

平成 30 年 6 月 11 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：16K19602

研究課題名(和文) SLE由来T細胞におけるmiR200a-3pを介したIL-2転写制御機構

研究課題名(英文) Downregulation of miR-200a-3p, Targeting CtBP2 Complex, Is Involved in the Hypoproduction of IL-2 in Systemic Lupus Erythematosus-Derived T Cells.

研究代表者

榑崎 真理子(Narazaki, Mariko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70773018

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モデルマウスMRL/lpr由来T細胞で発現低下を認めたmiR200a-3pについて、その病態的意義を検討した。miR200a-3p mimic導入EL4細胞にて、抑制性転写因子(ZEB1、ZEB2、CtBP2)の発現低下とIL-2遺伝子上NRE-A領域への結合低下及びIL-2プロモーター活性と蛋白発現亢進を確認した。またMRL/lpr由来T細胞にて同領域へのZEB1/CtBP2結合遷延を認めた。以上より、miR-200a-3p発現が低下したSLE由来T細胞では、ZEB1/ZEB2/CtBP2の発現亢進とIL-2遺伝子への結合遷延をきたし、IL-2産生抑制誘導の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify candidate disease-related microRNAs, we performed RNA sequencing and focused on miR-200a-3p which was significantly decreased, whereas its putative targets, ZEB2 and CtBP2, were upregulated in CD4+ T cells from lupus prone mice compared with the control. The complex of ZEB1/2 is known to suppress various genes including IL-2 by recruiting CtBP2. Therefore, we hypothesized that decreased miR-200a-3p causes IL-2 deficit through the ZEB/CtBP2 complex in SLE CD4+ T cells. Overexpression of miR-200a-3p suppressed the expression of these complexes and these bindings to IL-2 promoter region which caused IL-2 overexpression in EL4 cells. In addition, the ZEB1/CtBP2 complex on the region was significantly increased in stimulated lupus CD4+ T cells. Our studies have revealed a new epigenetic pathway in the control of IL-2 production in SLE whereby low levels of miR-200a-3p accumulate the binding of the ZEB1/CtBP2 complex to the IL-2 promoter and suppress IL-2 production.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス エピジェネティクス microRNA インターロイキン2 miR-200a-3p ZEB1 ZEB2 CtBP2

## 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、異常な T・B 細胞の活性化により様々なサイトカインや自己抗体の産生・免疫複合体の臓器への沈着を引き起こし、全身に障害を及ぼす自己免疫性疾患である。後天的遺伝子発現制御システムとして、マイクロ RNA (microRNA; miRNA) をはじめとするエピジェネティクス制御機構が注目されており、自己免疫疾患も含めた種々の疾患における病態形成への関与が報告されている。

我々は、SLE 由来 T 細胞における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、まず網羅的エピゲノムライブラリーを作成した。

SLE の代表的モデル動物である

MRL/MpJ-Tnfrsf6<sup>lpr</sup>/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/6Jc1 (B6 マウス) を用いた。脾臓細胞より抗体磁気ビーズを用いて CD4 陽性細胞の分離を行い、miRNA 及び mRNA を含む total RNA を抽出後、HiSeq を用いてシーケンス解析を行った。双方のライブラリーのデータを統合し、ターゲット遺伝子の発現異常を伴う候補 miRNA を検索した。この解析の結果、有意差を認めた候補 miRNA 群から、MRL/lpr にてもっとも有意なリード数の低下を認めた miR-200a-3p、及びその標的遺伝子であり mRNA のリード数上昇を認めた転写因子 CtBP2 (C-terminal binding protein 2)、ZEB2 (Zinc finger E-box protein 2) に着目した。

## 2. 研究の目的

SLE モデルマウス由来 T 細胞で発現低下を認めた miR200a-3p が、抑制性転写因子の発現亢進を介して、T 細胞の分化増殖に必須であるインターロイキン 2 (IL-2) の産生抑制に関与している可能性について検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) microRNA mimic 導入 EL4 細胞を用いた実験

マウス T 細胞系培養細胞 (EL4) にリポフェクタミンを用いて miR200a-3p mimic を遺伝子導入し、以下の実験を行った。

・ZEB1/2/CtBP2 の mRNA 量を real-time PCR 法で定量した。

・PMA/Iono (Phorbol 12-Myristate 13 Acetate/ Ionomycin) 刺激後、上清及び細胞を回収した。抽出した mRNA を用いて、IL-2 の mRNA 量を real-time PCR 法で定量した。培養上清中の IL-2 濃度を ELISA で定量した。IL-2 プロモーターを組み込んだ pT81 ルシフェラーゼベクターを co-transfection した細胞を PMA/Iono 刺激後回収し、ルシフェラーゼアッセイで IL-2 プロモーター活性を定量した。

