-Aldrich) 、抗α-tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich) 、抗 Lamin B 抗体 (Santa Cruz) 、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体 (Southern Biotech) 、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Southern Biotech) 、HRP 標識抗ヤギ抗体 (Southern Biotech)

3-3 quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

MOCK 細胞 (non-target コントロール細胞) と GTF2I ノックダウン細胞を 96 well plate に 1×10^4 cells/well で播種した。播種した翌日に 2 時間の血清飢餓処理ののち、ヒト IL-6 (R&D Systems) 100 ng/mL、可溶性 IL-6 受容体 (R&D Systems) 100 ng/mL、マウス IL-17 (R&D Systems) 50 ng/mL あるいは TNFα (PeproTech) 50 ng/mL で 3 時間刺激したのち mRNA 抽出を行なった。siRNA によるノックダウン細胞においては、後述する方法により siRNA による遺伝子ノックダウンを行なったのち、同様にヒト IL-6、可溶性 IL-6 受容体、及びマウス IL-17 あるいは TNFαを添加し 3 時間インキュベートしたのちに mRNA 抽出を行なった。細胞からの RNA 抽出は SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR (東洋紡ライフサイエンス) を用いて標準プロトコールによっておこなった。生検組織からの RNA 抽出は AllPrep® DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて標準プロトコールによっておこなった。cDNA の合成は M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて標準プロトコールでおこなった。標的遺伝子の mRNA、及び内在性コントロールとしてマウス由来細胞では hypoxanthine phosphorybosyltransferase (HPRT) 、ヒト由来細胞では glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。測定するにあたり、7300 fast real-time PCR システム (Applied Biosystems) と SYBR Green PCR master mix (Kapa Biosystems) を使用した。qPCR で用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

表 **1.** **qPCR** に用いたプライマーリスト

Gene	**Sequence**	
Mouse *HPRT*	Forward	5’-GAAGCGAGAGAACCAGG -3’
	Reverse	5’-CC CCCACCCCAGACA-3’
Mouse *GTF2I*	Forward	5’-AGGCCCTTCTGAAACTGATGG-3’
	Reverse	5’-GGTCACCTCAACTTCGGGG-3’
Mouse *IL-6*	Forward	5’-GAGGAACCACCCCAACAGACC-3’
	Reverse	5’-AAG GCACACG GCAACA-3’
Mouse *SOCS3*	Forward	5’-GCGGACCGCGGAG-3’
	Reverse	5’-GAGACGCCGGGACA-3’
Mouse *STAT3*	Forward	5’-CACCTTGGATTGAGAGTCAAGAC-3’
	Reverse	5’-AGGAATCGGCTATATTGCTGGT-3’
Mouse *LCN2*	Forward	5’- CCACCGGCAGGGAC-3’
	Reverse	5’- GGCCCAACAGGG -3’
Human *GAPDH*	Forward	5’-GAGCAACGGAGGCG -3’
	Reverse	5’-CGCCCGGAAGAGGG-3’
Human *CXCL2*	Forward	5’-GGGCAGAAAGCTTGTCTCAA-3’
	Reverse	5’-GCTTCCTCCTTCCTTCTGGT-3’
Human *CCL2*	Forward	5’-CAGCCAGATGCAATCAATGCC -3’
	Reverse	5’-TGGAATCCTGAACCCACTTCT -3’
Human *CCL5*	Forward	5’-CCTGCTGCTTTGCCTACATT-3’
	Reverse	5’-ACACACTTGGCGGTTCTTTC-3’
Human *CCL20*	Forward	5’- GCGACCAAGAGGCC-3’
	Reverse	5’-CGCACACAGACAACC -3’

3-4　関節炎誘導モデルと関節炎のスコア評価

F759 マウスを用いた関節炎モデルを既報のとおりに行った。*GTF2I* に特異的な shRNA (Sigma Aldrich) あるいはコントロールとして scrambled sequence (Sigma Aldrich) を搭載した shRNA (3.6×10^5 TU/dose) を Polybrene (40 μg/dose) と共に 6-8 週齢の F759 マウスの後肢踵関節腔に 1 日間隔で 3 回注入した。関節炎の誘導には、マウス IL-6 (100 ng/dose) 及び IL-17 (100 ng/dose) を 3 日間連続で注射した。関節炎の重症度は踵関節の可動性を指標として、0 点 (正常) 、1 点(わずかな可動制限) 、2 点 (軽度の可動制限) 、３点 (中程度の可動制限) 、及び 4 点 (重度の可動制限) として点数化した。

3-5　Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay (ELISA)

コントロール BC-1 細胞 (MOCK) および GTF2I ノックダウン細胞を 96 well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、一昼夜 5%CO_2、37℃下でインキュベートした。血清を添加していない DMEM 培養液にそれぞれヒト IL-6 100 ng/mL、可溶性 IL-6 受容体 100 ng/mL、マウス IL-17 50 ng/mL、TNFα 50 ng/mL となるように希釈し、96 well plate の培養液を置換した。18 時間サイトカインで刺激したのちに、その上清を IL-6 の産生量を確認するために用いた。ELISA は Mouse IL-6 ELISA Set (BD Biosciences) を用いて、標準プロトコールで行なった。すなわち、ELISA plate を coating buffer と capture antibody で一晩コートし、洗浄、ブロッキングを行なったのち、スタンダード IL-6 (0-1000 ng/mL を倍々希釈で作成) 、およびサンプル上清を添加し室温で 2 時間反応させたのち、HRP で標識された detection antibody を加えて 450/550 nm における吸光度を測定した。

3-6　MTT assay

ELISA で用いた 96 well plate から培養上清を除去し、10%FBS を含む DMEM 培養液で希釈した MTT 溶液 (500 μg/mL) を 100 μl/well で加えて、5%CO_2、37℃下で 2 時間インキュベートして呈色反応を行った。その後、上清を除去し DMSO を 100 μl/well 加えて MTT の沈殿を溶解し、500 nm における吸光度を測定した。

3-7　short hairpin RNA (shRNA) を用いたマウス *GTF2I* のノックダウン

96 well plate に BC-1 細胞を 1.5×10^3 cells/well で播種し一昼夜培養した。目的の遺伝子の shRNA を含むウィルス粒子ストック (nontarget shRNA, Sigma Mission SHC002V ; GTF2I shRNA-1 (sh1) , TRC0000086098 ; GTF2I shRNA-2 (sh2) , TRC0000086101 ; Sigma-Aldorich) を氷上で緩徐に解凍し、MOI (multiplicity of infection) が約 50 程度になるように DMEM に polybrene (8 μg/mL) を加えた培地で調整して、40 μl/well ずつ細胞に添加した。37℃、5%CO_2 下で 24 時間培養したのち、DMEM に puromycin (5 μg/mL) を加えた培地を 200 μL ずつ加えて 3 日間培養した。この薬剤選択により生存した細胞を一過性のノックダウン細胞株とした。同細胞株を 24 well plate、12 well plate、および 100mm dish へとスケールアップさせながら puromycin を含む DMEM で 3-4 日間培養かつ薬剤選択を行なった。この過程で確立したクローンについて qPCR を行い目的遺伝子のノックダウン効率の検証を行い、安定ノックダウン細胞株として以降の実験に用いた。

3-8　human small interfereing RNA (siRNA) を用いたヒト *GTF2I* のノックダウン

HSG 細胞あるいは SV-40 により不死化したヒト滑膜細胞を 96 well plate に 7×10^3 cells/well で播種し、siRNA (5 μM) 0.5 μL を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) によりトランスフェクションした。37℃ 5%CO_2 下で二昼夜インキュベートした細胞を qPCR に用いた。
使用した siRNA ; human si-GTF2I (SASI_Hs02_00332037 ; Sigma Aldrich), human si-nontarget (Sigma Mission SIC-001s ; Sigma Aldrich)

3-9 Western Blotting

Western Blotting に用いる細胞は、すべて 100mm dish に播種し培養した。必要に応じて刺激試薬を添加した後、細胞を氷上に置き、培養液を吸引除去し氷冷した Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1 mL の PBS とセルスクレーパー (住友ベークライト) を用いて細胞を回収した。4℃で 3 分間 3000 rpm の遠心により上清を除き、細胞ペレットを適切な細胞融解バッファーで処理した。全細胞成分分画の抽出には高塩濃度の細胞融解バッファー (NaCl 600 mM) を用いて細胞を融解した後、十分な voltex ののち、超音波処理 (30 秒間隔で 5 分×2 回) を行い、高速で 20 分間の遠心 (15000 rpm) を行なった後、細胞残渣を除いた上清を全細胞成分分画として回収した。細胞質分画及び核分画に分けて抽出する場合は、まず低塩濃度の細胞融解バッファー (NaCl 100 mM) で細胞を融解し 4℃の環境下で 2 時間緩徐に撹拌した後、低速 (800 g) で 10 分間遠心しその上清を細胞質分画として回収した。その後、残ったペレットを数回洗浄した後、上述した高塩濃度の細胞融解バッファーで融解、超音波処理 (30 秒間隔で 5 分間を 2 コース) したのち高速遠心を行い、上清を核分画として回収した。すべての工程において、細胞融解バッファーには 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich) 、 phosphatase inhibitor cocktail 2 及び phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich) を添加した。得られたサンプルは全て 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95℃ 5 分間煮沸させたのち、5-12%濃度勾配の SDS-PAGE ゲル (和光純薬工業) で Bio-Rad のウエットウエスタンブロットシステムを用いてポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行なった。Immobilon®-P (Millipore) に SDS-PAGE により分離したゲルタンパク質を転写した。内部コントロールとして、全細胞分画及び細胞質分画ではα-tubulin、核分画では lamin-B を用いた。二次抗体には HRP 標識抗体を用い、Pierece ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher) によって化学発光したものを、現像機 FPM100 (富士メディカルフィルム) でフィルムに感光し検出した。

3-10 Luciferase Reporter Assay

プロモーター活性の測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて標準プロトコールに従い行った。96-well plate に 2×10^4 cells/well で播種した HEK293T 細胞を一昼夜培養した後、empty vector である pEF-BOS、GTF2I 及びその変異体を 100 ng/well で導入、加えて pGL4.32 [*luc2P*/ NF-κB -RE/Hygro] (4.5 ng/well、Promega) 、pGL4.32 [*luc2P*/ IL-6 -RE/Hygro] (4.5 ng/well、Promega) 及び pGL4.74 [*hRluc*/TK] (0.5 ng/well、Promega) を導入した。細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法を用いた。24 時間培養後に培養液を除去し、刺激試薬を添加した培養液で 6 時間

インキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、Passive lysis buffer (50 μL/well) を加えて室温下で 20 分間穏やかに振盪して細胞を融解した。その後、その細胞溶解液 5 μL と発光基質 25 μL を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター (GloMax®-Multi Detection System、Promega) で測定した。なお、細胞間の導入効率の補正のために、遺伝子導入の際に同時に導入した pGL4.32 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとし、これとの比を算出し NF-κB luciferase 活性とした。

3-11 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内蛋白質の局在の観察

TNFα刺激による p65 の核内移行を確認するため、MOCK 及び GTF2I ノックダウン細胞を TNFα 50 ng/mL で 0 分、15 分及び 30 分間刺激した。刺激後の細胞は 4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、Perm/Wash solution (Cytofix/Cytoperm kit、BD Biosciences) で透過処理を施し、一次抗体として抗 p65 抗体で 1 時間反応させた。細胞を洗浄し余分な一次抗体を除いた後、二次抗体として抗ウサギ Alexa Fuor-488 標識抗体と Hoechst 33342 nuclear stain で 1 時間反応させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (AxioCam MRm、Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

3-12 免疫沈降法 (Immunoprecipitation Assay ; IP)

IP に用いる細胞はすべて 100mm dish に播種、培養した。バッファーで溶解されたサンプルはプロテイン G セファロースビーズ (Pharmacia) をサンプル 1 mg タンパク質相当量に対して 10 μg を添加し 4℃下で 1 時間緩徐に転倒混和しプレクリアをおこなった。その後、9000 rpm、1 分間 4℃下で遠心した後に上清を回収し、目的に応じて FLAG ビーズ (Sigma Aldrich) あるいは抗 p65 抗体 (Santa Cruz) を加えて 2 時間 4℃下で緩徐に転倒混和した。サンプルを細胞溶解バッファーで 5 回洗浄したのちに、免疫沈降された FLAG 融合タンパクは 3×FLAG ペプチド (Sigma Aldrich) で溶出した。2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95℃ 5 分間煮沸させたものを Western Blotting に用いた。

3-13 クロマチン免疫沈降法 (Chromatin IP ; ChIP)

ChIP に用いる細胞はすべて 5×10^5 個の MOCK および GTF2I ノックダウン細胞を 100mm dish に播種し、クロマチン安定化のため 2 日間インキュベートしたものを用いた。2 時間血清飢餓環境でインキュベートしたのち、TNFα 50 ng/mL の濃度で 60 分間刺激した。その後、37%ホルムアルデヒドを最終濃度 1%となるように添加したのち、

室温で 10 分間震盪させ細胞固定を行い、1.5 M グリシン 100 µL を加えて室温で 10 分間インキュベートし反応を停止させた。PBS で 2 回洗浄したのち 1 mL の PBS に懸濁し 3500 rpm、5 分間 4℃下で遠心分離して上清を取り除いた。その後、プロテアーゼ阻害剤およびフォスファターゼ阻害剤を含む SDS 細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 、10 mM EDTA (pH 8.0) 、1% SDS)を 500 µL で再懸濁し、適宜ボルテックス処理を施しながら 20 分間氷上でインキュベートした。抽出したクロマチンを超音波破砕機 Bioruptor UCD-250 (コスモバイオ) によって氷冷しながらソニケーション処理を施し (30 秒間隔で 5 分間×2 回) 、DNA を 200 bp 程度に断片化した。15000 rpm、 10 分間 4℃下で遠心分離した上清を 200 µL 回収した。Input サンプルとして、回収したサンプル 12 µL に対してエタノール沈殿を行い、DNA ペレットを得た。また、IP サンプルとして、回収したサンプル 120 µL に対して Dynabeads protein G (Life Technologies) と抗 p65 抗体およびコントロール IgG を添加し 4℃下で転倒混和しながら 2 時間反応させた。得られた Input サンプルおよび IP サンプルは 10% Chelex 100 (Bio-Rad) で処理させたのち Proteinase K (1 µg/mL、和光純薬)で残存する蛋白の溶出処理を行った。Proteinase K を 100℃ 10 分で失活化させたのち、抽出したクロマチンサンプルを核酸精製用シリカメンブレンスピンカラム EcoSpin IIa (GeneDesign) により精製した。得られたサンプルに対して、p65 のターゲット遺伝子として *IL-6*、*CCL2* および *CCL5* に対するプロモーター領域に対するプライマーを使用して qPCR を行なった。使用したプライマーの配列を表 2 に示す。

表 **2.** **p65** ターゲット遺伝子のプロモーター領域に対するプライマーリスト

Gene	**Sequence**		**PCR position**
IL-6	Forward	5’-CAAGACATGCCAAAGTGCTG-3’	-288 ~ -39
	Reverse	5’-TTGAGACTCATGGGAAAATCC-3’	
CCL2	Forward	5’-TGGCCCAGAGTAAGCACTAG-3’	+352 ~ +563
	Reverse	5’-TAAGTCGGCTGAGTCCTTGG-3’	
CCL5	Forward	5’-TGACAGCAACAAGTGTTTGG-3’	+886 ~ +1034
	Reverse	5’-GCATGTGCTGTCTCAGAGTCC-3’	

3-14 液体クロマトグラフィー質量分析

HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 p65 をトランスフェクションし、p65 抗体により免疫沈降を行なった。免疫沈降された FLAG 融合タンパクは 3×FLAG ペプチド (Sigma Aldrich) で溶出し、得られたサンプルを用いて SDS-PAGE を行なった。分離したゲル蛋白を syproruby 染色により可視化し、25 個のバンドを切り出した。切り出したバンドは In-Gel Tryptic Digestion Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてゲル内消化を行なった。得られたサンプルに対して LTQ linier ion-trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて質量分析を行なった。

3-15 ヒト唾液腺組織を用いた免疫組織化学染色

すべての患者検体は、原発性あるいは続発性の SS が疑われ確定診断のために北海道大学病院および共同研究期間である筑波大学附属病院において施行された口唇生検で得られた小唾液腺組織の余剰検体を使用した。本研究に際して、個々の患者からインフォームド・コンセントを取得しており、また本研究は北海道大学病院の倫理委員会によって承認された自主臨床研究『シェーグレン症候群患者の唾液腺及び末梢血における遺伝子発現およびウィルス感染、炎症増幅回路の活性化の解析 (臨床研究番号自 014-0466) 』および『シェーグレン症候群の唾液腺・末梢血における遺伝子発現および炎症回路の活性化の解析 (臨床研究番号 自 016-0478) 』の一環として実施した。

パラフィンに包埋された検体からミクロトームにより 5-8 μm 厚で切り出した切片を 40℃の蒸留水上に浮遊させた後、スライドガラスに切片を移し一昼夜乾燥させた。キシレンで脱パラフィンを行なった後、無水エタノールで検体を完全脱水させた。超純水で洗浄した後、抗原賦活化としてクエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) に浸して 10 分間煮沸させた。スライドガラスが室温に戻った後、超純水で洗浄し、内在性酵素の不活化として 3%過酸化水素水で 5 分間処理した。ブロッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories) を用いた標準プロトコールで行なった。一次抗体には抗リン酸化 p65 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体、抗 GTF2I 抗体を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質としては 3,3’-Diaminobenzidine (DAB) (ImmPACT^{TM} DAB Peroxidase Substrate Kit、Vector Laboratories) を用いた。

3-16　GTF2I の SNP シーケンスおよび isoform 発現

すべての患者検体は、原発性あるいは続発性の SS が疑われ確定診断のために北海道大学病院および共同研究期間である筑波大学附属病院において施行された口唇生検で得られた余剰検体を使用した。本研究に際して、個々の患者からインフォームド・コンセントを取得しており、また本研究は北海道大学病院の自主臨床研究事務局によって承認された自主臨床研究『シェーグレン症候群患者の唾液腺及び末梢血における遺伝子発現およびウィルス感染、炎症増幅回路の活性化の解析 (臨床研究番号 自 014-0466) 』および、北海道大学病院の自主臨床研究事務局、並びに共同研究機関である筑波大学附属病院の倫理委員会により承認された自主臨床研究『シェーグレン症候群の唾液腺・末梢血における遺伝子発現および炎症回路の活性化の解析 (臨床研究番号 自 016-0478) 』の一環として実施した。

摘出された唾液腺生検組織は速やかに PAXgene® Tissue Container (QIAGEN) の中に投入され 2-4 時間の間、室温下で反応させた。その後生検組織を取り出し PAXgene Tissue Stabilizer (QIAGEN) の中に投入し使用するまで-20℃で保存した。

Stabilizer の中に保存された組織の一部 (6 mg 相当量) を分割切除し、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA、ゲノム DNA として抽出した。

抽出されたゲノム DNA に対して、*GTF2I* 遺伝子内の intron 領域に存在する intronic SNP (rs117026326) 、および *GTF2I* と *GTF2IRD1* の遺伝子間に存在する intergenomic SNP (rs73366469) の有無を確認する目的で PCR を施行した。使用したプライマーの配列は表 3 に示す。ゲノム DNA 200 ng に対して、KOD Fx (東洋紡ライフサイエンス) を用いて PCR を行い SNP 前後 500 bp 程度の塩基長を増幅させたのち、PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Cean-Up System (Promega) を用いて精製した。精製した PCR 産物に対して BigDye® Terminator v3.1 Cycle Squencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス PCR を行なった。

抽出された RNA は SuperScript®III (Invitrogen) を用いた標準プロトコールで逆転写し cDNA を合成したのち、GTF2I の各 splicing variant (variant 1- variant 4) を特異的に認識するプライマーを用いて qPCR を行い、すべての isoform を含む GTF2I (pan-GTF2I) の発現に対するそれぞれの isoform の存在比を ΔΔCt 法により算出した。qPCR に用いたプライマーを表 4 に示す。

表 **3.** **GTF2I** に関連する **SNP** を検出するためのプライマーリスト

SNP	**Sequence**	
rs117026326	Forward	5’-AGGATGAGCAAAAGTTGTGGCACA-3’
	Reverse	5’-CTATGTCCACACAAAAGCCTCTAC-3’
rs73366469	Forward	5’-AGAATCGTGGCTCCGAAAGTAGGGTTGC-3’
	Reverse	5’-GGTGCTGGGAACTAGTGCGATGAATGAC-3’

表 **4.** **GTF2I** の各 **isoform** に対する特異的プライマーリスト

isoform	**Sequence**	
isoform 1	Forward	5’-CAGGCCCTTCTGAAACTGATGATG-3’
	Reverse	5’-CCTCACTTGTTTCTGAAGGGACATG-3’
isoform 2	Forward	5’-CCTGATTATTATCAATATAACATTCAAGGAAGCCACC-3’
	Reverse	5’-CCTCACTTGTTTCTGAAGGGACATG-3’
isoform 3	Forward	5’-CAGGCCCTTCTGAAACTGATGATG-3’
	Reverse	5’-GGTGGAGAATAATCATCATCTTCTGCTGG-3’
isoform 4	Forward	5’-CCTGATTATTATCAATATAACATTCAAGGAAGCCACC-3’
	Reverse	5’-GGTGGAGAATAATCATCATCTTCTGCTGG-3’

3-17 統計処理

実験データは平均値±標準偏差 (Mean±SD) あるいは平均値±標準誤差 (Mean±SEM) で示した。本研究では、実験データにおける 2 群間の有意差検定に Student's t test (t 検定) を用いた。また、患者データの統計学的処理に関しては、Fisher's exact test 及び Mann-Whitney U test を用いた。 p 値は 0.05 未満のものを有意とし、* $p < 0.05$、** $p < 0.01$、及び *** $p < 0.001$ で示した。

4. 結果

4-1 GTF2I は炎症アンプを正に制御する

まず、SS の疾患関連遺伝子かつ炎症アンプ関連遺伝子として抽出された遺伝子 *GTF2I* の炎症アンプへの関与を明らかにするために、*GTF2I* ノックダウン細胞を作出した。すなわち、マウス BC-1 細胞に *GTF2I* shRNA および nontarget shRNA を含むレンチウィルスを感染させ、puromycin による薬剤セレクションを行い、それぞれ *GTF2I* ノックダウン細胞 (sh1 および sh2) 、およびコントロール細胞 (MOCK) を得た。それらの細胞について、qPCR 法を用いて *GTF2I* の mRNA 発現を測定することでノックダウン効率を確認した (図 1) 。また、MOCK 及び *GTF2I* ノックダウン細胞を用いた Western blotting により、ノックダウン細胞において GTF2I 蛋白質の産生が抑制されていることを併せて確認した (図 2) 。

次に、炎症アンプへの関与について、IL-6 と IL-17 のサイトカイン刺激により誘導される *IL-6* の mRNA 発現量を qPCR 法で測定し、*GTF2I* のノックダウンにより *IL-6* の mRNA の発現誘導が抑制されることを確認した (図 1) 。同様に、*GTF2I* ノックダウン細胞では MOCK と比べて IL-6 の産生も抑制されることを ELISA 法により確認した (図 3) 。また、同時に MTT アッセイを用いて細胞増殖を評価することにより、*GTF2I* ノックダウン細胞における IL-6 の産生低下は細胞増殖に影響されるものではないことを確認した (図 3) 。

さらに *in vivo* での検討として、F759 マウスにおける関節炎誘導実験を行なった。すなわち、*GTF2I* shRNA あるいはコントロール shRNA (scrambled sequence) を F759 マウスの関節腔に投与後、炎症アンプを活性化する IL-6 および IL-17 を同様に関節腔に投与することでサイトカイン誘導性関節炎を発症させた。その結果、*GTF2I* shRNA を投与したマウスにおいて、関節炎の病態が有意に抑制された (図 4) 。

マウス由来細胞、およびマウス個体における *GTF2I* のサイレンシングによる炎症誘導の抑制は確認できたが、ヒト由来の細胞ではどうであろうか。そこで、ヒト唾液腺細胞 (HSG 細胞) に対して siRNA による *GTF2I* ノックダウンを行い、各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を確認した。その結果、マウス由来細胞と同様、HSG 細胞でも同様に、*CXCL2*、*CCL2*、*CCL5*、及び *CCL20* などの炎症メディエーターの mRNA の発現が有意に抑制された (図 5) 。これらの結果は、GTF2I が炎症アンプに強く関与する遺伝子であり、かつそれは動物種に依存するものではないことを示唆する。

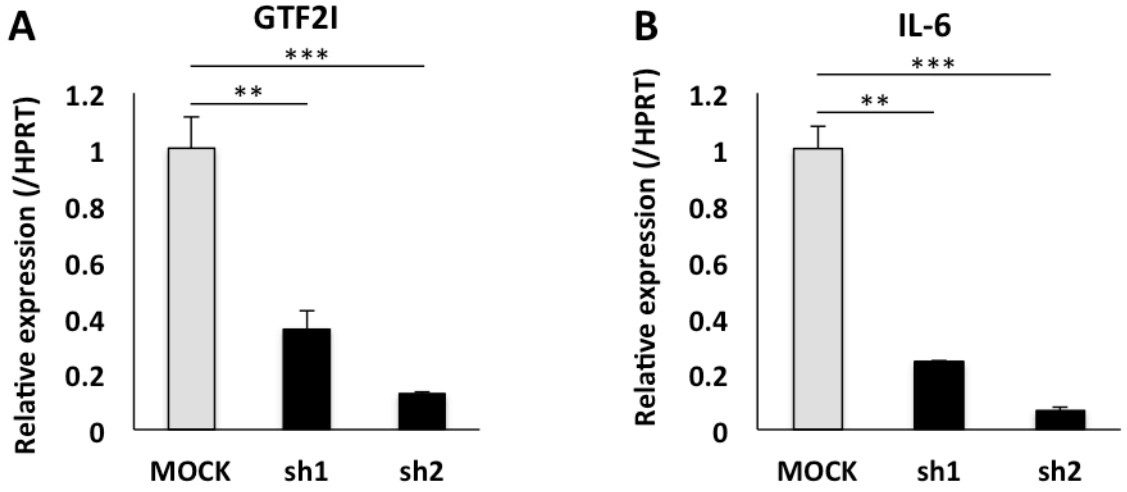


図 1 マウス血管内皮細胞における *GTF2I* ノックダウンによる *IL-6* mRNA の発現変化

(A) lentivirus による *GTF2I* shRNA をマウス血管内皮細胞である BC-1 細胞へ感染させ 2 クローンの *GTF2I* ノックダウン細胞を作出した。同様に、non-target shRNA を用いてコントロール細胞 (MOCK) を作出した。*GTF2I* の mRNA を qPCR 法で測定することによりノックダウン効率を確認した。 (B) MOCK、及び *GTF2I* ノックダウン細胞に対して IL-6 + IL-17 で刺激した後の、*IL-6* の mRNA 発現を qPCR により比較した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差をハウスキーピング遺伝子 *HPRT* に対する相対量で示す。** 及び *** は、t 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.01、及び 0.001 未満のものを示す。

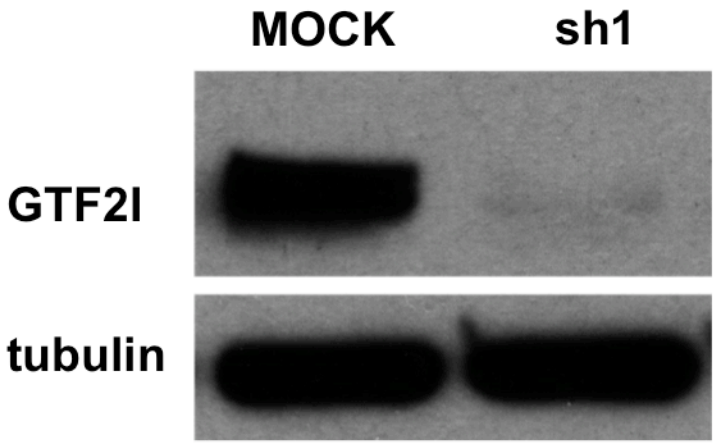


図 2　Western blotting による GTF2I ノックダウンの検証

BC-1 細胞から樹立された *GTF2I* ノックダウン細胞 (sh1) 及び MOCK 細胞を融解し、SDS-PAGE で蛋白質を分離したのち PVDF 膜へ転写し、抗 GTF2I 抗体、及び内部コントロールとして抗 tubulin 抗体を用いてそれぞれの蛋白質を検出した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。

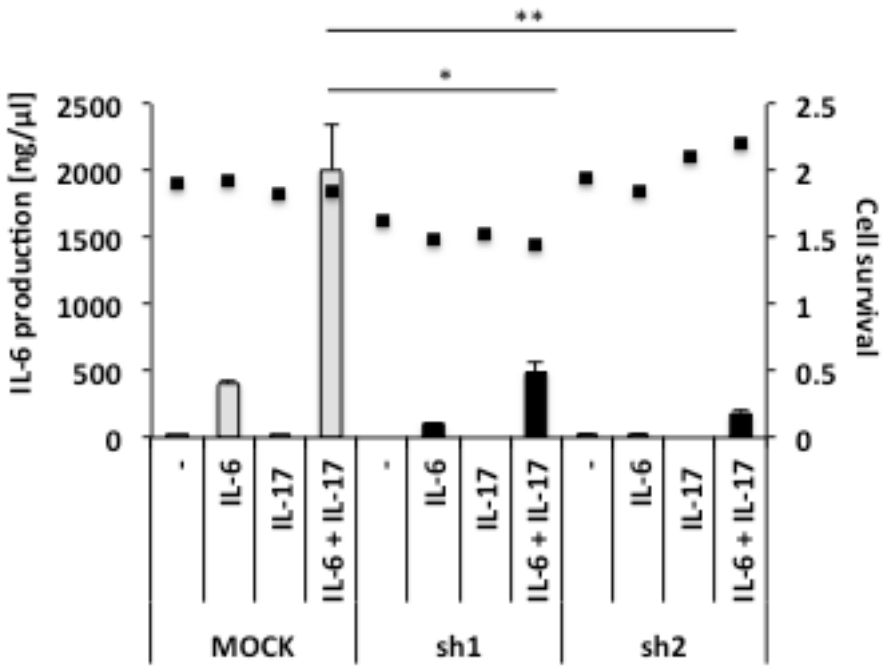


図 3　マウス血管内皮細胞における *GTF2I* ノックダウンによる IL-6 産生の変化

MOCK 及び *GTF2I* ノックダウン細胞において、ヒト IL-6 + IL-17 による刺激後のマウス IL-6 の産生を ELISA 法により比較した (左軸) 。併せて、細胞の生存率について MTT アッセイにより評価した (右軸) 。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。* 及び ** は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、及び 0.01 未満のものを示す。

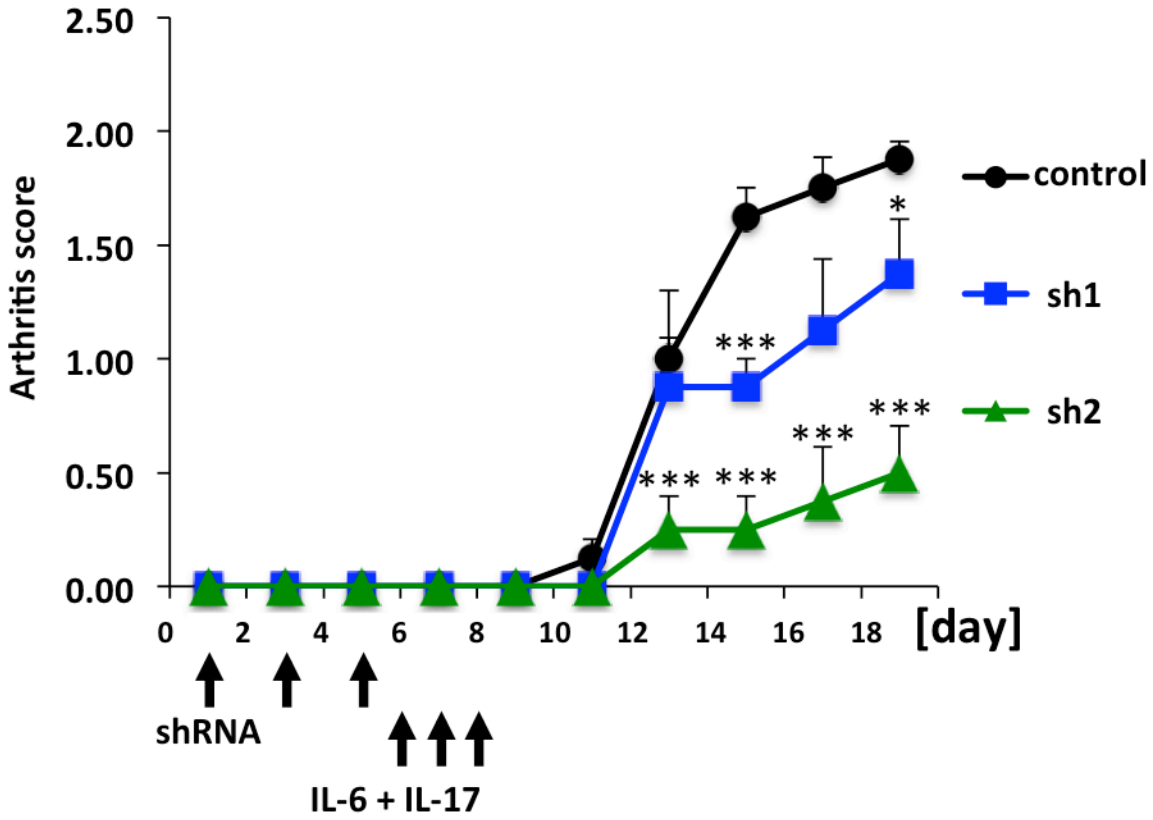


図 4　*GTF2I* shRNA の関節注射による関節炎の抑制

F759 マウスの後肢踵関節腔に non-target shRNA 及び *GTF2I* shRNA を day 1、day 3 および day 5 に注入し、引き続いて day 6、day 7、及び day 8 に IL-6 (100 ng) 及び IL-17 (100 ng) を同関節腔に注入し、各個体について関節炎スコアを評価した (n=3)。データは平均値と標準誤差を示す。* 、** 及び *** は、t 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.01、及び 0.001 未満のものを示す。

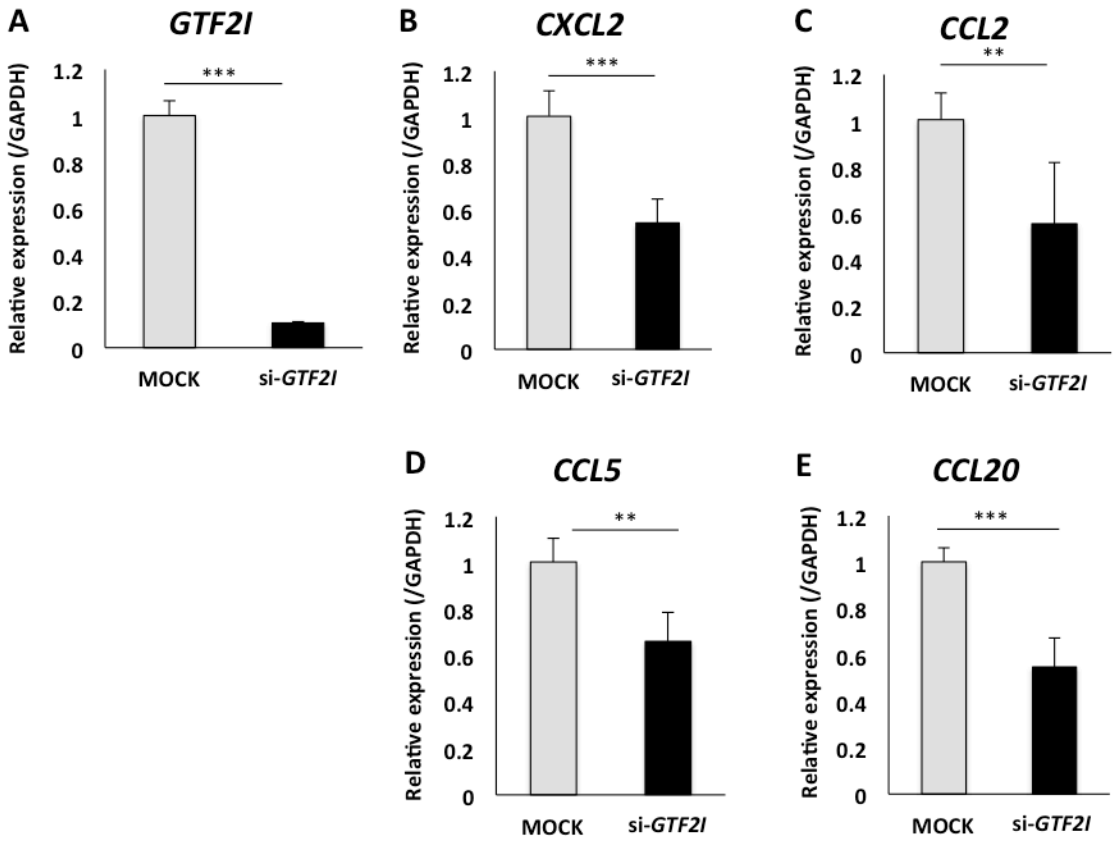


図 5　ヒト唾液腺細胞における *GTF2I* ノックダウンと各種炎症性ケモカイン mRNA の発現変化

(A) ヒト唾液腺細胞 (HSG 細胞) に *GTF2I* siRNA 及び scramble siRNA をトランスフェクションし *GTF2I* の一過性ノックダウン細胞を作出した。 (B-E) コントロール細胞と *GTF2I* ノックダウン細胞に対して IL-6 + IL-17 で刺激した後の、各種炎症性ケモカインの mRNA 発現を qPCR 法により測定した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸はハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* に対する相対量を表す。** 及び *** は、t 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.01、及び 0.001 未満のものを示す。

4-2　GTF2I は NF-κB 経路に関与する

つぎに、GTF2I が NF-κB 経路と STAT3 経路のどちらに強く関係しているかについて調べた。NF-κB 経路の標的遺伝子である *LCN2* と STAT3 の標的遺伝子である *STAT3* について、サイトカイン刺激後の発現誘導を qPCR 法で確認した。その結果、*GTF2I* ノックダウン細胞では MOCK に比べて *LCN2* の mRNA 発現が有意に抑制される一方、*STAT3* の mRNA 発現は変化が認められないことが明らかになった (図 6) 。また、GTF2I 強制発現下における p65 及び IL-6 のプロモーター活性をレポーターアッセイにより評価したところ、いずれも GTF2I の遺伝子導入に伴いプロモーター活性が上昇することがわかった (図 7) 。これらの結果は、GTF2I が NF-κB 経路に強く関与していることを示唆する。

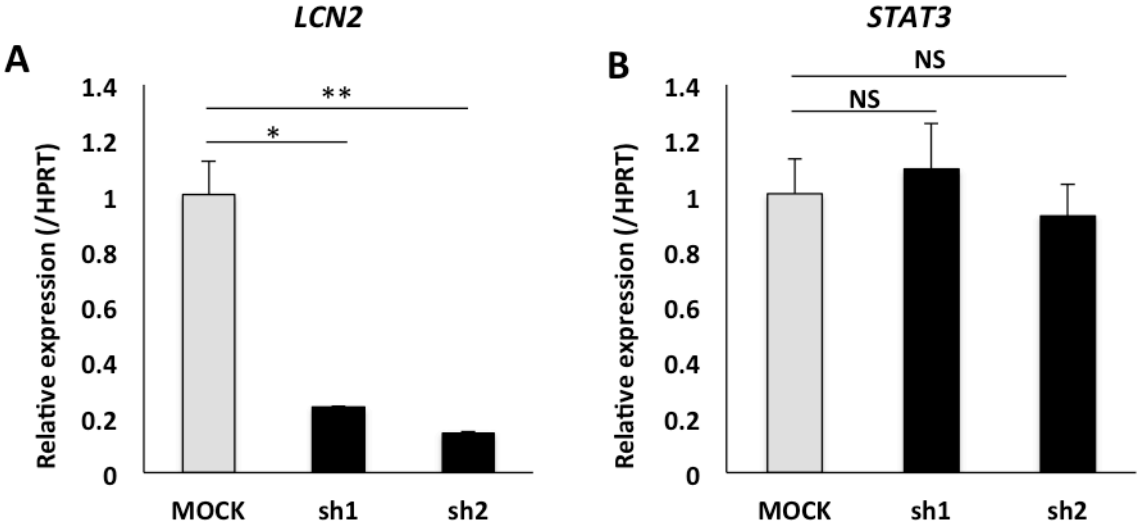


図 6　*GTF2I* ノックダウン細胞における NF-κB 標的遺伝子及び STAT3 標的遺伝子の mRNA 発現の変化

(A) BC-1 細胞から作出した *GTF2I* ノックダウン細胞及びコントロール細胞に対して、IL-6 + IL-17 で刺激をした後の、NF-κB 経路の標的遺伝子である *LCN2* の mRNA 発現を qPCR により測定した。 (B) BC-1 細胞から作出した *GTF2I* ノックダウン細胞及びコントロール細胞に対して、IL-6 + IL-17 で刺激をした後の、STAT3 経路の標的遺伝子である *STAT3* の mRNA 発現を qPCR 法により測定した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸はハウスキーピング遺伝子 *HPRT* に対する相対量を表す。* 及び ** は、t 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、及び 0.01 未満のものを示す。

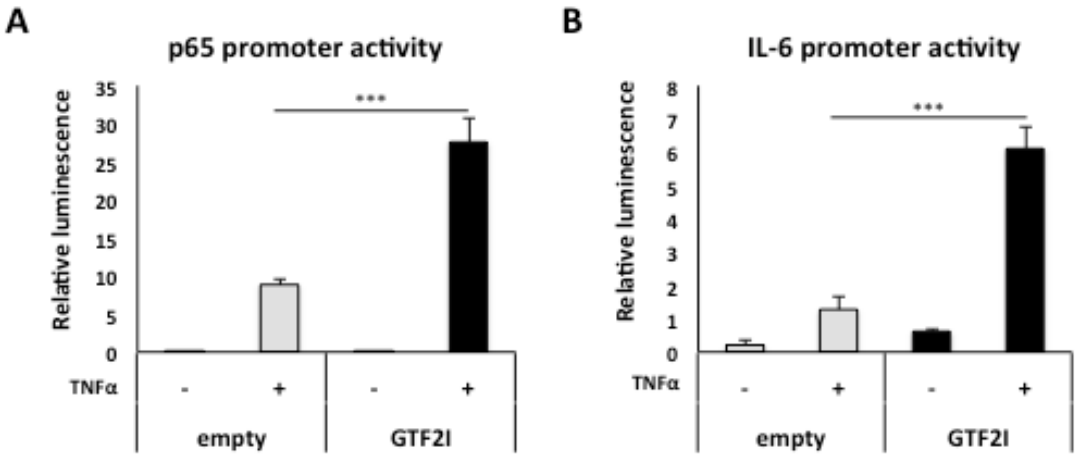


図 7　GTF2I の強制発現下におけるレポーターアッセイ

(A) HEK293T 細胞へ GTF2I をトランスフェクションし、p65 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。 (B) HEK293T 細胞へ GTF2I をトランスフェクションし、IL-6 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。 データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。** 及び *** は、t 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.01、及び 0.001 未満のものを示す。

4-3　GTF2I は細胞質においては NF-κB 経路の活性化には影響を及ぼさない

NF-κB 経路は IL-1、IL-17、TNFα、あるいは LPS などさまざまな炎症性サイトカインやストレスにより活性化することが知られている。NF-κB 経路において転写活性を有する分子として重要なものの一つが p65 分子である。p65 は細胞質では IκBα と結合し非活性化した状態で存在するが、先述したような刺激により IκB キナーゼ (IKK) 複合体のリン酸化を経て IκBα がリン酸化を受け、その結果プロテアソーム系により分解される。IκB が分解された p65 分子はリン酸化により活性化し、核局在シグナルが露出することにより核内へ移行し転写活性を有するようになる [24 25 26]。そこで、まず MOCK 及び *GTF2I* ノックダウン細胞に TNFα による刺激を加え、IκBα および p65 のリン酸化及び分解について経時的に評価した。その結果、*GTF2I* のノックダウンは、IκBα や p65 のリン酸化には影響を及ぼさないことが確認された (図 8) 。さらに、共焦点顕微鏡を用いた観察においても、TNFα 刺激後の p65 の核内移行は MOCK と *GTF2I* ノックダウン細胞の間に違いは認められなかった (図 9) 。これらの結果から、GTF2I は細胞質での NF-κB 経路の活性化には影響を及ぼしていないことが明らかになった。

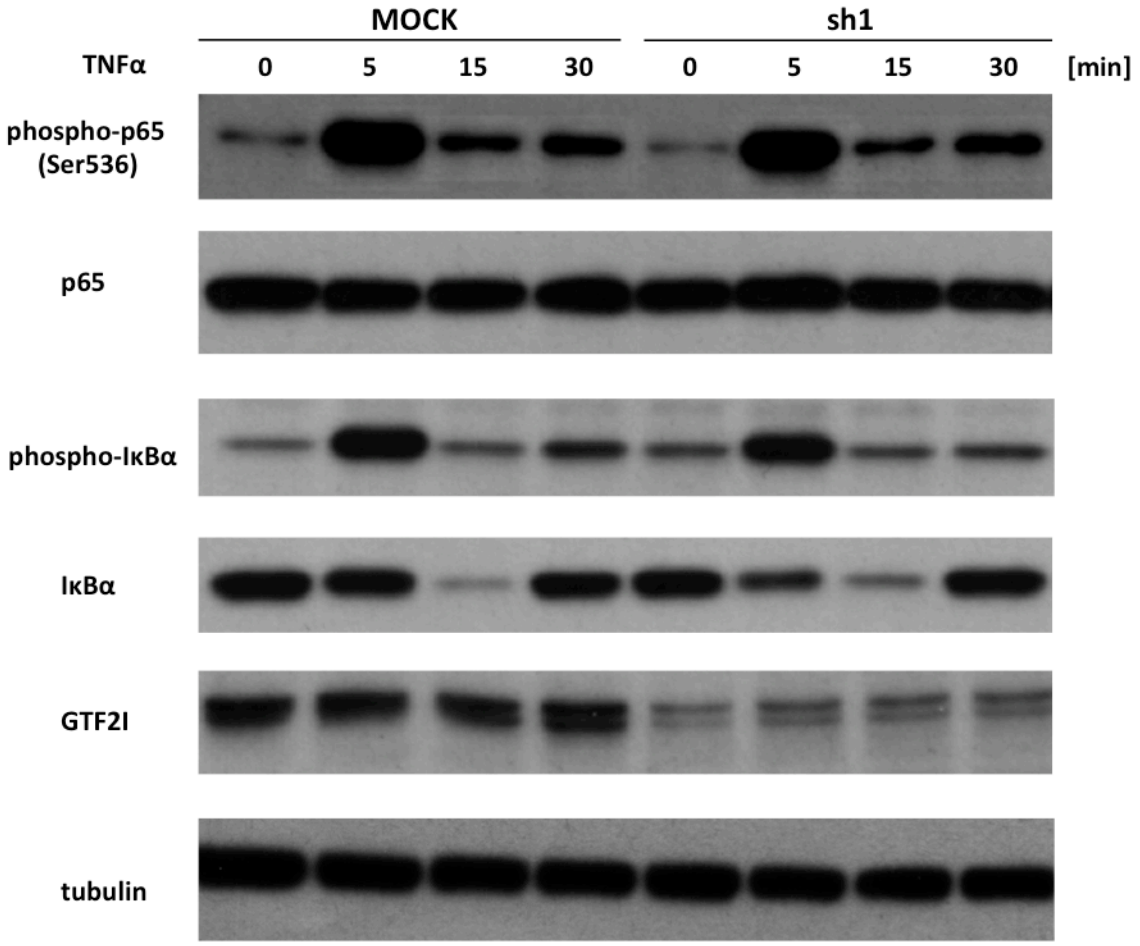


図 8　*GTF2I* ノックダウンによる p65、IκBαのリン酸化の変化

GTF2I ノックダウン細胞、及び MOCK 細胞に TNFα (50 ng/mL) で刺激を加えた。刺激後 0、5、15、及び 30 分に細胞を溶解し、細胞質分画を回収した。それらのサンプルについて、western blotting により、p65、IκBαのリン酸化状態の経時的な変化を評価した。3 回以上の独立した実験結果のうち代表的なデータを示す。

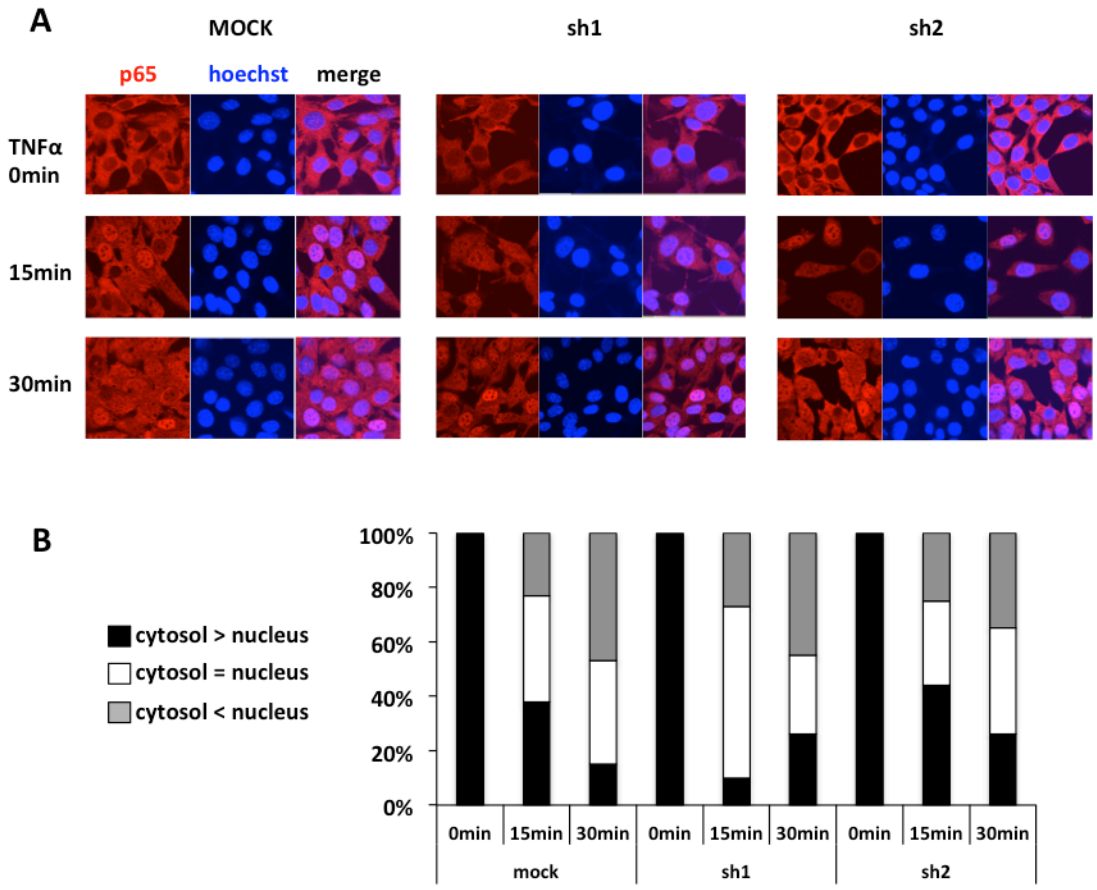


図 9　*GTF2I* ノックダウンによる p65 の核内移行の変化

(A) *GTF2I* ノックダウン細胞及び MOCK 細胞に対して 24 時間の血清飢餓状態の後、TNFαで刺激を行い p65 の核内移行について共焦点顕微鏡で観察した。hoechst は核染色を示す。(B) (A) の結果について、各サンプルにおいて細胞 500 個以上について p65 の核内移行の有無を計測し定量化した。

4-4　GTF2I は核内において p65 のプロモーター領域への結合に関与する

GTF2I には二つの核局在シグナルが存在することが報告されている[27]。NF-κB 経路の活性化により GTF2I の局在が影響を受けるかどうかを確認するため、ヒト滑膜細胞およびヒト唾液腺細胞において免疫蛍光染色を行なった。その結果、24 時間という長時間の血清飢餓の条件下においても、いずれの細胞でも GTF2I の大部分は核内に存在した (図 10、11) 。すなわち、GTF2I はこれらの細胞においては定常状態においてその大部分がすでに核内に存在することが明らかとなった。

p65 は TNFαや IL-1 あるいは IL-17 などのサイトカイン刺激により核へ移行したのち、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する κB element に結合し転写活性を有する。MOCK 及び *GTF2I* ノックダウン細胞を用いた ChIP アッセイの結果から、*GTF2I* ノックダウン細胞では p65 の *IL-6*、*CCL2* および *CCL5* などの標的遺伝子のプロモーター領域への結合が著明に抑制された (図 12-14) 。これらの結果からは、GTF2I は核内において p65 のプロモーター領域への結合に関与していると考えられる。

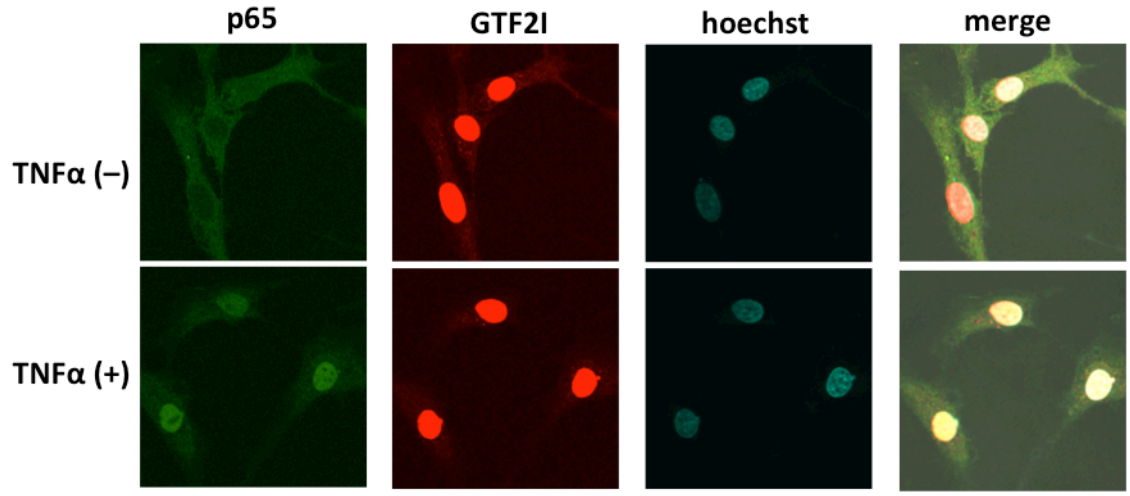


図 10　ヒト滑膜細胞における GTF2I の局在

ヒト滑膜細胞を 24 時間血清飢餓状態でインキュベートした後、TNFα刺激の有無による GTF2I の局在の変化について蛍光組織化学染色により確認した。細胞核は hoechst で染色した。

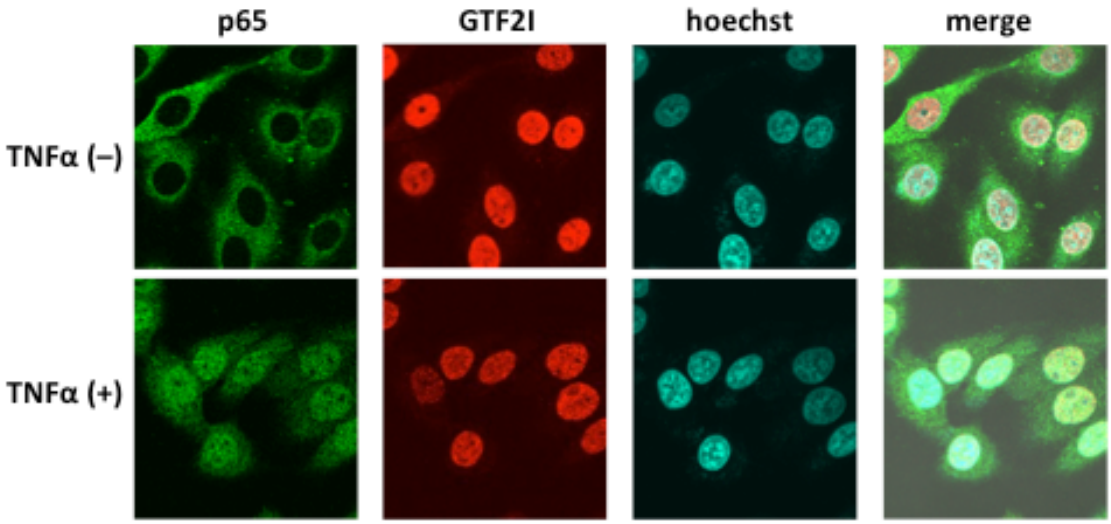


図 11　HSG 細胞における GTF2I の局在

HSG 細胞を 24 時間血清飢餓状態でインキュベートした後、TNFα刺激の有無による GTF2I の局在の変化について蛍光組織化学染色により確認した。細胞核は hoechst で染色した。

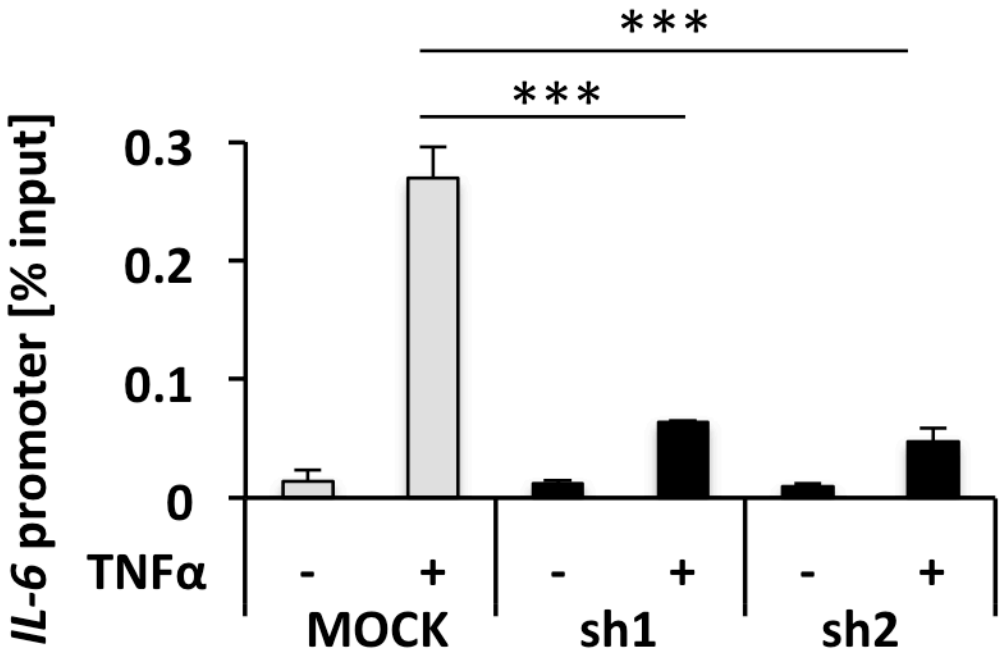


図 12　p65 の *IL-6* プロモーター領域へのリクルートメント

MOCK 細胞及び *GTF2I* ノックダウン細胞を用いて、p65 の *IL-6* プロモーター領域へのリクルートメントを ChIP アッセイにより評価した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は Input に対する相対量を表す。*** は、t 検定で比較した際の *p* 値が 0.001 未満のものを示す。

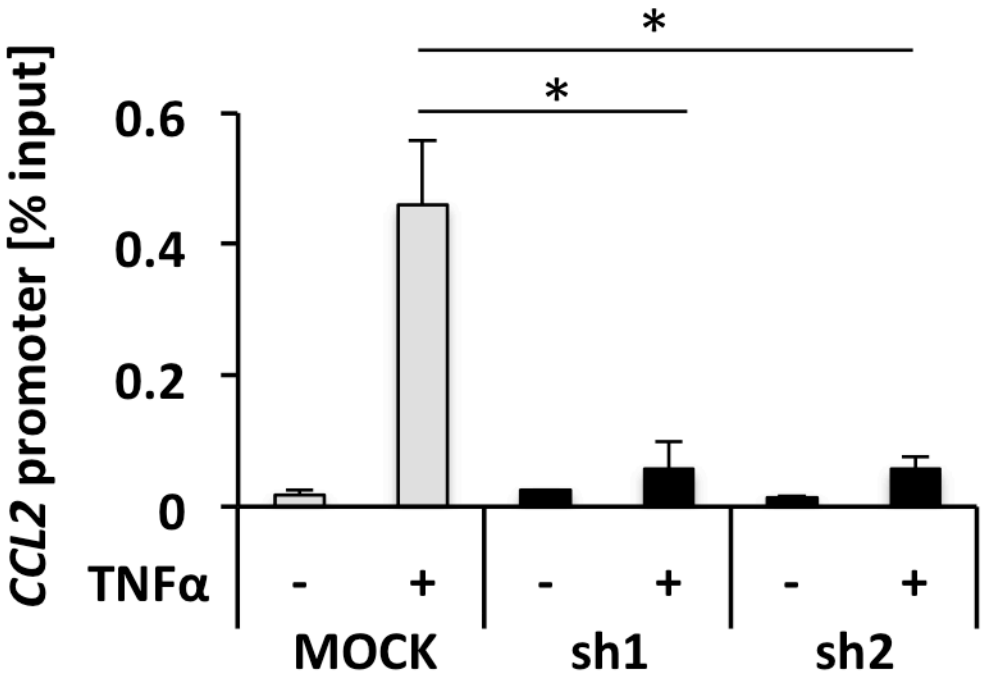


図 13　p65 の *CCL2* プロモーター領域へのリクルートメント

MOCK 細胞及び *GTF2I* ノックダウン細胞を用いて、p65 の *CCL2* プロモーター領域へのリクルートメントを ChIP アッセイにより評価した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は Input に対する相対量を表す。* は、t 検定で比較した際の *p* 値が 0.05 未満のものを示す。

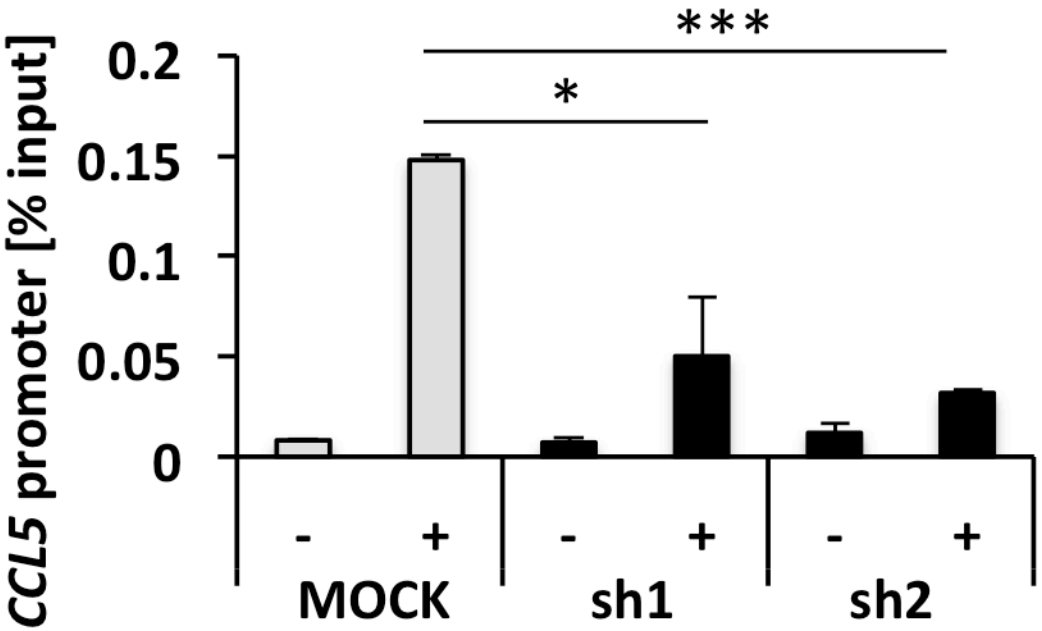


図 14　p65 の *CCL5* プロモーター領域へのリクルートメント

MOCK 細胞及び *GTF2I* ノックダウン細胞を用いて、p65 の *CCL5* プロモーター領域へのリクルートメントを ChIP アッセイにより評価した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は Input に対する相対量を表す。* 及び *** は、t 検定で比較した際の *p* 値がそれぞれ 0.05、0.001 未満のものを示す。

4-5　GTF2I は Leucine zipper domain を介して p65 と会合する

これまでの結果から、GTF2I が細胞質ではなく、核内において NF-κB 経路の活性化に関与していることが明らかになった。そこで次に、GTF2I と p65 の結合について調べた。

まず、HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 p65 を強制発現させ、その細胞溶解液を FLAG ビーズで免疫沈降を行なった。得られたサンプルを SDS-PAGE で蛋白分離し、syproruby 染色で可視化されたバンドの一つに対して液体クロマトグラフィー質量分析を行なった結果、GTF2I と p65 が相互作用を有する可能性が高いことが示された (表 5) 。実際に、HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 GTF2I をトランスフェクションし、FLAG で免疫沈降ののち抗 p65 抗体で western blotting を行うことで、GTF2I と p65 が会合することを確認した (図 15) 。p65 は、N 末端側にある Rel homology domain (RHL) と C 末端側に存在する転写活性領域 (transactivation domains ; TA1, TA2) を有することが知られている [28]。そこで、図 16 に示すような p65 の欠失変異体 (deletion mutant) を作成しそれぞれにおいて GTF2I との相互作用の有無について確認した。その結果、GTF2I は p65 の RHD を介して会合することが明らかになった (図 17) 。一方、GTF2I において p65 との会合に重要な領域はどこであろうか。GTF2I は図 18 に示すような構造をもつ。すなわち、N 末端側の Leucine zipper domain (LZ) 、二つの核局在シグナル (Nuclear localizing signal ; NLS) 、Basic region (BR) 、そして 6 つの繰り返す特徴的な I-repeat domain (R1-R6) が存在する。LZ は GTF2I の二量体の形成に、また I-repeat domain は Helix-loop-helix モチーフを有し DNA への結合にそれぞれ重要な領域と報告されている [29]。LZ を欠損させた GTF2I の欠失変異体を作成し免疫沈降を行なった結果、GTF2I の p65 との会合においては LZ が必須のドメインであることが明らかになった (図 19) 。

表 5.　液体クロマトグラフィー質量分析による p65 結合蛋白質のリスト

Scan (s)	Abbreviation	peptide	P(pro) : p(pep)	Score : XC	m.W : Sp	Accession : RSp	Peptide (Hits) : Ions
1	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A/1B	1.00E-30	246.38	70009.2	194248072	39 (34 5 0 0 0)
2	TUBB4	Tubulin, beta 4, isoform CRA_b	1.11E-15	26.34	54432.4	119589485	4 (2 1 1 0 0)
3		Transcription factor p65 isoform 2	4.44E-15	288.29	59872.4	223468681	191 (177 8 3 3 0)
4	GTF2I	General transcription factor II-I	1.55E-14	148.24	112346.2	17865459	18 (17 1 0 0 0)
5		hCG2042771	5.72E-14	30.33	88324.5	119587079	5 (5 0 0 0 0)
6	HSPH1	Heat shock protein 105kDa (HS105)	9.77E-14	170.29	96803.6	2495344	21 (21 0 0 0 0)
7	CTPS	CTP synthase isoform CRA-a	1.05E-13	20.28	66648.1	119627598	2 (2 0 0 0 0)
8	SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1)	1.30E-13	140.28	145738.0	269849656	14 (14 0 0 0 0)
9	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	1.57E-13	316.28	96689.1	119570091	53 (52 0 1 0 0)
10	SMARCC1	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	4.86E-13	60.31	122790.2	209572723	6 (6 0 0 0 0)

SDS-PAGE で得られたバンドのうち、GTF2I が含まれると想定される部分のバンドを切り出し質量分析に用いた。その結果のうち、p65 と会合すると想定される蛋白質の候補の上位 10 番目までをリスト化した。P (pep) , probability value for the peptide ; P (pro) , probability value for the protein; RSp, ranking of the particular match during preliminary scoring; Sp, preliminary scoring; XC, cross-correction

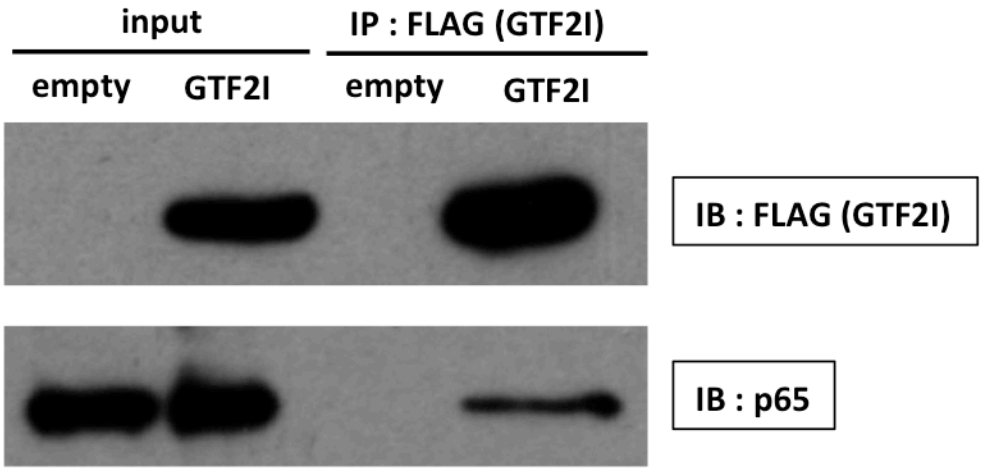


図 15　GTF2I と p65 の結合

HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 GTF2I をトランスフェクションしたのち細胞を溶解し全細胞分画を回収した。得られた細胞溶解液を protein G でプレクリアした後、FLAG ビーズで免疫沈降を行なった後、FLAG ペプチドで溶出させた。得られたサンプルを SDS-PAGE により蛋白質を分離し、p65 を抗 p65 抗体で検出し、GTF2I との結合の有無を確認した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。

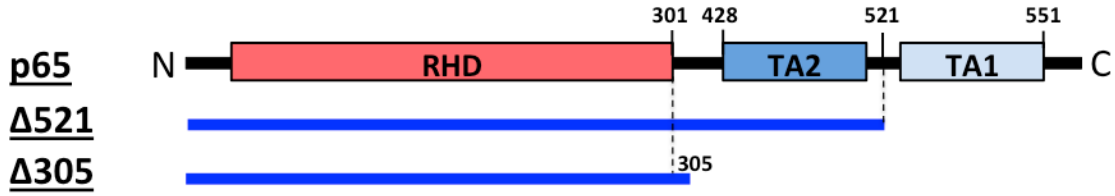


図 16　p65 の構造と p65 の欠失変異体の作成

p65 は N 末端側に Rel homology domain (RHD) 、及び C 末端側に二つの transcription activation domain (TA1, TA2) を有する。TA1、及び TA1 と TA2 の両方をそれぞれ欠失した変異体 (Δ521、Δ 305) を作成した。p65 及び欠失変異体の構造のシェーマを上に示す。

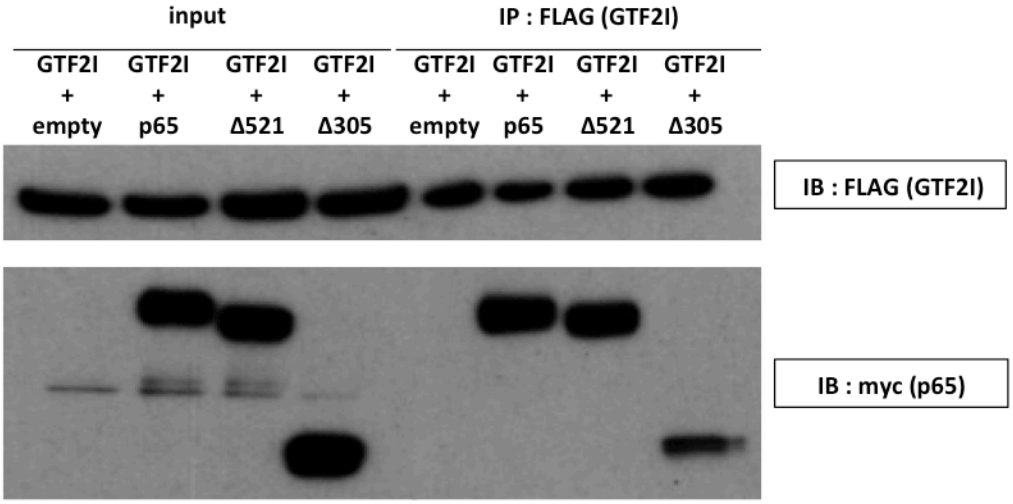


図 17　GTF2I と p65 及び p65 欠失変異体との結合

HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 GTF2I と Myc タグ融合 p65、及び p65 欠失変異体をトランスフェクションした。細胞を溶解し、protein G でプレクリアした後、FLAG ビーズで免疫沈降を行い、GTF2I と p65 その欠失変異体との結合の有無を western blotting により確認した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。

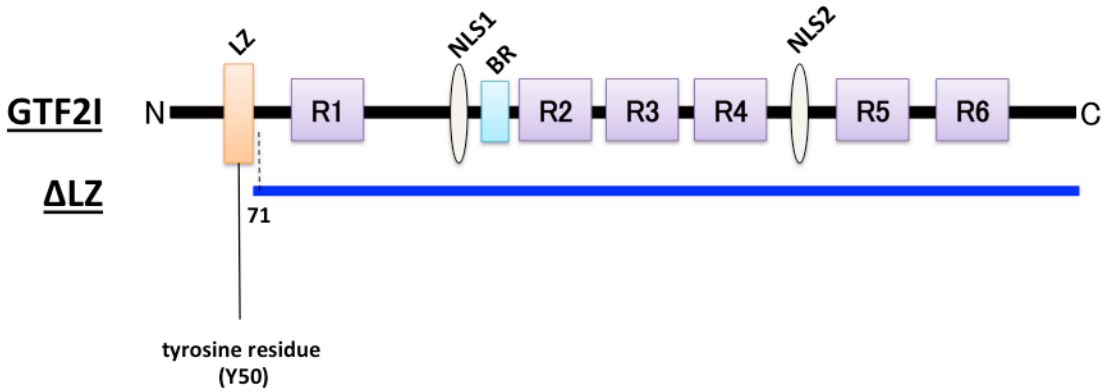


図 18　GTF2I の構造と GTF2I の欠失変異体の作成

GTF2I は N 末端側に存在する Leucine zipper domain (LZ) 、2 つの neuclear localization signal (NLS) 、basic region (BR) 、及び 6 つの I-repeat domain (R1-R6) より構成される。GTF2I の構造及び LZ の欠失変異体 (ΔLZ) のシェーマを上に示す。また、図には示さないが、LZ 内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) およびアルギニンに置換した変異体 (Y50R) 、そして Y248、Y398 および Y503 をフェニルアラニンに置換した変異体も作成した。

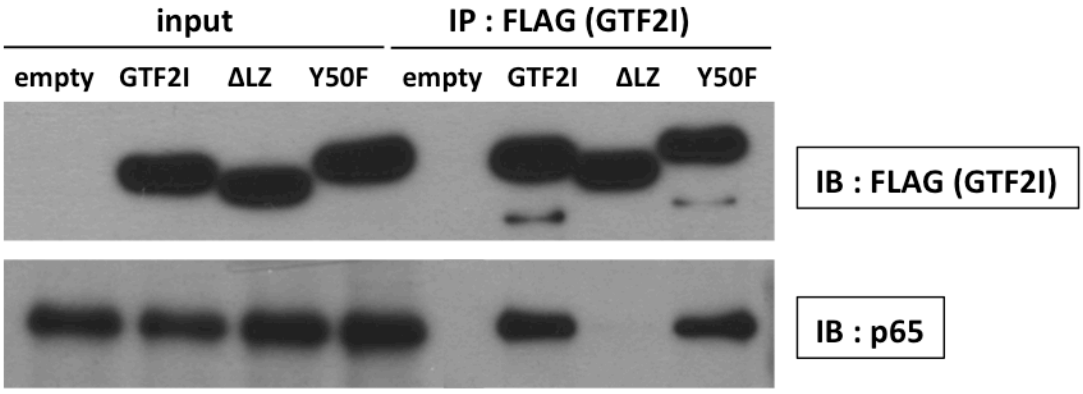


図 19　GTF2I 及び GTF2I の欠失変異体と p65 との結合

HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 GTF2I 及びその欠失変異体をトランスフェクションした。細胞を溶解し、protein G でプレクリアした後、FLAG ビーズで免疫沈降を行い、GTF2I およびその欠失変異体と p65 との結合の有無を western blotting により確認した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。

4-6　GTF2I の Leucine zipper domain に存在するチロシン残基は p65 の転写活性に重要である

既報において、GTF2I は B 細胞においては Bruton's tyrosine kinase　(BTK) によりチロシンリン酸化修飾を受けて二量体を形成し核内へ移行することが報告されている [30]。その他にも、GTF2I のチロシンリン酸化は、その基本転写因子としての機能を発揮するうえで極めて重要な反応であることが報告されている。そこで、LZ において唯一認められるチロシン残基である、50 番目のチロシン残基 (Y50) をフェニルアラニンに置換した変異体 (Y50F) を作成したところ、同変異体は p65 とは会合するが p65 プロモーター活性の増加には寄与しないことが明らかとなった (図 19、20) 。さらに、wild type (WT) の GTF2I と Y50F 変異体を cotransfection することによる p65 のプロモーター活性を評価したところ、WT の GTF2I 存在下では Y50F の導入量依存的に p65 プロモーター活性は上昇した (図 21) 。また、チロシン残基の constitutive active form として Y50 をアルギニン (R) に変異させた Y50R 変異体を作成したところ、WT と比較して p65 プロモーター活性が上昇することが明らかになった (図 22) 。これは GTF2I が二量体を形成するため、WT の GTF2I が存在すれば Y50F 変異体も二量体を形成でき、すなわち核内へ移行し基本転写因子としての働きを得ることができると考えられる。さらに、既に報告されている GTF2I の重要なチロシンリン酸化部位として Y248、Y398 および Y503 があるが [30]、これらをフェニルアラニンに変異させた constitutive inactive form はいずれも p65 プロモーター活性を変化させなかった (図 23) 。これらの結果から、GTF2I は LZ を介して p65 と会合し、特に GTF2I の LZ 領域内のチロシン残基 (Y50) は、新規に同定された NF-κB 活性化に重要なチロシンリン酸化部位であると考えられる。

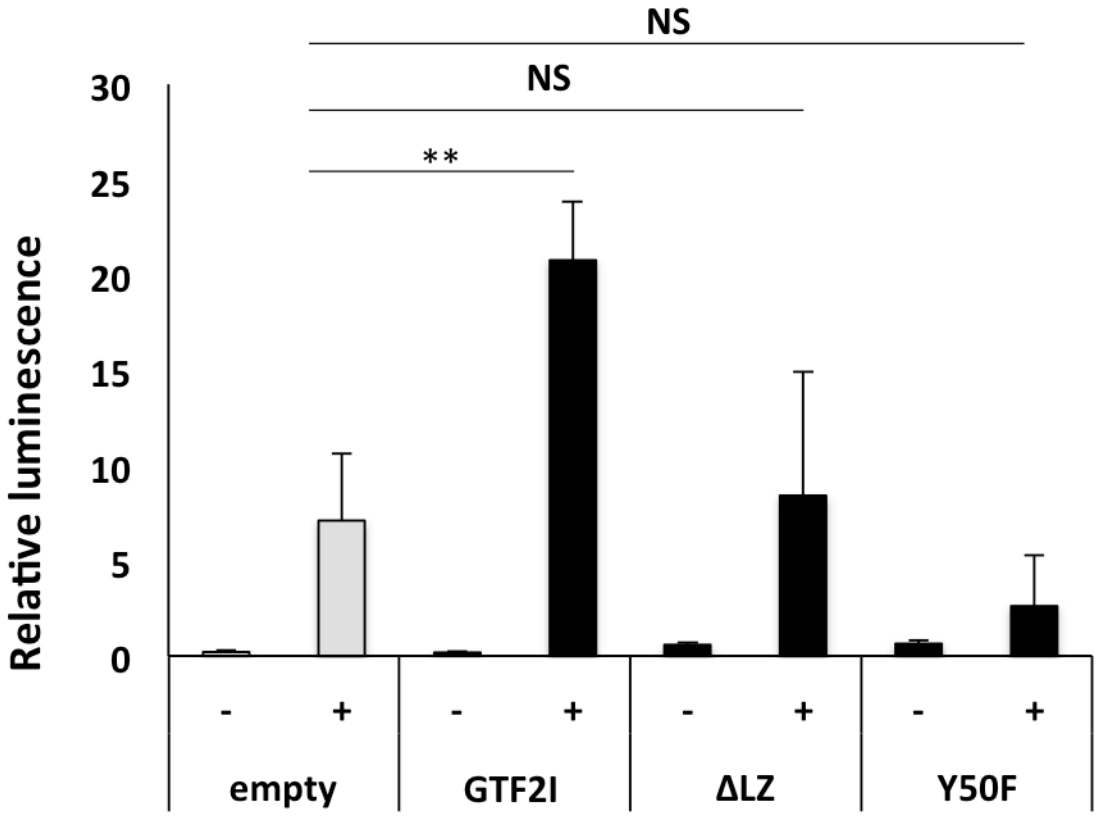


図 20　GTF2I 及びその欠失変異体の強制発現下における p65 プロモーター活性の変化

HEK293T 細胞へ GTF2I 及びその欠失変異体 (ΔLZ、Y50F) をトランスフェクションし、p65 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。　** は、t 検定で比較した際の p 値が 0.01 未満のものを示す。

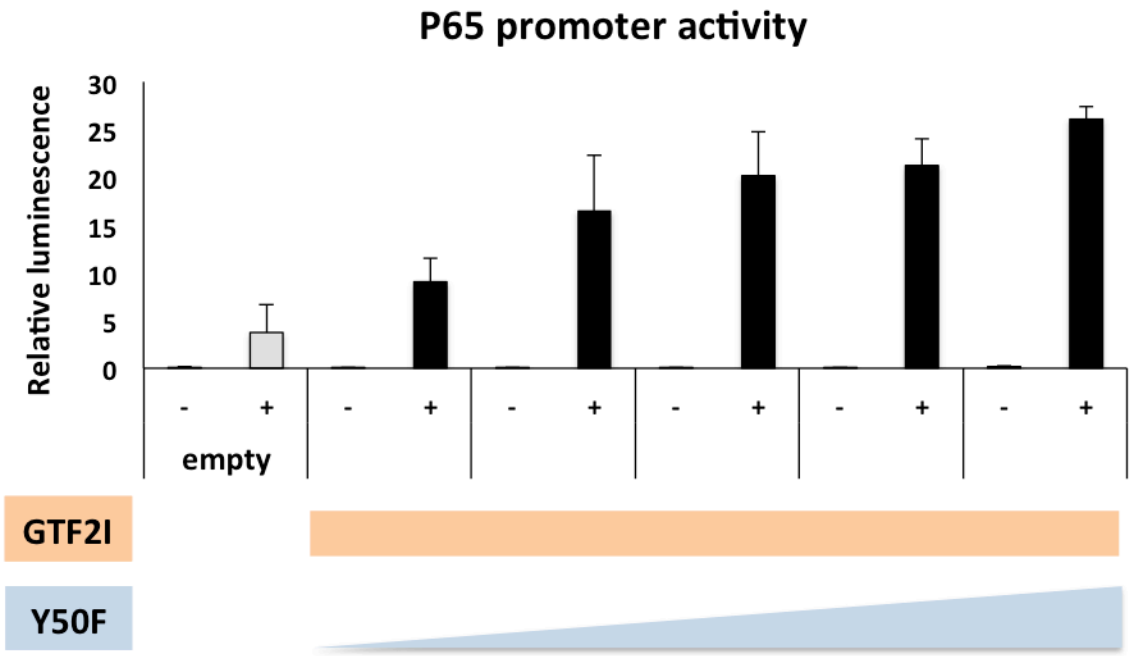


図 21　GTF2I と Y50F を同時に強制発現させた場合の p65 プロモーター活性の変化

HEK293T 細胞へ GTF2I と Y50F を同時にトランスフェクションし、p65 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。GTF2I は一定量 (5 µg) でトランスフェクションし、Y50F は 0-5 µg とトランスフェクション量を変化させた。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。

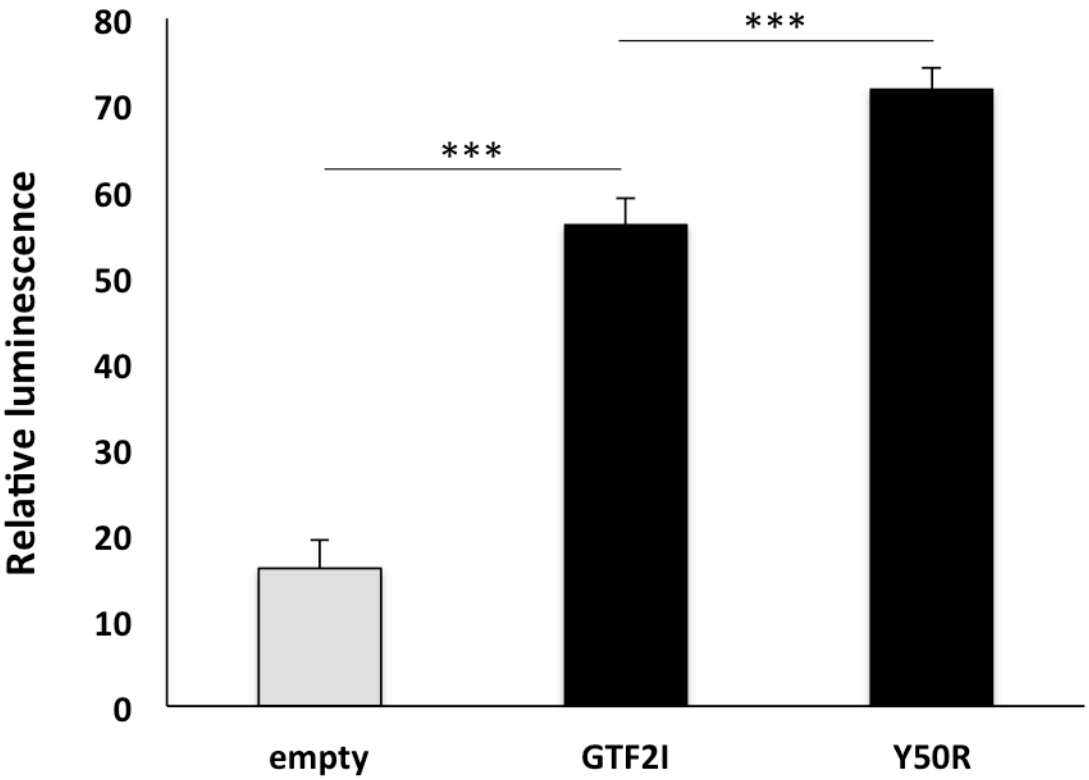


図 22　GTF2I 及び Y50R をトランスフェクションした場合の p65 プロモーター活性の変化

HEK293T 細胞へ GTF2I 及び欠失変異体 Y50R をトランスフェクションし、p65 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。*** は、t 検定で比較した際の p 値が 0.001 未満のものを示す。

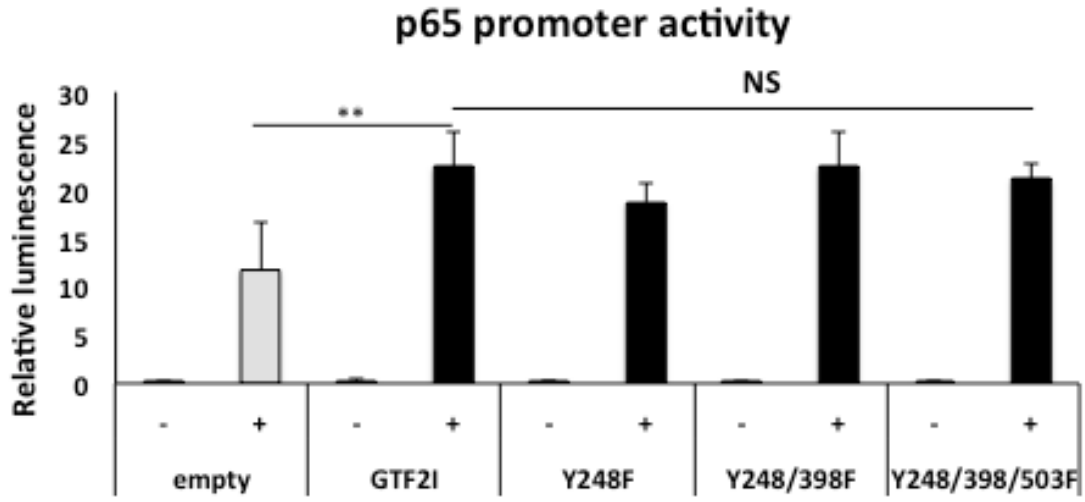


図 23　GTF2I 及び GTF2I の代表的チロシンリン酸化部位のフェニルアラニン変異体を強制発現したときの p65 プロモーター活性の変化

GTF2I、及び既に報告されている GTF2I の代表的なチロシンリン酸化部位である Y248、Y398、及び Y503 をフェニルアラニンに置換した変異体を HEK293T 細胞へトランスフェクションし、p65 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。　** は、t 検定で比較した際の *p* 値が 0.01 未満のものを示す。

4-7　GTF2I は STAT3αよりも STAT3βに優先的に会合する

炎症アンプのメカニズムとして、NF-κB 経路と JAK-STAT3 経路の同時活性化が重要であり、これまでの結果から、GTF2I は基本転写因子として核内において p65 と会合し NF-κB 経路を活性化させることが明らかになった。では、GTF2I は JAK-STAT3 経路の重要な転写因子である STAT3 とも会合するのだろうか。同様の手法により、GTF2I と STAT3 の相互作用についても検討した。STAT3 は STAT3α と STAT3βの二つの isoform が存在しその働きには相違があることが報告されている [31,32]。すなわち、STAT3βは STAT3αの C 末端の 55 アミノ酸が異なる 7 アミノ酸に置換された短い構造をとり、STAT3αと比べて DNA 結合能は高い一方、転写活性能は低い。免疫沈降の結果からは、GTF2I は STAT3 のうち STAT3βと優先的に会合することが明らかになった (図 24) 。この結果は、*GTF2I* ノックダウン細胞においてサイトカイン刺激による STAT3 の標的遺伝子である *STAT3* の発現が MOCK 細胞と比較して抑制されなかった結果 (図 6) に矛盾しない。すなわち、GTF2I は STAT3 と結合はするものの、STAT3 の転写活性には影響を与えていないであろうと考えられる。

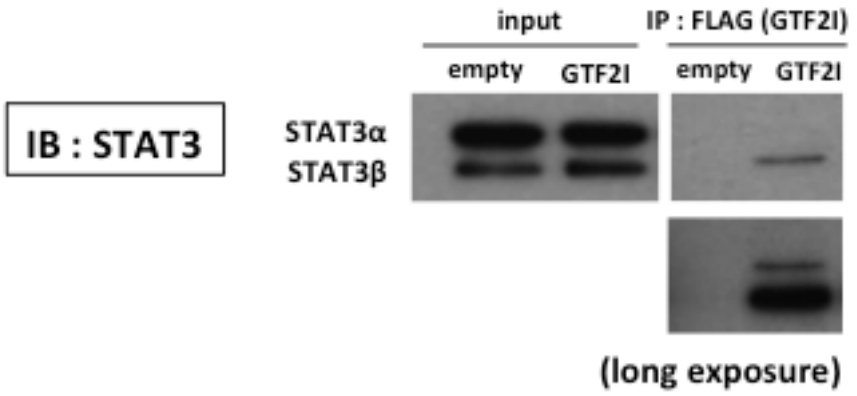


図 24　GTF2I 及び GTF2I の欠失変異体と p65 との結合

HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 GTF2I をトランスフェクションした。細胞を溶解したのち FLAG ビーズで免疫沈降を行い、GTF2I と STAT3 との結合の有無を western blotting により確認した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。

4-8　GTF2I はリン酸化 p65 およびリン酸化 STAT3 とともに SS 患者唾液腺組織において高発現する

GTF2I は pSS の疾患関連遺伝子として 2013 年に報告されている[33]。それに引き続き、SS にしばしば高頻度に合併する RA や SLE に関しても GTF2I の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism ; SNP) が関連すると報告されている[34 35]。それでは、SS の主な病変部である唾液腺組織において GTF2I の発現はどのようになっているのだろうか。pSS 患者と健常者の唾液腺組織における GTF2I、リン酸化 p65、及びリン酸化 STAT3 の発現を免疫組織化学染色により確認した。その結果、健常者と比べて SS 患者では唾液腺組織 (唾液腺腺房細胞) において GTF2I が高発現しており 、また GTF2I とリン酸化 p65 及びリン酸化 STAT3 は類似の染色パターンを示すことが確認された (図 25、26、28) 。また、抗 SS-A 抗体及び抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) といった SS や RA の疾患特異的自己抗体を有するも、唾液腺へのリンパ球浸潤が認められず、アメリカリウマチ学会及び欧州リウマチ学会の 2016 年診断基準[36]を満たさなかったため SS と診断され得なかった患者の唾液腺組織においても、GTF2I が健常者と比べて高発現していることが確認された (図 27) 。これらの結果は、GTF2I が SS における唾液腺の炎症病態に深く関与しているのみならず、リンパ球浸潤が生じる前から GTF2I の発現が増加している事実は、GTF2I がより早期の SS 診断ツールとなりうる可能性を示唆している。

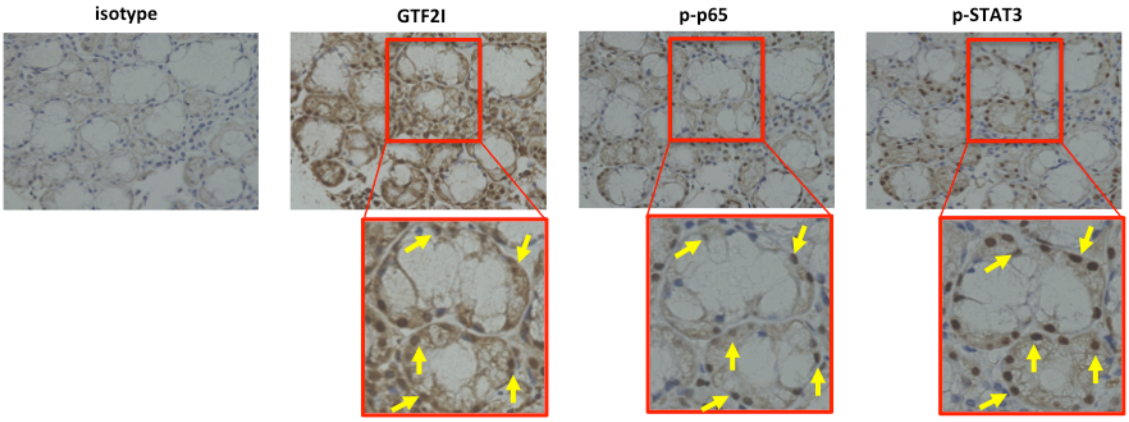


図 25　pSS 患者 (38 歳女性) の唾液腺組織

pSS の患者から採取した小唾液腺組織において、GTF2I、リン酸化 p65 (p-p65) 、及びリン酸化 STAT3 (p-STAT3) を免疫組織化学染色により検出した。矢印は GTF2I、リン酸化 p65、及びリン酸化 STAT3 が同様の染色パターンを示す細胞を表す。

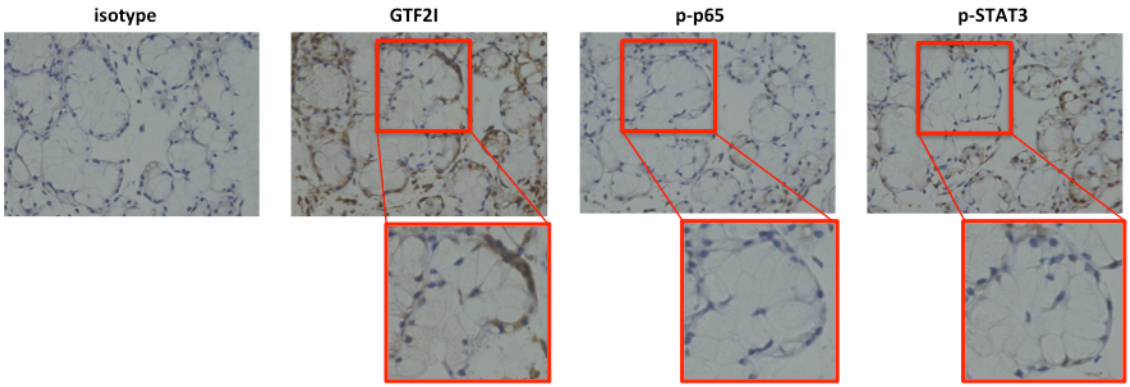


図 26　健常者 (21 歳男性) の唾液腺組織

健常者から採取した小唾液腺組織において、GTF2I、リン酸化 p65 (p-p65)、及びリン酸化 STAT3 (p-STAT3) を免疫組織化学染色により検出した。

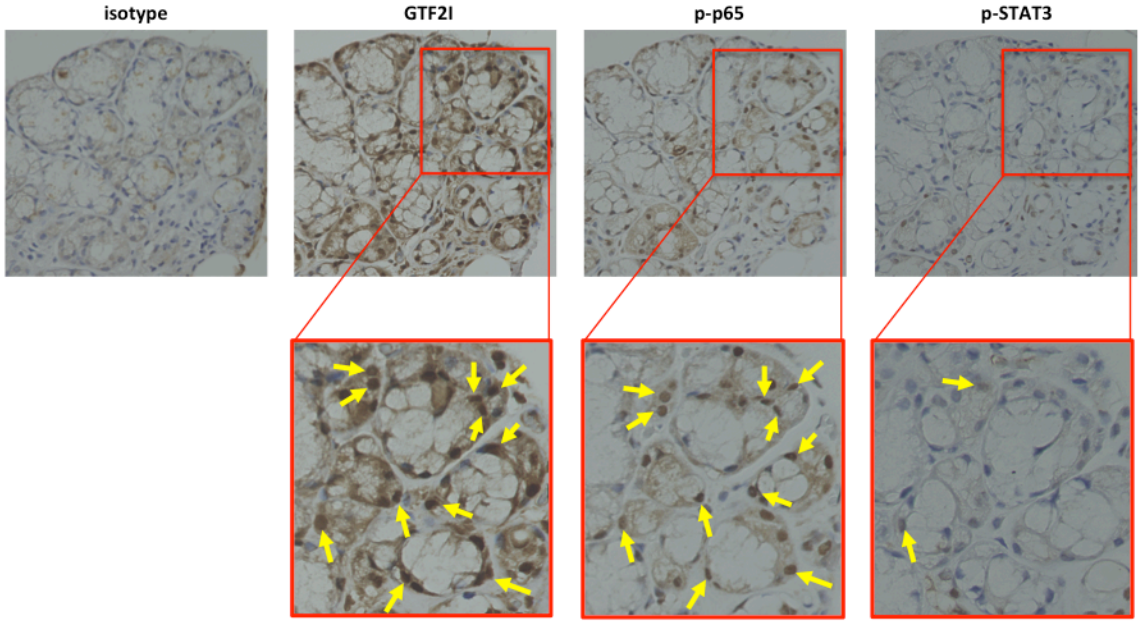


図 27　SS-A 抗体・抗 CCP 抗体陽性の非 SS 患者の唾液腺組織

抗 SS-A 抗体及び抗 CCP 抗体陽性の非 SS 患者から採取した小唾液腺組織において、GTF2I、リン酸化 p65 (p-p65) 、及びリン酸化 STAT3 (p-STAT3) を免疫組織化学染色により検出した。矢印は GTF2I、リン酸化 p65、及びリン酸化 STAT3 が同様の染色パターンを示す細胞を表す。。

