

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591163

研究課題名 (和文) 自己免疫疾患における RasGRP ファミリー分子の発現検討

研究課題名 (英文) Abnormal expressions of RasGRPs in autoimmune diseases

研究代表者

保田 晋助 (YASUDA SHINSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00374231

研究成果の概要 (和文)：Ras を活性化する因子である RasGRP ファミリーのうち、T 細胞に発現する RasGRP1 の発現を、全身性エリテマトーデス患者で検討してきた。患者群において RasGRP1 のスプライシング異常および蛋白レベルの発現低下を報告してきたが、今回はスプライシング異常が蛋白発現に与える影響に関して検討した。T 細胞に対してプロテアソーム阻害・NMD (nonsense-mediated mRNA decay) の阻害を行ったが RasGRP1 発現に変化は認めなかった。スプライスバリエント蛋白が正常 RasGRP1 および T 細胞機能に与える影響について検討する目的で、RasGRP1 splice variant A を T 細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。C57BL6 マウスを背景に、3 系統に遺伝子導入を確認した。うち 1 系統において胸腺における RasGRP1 splice variant A-V5 の蛋白発現を確認し得たが、現時点では胸腺における double positive, single positive 細胞のポピュレーションに明らかな異常は認めていない。

研究成果の概要 (英文)：Ras guanyl nucleotide-releasing proteins (RasGRPs) are guanine exchange factors for Ras. Among them, RasGRP1 is preferentially expressed in T cells. We have investigated abnormal expressions of RasGRP1 in patients with systemic lupus erythematosus and previously reported that alternative splicing of RasGRP1 is abundant in lupus T cells that alternative splicing is related to lower protein levels of this signaling molecule. In the present study, we at first tested if nonsense-mediated mRNA decay and/or ubiquitine-proteasome pathway play a role in lower protein levels of RasGRP1 in lupus T cells. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay nor proteasome impact the expression levels or patterns of RasGRP1 protein. Then we decided to generate Tg mice expressing RasGRP1 splice variant A, the most frequent alternatively-spliced RasGRP1 isoform, exclusively in T cells. We successfully generate mice that express RasGRP1 splice variant A protein in their thymus. Although proportion of single positive/double negative T cells in the thymus was not apparently affected by this splice variant, we are investigating activation of Ras-Erk pathway in Tg T cells when stimulated by anti-CD3/28 antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：自己免疫疾患・全身性エリテマトーデス・スプライス異常

## 1. 研究開始当初の背景

RasGRP1 (Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1) は、非活性型Rasを活性型Rasに変換するRasの活性化因子であり、中枢神経系およびT細胞に発現する。後者においてはT細胞レセプター刺激の下流でRas/Erk経路を活性化、IL-2産生を亢進させることが知られている。RasGRP1欠損マウスでは胸腺 double negative 細胞におけるRasの活性化は障害されていなかったが、T細胞の成熟障害による著しい single positive 細胞の減少が観察された。全身性エリテマトーデス (SLE; Systemic Lupus Erythematosus) 患者におけるRasGRP1の発現に関する我々の検討では、患者末梢血においてRasGRP1スプライス異常が高頻度であることおよびスプライス異常に伴う正常蛋白発現の低下を認め、報告した (S Yasuda et.al., J Immunol 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では、SLE患者において高頻度に認めたRasGRP1のスプライス異常とその転写後調整につき検討を加える。また、スプライスバリエントが正常蛋白の発現に与える影響についても *in vitro* および *in vivo* の研究を用いて検討する。

## 3. 研究の方法

T細胞株や健康人由来の末梢血T細胞を用いて、caffeine, wortmannin などによるNMD阻害やMG132などのプロテアソーム阻害剤がスプライスバリエントの発現に与える影響を、RNA、蛋白レベルで検証する。

スプライスバリエントが正常蛋白の発現に与える影響に関する検討では、内因性に RasGRP1 を発現する Jurkat 細胞に RasGRP1 スプライスバリエントをコードするベクターをレトロウイルスの系を用いてトランスフェクションし、正常 RasGRP1 の発現量や T細胞レセプター刺激後の Ras 経路の活性化について検討する。 *in vivo* における検討としては、タグ付き RasGRP1 スプライスバリエント (RasGRP1 splice variant A-V5) をT細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現形につき検討する。

## 4. 研究成果

RasGRP1 スプライスバリエントを発現させた細胞株をプロテアソーム阻害剤、NMD を阻害する caffeine, wortmannin, LY294002 等で処理して RasGRP1 蛋白の発現を検討したが明らかな変化はみられなかった。一方、IFN や TNF による Jurkat 細胞株の刺激で蛋白発現や mRNA 発現に変化を認めており、炎症性サイトカインによって RasGRP1 のスプライシングや発現が調整されている可能性が示唆された。