刺激後の細胞から抽出した核蛋白を用いて、IL-2 の転写抑制部位である negative regulatory element A (NRE-A) 領域への ZEB1/2/CtBP2 の結合をゲルシフト法で検討した。NRE-A への ZEB1/2/CtBP2 の結合能は、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) でも確認した。

### 2) マウス由来細胞を用いた実験

B6 及び MRL/lpr マウス脾臓より抽出した CD4 陽性細胞を用い、miR200a-3p 及び ZEB1/2/CtBP2 発現量を real-time PCR 法で定量した。PMA/Iono 刺激後の培養上清を回収し、IL-2 濃度を ELISA で定量した。PMA/Iono 刺激後、ChIP 法で NRE-A への ZEB1/2/CtBP2 の結合能を確認した。

## 4. 研究成果

### 1) miR-200a-3p による ZEB1、ZEB2、CtBP2 の制御

複数の検体を用いて、miR-200a-3p の発現量が MRL/lpr マウスで著明に低下していることを確認した。その標的遺伝子候補である CtBP2 は MRL/lpr マウスにて有意に上昇し、

ZEB2 は有意ではなかったもののコントロールより高い傾向にあった。miR-200a-3p は、ZEB ファミリーのそれぞれの3' UTRに結合配列を持つことから、miR-200a-3p が ZEB2、CtBP2 を抑制的に制御していることが示唆された。また、我々の統合解析では発現亢進は認めなかったが、ZEB ファミリーであることを考慮して追加した ZEB1 は、ZEB2、CtBP2 とは逆に mRNA レベルの発現は MRL/lpr マウスにおいて有意に低下していた。しかし蛋白・核移行レベルで miR-200a-3p と関連する可能性を考慮し、引き続き解析の対象とした。

2) miR-200a-3p による ZEB1、ZEB2、CtBP2 を介した IL-2 産生制御

miR-200a-3p 導入 EL4 細胞にて、ZEB1、ZEB2、CtBP2 の mRNA 発現は低下し、更に PMA/Iono 刺激による IL-2 誘導は miR-200a-3p 過剰発現により亢進し、IL-2 プロモーター活性の上昇及び mRNA 発現量の上昇を惹起した。PMA/Iono 刺激後の IL-2 産生量は、コントロールと比較し MRL/lpr マウスで低下していることもあわせて確認した。

3) miR-200a-3p による ZEB1、ZEB2、CtBP2 の IL-2 遺伝子への結合能の検討

ZEB1 の IL-2 への結合配列として報告されている NRE-A 領域へ、上記転写因子が結合するか、またその結合に miR-200a-3p が関与するかに関して、ゲルシフトアッセイ及び ChIP 法で検討した。miR200a-3p mimic 導入 EL4 細胞ではいずれも結合の低下を認めたが、MRL/lpr 由来 T 細胞では正常マウスで認めた ZEB1、CtBP2 結合の乖離が遷延していた。

以上の結果より、in vivo と in vitro にて ZEB2 の動態に違いがあるものの、SLE では miR-200a-3p の発現低下による ZEB1、ZEB2、CtBP2 の発現亢進により、IL-2 産生が抑制されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

E Katsuyama,  
K-Sunahori-Watanabe, S Hiramatsu, Y Miyawaki, K Ohashi, M Morishita, H Watanabe, T Katsuyama, M.Narazaki,  
N Tatebe, T Kawabata, KE Sada, and J Wada  
Down-regulation of miR-200a-3p targeting C-terminal Binding Protein-2(CtBP2) is involved in hypoproduction of IL-2 in SLE derived T cells 日本リウマチ学会、2016年4月21日、横浜

E Katsuyama, M Yan,  
K-Sunahori-Watanabe, S Hiramatsu, Y Miyawaki, K Ohashi, M Morishita, H Watanabe, T Katsuyama, M.Narazaki, N Tatebe, T Kawabata, KE Sada, and J Wada  
Down-regulation of miR-200a-3p, targeting C-terminal binding protein-2 (CtBP2) complex, is involved in the hypoproduction of IL-2 in SLE-derived T cells, American College of Rheumatology 2016、2016年11月25日 Washington, D.C

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑崎 真理子 (NARAZAKI Mariko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70773018

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )