

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16151

研究課題名(和文) SLE由来T細胞におけるDNAメチル化で制御されたカテプシンEの機能解析

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

浅野 澄恵 (ASANO, Sumie)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80816497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SLE由来CD4陽性T細胞において新規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領域内に11箇所のCpGの低メチル化とCtse mRNAの有意な発現亢進を確認した。そのうちB6で高メチル化したCGCG配列において、MRLでは低メチル化を認めた。ChIP-qPCR法とEMSA法にて、CGCG領域のDNA脱メチル化により、メチル化感受性転写因子Kaisoの結合が阻害され、Ctseの発現亢進を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLEの新規治療薬を見いだすため、その発症機序に着目し、後天的遺伝子制御に関与するメチル化DNAとmRNAを検索した。SLEのCD4陽性細胞で、カテプシンE(Ctse)のCGCG配列の低メチル化によりメチル化感受性転写因子Kaisoの結合が阻害され、Ctseの発現が亢進し、Pcd4 mRNAの発現亢進を介してIL-10分泌が亢進することを確認した。Ctseは少なくともSLEにおけるIL-10の高発現に関連しており、更なるCtseの機能解析にて、SLEの病態解明や新規治療ターゲットになりうる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Global DNA hypomethylation in CD4+ cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients was suggested to play a key role 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 C57BL/6/J (B6) mice. We identified Cathepsin E (Ctse), in which 13 methyl-CpGs within 583 bp region of intron 1 were hypomethylated, and Ctse mRNA upregulated in MRL compared with B6 mice. One of methyl-CpGs, mCGCG was $93.3 \pm 2.05\%$ methylated in B6 mice, while $80.0 \pm 6.2\%$ methylated and mutated to CGGG in MRL mice. Kaiso is known to bind to mCGCG and we hypothesized that it may repress expression of Ctse in B6 mice. The binding of Kaiso to mCGCG site in B6 mice was reduced in MRL mice revealed by ChIP-PCR. EL4 cells treated with 5-azaC and/or Trichostatin A showed the suppression of the binding of Kaiso to mCGCG motif by ChIP-PCR and the overexpression of Ctse was demonstrated by qPCR.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：DNAメチル化 SLE CTSE CD4陽性T細胞 Kaiso

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、網羅的エピゲノムライブラリーを後述の方法で作成した。代表的SLEモデルマウスMRL/lpr、正常コントロールマウスとしてC57BL/6より脾臓CD4陽性T細胞を抽出し、DNAメチル化とmRNA発現ライブラリーを作製し次世代シーケンサーを用いて統合解析を施行した。その中で、我々は新規候補遺伝子として、SLEで発現増強を認めたカテプシンE (CTSE; Cathepsin E) に着目した。同遺伝子のイントロン1領域にDNAメチル化が有意に低下している部位が存在しており、ここに転写因子Kaisoが関与してCTSEの発現調整が行われていることもChIP-PCR法等で確認した。

CTSEは細胞内アスパラギン酸プロテアーゼで、細胞内外の蛋白質代謝やプロセッシングなどに関与し、その代表的酵素であるペプシンと共通の祖先に由来する (Nucleic Acids Res 36, D320, 2008)。マクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞のエンドソームに存在し、外来抗原のプロセッシング、MHC classによるT細胞エピトープの提示に関与している (Eur J Immunol 22, 1519-24, 1992)。欠損により、上記機能の障害が報告されているほか、Th2細胞への分化誘導を惹起しアトピー性皮膚炎を発症したり (J Biochem 134, 893-902, 2003)、マクロファージにおけるリソソームの貯蔵障害や (J Biol Chem 282, 1851-62, 2007)、オートファジー障害などの報告もある (PLoS One 8, e82415, 2013)。

また、CTSEと同じcatehepsinファミリーに属するCTSS (Cathepsin S) のアンタゴニストをMRL/lprマウスに投与したところ、脾臓のCD4陽性T細胞・CD4陰性CD8陰性T細胞の活性化が抑制され、濾胞性B細胞が減少し、IgGやds-DNA抗体の低下、糸球体のIgG depositの低下を認め、ループス腎炎が改善したことも報告されている (Ann Rheum Dis 74, 452-63, 2015)。

現在までにSLEにおけるCTSEの検討を行った報告は認めないが、CTSSと類似するCTSEが前記と同様の機序でSLEの病態や発症に関与している可能性が期待される。

以上の知見より、SLEにおけるCTSE発現上昇は、抗原提示のプロセッシングなどに作用することで、自己抗体産生やT細胞分画に影響し、自己免疫応答の増強を惹起する可能性があり、病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。このメカニズムについて本研究で明らかにする。

2. 研究の目的

SLEにおけるCTSE発現上昇のメカニズムおよびSLE病態への関与を解明することにより、同分子選択的アンタゴニストを用いることで、新たな創薬の端緒となる可能性を検討する。前述のとおり、SLE病態に関連した遺伝子のプロモーター領域が低メチル化状態にあることは多数報告されてきた。しかし、CD4陽性T細胞において、低メチル化状態にある遺伝子を網羅的に検索し、同一検体のRNAライブラリーと統合して、新規SLE関連遺伝子を探索するという手法は今回我々が独自に創造した研究手法である。この手法から着目したCTSEに関しては前述のとおり、抗原提示のプロセッシングや自己免疫応答の増強に関与している可能性があり、そのメカニズムについてさらに検討を行う。

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-Tnfrsf6lpr/Crlj (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/6J (B6マウス) を用い、摘出した脾臓細胞よりCD4陽性細胞をミリ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) 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、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。

3) 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 (AATII) 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。

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。

5) SLE 患者由来 T 細胞における CTSE mRNA および IL-10 の確認と病態への関与

初発未治療の SLE 患者の末梢血液から、Stemcell 社 RosetteSep 分離試薬を用いて CD4 細胞及び CD8 細胞を分離し、total RNA を抽出した。年齢、性をマッチさせた健常成人のサンプルも同時に回収し、CTSE mRNA について患者群との差異を検証した

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 の発現を負に制御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) 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 Kaiso 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。

3) 5-azaC/ TSA 処理培養細胞を用いた Ctse 発現制御の解析

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。

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

programed cell death 4 (Pdc4) の mRNA 発現低下を認めており、Pdc4 発現制御を介した間接的な関与が考えられた。

5). SLE 患者由来 T 細胞における CTSE mRNA および IL-10 の確認と病態への関与

SLE 患者由来 CD4 陽性 T 細胞において健常者に比較し、CTSE mRNA および IL-10 の発現亢進を認めた。しかし、臨床データとの相関は認められなかった。

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。

なお、当初は CTSE 酵素活性の測定、T 細胞系培養細胞(EL-4)へ shRNA(CTSE)や CTSE 高発現ベクタートランスフェクション後の機能解析を予定していたが、有意な結果を得られておらず、検討を重ねている段階にある。また、マウスへの CTSE 阻害薬の投与も検討していたが、阻害薬自体の入手が困難で実験に着手できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Hiramatsu Sumie, Watanabe Katsue S, Zeggar Sonia, Asano Yosuke, Miyawaki Yoshia, Yamamura Yuriko, Katsuyama Eri, Katsuyama Takayuki, Watanabe Haruki, Takano-Narazaki Mariko, Matsumoto Yoshinori, Kawabata Tomoko, Sada Ken-Ei, Wada Jun | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice derived CD4+ T cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-38809-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sumie Hiramatsu |
| 2. 発表標題 DNA Methylation-dependent regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice. |
| 3. 学会等名 the 62st Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology(JCR) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 和田 淳 (WADA JUN) (30294408) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301) | |
| 研究協力者 | 渡部 克枝 (WATANABE KATSUE) (80639914) | 岡山大学・医学部・客員研究員 (15301) | |