

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460697

研究課題名(和文) ヒトCD4+T細胞における転写因子STAT5Bの遺伝子制御機能の解析

研究課題名(英文) The roles of STAT5B for gene regulation on human CD4+ T cells

研究代表者

金井 孝裕 (Kanai, Takahiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00398504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞上における、STAT5Bによる制御遺伝子の一部を明らかにした。これらのSTAT5B制御遺伝子は、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の、ネフローゼ期にみられる徴候を説明するものであった。本結果をさらに確認すべく、患者血清を解析したところ、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の、ネフローゼ期にのみ上昇し、他のネフローゼ症候群のネフローゼ期では、上昇していない物質を同定した。本研究により同定した物質は、これまで、小児特発性ステロイド感受性との関連を指摘されたことのない物質である。

研究成果の概要(英文)：We revealed several genes that were regulated by STAT5B on human T cells. Some of the genes were corresponding to the phenotype of idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome in children. When we analyzed the serum from the patients with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome, a substance was found which serum levels were associated with urinary protein/urinary creatinine levels. This is the first time to report the association of the substance and the status of idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. In next step, we are planning to find how the substance effects on the pathophysiology of idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome.

研究分野：小児腎臓病

キーワード：小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群 T細胞 遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の病因は、まだ解明されていない。

本症の原因は不明で、特異的治療法や根本的治療法はない。ステロイド治療により生命予後は良好となつてはいるが、根治療法ではないため頻回に再発し、長期間のステロイド内服が必要となる。ステロイドの長期内服は、骨粗鬆症や緑内障・白内障、精神疾患、耐糖能異常など、さまざまな続発症を生み出す。これら続発症や続発症予防のために、小児の健やかな成長・発達が妨げられている。

小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群は、日本において、年間約 1300 人の新規患者がある慢性腎疾患である。本症は、好発年齢を 4 ~ 5 歳とし、成人にも発症するものの、本症罹患者全体の約 70% は小児期に発症する。本研究により、本症の病態解明に寄与する知見を得て、その発症予防および新たな治療薬の開発が必要とされる

我々は、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の病態に、T 細胞が深く関与することを、サイトカイン・Th 細胞数バランスの視点より、証明し報告してきた。

悪性腫瘍細胞では、STAT5B が活性化している。そして、悪性腫瘍のうち、T 細胞性悪性リンパ腫は、ISSNS を続発する。また、小児 ISSNS は、T 細胞、または、B 細胞の抑制により、寛解する。これは、T 細胞・B 細胞における STAT5B の活性化が、その制御遺伝子の転写を促すことで、小児 ISSNS の病態に深く関与することを示唆する。

STAT5B は、転写因子の一つである。IL-2・IL-7・IL-9・エリスロポエチンなどのサイトカインに応答して、二量体を形成した後、核内へ移動し、免疫機能・細胞増殖に関与する遺伝子の発現を、調節している。このうち、IL-7 は、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群のネフローゼ期に、血中能動が上昇することを、我々は報告した。

ヒト STAT5 には、アミノ酸レベルで 90% 以上類似した二種類の分子、STAT5A と STAT5B が存在するが、申請者らはヒト STAT5B が、STAT5A と重複しない機能を持つことを報告した。また、マウスモデルにおける Stat5a と Stat5b は、ヒト STAT5A や STAT5B と同じ機能を、必ずしも示さないため、ヒト STAT5B 機能の解析には、ヒト検体を用いる必要がある。

上記より、転写因子 STAT5B のヒト T 細胞上における遺伝子制御機能を解析し、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群における病勢関連遺伝子・遺伝子産物を同定し、本症の病態解明に寄与する知見を得て、本症の発症予防および、新たな治療薬の開発に寄与する必要がある。

2. 研究の目的

小児慢性腎疾患において主要な位置を占める、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の病態に対し重要な役割を持つヒト T 細胞において、その制御に重要な役割を果たす、転写因子 STAT5B の遺伝子制御機能を解明し、上記疾患の病態解明に寄与する知見を得て、同疾患の発症予防および新たな治療薬の開発を促進させることを目的とする。

このために、以下を具体的目標とした。

目的 1) ヒト T 細胞における転写因子 STAT5B の、DNA 結合部位およびその制御遺伝子を同定する。

目的 2) ヒト T 細胞における STAT5B の共役因子を同定し、遺伝子制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

材料 1

ヒト T 細胞

方法 1

ChIP-seq 法

抗ヒト STAT5B モノクローナル抗体と、コントロール IgG 抗体を用い、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行う。得られた各 ChIP DNA を、PCR にて増幅後、Genome Analyzer II (Illumina®) を利用し、シーケンスする。

マッピングと DNA 結合部位の同定

UCSD ゲノムデータベース hg19 を参照ゲノムとして、マッピングとピークファインダーに、GenomeStudio (Illumina®) を用いる。DNA 結合部位の同定には、TRANSFAC® (BIOBASE, Wolfenbüttel, Germany) を用いる。STAT5B ChIP-seq の結果に検出された DNA 結合部位から 10,000 bp 以内にある遺伝子を STAT5B 特異的制御遺伝子候補とする。

つづいて、検出した STAT5B 特異的制御遺伝子候補の発現を、q-PCR 法で確認する。

材料 2

材料:

▶ヒト T 細胞 (30×10^6 [cell]) を、rhIL-2 [100 U/mL] で 30 分間刺激した後に使用する。

方法 2

細胞質蛋白と核蛋白の分離

細胞質蛋白・核蛋白分離抽出用キット (NE-PER®, Thermo Scientific) を用いて分離し、核蛋白を利用する。

免疫沈降法 (IP) - ウェスタンブロット

STAT5B 抗体を用いた IP で得た、STAT5B と共沈殿する核蛋白質ビーズ複合体を、1% SDS バッファーで洗浄し、非特異的結合蛋白質を洗い落とした後、目的蛋白質を同定する。

プロテインシーケンサーによる同定

(エドマン法)

並行して行った蛋白質転写後の PVDF 膜の目的箇所を切り出し、プロテインシーケン

サーにて、アミノ酸シーケンスを行い、蛋白質を同定する。

siRNA 法を用いた共役因子の同定

同定した蛋白質を siRNA 法にてノックダウンし、先に同定した STAT5B 制御遺伝子の発現率を、コントロールと比較する。

4. 研究成果

結果 1

ヒト T 細胞上における、STAT5B による制御遺伝子の一部を明らかにした。これらの STAT5B 制御遺伝子は、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の、ネフローゼ期にみられる徴候を説明するものであった。本結果をさらに確認すべく、患者血清を解析したところ、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の、ネフローゼ期にのみ上昇し、他のネフローゼ症候群のネフローゼ期では、上昇していない物質を同定しえた (投稿準備中)。

本研究により同定した物質は、これまで、小児特発性ステロイド感受性との関連を指摘されたことのない物質である。今後、今回同定した物質が、どのように小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の病態に関与するかを、検討する必要がある。

結果 2

ヒト T 細胞を用いて、STAT5B に対する共役因子候補蛋白質の同定をこころみたが、実験手法を変えると、異なる結果となってしまった。これが、検出されるべき蛋白質が、複数存在するのか、ヒト T 細胞の異質性を反映しているのか、現時点で確定できていない。

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)

・投稿準備中

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 金井 孝裕 自治医科大学
医学部 講師

(Kanai Takahiro)

研究者番号：00398504

(2)研究分担者 小高 淳 自治医科大学
医学部 講師

(Odaka Jun)

研究者番号：70382885

(3)研究分担者 青柳 順 自治医科大学
医学部 助教

(Aoyagi Jun)

研究者番号：80438639