

平成30年6月8日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19601

研究課題名(和文) SLE由来T細胞におけるカテプシンEの発現上昇とDNAメチル化による発現制御

研究課題名(英文) DNA Methylation-dependent regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice

研究代表者

宮脇 義亜 (MIYAWAKI, Yoshia)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：10761116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SLE由来T細胞において新規のメチル化感受性疾患関連遺伝子を探索するため、SLEモデルマウスMRL/lpr (MRL) 及び対照群C57BL/6 (B6)より脾臓由来CD4陽性T細胞のメチル化DNAとmRNAを抽出し、網羅的シーケンス解析によって、MRLにおいてカテプシンE (CTSE) のイントロン1領域内のCGCG配列のDNA低メチル化とmRNAの有意な発現亢進を確認した。ChIP-PCR法、EMSA法にて、CGCG領域のDNA脱メチル化により、転写因子Kaiso およびHDAC3の結合が阻害され、CTSEの発現が亢進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Global DNA hypomethylation in T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients was involved in the pathogenesis. To identify new methylation-sensitive genes, we integrated genome-wide DNA methylation and mRNA profiling data in CD4+ cells of MRL/lpr (MRL) and C57BL6/J (B6) mice. We identified Cathepsin E (Ctse), in which 13 methyl-CpGs within 583 bp region of intron 1 were hypomethylated, and the transcript level was upregulated in MRL compared with B6. Among them, we focused on a mCGCG which was hypomethylated and mutated to CGGG in MRL. The binding of Kaiso, a repressive transcriptional factor recognized mCGmCG motif was reduced in MRL and EL4 cells treated with 5-azaC and/or Trichostatin A. In addition, IL-10 secretion was reduced in EL4 cells transfected with siCtse. In conclusion, reduced recruitment of Kaiso to the hypomethylated mCGCG motif induced the overexpression of Ctse and IL-10 in CD4+ cells which may be involved in the pathogenesis of SLE.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：SLE Ctse Kaiso Epigenetics DNA methylation CD4陽性T細胞

1. 研究開始当初の背景

全身性ループスエリテマトーデス (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。我が国の特定疾患治療研究事業の対象疾患で、2014年の全国特定疾患医療受給者証所持者数は63622人と報告されており、発病率は10万人あたり10~100人と推定されている。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への対応が早急に求められている。

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として、感染、性ホルモン、紫外線、薬物など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、エピゲノム機構による遺伝子発現制御が注目されている。その中で、DNAメチル化については、SLE患者の、特にT細胞において、種々の遺伝子のプロモーター領域のCpG islandで対照群と比較し脱メチル化の状態を維持していることが報告されており、病態への関与が示唆される。病態に関与するメチル化感受性遺伝子については、CD5、CD11a、CD70など多数報告がある (*Epigenetics* 6, 593-601, 2011)。これらの知見に基づき、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、代表的SLEモデルマウスMRL/lprマウス及びその対照となるC57BL/6Jマウス由来T細胞より分離したmRNA及びメチル化DNAを用いて次世代シーケンサーにて統合解析した。その中で、我々は新規疾患関連候補遺伝子として、対照と比較しSLEで発現増強を認め、かつ同遺伝子イントロン1上にDNA低メチル化領域の存在が確認されたカテプシンE (Ctse; Cathepsin E) に着目した。

2. 研究の目的

SLE由来T細胞におけるCtse遺伝子イントロン1領域のDNA低メチル化領域での転写制御機構について解析し、同遺伝子の発現上昇によるSLE病態形成への関与を検証する。

3. 研究の方法

1) MRL/lprマウス脾臓T細胞由来を用いた網羅的エピゲノムライブラリーの作成と候補遺伝子の同定

SLEモデルマウスMRL/MpJ-Tnfrsf6^{lpr}/CrIj (MRL/lprマウス: 16週) 及びその対照群として同一週齢の健常マウスC57BL/6JJcl (B6マウス) を用い、摘出した脾臓細胞よりCD4陽性細胞をミルテニー社の抗体磁気ビーズで分離し抽出精製したtotal RNAより、イルミナ社のTruSeq Small RNA/RNA Sample Preparationに従ってsmall RNA及びRNA解

析用のライブラリーを調整し、次世代シーケンサーHiSeqを用いてシーケンスを行った。更に同一の手法を用いて分離した脾臓由来CD4陽性細胞からゲノムDNAを分離し、メチル化DNAを濃縮した上で次世代シーケンサーにて解析し、上記ライブラリーと統合し、DNAメチル化にて発現が制御される新規標的遺伝子を検索した。対照と比較し発現差異を認める候補遺伝子については、複数のマウス検体を用いて転写及び蛋白発現レベルを定量化し、再現性を確認した。

着目したDNAメチル化の差異を認める領域については、バイサルファイトシーケンス法を用いて各塩基のメチル化状態を解析した。同定された領域に結合しうる候補転写因子の検索はJASPARデータベースを用いて検索した。

2) 5-azaC/TSA処理培養細胞を用いたCtse発現制御の解析

マウスT細胞株EL-4をDNA脱メチル化剤5-Azacytidine (5-azaC) で処理し、DNA及びmRNAを抽出した。DNAはメチル化感受性制限酵素 (AAT11) 処理後、切断部位を挟むプライマー及びコントロールとして切断部位を含まないように設計されたプライマーを用いてPCRを行い、候補転写因子結合領域のDNAメチル化の差異について半定量化した。Ctse転写レベルはreal-time PCR法で定量した。更に、同細胞における転写因子の結合能に関してはChromatin immunoprecipitation assay (ChIP)-PCR法を用いて解析した。また、Histone Deacetylase (HDAC) 3の結合の差異を検討する上で、HDAC阻害剤Trichostatin A (TSA) を単独ないし5-azaC併用下で添加し、同様の検討を行った。

3) MRLマウスにおける転写因子結合能の差異とCtseプロモーターへの影響

MRLマウスにおける転写因子結合能の差異については、ChIP-PCR法での検討に加え、MRLまたはB6の転写因子結合領域含有メチル化配列をプローブとしたElectrophoresis mobility shift assay (EMSA) 及び転写因子抗体を用いたsupershift assayを施行した。また、転写因子結合領域含有DNA低メチル化領域とプロモーター領域をサブクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子含有ベクター (pGL4) に挿入したプラスミドを作成後、CpGメチルトランスフェラーゼ (*M. Sss I*) とその基質S-adenosyl methionine (SAM) で反応させメチル化プラスミドを作成した。EL4細胞にメチル化もしくは非メチル化プラスミドをエレクトロポレーション法で遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにてプロモーター活性を定量した。

4) Ctse発現低下によるIL-10産生低下

CtseのsiRNAをEL-4細胞にエレクトロポレーション法で導入し、PMA/Ionomycin刺激を行い、mRNA (6hr) 及び培養上清 (12,24hr) を回収し、IL-10をreal-time PCR法及びELISA法で定量した。

4. 研究成果

1) SLE 由来 T 細胞における Ctse 発現亢進と DNA 低メチル化領域の同定

網羅的エピゲノムライブラリーの解析結果から新規標的候補遺伝子として着目した CTSE について、real-time PCR 法及び Western Blot 法を用いて同遺伝子の転写及び蛋白発現レベルを定量化し、対照と比較して SLE 由来 T 細胞で発現が亢進していることを確認した。

また、MRL にて DNA 低メチル化を認めた同遺伝子イントロン 1 領域内の 583bp 長の配列についてバイサルファイトシーケンス解析を行い、同領域内の 13 個の CpG 配列のうち、11 個で DNA メチル化の低下、2 個で変異を認めた。この中で、我々は 11 番目のメチル化 CpG (mCGCG) 配列と、同領域に結合する可能性のある候補メチル化感受性転写因子 Kaiso に着目した。Kaiso は C2H2 zinc-finger domain によりメチル化 DNA 配列 (mCGmCG) を特異的に認識し、さらに SMART/ NCoR/HDAC3 複合体をリクルートすることで遺伝子発現を抑制するとの報告があり、同転写因子が同定したメチル化 CGCG 領域に結合し、Ctse の発現を抑制する可能性が示唆された。MRL における同部位のメチル化は $80.0 \pm 6.2\%$ と、B6 ($93.3 \pm 2.05\%$) と比較し低下しており、かつ配列の変異 (CGGG) も認めた。ChIP-PCR にて、MRL 由来 T 細胞の同領域への Kaiso 及び HDAC3 の結合は B6 と比較し低下していた。

2) 5-azaC/ TSA 処理培養細胞を用いた Ctse 発現制御の解析

次に、5-azaC 処理後 EL-4 細胞にて、メチル化感受性制限酵素処理 PCR 法を用いて同領域の脱メチル化を確認した上で、脱メチル化による Kaiso の結合及び CTSE 発現の影響を検討した。脱メチル化・ヒストンアセチル化状態にある CGCG 配列では有意に Kaiso および HDAC3 の結合能が低下し、Ctse の mRNA 発現が亢進することを確認した。

3) MRL マウスにおける転写因子結合能の差異と Ctse プロモーターへの影響

B6 と MRL で同部位の塩基配列に違いを認めため (B6:CGCG, MRL:CGGG)、各々のメチル化配列をプローブとした EMSA 及び Kaiso 抗体を用いた supershift assay を施行した。mCGCG 配列では Kaino 抗体添加時に supershift バンドを確認しえたが、mCGGG 配列ではバンドシフトを認めず、MRL における Kaiso の結合能の低下が示唆された。また、CGGG 配列含有プラスミドは CGCG 配列含有プラスミドと比較し Ctse プロモーター活性が高かったが、メチル化プラスミドについてはいずれの配列においても活性が低下した。

4) Ctse による IL-10 産生制御

siCTSE 導入 EL4 細胞では、IL-10 の転写レベルは有意な変化を認めなかったが蛋白レベルは有意差をもって低下していた。CTSE に

よる IL-10 制御のメカニズムについては、今後の更なる検証が必要であるが、MRL マウスにおいて、IL-10 mRNA の亢進とともに、IL-10 翻訳を抑制する programmed cell death 4 (Pcd4) の mRNA 発現低下を認めており、Pcd4 発現制御を介した間接的な関与が考えられた。

以上の結果より、mCGmCG 配列を認識する抑制性転写因子 Kaiso の結合が、MRL マウスにおける配列の変異及び DNA メチル化低下により低下することで CTSE 発現亢進が惹起され、IL-10 発現亢進等で SLE の病態形成に関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

平松 澄恵、宮脇 義亜、DNA Methylation-dependent regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice、the 61st Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology(JCR)、2017年4月21日、Fukuoka International Congress Center (福岡県福岡市)

平松 澄恵、宮脇 義亜、MRL/lpr マウスにおける DNA メチル化感受性転写因子 Kaiso によるカテプシン E (CTSE) の発現制御、第 45 回日本臨床免疫学会総会、2017年9月29日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

平松 澄恵、宮脇 義亜、DNA Methylation-dependent regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice、2017 ACR/ARHP Annual Meeting、2017年11月7日、(San Diego, CA, USA)

平松 澄恵、宮脇 義亜、DNA Methylation-dependent regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice、The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology、2017年12月13日、仙台国際センター、(宮城県仙台市)

[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](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮脇 義亜 (MIYAWAKI, Yoshia)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・

非常勤研究員

研究者番号：10761116

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者