

令和 元 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09896

研究課題名（和文）miR223を介したS1PR1発現制御とSLEにおける病態への関与

研究課題名（英文）The pathogenesis of S1PR1 reduction via miR223-3p in Lupus T cells.

研究代表者

渡部 克枝（砂堀克枝）（WATANABE, KATSUE）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80639914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：全身性エリテマトーデス（SLE）においてスフィンゴシン1リン酸受容体1（S1PR1）の発現低下を示唆する報告がある。我々は、SLEの代表的モデルマウスMRL/lprマウス脾臓由来T細胞において、S1pr1の発現を抑制するmicroRNA223-3p（miR223）の発現亢進を確認した。miR223ノックアウトB6/MRLマウスを作成し解析したところ、末梢リンパ節CD4+T細胞中のearly apoptosis細胞の割合と、脾臓中のCD19+細胞、CD19+CD138+細胞及びCD138+細胞数が有意に上昇していることを確認し、SLEの病態改善に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天的遺伝子制御によりSLEの病態形成に関与する新規候補microRNAとしてmiR223-3pに着目し、標的遺伝子であるS1PR1の発現制御を介したアポトーシス能への影響等が確認された。SLEは、いまだアンメットメディカルニーズの高い難治性の自己免疫疾患であり、miR223及びS1PR1が新規治療標的となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The reduction of sphingosine 1 phosphate receptor 1 (S1PR1) expression in systemic lupus erythematosus (SLE) is reported. We confirmed the upregulation of microRNA223-3p (miR223), which suppresses the expression of S1PR1, in the splenic T cells in MRL/lpr lupus-prone mice. We constructed and analyzed miR223 knockout B6/MRL mice. The proportion of early apoptosis cells in peripheral lymphatic CD4+ T cells was significantly increased, and the numbers of CD19+ cells, CD19+CD138+ cells and CD138+ cells in spleen were also significantly increased. They might contribute to the improvement of the disease activity of SLE.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：SLE S1PR1 miR223 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus; SLE) は、代表的な慢性炎症性自己免疫疾患であり、重篤な臓器障害をきたしうる予後不良の疾患である。発病率は 10 万人あたり 10~100 人と推定されており、20~40 歳代の若年女性に好発し、妊娠出産などの女性のライフステージに重大な影響を及ぼす。現在はステロイドを中心とした免疫抑制療法が主体だが、未だ確立された治療法はなく、アンメットメディカルニーズに応えることが求められている。

SLE の発症のメカニズムは依然不明であるが、一卵性双生児における疫学調査にて、一方が有病者の場合、他方の有病率は 25%から 50%と報告されており、何らかの遺伝的素因を背景、に、感染、性ホルモン、紫外線、薬物等の環境因子が加わって発症するものと推測されている。近年、後天的遺伝子制御メカニズムのひとつとして、micro RNA (miRNA) などの non-coding RNA による RNA サイレncing が注目されている。20-25 塩基長の miRNA はエフェクター複合体 RISC (RNA-induced silencing complex) へ取り込まれ、mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) の相補的配列に結合し、標的 mRNA の安定性や蛋白への翻訳を阻害することで遺伝子発現を負に制御しており、分化発生や発癌メカニズムの他、免疫応答への関与も報告されている。特に SLE においては、免疫応答に重要な役割を担う T 細胞におけるエピゲノム制御が多数報告されていることより、我々は、SLE 由来 T 細胞において後天的遺伝子発現修飾機構で制御される新規疾患関連遺伝子を探索するため、網羅的エピゲノムライブラリーを作成し解析した。その中で我々は、SLE モデルマウス由来 T 細胞における miR223-3p (miR223) 発現亢進及びその標的遺伝子である S1pr1 の発現低下に着目した。

S1P は 379Da のスフィンゴ脂質で、セラミドが分解されて生じたスフィンゴシンが、炎症性サイトカインや成長因子により活性化されたスフィンゴシンキナーゼでリン酸化を受け産生後、APC トランスポーターを介して細胞外へ放出される。主要な産生細胞として、血小板やマクロファージ、赤血球等が知られている。S1P 受容体はリゾリン脂質受容体ファミリーに属する G タンパク質共役受容体であり、5 種のアイソタイプが存在する。このうち、S1P 受容体 1 (S1PR1) はリンパ球や血管内皮細胞等、免疫担当細胞を中心に広く発現している。

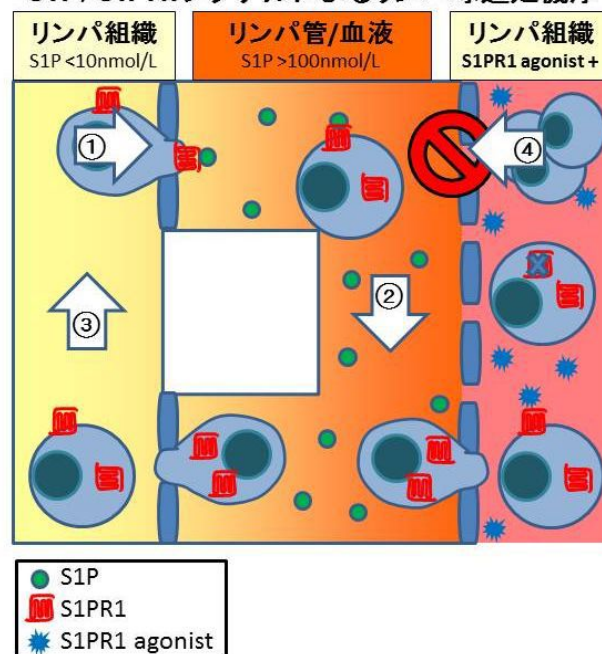
リンパ球表面に存在する S1PR1 は血漿および組織中の S1P 濃度勾配に従い、図 1 に示す通り細胞表面の発現が調整される (Annu Rev Immunol 30, 69-94, 2012)。S1P リアーゼ等の S1P 分解酵素の存在する胸腺や二次リンパ組織では、S1P が低濃度となりリンパ球表面の S1PR1 発現が上昇し、S1P が高濃度に存在する循環血中への移出が促進される (図 1-)。一方、S1P 高濃度の血液・リンパ液中では、リンパ球表面の S1PR1 は内在化し、それと並行してシグナル伝達が生じ細胞運動が誘導される ()。その後、再度 S1P 低濃度のリンパ組織内に移入したリンパ球における内在化した S1PR1 はリサイクルされ、再度細胞表面での発現が回復し、循環血漿中への移出が可能となる ()。S1PR1-KO マウスは血管内皮細胞間の接着阻害のため胎生致死となるが (J Clin Invest 106(8), 951-961, 2000)、S1PR1 リンパ球特異的 KO マウスでは、胸腺から血漿中へのリンパ球の移出が阻害され、末梢血・二次リンパ組織へのリンパ球浸潤の減少を認める (J Biol Chem 279(15), 15396-15401, 2004)。

多発性硬化症等で欧米にて適応を取得している免疫抑制剤 Fingolimod (FTY720) は、生体内でリン酸化後、リンパ球上の S1PR1 に対してアゴニストとして作用し、細胞表面の S1PR1 を内在化させることで二次リンパ組織から循環血漿中へのリンパ球の移出を阻害し、臓器への細胞浸潤抑制により免疫抑制機能を発揮することが判明している ()。他の自己免疫疾患での臨床応用も期待されており、SLE においては、疾患モデルマウス Fas^{lpr}/lpr 脾細胞及び SLE 患者末梢血単核細胞 (PBMC) において、S1PR1 発現低下が報告されている (J Immunol 194(11), 5437-5445, 2015)。加えて、MRL/lpr マウスに S1PR1 選択的アゴニスト KRP-203 を投与した場合、CD4-CD8-T 細胞での Fas 非依存性アポトーシスの亢進及び、腎組織への T 細胞の浸潤抑制による腎炎進展抑制効果が認められた (Kidney Int 74(10), 1319-1326, 2008)。このような背景から、S1PR1

受容体を介したリンパ球循環動態の変化は、SLE の病勢に深く関与していると考えられるが、S1PR1 発現低下の機序は不明である。上述の予備実験における miRNA/mRNA 統合ライブラリーにて、miR223 のリード数補正值は、対照となる C57BL/6 (B6) マウス 7.9 に対し、MRL/lpr マ

図1

S1P/S1PR1シグナルによるリンパ球遊走機序



ウスで 214.8 と疾患群で著明に亢進していた。一方、その標的の一つである S1pr1 のリード数補正值は、B6 マウスで 138.0 に対し MRL/lpr マウスで 33.0、SLE/control 比で 0.24 と低下しており ($P < 0.005$)、SLE における miR223 の発現亢進が、標的遺伝子である S1pr1 の発現抑制を惹起している可能性が示唆された。しかしながら、過去の報告では、SLE 患者血漿中での増加 (J Rheumatol 42(2), 214-221, 2015) や末梢血単核球細胞での発現亢進 (PLoS One 5(5), e10344, 2010) を認める報告がある一方で、活動性のループス腎炎患者血漿中での低下 (Arthritis Rheum 65(5), 1324-1334, 2013) も報告されており、同 miRNA の関与についての一定の見解は得られていない。また、S1PR1 発現を調整する miRNA として miR155 の関与が指摘されている。miR155-/- Fas lpr/lpr マウスでは、腎・脾で S1pr1 の発現が上昇し、腎尿細管間質への T 細胞浸潤を抑制することで腎炎の進展を抑制し、この効果は S1PR1 アンタゴニスト W146 の投与により減弱した (J Immunol 194(11), 5437-5445, 2015)。同様に、SLE で発現亢進を確認した miR223 が、標的である S1PR1 の発現抑制をきたし、SLE の病態に関与している可能性を考え、今回の実験計画を立案した。

2. 研究の目的

全身性エリテマトーデス (SLE) において、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 1 (S1PR1) の発現低下を示唆する報告がある。我々は、SLE の代表的モデルマウス MRL/lpr マウス脾臓由来 T 細胞において、S1pr1 の発現を抑制する microRNA223-3p (miR223) の発現亢進を確認した。miR223 を介した S1PR1 発現制御による病態関与を解明するため、miR223 ノックアウト SLE モデルマウスを作成し、リンパ球サブセットやアポトーシス能、表現型の差異等を解析する。

3. 研究の方法

1) MRL/lpr マウス脾臓 T 細胞における miR223 及び S1PR1 発現量の確認

MRL/lpr マウス脾臓 T 細胞由来を用いた smallRNA/mRNA 統合ライブラリーにて、コントロールマウス (C57BL/6 : B6) と比較して MRL/lpr マウスにて miR223 の発現亢進及び S1pr1 の mRNA 発現量の低下を認めたことより、再現性の確認のため、B6 マウス及び MRL/lpr マウス脾臓由来 T 細胞より抽出した複数検体の small RNA 及び mRNA を用いて、miR223 及び S1pr1 の転写レベルの発現量を real-time PCR 法で測定した。

2) miR223 による S1PR1 発現調整の検討

マウス T 細胞系培養細胞 EL-4 に、リポフェクタミンを用いて microRNA mimic の導入による miR223 過剰発現、もしくは antagomir223 導入による同 miRNA の発現阻害を行い、S1pr1 の mRNA 発現量の差異を real-time PCR 法にて定量した。

標識としてルシフェラーゼ遺伝子をライゲーションし S1PR1 の 3'UTR 領域含有レトロウイルスを細胞株に遺伝子導入し、生理的に miR223 が結合しうるカルシフェラーゼアッセイを用いて定量的評価を行った。

3) miR223 欠損 SLE モデルマウスの作成

miR223 欠損 SLE モデルマウスとして、MRL/lpr 及び B6/MRL マウスとの交配を行い、2 種のモデルマウスを作成した。

MRL/lpr マウス (MRL/MpJ-Tnfrsf6^{lpr}/Crlj) は、代表的な自然発症系 SLE 疾患モデルマウスであり、常染色体劣性突然変異遺伝子 lpr (lymphoproliferation) を持ち、アポトーシスを誘導する Fas の欠損を認める。Thy1+B220+CD4-CD8-の異常 T 細胞の増殖による脾腫及び全身リンパ節腫大、抗 ds-DNA 抗体などの自己抗体の過剰産生や、ループス腎炎様の免疫複合体沈着型腎炎を認める。8 週齢頃からリンパ節腫脹と蛋白尿、関節炎、脱毛が出現し、病勢は 16 週齢頃までにピークを迎え、正常マウスと比較し寿命は短縮する。

上記 MRL/lpr マウスと、miR223 ホモノックアウト (KO) マウス (B6.Cg-Ptprca Mir223^{tm1Fcam/J}) を交配し、miR223 ヘテロ KO MRL/lpr マウスを作成後、戻し交配を順次行い、第 7 世代以降 miR223 ヘテロ KO MRL/lpr 雌雄を交配し、miR223 ホモ KO MRL/lpr を得た。

更に、B6 マウスを背景に持つ B6/MRL マウス (B6.MRL-Fas^{lpr}/J) と miR223 ホモ KO マウスとの交配を行い、コントロールとして B6/MRL と B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ との交配で得られたマウスを用いた。遺伝背景を一致させることで交配の時間を短縮させることが可能になるが、病勢は MRL/lpr マウスと比較し軽症で、発症までに時間を有することが欠点として挙げられる (6 か月前後)。

4) miR223 欠損 SLE モデルマウスを用いた T 細胞サブセット及び表現型解析

MRL/lpr 及び MRL/lpr-miR223KO マウスについては、発症早期 8 週齢以降発症後期 16 週齢まで、以下のような項目をメインに解析する。

- ・16 週齢にて、胸腺、リンパ節、脾臓のリンパ球サブセットの差異を Flow Cytometer を用いて解析し、S1pr1 発現量の解析も同時に行う。また、各サブセットのアポトーシスアッセイで、アポトーシス効率の差異を検討する。

- ・8~16 週齢まで、2 週ごとに体重測定し、回収した尿検体中の蛋白定量を行う。血清は 8、12、16 週に回収し、血清中 S1P 濃度、dsDNA 抗体値を測定する。

- ・16 週齢の腎組織を光学顕微鏡標本および免疫蛍光染色法を用いて腎炎の評価を行い、糸球体及び間質の浸潤細胞の程度と種類を同定する。また、腎以外に、胸腺、リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓、肺などの各臓器における miR223 および S1PR1 発現量の差異を解析する。

B6/MRL 背景マウスについては、同様の解析を、発症早期の 56 週齢で施行する。

4. 研究成果

図 2 に示すとおり、コントロールマウス (B6) と比較し、MRL/lpr マウスにおける miR223 の発現亢進及び S1PR1 の mRNA 発現低下を確認し、予備実験で得られていたエピゲノムライブラリーの結果の再現性を確認した上で、miR223 による S1PR1 の発現制御について、in vitro の系で検証した。

miR223 mimic もしくはコントロール (Negative control mimic) をマウス T 細胞系培養細胞 EL-4 にリポフェクティンを用いて遺伝子導入し、S1PR1 の mRNA 発現が有意に上昇することを確認した。また、ルシフェラーゼ遺伝子をライゲーションした S1PR1 の 3' UTR 領域含有レトロウイルスを EL-4 細胞株に遺伝子導入し、生理的に miR223 が結合しうるかルシフェラーゼアッセイを用いて定量的評価を行った。同細胞に miR223 mimic を遺伝子導入した際、コントロールと比較しルシフェラーゼ活性の低下を認めており、S1PR1 の 3' UTR への miR223 の結合が S1PR1 の発現抑制に関与することが示唆された。

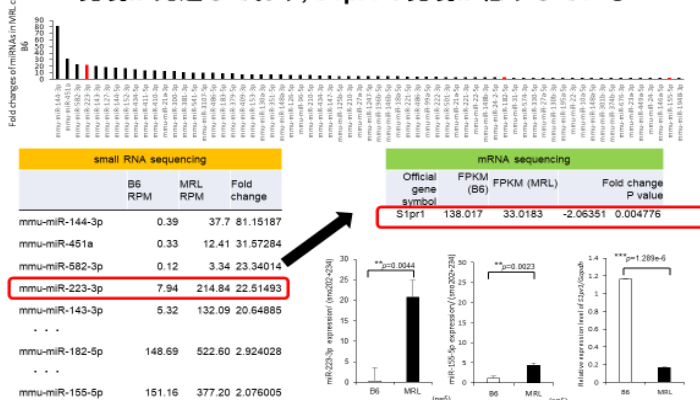
さらに、MRL/lpr マウスに S1PR1 アゴニストを投与すると、リンパ球のアポトーシスが増加し腎障害が軽減したとの報告 (J Immunol:194(11),5437-5445, 2015) をもとに、miR223 mimic 導入細胞における apoptosis assay を行い、コントロールと比較し、early apoptosis 細胞が増加していることを確認した。

SLE における miR223 の機能を in vivo で確認するため、miR223 KO マウスと B6MRL マウスの交配を行い、正常 B6MRL と miR223 欠損 B6MRL マウスの T 細胞の性状について、FACS を用いて解析・比較した。miR223 欠損 B6MRL マウスの脾臓由来 CD4⁺T 細胞では S1pr1 の発現が有意に上昇し、末梢リンパ節 CD4⁺T 細胞中の early apoptosis 細胞の割合も有意に上昇していた。さらに miR223 欠損 B6MRL マウス脾臓中の CD19⁺細胞、CD19⁺CD138⁺細胞及び CD138⁺細胞数が有意に上昇していることも確認した。

モデルマウスでの生体内分布や表現系の解析は引き続き施行している。今後は、B6MRL 背景マウスとともに、MRL/lpr-miR223KO マウスにおける S1PR1 の発現回復が末梢リンパ節および脾臓、腎の病態改善に寄与しているかどうかについて、詳細に検討をすすめる。さらに、apoptosis assay の結果が in vivo と in vitro で相反する形となっており、その原因として、もともと miR223 の発現が一過性に低下している場合と先天的に低下している場合で表現型に差異を生じる可能性、また今回の miR223KO マウスはリンパ球特異的欠損ではないことも影響している可能性が考えられたため、この点をさらに検証するため、リンパ球特異的 miR223 欠損マウスの作製および解析についても検討中である。

図2

B6に比較しMRLのCD4陽性T細胞では、miR223の発現が亢進しており、S1pr1の発現が低下している



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浅野（平松） 澄恵

ローマ字氏名：Sumie Hiramatsu ASANO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。