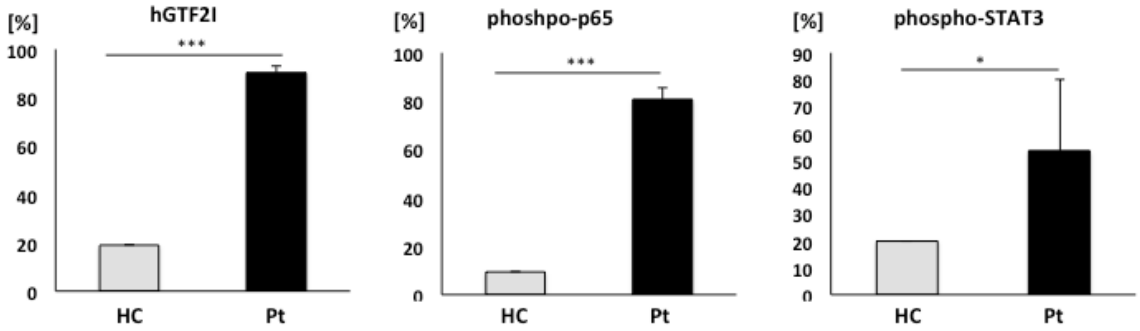


図 28　SS 患者と健常者の唾液腺組織における GTF2I、リン酸化 p65、及びリン酸化 STAT3 の陽性細胞の比率

免疫組織化学染色を行なった唾液腺組織における、GTF2I、リン酸化 p65、及びリン酸化 STAT3 の陽性細胞の数を計測し、定量化した。各々の切片において少なくとも 500 個以上の細胞を計測した。***は、t 検定で比較した際の *p* 値が 0.001 未満のものを示す。HC, healthy control;　Pt, patient of SS;

4-9　GTF2I には 4 つの isoform が存在する

GTF2I の遺伝子産物には 4 つの異なる isoform が存在することがわかっている[27, 37, 38] (図 29) 。それらの isoform はスプライシングによる exon10 および exon12 の有無により区別される。isoform 2 と isoform 4 は NIH 3T3 細胞において相反する転写機能を有することが報告されている[39] ほか、isoform 1 の発現は哺乳類では神経系に限定されるといった報告がある[27] が、未だ各 isoform の機能の相違については不明な点が多い。後述するように、SS、SLE、あるいは RA などの自己免疫疾患において GTF2I に関する 2 つの SNP (rs73366469、rs117026326) が報告されているが[33, 34, 35]、そのうちの一つ (rs117026326) はスプライシングに関係する exon 10 の直前のイントロン領域に存在する。そこで、GTF2I の 4 つの isoform と NF-κB 経路への関与の相違について調べていくこととした。まず、4 つの isoform を区別するべく、図 30 に示すようにスプライシングに関与する exon とそれに隣接する exon をまたぐようなプライマーを設計した。それらのプライマーを用いて HSG 細胞、ヒト滑膜細胞における各 isoform の発現を qPCR 法により確認したところ、いずれの細胞種においても同様の発現パターンを有しており、またその発現はサイトカイン刺激によっても変化しないことが明らかとなった (図 31、32) 。

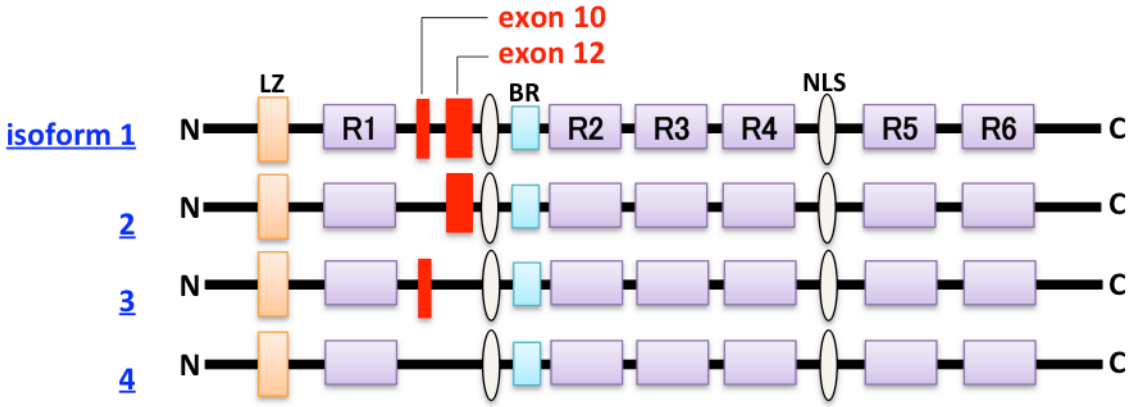


図 29　GTF2I の 4 つの isoform

GTF2I は exon10 と exon12 のスプライシングにより 4 つの isoform が存在する。上にそのシェーマを示す。

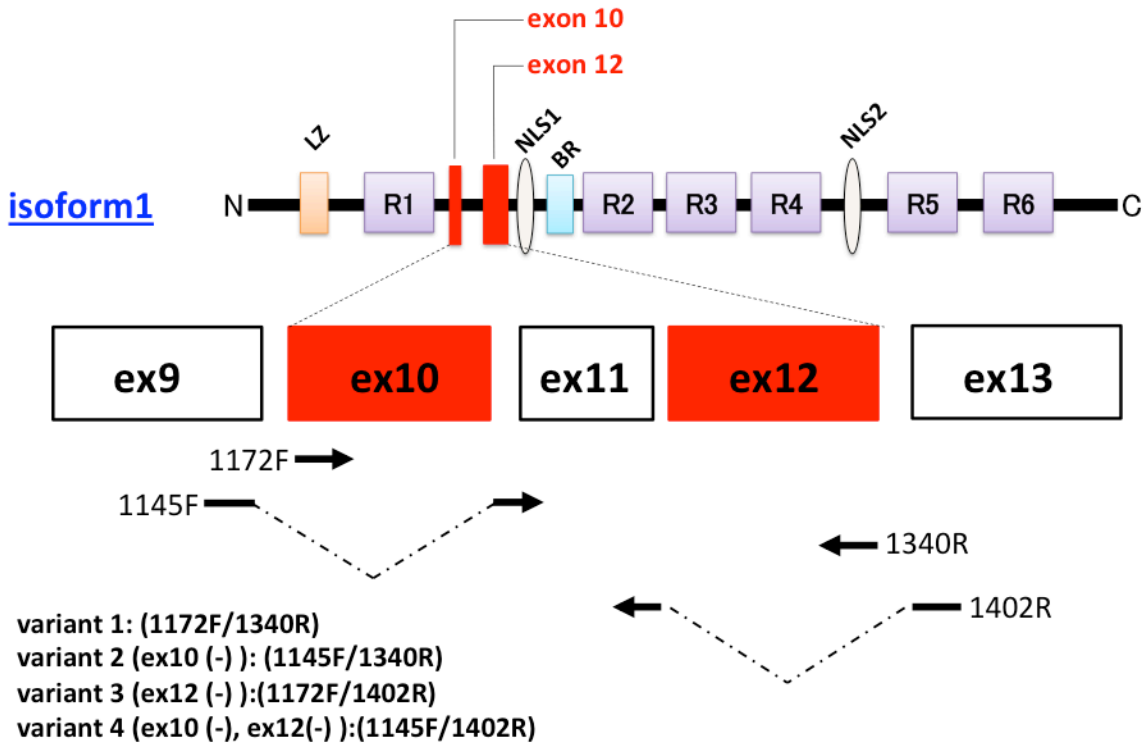


図 30　4 つの isoform に特異的なプライマーの設計

GTF2I の 4 つの isoform を区別するため、スプライシングに関与する exon10、exon12 の内部にプライマーを設計、合わせて exon9 と exon11 及び exon11 と exon13 を繋ぐようにプライマーを設計した。図に示すような組み合わせでプライマーを用いることでそれぞれの isoform 特異的に qPCR が行われる。上にそのシェーマを示す。

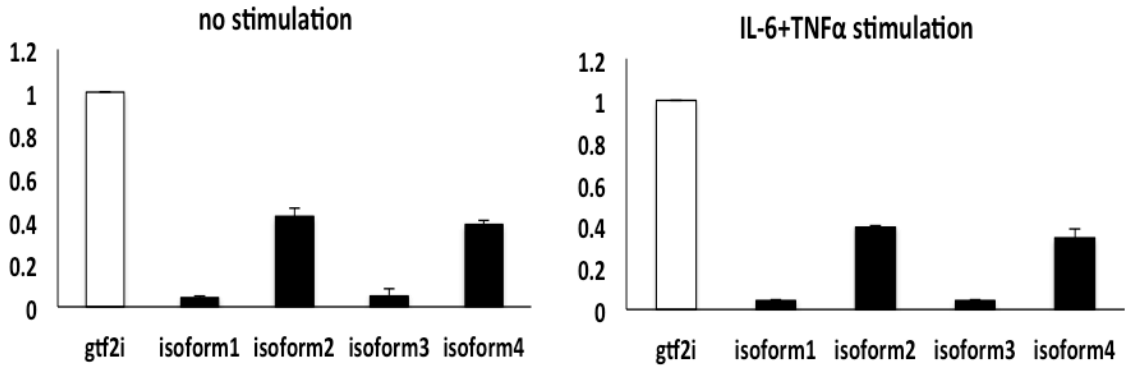


図 31　HSG 細胞における GTF2I の各 isoform の発現

HSG 細胞を用いて各 isoform の発現を qPCR により測定した。24 時間の血清飢餓、及び血清飢餓の後に IL-6 100 ng/mL と TNFα 50 ng/mL で 3 時間の刺激を加えた後に mRNA を回収した。*GTF2I* 及びその各 isoform の発現量を、ΔΔCt 法を用いてハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* に対する相対量として算出し、*GTF2I* を 1 とした時の各 isoform の存在比を縦軸に表した。

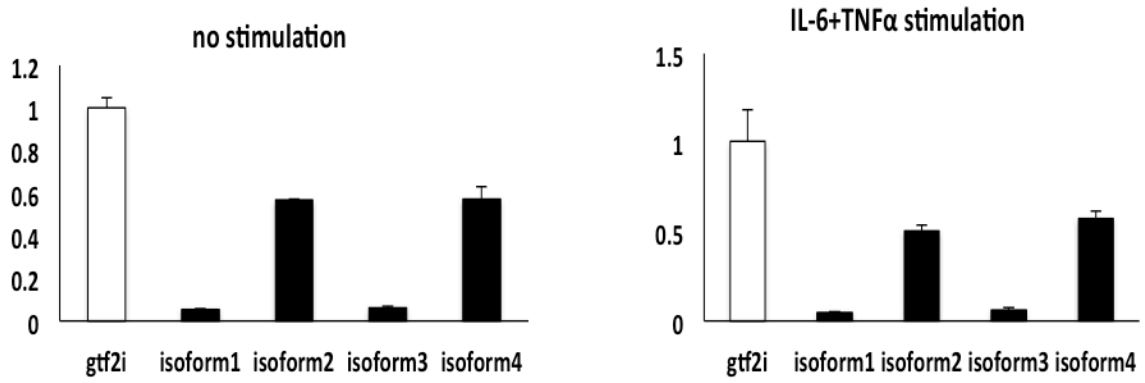


図 32　ヒト滑膜細胞における GTF2I の各 isoform の発現

ヒト滑膜細胞を用いて各 isoform の発現を qPCR により測定した。24 時間の血清飢餓、及び血清飢餓の後に IL-6 100 ng/mL と TNFα 50 ng/mL で 3 時間の刺激を加えた後に mRNA を回収した。*GTF2I* 及びその各 isoform の発現量を、ΔΔCt 法を用いてハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* に対する相対量として算出し、*GTF2I* を 1 とした時の各 isoform の存在比を縦軸に表した。

4-10　GTF2I の isoform 2 は他の isoform と比べて p65 のプロモーター活性をより上昇させる

では次に、GTF2I の 4 つの isoform は NF-κB 経路に与える影響に関して違いはあるのだろうか。そこで、まず各 isoform の cDNA を含んだプラスミドを構築した。その各々を HEK293T 細胞へトンラスフェクションし、p65 のプロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより確認した。その結果、isoform 2 はその他の isoform と比べて有意に p65 プロモーター活性を上昇させることが明らかとなった (図 33) 。さらに、免疫沈降法でも、isoform 2 はその他の isoform と比べてより強く p65 と会合することが確認された (図 34) 。

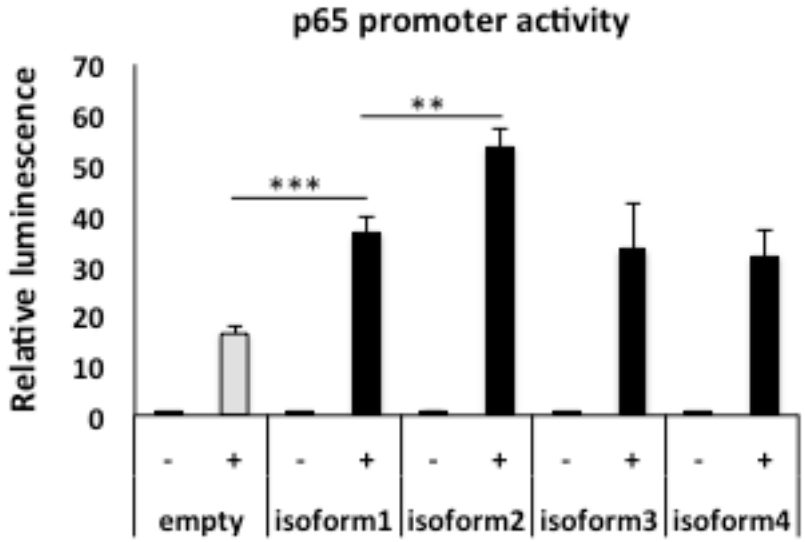


図 33　GTF2I の各 isoform 強制発現下における p65 プロモーター活性の変化

HEK293T 細胞へ GTF2I の各 isoform をトランスフェクションし、p65 プロモーター活性の変化をデュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した。ルシフェラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼ反応を測定後に、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼで補正した。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。縦軸は補正後の蛍光強度を示す。 ** 及び *** は、t検定で比較した際のp値がそれぞれ0.01、0.001 未満のものを示す。

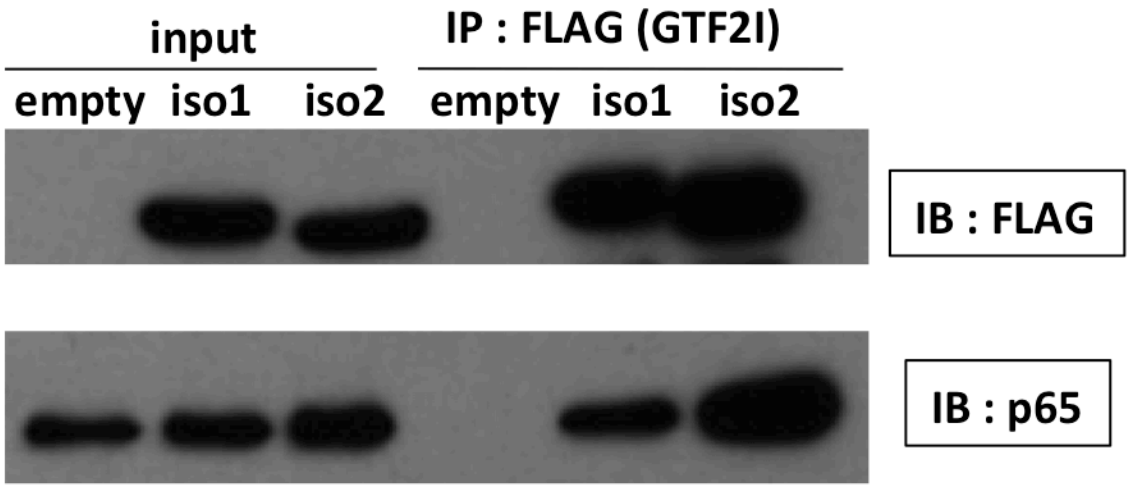


図 34　GTF2I の各 isoform における p65 との結合の相違

HEK293T 細胞に FLAG タグ融合 GTF2I の各 isoform をトランスフェクションした。細胞を溶解したのち FLAG ビーズで免疫沈降を行い、p65 との結合の有無を western blotting により確認した。3 回の独立した実験結果のうち、代表的なデータを示す。

4-11　SS 患者の唾液腺組織における *GTF2* 及びその isoform の発現と SNP の有無

先述したように、これまでいくつかの既報におけるゲノムワイドスクリーニング解析から、*GTF2I* は SS、及び RA、SLE といった SS に高頻度に合併しうる他の自己免疫疾患においても疾患感受性遺伝子であることが報告されている[33, 34, 35]。すなわち、SS に関しては intron 領域に認められる SNP (rs117026326) 、また、SS 並びに SS と合併する RA 及び SLE では *GTF2I* と同じ 7 番染色体 7q 11.23 領域において *GTF2I* とその上流で隣接する遺伝子 *GTF2IRD1* (GTF2I repeat domain containing protein 1) との間に存在する遺伝子間 SNP (rs73366469) が各疾患患者において健常者に比べて高頻度に認められることが明らかになっている (図35) 。さらに intron 領域の SNP (rs117026326) においてはその存在する部位は、*GTF2I* の splicing に関与する exon 10 の直前の intron に存在することがわかった。そこで、SS 患者 20 例の口唇生検から得られた小唾液腺組織を用いて、上記 2 つの SNP の有無、*GTF2I* およびその各 isoform の発現について確認した。全 20 例中、8 例において 2 つの SNP を共に有する (7 例はヘテロ接合型、1 例はホモ接合型) ことが確認され、一方残りの 12 例についてはいずれの SNP も認められなかった (図 36-38) 。SNP の有無による 2 群間において、患者背景や自己抗体プロファイル、小唾液腺生検の組織学的評価スケールや疾患活動性などの評価項目に関して有意差は認めなかった (表 6) 。各 isoform の発現パターンについては SNP の有無によらず同様であり (図 39) 、p65 プロモーター活性をより増強させる variant である isoform 2 の比率についても 2 群間で有意差は認めなかった (図 40) 。しかしながら、すべての isoform を含む総 *GTF2I* (pan-*GTF2I*) の mRNA 発現量に関しては、SNP を有する群において有意に高い結果を認めた (図 41) 。

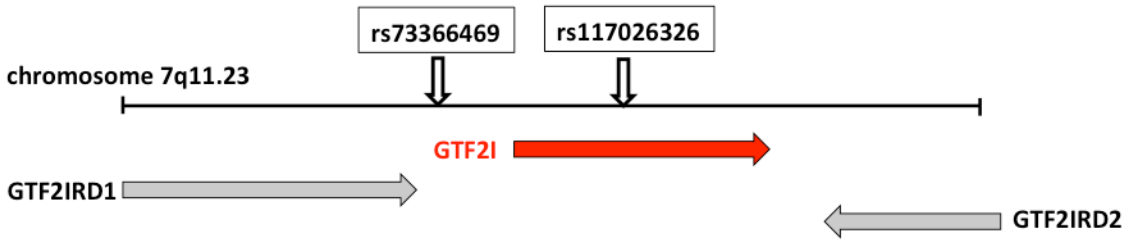


図 35　GTF2I にみられる 2 つの SNP

SS 患者のほか、RA や SLE 患者において、*GTF2I* の intron 領域に存在する SNP (rs117026326) や *GTF2IRD1* - *GTF2I* 間に存在する SNP (rs73366469) が高頻度に認められる。上にそのシェーマを示す。

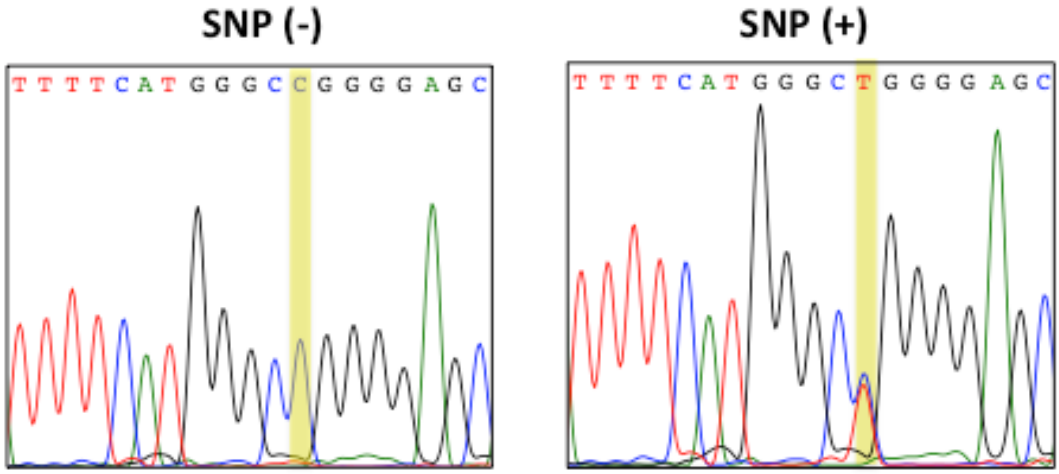


図 36　SS 患者における intronic SNP rs117026326 の確認

SS 患者の小唾液腺組織から抽出されたゲノム DNA を用いて *GTF2I* の intron 領域に存在する SNP rs117026326 (黄色部分) を DNA シークエンスにより確認した。SNP 陰性例と陽性例 (ヘテロ接合) のシークエンス波形を上に示す。

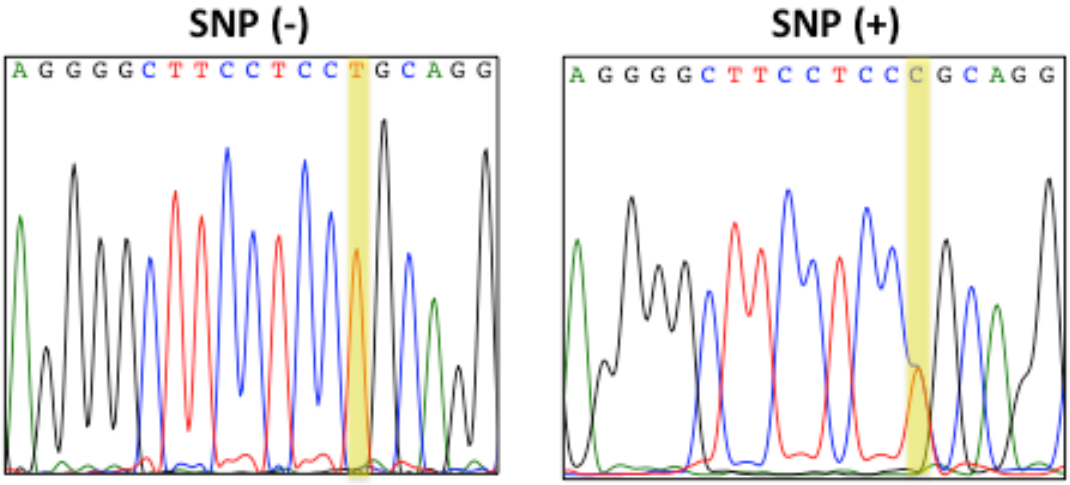
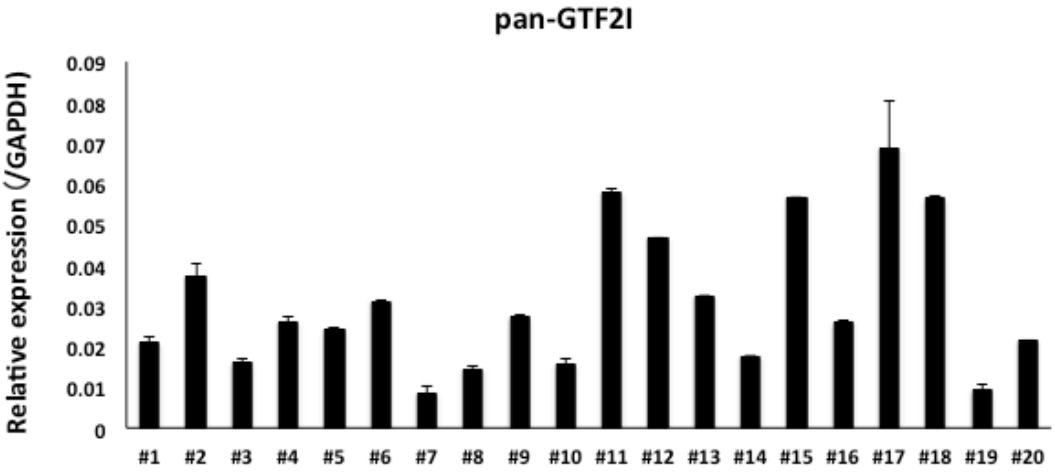


図 37　SS 患者における inter-genomic SNP rs73366469 の確認

SS 患者の小唾液腺組織から抽出されたゲノム DNA を用いて *GTF2IRD1-GTF2I* 間に存在する SNP rs73366469 (黄色部分) を DNA シークエンスにより確認した。SNP 陰性例と陽性例 (ヘテロ接合) のシークエンス波形を上に示す。



sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
intronic SNP (rs117026326)	-	±	-	-	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-	±	±	±	±	-	-
inter-genomicSNP (rs73366469)	-	±	-	-	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-	±	±	±	±	-	-

図 38　SS 患者における *GTF2I* の発現及び SNP の有無

SS 患者 (n=20) の小唾液腺組織から mRNA 及びゲノム DNA を抽出し、各々*GTF2I* の発現及び及び 2 つの SNP (rs117026326、rs73366469) の有無について確認した。+ はホモ変異、 ± はヘテロ変異を示す。

表 6　SNP 解析に用いたサンプルの患者背景

	SNP (−) (n=12)	SNP (+) (n=8)	*p* value‡
Age at biopsy, median years [IQR]	57.5 [51.5-70.25]	48.5 [38.25-66]	0.187
Disease duration, median years [IQR]	1 [1-6.75]	1 [1-2.75]	0.656
Sex (female), n (%)	20 (100)	7 (87.5)	0.400
Anti-Ro (SS-A), n (%)	7 (58)	8 (100)	0.055
Anti-La (SS-B), n (%)	3 (25)	1 (13)	0.494
Antinuclear antibody, n (%)	9 (75)	8 (100)	0.242
Greenspan Grade†			
Grade 4, n (%)	7 (59)	3 (38)	0.650
Grade 3, n (%)	4 (33)	4 (50)	0.648
Grade 2, n (%)	1 (8)	1 (12)	0.505
Grade 1, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.000
Grade 0, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.000
Schirmer's test mm/5min, median [IQR]	3.5 [1-15]	3 [2-10]	0.955
Saxon's test g/2min, median [IQR]	2.25 [1.42-2.98]	0.94 [0.32-2.37]	0.149
Complications			
RA, n (%)	2 (17)	1 (13)	0.463
SLE, n (%)	0 (0)	1 (13)	0.400
Treatment with corticosteroids, n (%)	2 (17)	3 (38)	0.292
Treatment with other immunosuppressant, n (%)	1 (8)	1 (13)	0.505

† Greenspan Grade ; Greensapn らにより報告された小唾液腺生検の組織学的評価スケールに基づいて行った[40]。　‡ 統計学的解析は、Fisher's exact test 及び Mann-Whitney U test を用いた。

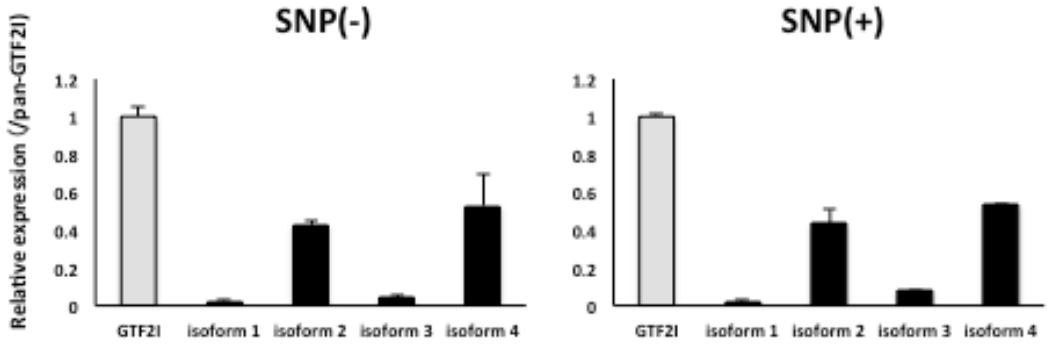


図 39　SS 患者における *GTF2I* の 4 つの isoform の発現パターン

SS 患者の小唾液腺組織から抽出された mRNA を用いて *GTF2I* の各 isoform の発現について qPCR 法により確認した。pan-*GTF2I* 及びその各 isoform の発現量を、ΔΔCt 法を用いてハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* に対する相対量として算出し、pan-*GTF2I* を 1 とした時の各 isoform の存在比を縦軸に表した。SNP 陰性例と陽性例 (ヘテロ接合) における各 isoform の発現パターンの一例を上に示す。

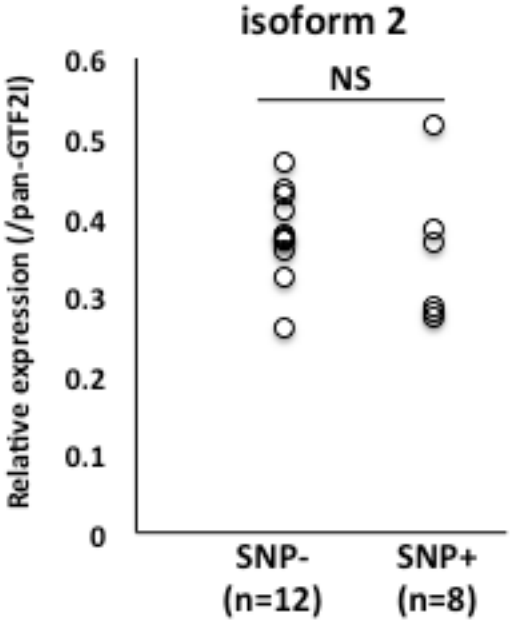


図 40　SS 患者における SNP の有無と *GTF2I* isoform2 の発現

SS 患者の小唾液腺組織から抽出された mRNA を用いて、*GTF2I* isoform2 の pan-*GTF2I* に対する発現比について qPCR 法により確認した。

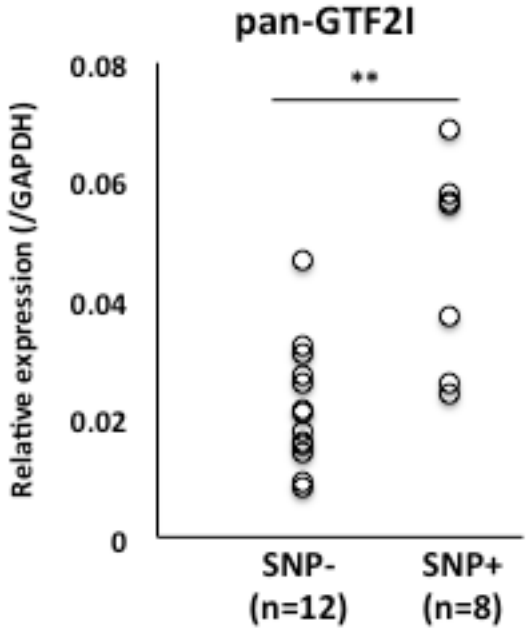


図 41　SNP の有無による *GTF2I* 発現の相違

SS 患者 (n=20) を、*GTF2I* に関連する SNP の有無から 2 群に分類し、各々における pan-*GTF2I* の発現量を qPCR 法により確認した。pan-*GTF2I* の発現量を、ΔΔCt 法を用いてハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* に対する相対量として算出し縦軸に表した。** は、Mann-Whitney U test で比較した際の *p* 値が 0.01 未満のものを示す。

5. 考察

自己免疫疾患は、遺伝的要因に加え喫煙、感染、その他の環境因子や性ホルモンなど様々な要因が複雑に関連して発症する慢性炎症疾患で、その発症あるいは炎症持続のメカニズムについては現在も不明な点が多い。SS は主に外分泌腺組織を中心に慢性炎症とその結果生じる外分泌機能の破綻を主徴とする。また、外分泌組織の炎症のみならず、肺、腎臓、神経、皮膚、血液など全身において多彩な症状を呈する。その発症機序においては諸説が提言されているものの未だ不明な点が多い。しばしば自然免疫の観点から SS の病態形成が議論される。例えば、ウィルス感染とそれに引き続く 1 型 IFN の上昇と Toll 様受容体の活性化が唾液腺分泌の低下を惹起することがマウスモデルで示されている[41]。実際に SS の発症と EB ウィルス、C 型肝炎ウィルス、ヒト T 細胞白血病ウィルス (HTLV-1) などが関連していると言及する報告もあるが[42, 43, 44]、統一した見解には至っていない。その他にも、他の自己免疫疾患と同様、さまざまな環境因子が SS の発症に関係しているとの報告が多く存在するものの、SS の病態形成の全貌を示すには至らない。一方、遺伝学的な研究手法の発達とともに、SS をはじめとした自己免疫疾患における疾患感受性遺伝子の同定がすすんでいる。

今回我々は、ゲノムワイド関連解析により新規の SS 疾患関連遺伝子として報告された遺伝子 *GTF2I* に注目し、その機能解析と SS の炎症病態への関与について研究を行った。GTF2I は 1991 年に Roy らにより発見された、intiator element (Inr) に結合する基本転写因子の一つである[45]。様々な細胞外シグナル、例えば B 細胞受容体や T 細胞受容体を介した刺激、あるいは増殖因子などの刺激により GTF2I は活性化しその転写調節の作用を有するようになる。その過程においてはチロシンリン酸化による GTF2I の活性化 (二量体の形成と核内移行) が重要な反応であり、活性化した GTF2I は細胞増殖、分化、神経の発生、あるいは小胞体ストレス反応など様々な生理学的役割があることが報告された[46, 47, 48, 49]。また、細胞外シグナルによるリン酸化に加え、SUMO 修飾やユビキチン化などの転写後修飾を受けることも明らかになっており、これはプロテオソーム系による GTF2I の分解に重要であるとされる[50]。

GTF2I とヒト疾患との関連に関しては、非常に稀な遺伝子疾患であり精神発達遅延、心臓疾患、エルフ様顔貌などを特徴とするウィリアムズ症候群 (Williams-Beuren syndrome : WBS) の責任遺伝子であることが報告されており、同症候群では GTF2I を含む 7q11.23 領域が欠失することがわかっている[51]。また、胸腺上皮性腫瘍においては、特定のミスセンス変異 (chromosome 7 c.74146970 T>A) は A 型胸腺上皮性腫瘍の 82%、AB 型胸腺上皮性腫瘍の 74%と高頻度に認められる一方、浸潤を伴うものには同変異は認めなかったことから、左記のミスセンス変異は胸腺上皮性腫瘍の生命予後

と相関することが報告されている[52]。立体構造予測では本変異はGTF2Iに大きな構造変化をもたらすものではないものの、プロテオソーム系による分解を抑制するような微細な変化をもたらすものと想定されている[52]。

すでに述べたように、自己免疫疾患とGTF2Iの関連については、SS患者において高頻度に認められるintronic SNP (rs117026326) が2013年に報告され[33]、その後続いてSS患者のみならず、SSとしばしば合併するRA及びSLE患者においても別のSNPが関連していることが相次いで報告された[34, 35]。しかしながら、GTF2Iが自己免疫疾患における慢性炎症の病態形成にどのように寄与しているかについては全く検討はなされていない。

今回我々は、GTF2Iが非免疫細胞においてNF-κB経路を介して炎症回路を正に制御することを示した。Toddらは、マウス不死化B細胞株であるWEHI-231細胞を用いた検討において、IgMとTGF-βの刺激条件下においては、GTF2Iは細胞増殖に抑制的であることを示し、それはc-Relの核内への局在を抑制するとともにp50のホモ二量体の形成を誘導することによると結論づけている[53]。今回、我々の検討においては、GTF2Iはp65分子との相互作用を有し、p65の標的遺伝子上のプロモーター領域への結合に関与することでNF-κB経路を亢進させ慢性炎症の誘導に関与していることを示した。NF-κB経路の活性化という観点からはほぼ真逆とも取れるこの相違が、免疫細胞と非免疫細胞という細胞種の違いに依存するものか、あるいは細胞刺激環境に依存するものであるのか、さらなる検討が必要と考える。

また、我々はNF-κB経路の中心的な分子であるp65との相互作用においてGTF2IのN末端に存在するLeucine Zipper domain (LZ) の重要性を見出した。LZは蛋白質の二次構造のモチーフの一つで、平行に並んだα-helix構造により接着力を獲得するため、二量体を形成する蛋白質に共通して見られる[54]。GTF2Iは上述のとおり細胞外シグナルをとおしてチロシンリン酸化をうけることで活性化し、二量体を形成し基本転写因子としてのはたらきを獲得する。 p65との相互作用にLZが不可欠であるという事実は、少なくともGTF2IのNF-κB経路への関与における二量体形成の必要性を十分に表している。また、この事実はGTF2IがNF-κB経路の細胞内イベントには影響を及ぼさないという実験結果とも合致する。また既報においては、例えばB細胞においてはBruton型チロシンキナーゼ (BTK) によりGTF2Iは活性化、すなわち二量化し核内移行を行うことが報告されているが[55, 56, 57]、今回の我々の検討では、非免疫細胞においては24時間という極めて長時間の血清飢餓状態においてもそのほとんどは核内に存在することを明らかにした。加えて、上述のBTKによる重要なリン酸化部位として報告されているチロシン残基 (Y248、Y398、Y503) の変異体はNF-κB経路への影響について変化をきたさないことが示された。これらのことは、非免疫細胞においてはGTF2Iが定常状態においてすでに何らかの細胞内キナーゼによるリン酸化を介して

活性化状態あることを意味していると同時に、非免疫細胞特有のリン酸化（活性化）のメカニズムが存在する可能性が示唆される。どのような細胞内キナーゼによりGTF2I の活性化が維持されているかについては今回の研究では同定できておらず、更に今後の検討が必要である。

今回の研究で、我々は GTF2I の各 isoform の NF-κB 経路への影響の違いについても検討した。既報においては、Vβ promoter 活性と c-fos promoter 活性などを isoform 毎で評価した結果、各 isoform で DNA 結合能は異なるものの promoter 活性には相違がみられなかった [27]。一方、今回の我々の結果からは、isoform 間で NF-κB 経路への影響が異なることを見出した。これが、細胞内シグナルもしくは細胞種特異的な現象かどうかについては、今後のさらなる検討が望まれる。

我々はまた、実際に SS をはじめとした自己免疫疾患の炎症病態と GTF2I の関連を直接的に見出すという観点から、上述の isoform の発現と SNP の関与にも着目した。SS と GTF2I の疾患関連を見出した GWAS では、併せて患者末梢血単核球を用いた expression Quantitatve Trait Lucs 解析 (eQTL 解析) も行なっているが、その結果からは GTF2I の発現と genotype に関して関連は認めなかったとしている [33]。しかしながら、我々の検討では、実際に SS 患者の唾液腺組織では 2 つの SNP (rs117026326、rs73366469) を有する症例において GTF2I は高発現していた。すなわち、臨床症状に直接的に関連するような炎症局所においては全身とは異なる遺伝子発現パターンを呈していることを意味する。さらに、疾患特異的自己抗体を有しかつ臨床症状があるものの唾液腺組織にリンパ球浸潤が認められないため SS の診断に至らなかった症例においても唾液腺組織において GTF2I は高発現していた。この事実は、慢性炎症の結果として生じるリンパ球浸潤の分子基盤として GTF2I の高発現とそれによるによる炎症維持機構が存在する可能性が示唆され、さらには新たな診断マーカーとしての有用性が期待される。SS において高頻度に認められる intronic SNP は、GTF2I のスプライシングに関係する exon10 の直前に存在することは極めて興味深い。しかしながら今回 20 症例の唾液腺組織の検討からは、SNP と各 isoform 発現すなわち GTF2I のスプライシングへの関連は見いだせなかった。今後、サンプルサイズを増やし、さらなる検討が必要である。

本研究では、GTF2I が核内において p65 と会合することをとおして非免疫細胞における NF-κB 経路の活性化に関与していることを明らかにし、また実際に SS 患者の唾液腺組織においても GTF2I が高発現していることを明らかにした (図 42) 。今後は GTF2I の炎症誘導、あるいは転写制御の機構のさらなる検討を通して、自己免疫疾患の慢性炎症病態のより詳細な解明の一助になると考えている。

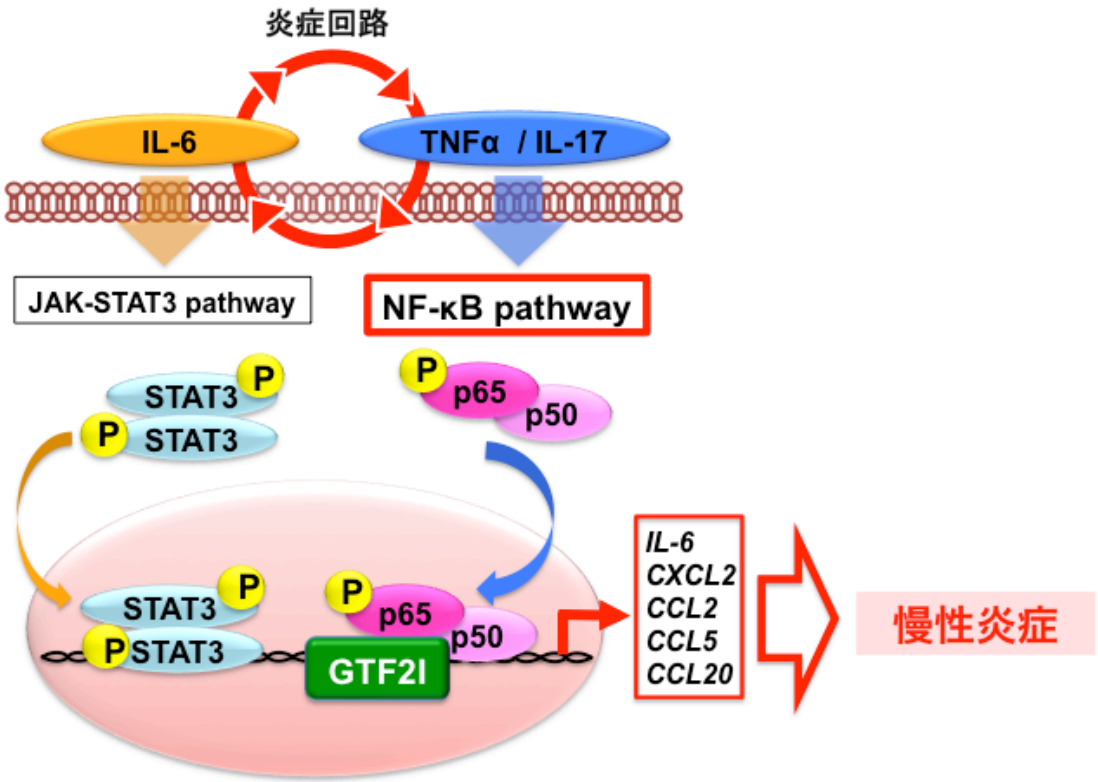


図 42　GTF2I による炎症回路の制御

GTF2I による炎症回路の制御についてそのシェーマを示す。GTF2I は唾液腺細胞などの非免疫細胞において、核内で p65 分子と会合し NF-κB経路を活性化する。その結果、IL-6 をはじめとした炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が亢進し、慢性炎症病態を惹起する。

6. 総括及び結論

- GTF2I は唾液腺細胞をはじめとした非免疫細胞において NF-κB 経路を介して炎症病態を制御する。
- GTF2I と p65 の会合においては Leucine Zipper ドメインのチロシン残基が重要である。
- SS 患者の唾液腺ではリン酸化 p65、リン酸化 pSTAT3 とともに GTF2I が高発現している。
- GTF2I の 4 つの isoform では NF-κB 経路の活性化に与える影響が異なる。
- SS 患者で高頻度にみられる GTF2I の SNP は、GTF2I の発現に影響を与える。

本研究では、まず *GTF2I* ノックダウン細胞を用いた in vitro の実験、及び関節炎モデルマウスを用いた in vivo の実験をとおして、GTF2I が NF-κB 経路を介して炎症病態を制御する遺伝子であることを確認した。また、GTF2I の欠失変異体の作成により、NF-κB 経路の重要分子である p65 との会合およびそれに関与する GTF2I のドメインを同定した。また、GTF2I の基本転写因子としての働きに重要なチロシンリン酸化部位を同定した。実際に SS 患者の唾液腺組織では GTF2I が健常者に比べて高発現していることも確認した。さらに、GTF2I で報告されている 4 つの isoform の NF-κB 経路の活性化に与える影響は一様ではないことも確認された。SS 患者で高頻度に認められる GTF2I の SNP は GTF2I のスプライシング機構には影響を与えないが、GTF2I の発現制御に関与していると考えられた。

今後は、患者検体を含めたさらなる検討を行い、GTF2I による転写制御のより詳細な分子メカニズムの解析、並びに SS あるいは同じく疾患関連遺伝子として報告されている RA や SLE を含めた自己免疫疾患の病態の理解と治療応用を目指した研究進展が望まれる。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、今回、このような研究の機会を与えて頂きました、北海道大学大学院医学研究院、免疫・代謝内科学教室の渥美達也教授に謝意を表します。また、本研究全般にわたり直接ご指導ご鞭撻賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所所長、及び分子神経免疫学分野教授であります村上正晃先生に深く感謝申し上げます。また、基礎的な部分から直接のご指導を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野講師・上村大輔先生、同助教・有馬康伸先生に心から感謝いたします。さらに、本研究に用いる検体を提供して頂きました北海道北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野内科学分野、同歯学研究院口腔診断内科の北川善政教授、並びに筑波大学医学医療系内科医療系内科膠原病・リウマチ・アレルギー分野の住田孝之教授、松本功准教授、坪井洋人先生に深く感謝致します。

最後に本研究を遂行するにあたり、ご助言・ご協力・ご支援頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野および遺伝子病制御研究所分子神経免疫学の全ての皆様に心より御礼申し上げます。

8. 参考文献

1 Tsuboi, H., Asashima, H., Takai, C., Hagiya, C., Yokosawa, M., Hirota, T., Umehara, H., Kawakami, A., Nakamura, H., Sano, H., Tsubota, K., Ogawa, Y., Takamura, E., Saito, I., Inoue, H., Nakamura, S., Moriyama, M., Takeuchi, T., Tanaka, Y., Hirata, S., Mimori, T., Yoshifuji, H., Ohta, A., Matsumoto, I. & Sumida, T. Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* **24**, 464-470 (2014).

2 Both, T., Dalm, V. A., van Hagen, P. M. & van Daele, P. L. Reviewing primary Sjogren's syndrome: beyond the dryness - From pathophysiology to diagnosis and treatment. *International journal of medical sciences* **14**, 191-200 (2017).

3 Singh, N. & Cohen, P. L. The T cell in Sjogren's syndrome: force majeure, not spectateur. *Journal of autoimmunity* **39**, 229-233 (2012).

4 Fox, R. I. & Stern, M. Sjogren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* **116**, 3-13 (2002).

5 Sakai, A., Sugawara, Y., Kuroishi, T., Sasano, T. & Sugawara, S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *Journal of immunology* **181**, 2898-2906 (2008).

6 Lee, S. Y., Han, S. J., Nam, S. M., Yoom, S. C., Ahn, J. M., Kim, T. I., Kim, E. K. & Seo, K. Y. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjogren syndrome dry eye patients and non-Sjogren syndrome dry eye patients. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, 247-253 (2013).

7 Daridon, C., Devauchelle, V., Hutin, P., Le Berre, R., Martins-Carvalho, C., Bendaoud, B., Dueymes, M., Saraux, A., Youinou, P. & Pers, J. O. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism* **56**, 1134-1144 (2007).

8 Mariette, X., Roux, S., Zhang, J., Bengoufa, D., Lavie, F., Zhou, T. & Kimberly, R. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Annals of the rheumatic diseases* **62**, 168-171 (2003).

9 Nocturne, G. & Mariette, X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome. *Nature reviews. Rheumatology* **9**, 544-556 (2013).

10 Lavie, F., Miceli-Richard, C., Ittah, M., Sellam, J., Gottenberg, J. E. & Mariette, X. B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Scandinavian journal of immunology* **67**, 185-192 (2008).

11 Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K. & Takada, K. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *The Journal of experimental medicine* **206**, 2091-2099 (2009).

12 Zheng, L., Zhang, Z., Yu, C. & Yang, C. Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjogren's syndrome. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **109**, 844-850 (2010).

13 Mariette, X., Ravaud, P., Steinfeld, S., Baron, G., Goetz, J., Hachulla, E., Combe, B., Puechal, X., Pennec, Y., Sauvezie, B., Perdringer, A., Hayem, G., Janin, A. & Sibilia, J. Inefficacy of infliximab in primary Sjogren's syndrome: results of the randomized, controlled Trial of Remicade in Primary Sjogren's Syndrome (TRIPSS). *Arthritis and rheumatism* **50**, 1270-1276 (2004).

14 Sankar, V., Brennan, M. T., Kok, M. R., Leakan, R. A., Smith, J. A., Baum, B. J. & Pillemer, S. R. Etanercept in Sjogren's syndrome: a twelve-week randomized, double-blind, placebo-controlled pilot clinical trial. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2240-2245 (2004).

15 Meijer, J. M., Meiners, P. M., Vissink, A., Spijkervet, F. K., Abdulahad, W., Kamminga, N., Brouwer, E., Kallenberg, C. G. & Bootsma, H. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism* **62**, 960-968 (2010).

16 Bowman, S. J., Everett, C. C., O'Dwyer, J. L., Emery, P., Pitzalis, C., Ng, W. F., Pease, C. T., Price, E. J., Sutcliffe, N., Gendi, N. S. T., Hall, F. C., Ruddock, S. P., Fernandez, C., Reynolds, C., Hulme, C. T., Davies, K. A., Edwards, C. J., Lanyon, P. C., Moots, R. J., Roussou, E., Giles, P., Sharples, L. D. & Bonbardieri, M. Randomized Controlled Trial of Rituximab and cost-effectiveness analysis in treating fatigue and oral dryness in primary Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* (2017).

17 Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y & Hirano, T. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* **29**, 628-636 (2008).

18 Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S. J., Saeki, Y., Kitamura, Y. & Hirano, T. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *The Journal of experimental medicine* **196**, 979-990 (2002).

19 Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y., Takatsu, K., Kamimura, D. & Hirano, T. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *The Journal of experimental medicine* **208**, 103-114 (2011).

20 Sawa, S., Kamimura, D., Jin, G. H., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Isihara, K., Murakami, M. & Hirano, T. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1459-1470 (2006).

21 Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J. J., Atsumi, T., Shiraya, S., Nakatsuji, Y., Kinoshita, M., Kohsaka, H., Nishida, M., Sakoda, S., Miyasaka, N., Yamauchi-Takihara, K. & Hirano, T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell reports* **3**, 946-959 (2013).

22 Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., Sabharwal, L., Jiang, J. J., Kumai, N., Miyasaka, N., Sakoda, S., Yamauchi-Takihara, K., Ogura, H., Hirano, T. & Murakami, M. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *Journal of immunology* **194**, 1039-1046 (2015).

23 Nakagawa, I., Kamimura, D., Atsumi, T., Arima, Y. & Murakami, M. Role of Inflammation Amplifier-Induced Growth Factor Expression in the Development of Inflammatory Diseases. *Crit. Rev. Immunol.* **35**, 365-378 (2015).
24 Moynagh, P. N. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* **118**, 4589-4592 (2005).
25 Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706-6716 (2006).
26 Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684 (2006).
27 Cheriyath, V. & Roy, A. L. Alternatively spliced isoforms of TFII-I. Complex formation, nuclear translocation, and differential gene regulation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 26300-26308 (2000).
28 Chaturvedi, M. M., Sung, B., Yadav, V. R., Kannappan, R. & Aggarwal, B. B. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* **30**, 1615-1630 (2011).
29 Roy, A. L. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I: 10 years later. *Gene* **492**, 32-41 (2012).
30 Egloff, A. M. & Desiderio, S. Identification of phosphorylation sites for Bruton's tyrosine kinase within the transcriptional regulator BAP/TFII-I. *The Journal of biological chemistry* **276**, 27806-27815 (2001).
31 Schaefer, T. S., Sanders, L. K., Park, O. K. & Nathans, D. Functional differences between Stat3alpha and Stat3beta. *Molecular and cellular biology* **17**, 5307-5316 (1997).
32 Huang, Y., Qiu, J., Dong, S., Redell, M. S., Poli, V., Mancini, M. A. & Tweardy, D. J. Stat3 isoforms, alpha and beta, demonstrate distinct intracellular dynamics with prolonged nuclear retention of Stat3beta mapping to its unique C-terminal end. *The Journal of biological chemistry* **282**, 34958-34967 (2007).
33 Li, Y. *et al.* A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjogren's syndrome at 7q11.23. *Nat. Genet.* **45**, 1361-1365 (2013).
34 Fang, K., Zhang, K. & Wang, J. Network-assisted analysis of primary Sjogren's syndrome GWAS data in Han Chinese. *Sci. Rep.* **5**, 18855 (2015).
35 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., Bhattarai, K., Adler, A., Bang, S. Y., Lee, H. S., Kim, T. H., Kang, Y. M., Suh, C. H., Chung, W. T., Park, Y. B., Choe, J. Y., Shim, S. C., Kochi, Y., Suzuki, A., Kubo, M., Sumida, T., Yamamoto, K., Lee, S. S., Kim, Y. J., Han, B. G., Dozmorov, M., Kaufman, K. M., Wren, J. D., Harley, J. B., Shen, N., Chua, K. H., Zhang, H., Bae, S. C. & Nath, S. K. High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nat. Genet.* **48**, 323-330 (2016).
36 Shiboski, C. H., Shiboski, S. C., Seror, R., Criswell, L. A., Labetoulle, M., Lietma, T. M., Rasmussen, A., Scofield, H., Vitali, C., Bowman, S. J., mariette, X. & International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjogren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Annals of the rheumatic diseases* **76**, 9-16 (2017).
37 Makeyev, A. V. & Bayarsaihan, D. Alternative splicing and promoter use in TFII-I genes. *Gene* **433**, 16-25 (2009).
38 Roy, A. L. Pathophysiology of TFII-I: Old Guard Wearing New Hats. *Trends. Mol. Med.* **23**, 501-511 (2017).

39 Hakre, S., Tussie-Luna, M. I., Ashworth, T., Novina, C. D., Settleman, J., Sharp, P. A. & Roy, A. L. Opposing functions of TFII-I spliced isoforms in growth factor-induced gene expression. *Mol. Cell*.**24**, 301-308 (2006).

40 Greenspan, J. S., Daniels, T. E., Talal, N. & Sylvester, R. A. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **37**, 217-229 (1974).

41 Deshmukh, U. S., Nandula, S. R., Thimmalapura, P. R., Scindia, Y. M. & Bagavant, H. Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function. *J. Oral Pathol. Med.* **38**, 42-47 (2009).

42 Kivity, S., Arango, M. T., Ehrenfeld, M., Tehori, O., Shoenfeld, Y., Anaya, J. M. & Agmon-Levin, N. Infection and autoimmunity in Sjogren's syndrome: a clinical study and comprehensive review. *Journal of autoimmunity* **51**, 17-22 (2014).

43 Wang, Y., Dou, H., Yu, L., Chen, S., Min, Y., Zhao, K., Wang, X. & Hu, C. Hepatitis C virus infection and the risk of Sjogren or sicca syndrome: a meta-analysis. *Microbiol. Immunol.* **58**, 675-687 (2014).

44 Hida, A., Imaizumi, M., Sera, N., Akahoshi, M., Soda, M., Maeda, R., Nakashima, E., Nakamura, H., Ida, H., Kawakami, A. & Eguchi, K. Association of human T lymphotropic virus type I with Sjogren syndrome. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 2056-2057 (2010).

45 Roy, A. L., Meisterernst, M., Pognonec, P. & Roeder, R. G. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* **354**, 245-248 (1991).

46 Desgranges, Z. P., Ahn, J., Lazebnik, M. B., Ashworth, T., Lee, C., Pestell, R. C., Rosenberg, N., Prives, C. & Roy, A.L. Inhibition of TFII-I-dependent cell cycle regulation by p53. *Molecular and cellular biology* **25**, 10940-10952 (2005).

47 Hong, M., Lin, M. Y., Huang, J. M., Baumeister, P., Hakre, S., Roy, A. L. & Lee, A. S. Transcriptional regulation of the Grp78 promoter by endoplasmic reticulum stress: role of TFII-I and its tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16821-16828 (2005).

48 Misra, U. K., Wang, F. & Pizzo, S. V. Transcription factor TFII-I causes transcriptional upregulation of GRP78 synthesis in prostate cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **106**, 381-389 (2009).

49 Misra, U. K., Mowery, Y. M., Gawdi, G. & Pizzo, S. V. Loss of cell surface TFII-I promotes apoptosis in prostate cancer cells stimulated with activated alpha(2) -macroglobulin. *J. Cell. Biochem.* **112**, 1685-1695 (2011).50 Tussie-Luna, M. I., Michel, B., Hakre, S. & Roy, A. L. The SUMO ubiquitin-protein isopeptide ligase family member Miz1/PIASxbeta /Siz2 is a transcriptional cofactor for TFII-I. *The Journal of biological chemistry* **277**, 43185-43193, doi:10.1074/jbc.M207635200 (2002).

50 Pober, B. R. Williams-Beuren syndrome. *The New England journal of medicine* **362**, 239-252 (2010).

51 Petrini, I., Meltzer, P. S., Kim, I. K., Lucchi, M., Park, K. S., Fontanini, G., Gao, J., Zucali, P. A., Calabrese, F., Fabaretto, A., Rea, F., Rodriguez-Canales, J., Walker, R. L., Pineda, M., Zhu, Y. J., Lau, C., Killian, K. J., Bilke, S., Voeller, D., Dakshanamurthy, S., Wang, Y. & Giaccone, G. A specific missense mutation in GTF2I occurs at high frequency in thymic epithelial tumors. *Nat. Genet.* **46**, 844-849 (2014).

52 Ashworth, T. & Roy, A. L. Cutting Edge: TFII-I controls B cell proliferation via regulating NF-kappaB. *Journal of immunology* **178**, 2631-2635 (2007).

53 Landschulz, W. H., Johnson, P. F. & McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764 (1988).
54 Yang, W. & Desiderio, S. BAP-135, a target for Bruton's tyrosine kinase in response to B cell receptor engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 604-609 (1997).
55 Novina, C. D., Cheriyath, V. & Roy, A. L. Regulation of TFII-I activity by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 33443-33448 (1998).
56 Novina, C. D., Kumar, S., Bajpai, U., Cheriyath, V., Zhang, K., Pillai, S., Wortis, H. H. & Roy, A. L. Regulation of nuclear localization and transcriptional activity of TFII-I by Bruton's tyrosine kinase. *Molecular and cellular biology* **19**, 5014-5024 (1999).