異常 RasGRP1 RNAが正常 RasGRP1 の発現をコントロールする可能性に関する検討では、内因性に RasGRP1 を発現する Jurkat 細胞に RasGRP1 スプライスバリエントをコードするベクターをレトロウイルスの系を用いてトランスフェクションし、抗生剤を用いてクローニングを行っており、今後正常 RasGRP1 の発現量や T細胞レセプター刺激後の Ras 経路の活性化について検討する。 *in vivo* における検討として、タグ付き RasGRP1 スプライスバリエント (RasGRP1 splice variant A-V5) をT細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。 C57BL6 マウスを背景に、現在 3 系統に遺伝子導入を確認した。うち1系統において、胸腺における RasGRP1 splice variant A-V5 の蛋白発現を確認し得た。現時点では、胸腺における double positive, single positive細胞のポピュレーションに明らかな異常は認めていないが、今後T細胞レセプター刺激・ジアルシグリセロール刺激などによるRas活性化について検討を行ってゆく。

## 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 18 件)

1. Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F, Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between beta(2) glycoprotein

- I and alpha5beta1 integrin. *J Cell Mol Med.* 2011 Jan;15(1):141-51. 査読あり
2. Matsuura E, Shen L, Matsunami Y, Quan N, Makarova M, Geske FJ, Boisen M, Yasuda S, Kobayashi K, Lopez LR. Pathophysiology of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2010 Apr;19(4):379-84. 査読あり
  3. Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima K, Koike T. Increased expression of phospholipid scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2010 Aug;37(8):1639-45. 査読あり
  4. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2457-67. 査読あり
  5. Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, Kobayashi K, Ieko M, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Nicked  $\beta_2$ -glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood.* 2009;114(12):2553-9. 査読あり
  6. Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, Furusaki A, Kondo M, Sato-Matsumura KC, Abe R, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amasaki Y, Nishio M, Sawada K, Shimizu H, Koike T. Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression. *J Rheumatol.* 2009 Jun;36(6):1240-8. 査読あり
  7. Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol.* 2009;79:188-195. 査読あり
  8. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009 Aug;68(8):1366-7. 査読あり
  9. Oku, K Atsumi, T Bohgaki, M Amengual, O Kataoka, H Horita, T Yasuda, S Koike, T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jun;68(6):1030-5. 査読あり
  10. Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, Oku K, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases. *Rheumatology.* 2008;47(11):1686-1691. 査読あり
  11. Kon Y, Atsumi T, Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Koike T. Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and

antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol.2008;26(1):129-132.査読あり

12. 保田晋助; 強皮症の画像診断. リウマチ科 2010;44(2); 146-150.査読無し
13. 保田晋助; 全身性エリテマトーデスの生命予後は改善したか. リウマチ科 2010;44(4); 354-357.査読無し
14. 保田晋助; セルトリズムマブ.Pharma Medica.2010; 28(3); 53-55. 査読無し
15. 保田晋助; 関節リウマチとビタミンD. リウマチ科, 2009;42(5):540-544. . 査読無し
16. 保田晋助: 自己免疫の発症とRasGRP1.臨床免疫・アレルギー科,2009;51(4): 356-362. 査読無し
17. 保田晋助, 小池隆夫:「原発性抗リン脂質抗体症候群」『呼吸器症候群□-その他の呼吸器疾患を含めて-(別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズNo. 9)』256-260,2009.査読無し
18. 保田晋助: Ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 とリウマチ性疾患.リウマチ科, 2008;40(3): 293-297.査読無し

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Yasuda S. Abnormal splicing of RasGRPs. Monthly Lúpus Lecture Series, Dec 14, 2010 Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston MA
- 2) Yasuda S. Standardization of laboratory diagnosis of APS in Asia. 6<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis, Oct 13-16, 2010 Nusa Dua Bali
- 3) Yasuda S. ACA, Antiβ2GPI, LA are

the only Antiphospholipid Antibodies Test in Diagnose of APS, Contra. 6<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis, Oct 13-16, 2010 Nusa Dua Bali

- 4) Yasuda S, Odani T, Fujieda Y, Yoshida N, Kataoka H, Horita H, Atsumi T, Koike T. Autologous peripheral blood stem cell transplantation as a treatment for the interstitial lung diseases in patients with systemic sclerosis. 4<sup>th</sup> Asian congress on autoimmunity. Sep 11-13, 2009, Singapore
- 5) Yasuda S, Fujieda Y, Hashimoto T, Miidera H, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. High expressions of RGS1 and Mx1 transcripts in T cells from lupus patients at the active and quiescent state. Annual European Congress of Rheumatology 2009, Amsterdam, 10 – 13 Jun 2009

[図書] (計 2 件)

- 1) 保田晋助, 小池隆夫; よくわかる関節リウマチのすべて「関節リウマチとはどんな病気か」永井書店: .2009
- 2) 保田晋助, 小池隆夫; 別冊日本臨床 呼吸器症候群 (第2版)「原発性抗リン脂質抗体症候群」株式会社日本臨床:256-260.2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保田 晋助 (YASUDA SHINSUKE)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 00374231

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし