

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860374

研究課題名(和文) スプライシング活性測定を用いた全身性エリテマトーデスの新規診断法の確立

研究課題名(英文) Development of novel diagnosis of systemic lupus erythematosus by measurement of splicing activity

研究代表者

有戸 光美 (Arito, Mitsumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血リンパ球のスプライシング活性が、全身性エリテマトーデス(SLE)の単一診断として有用であるかについて評価した。

まず末梢血リンパ球を対象としたスプライシング活性評価法を確立し、その条件を最適化した。次にその手法を用いて、SLE及び健常者の末梢血リンパ球のスプライシング活性を測定したが、顕著な差は認められなかった。一方で、スプライシング活性測定の対象は末梢血リンパ球よりT細胞のみに絞った方が正確に評価できる結果が得られたため、今後検討する。

研究成果の概要(英文)：It was studied whether 'measurement method of splicing activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)' is useful as a single diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). Firstly, the measurement method of splicing activity of PBMCs was developed and optimized. Next, the splicing activity of PBMCs from the patients with SLE and healthy donors was measured by this methods. As a result of that, there was no difference on the splicing activity between groups of the patients with SLE and healthy donors. For a while, it was found that the measurement of splicing activity of only T cells may be more accurate than that of PBMCs, so I will investigate splicing activity of T cells from the patients with SLE and healthy donors.

研究分野：分子細胞生物学、分子病態学、疾患プロテオミクス

キーワード：全身性エリテマトーデス SLE スプライシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身性エリテマトーデス (SLE) 診断マーカー開発の意義

SLE の診断には、米国リウマチ学会の「SLE 改訂分類基準」が汎用されており、11 項目の理学的所見や画像もしくは血液検査のうち 4 項目以上あてはまる場合に、SLE と診断される。このように分類基準が曖昧となっている理由として、症状が多彩であり、全 SLE 患者に共通して存在し、他の膠原病および炎症性疾患と鑑別できる所見が発見されていないことが考えられる。そのため、全 SLE 患者に共通した異常を見出し、感度・特異度の高い診断マーカーとして確立することが求められている。

(2) これまでの研究

SLE で検出される抗 ribonucleoprotein (RNP) 抗体の対応抗原 U1-68k は、mRNA のスプライシングを担う、U1-RNP 分子の構成成分である。本蛋白質は、C 末端領域に高度にリン酸化された Arginine serine rich-domain (RS ドメイン) を有し、本ドメインのリン酸化の制御が U1-RNP 分子の mRNA スプライシング活性に重要である (Rossi F et al. Nature 381(6577):80-2 (1996)) ことが知られている。研究代表者らは、抗 RNP 抗体及び抗リン酸化 RS ドメイン抗体を用いた二次元 western blot により、SLE 患者の末梢血リンパ球で関節リウマチ患者や健常者と比較して、RS ドメインのリン酸化レベルの低い脱リン酸化 U1-68k の量が増加していることを明らかにした (Nagai K & Arito et al. Electrophoresis. 33:1-8 (2012))。また、SLE の末梢血リンパ球では TCR の鎖のスプライシング異常が報告されており、SLE における全般的スプライシング異常の一部を観察しているかもしれない (Tsuzaka K et al. Mod. Rheumatol. 12: 167-173 (2002) and Springer Semin Immunopathol. 28(2):185-93 (2006))。

(3) 本研究の着想

上記より、この U1-68k の異常な脱リン酸化は、U1-68k の抗原性を変化させて抗 RNP 抗体の産生に関わる一方で、mRNA の全般的なスプライシングの異常を通じて、白血球の機能異常を起し、その結果、多種の自己抗体産生を招いている可能性が考えられる。

そのため、U1-68k の脱リン酸化及びスプライシング異常が、単独で高感度・高特異度の SLE の診断マーカーとなりうることを期待される。二次元 western blot により検出される脱リン酸化量が、SLE の診断に使える可能性は高いが、二次元 western blot の欠点として 1) 必要検体量が多い点、2) 時間を要する点、3) 多検体の解析には向かない点が挙げられる。そこで、研究代表者は、簡便で現実的なアプローチとして、末梢血リンパ球のハイスループットなスプライシング活性評価法を確立し、脱リン酸化 U1-68k の増加に

伴うスプライシング異常を診断マーカーの第一候補とした。また、病態に近い機能異常をマーカーの対象とするため、病勢モニタリングマーカーになりうることも期待される。ただし、研究代表者が見出した U1-68k の脱リン酸化は、混合性結合組織病 (MCTD) でも同様に観察される。MCTD については、独立した疾患であるとする考えがある一方で、SLE の一亜型に過ぎないとの考えもあり、欧米では、近年、後者の考え方が優勢となっている。従って、SLE と MCTD を鑑別することの意義は、定まっておらず、本研究ではそこには立ち入らない。MCTD を含め、SLE 群として考えることとする。本研究により、MCTD 患者と SLE 患者とで何らかの差が認められれば、上述の SLE と MCTD との異同について、新しい知見を与えるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、この異常の診断的意義を確立すると共に、研究代表者が確立した末梢血リンパ球のハイスループットなスプライシング活性評価法により、「スプライシング異常」が「SLE の診断もしくは病勢モニタリングマーカー」として有用であるかについて評価する。さらに、本解析を通して、SLE などの膠原病の病態形成機序の解明を試みる。

3. 研究の方法

各膠原病患者および健常者の末梢血リンパ球を超音波破碎し、細胞抽出液を調製し、スプライシング活性測定に供する。各検体のスプライシング活性を測定することで、SLE 特異的にスプライシング活性の異常があるかについて調べる。まず、各細胞抽出液に、スプライシング対象として、予め作製した「chicken δ -crystallin pre mRNA」及びスプライシング反応に必須な ATP や Mg を含む溶液を加え、スプライシング反応をさせる。次に、pre mRNA (未スプライシング物) 及びスプライシング産物を含む RNA を精製し、逆転写後、PCR 及びリアルタイム PCR に供する。この際、スプライシング産物を検出するプライマー及び Taqman プロープによる検出系と未スプライシング物を検出するプライマーによる検出系で測定し、検出される蛍光を数値化し、評価する。なお、各検出系によるスプライシング活性測定および評価の最適化を行う必要がある。

4. 研究成果

(1) RT-PCR 及び RT-qPCR を用いたスプライシング活性測定及び評価の最適化

リアルタイム PCR でスプライシング活性を測定する際に、これまでに使用していたプロ

ープでは、ヒト急性T細胞性白血病細胞由来細胞株 Jurkat 細胞によるスプライシング産物が顕著に検出できなかった。また PCR 産物、すなわちスプライシング産物の増幅を示す蛍光強度の曲線も理想的なカーブを示さなかった。そこで、リアルタイム PCR でスプライシング産物の検出精度をあげるために、プローブセットを数種類設計した。Jurkat 細胞及び健常者 PBMCs を対象にそれらプローブセットについて検討した。その結果、Jurkat 細胞を用いてスプライシング活性測定した場合、スプライシング後のサンプルでスプライシング産物が顕著に検出可能となった。しかし、PBMCs ではスプライシング産物の検出が不明瞭であった。RT-PCR の場合も同様の現象がみられた。また、各サンプルをスプライシングと関係ない領域を増幅したところ、Jurkat 細胞ではスプライシング前と同量のバンドが検出されるのに対し、PBMCs ではそのバンドは著しく減少していた。このことから、PBMCs によるスプライシング産物が検出困難なのは、スプライシング活性に関係なく、PBMCs 由来の RNase が preRNA 及びスプライシング産物に作用した可能性が考えられた。さらにその問題を解消するために RNase 阻害剤やトラップ RNA を増量した上で同様の測定を試みた。その結果、RNase 阻害剤では特に改善は認められなかったが、トラップ RNA によりスプライシング産物の検出が良好になるという結果が得られた。しかし、PCR 産物の増幅を示す蛍光強度の曲線については、両細胞とも改善しなかった。現時点で、リアルタイム PCR によるスプライシング産物の検出についてはプローブの変更やトラップ RNA の増量により一部改善が認められたものの、さらに精査する必要があると考える。

(2) スプライシング活性測定対象の検討

(1) で述べた通り、PBMCs 由来の RNase が preRNA 及びスプライシング産物に作用し、スプライシング産物の検出が困難になった可能性が考えられた。その原因の一つとして、RNase 活性が強いとされる PBMCs を構成細胞の1つである monocytes の影響が大きく作用していることが考えられた。そこで、T 細胞など各細胞を単離し、RT-PCR の系でスプライシング産物の検出を試みた。PBMCs 及び T 細胞の細胞数を揃えてスプライシング活性に供した結果、検出が不明瞭であった PBMC によるスプライシング産物のバンドが、T 細胞では比較的濃く検出された。また、スプライシングとは関係のない領域を増幅したところ、PBMCs の場合そのバンドは著しく低下するのに対して、T 細胞の場合スプライシング前のサンプルと同程度であった。当初の予定では、簡便にスプライシング活性評価に供するために PBMCs を対象としていたが、T 細胞のみを対象とした方がより正確な結果が得られることができると考えた。

(3) SLE、MCTD 患者及び健常者由来 PBMCs

のスプライシング活性測定

SLE 患者(4 例)、MCTD 患者(4 例)及び健常者(4 例)の PBMCs を対象にスプライシング活性に供した。その結果、各群間でスプライシング活性に著しい差は認められなかった。一部、個体間でばらつきがあるため、今後検体数を増やして検討する必要があると考える。

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7件)

1. Aberrant Glycosylation of Lumican in Aortic Valve Stenosis Revealed by Proteomic Analysis. Suzuki H, 他 8 名 7 番目 Int Heart J. 57(1):104-11. 2016 査読有 doi: 10.1536/ihj.15-252.
2. Effects of methotrexate and salazosulfapyridine on protein profiles of exosomes derived from a human synovial sarcoma cell line of SW982. Tsuno H 他 10 名 4 番目 Proteomics Clin Appl. 10(2):164-71. 2016 査読有 doi: 10.1002/prca.201500064.
3. Altered acetylation of proteins in patients with rheumatoid arthritis revealed by acetyl-proteomics. Arito M, 他 9 名, Clin Exp Rheumatol. 33(6):877-86. 2015 査読有 <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=8589>
4. Roles of layilin in TNF- α -induced epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells. Adachi T, Arito M, 他 9 名 Biochem Biophys Res Commun. 467(1):63-9. 2015 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.121.
5. Serum peptides as candidate biomarkers for dementia with Lewy bodies. Suzuki I, Noguchi M, Arito M, 他 9 名, Int J Geriatr Psychiatry. 30(12):1195-206. 2015 査読有 doi: 10.1002/gps.4274.
6. Effects of tofacitinib on nucleic acid metabolism in human articular chondrocytes. Koizumi H, Arito M, 他 7 名, Mod Rheumatol. 25(4):522-7. 2014 査読有, doi: 10.3109/14397595.2014.995874
7. Secretion of inflammatory factors from chondrocytes by layilin signaling. 著者名 Asano K, Arito M, 他 8 名, Biochem Biophys Res Commun. 452(1):85-90. 2014 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.053.

[学会発表](計21件)

1. SLE 患者末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルの解析、有戸光美、野澤洋平、他 4 名、日本プロテオーム学会 2015 年会 (JHUPO 第 13 回大会) 2015 年 7 月 23 日、発表会場所在地 くまもと森都心(熊本県熊

本市)
2. レビー小体型認知症における血清ペプチドバイオマーカーの探索
発表者 黒川真奈絵、有戸光美、他 5 名
学日本プロテオーム学会 2015 年会 (JHUP0 第 13 回大会)、2015 年 7 月 23 日、発表会
場所在地 くまもと森都心 (熊本県熊本市)
3. 好中球 Myeloperoxidase の等電点をアルカリ側にシフトさせる酸化修飾の解析、永井宏平、内田貞輔、他 7 名 5 番目、日本プロテオーム学会 2015 年会 (JHUP0 第 13 回大会)、2015 年 7 月 23 日、発表会場所在地 くまもと森都心 (熊本県熊本市)
4. シェドミクス法の確立に関する研究、表山和樹、有戸光美、他 5 名、日本プロテオーム学会 2015 年会 (JHUP0 第 13 回大会)、2015 年 7 月 23 日、発表会場所在地 くまもと森都心 (熊本県熊本市)
5. ANCA 関連血管炎における好中球ミエロペルオキシダーゼの酸化修飾、内田貞輔、永井宏平、他 6 名 5 番目、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
6. ヒト関節軟骨細胞における layilin を介したシグナルによる炎症因子の誘導、有戸光美、黒川真奈絵、他 5 名、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
7. ヒト関節軟骨細胞における tofacitinib の核酸代謝に対する影響、有戸光美、小泉英樹、他 5 名、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
8. サーフセスオミックスを利用したサラゾスルファピリジンの作用の解析、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、他 3 名、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
9. SLE 患者末梢血単核球の表面蛋白質プロファイルの解析、野澤洋平、有戸光美、他 5 名、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
10. 新しいタイプの核内レセプター・コアクティベーター (MTI-II) を利用した NF- κ B 阻害薬の開発、岡本一起、他 7 名 4 番目、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府京都市)
11. Sulfasalazine 及び tofacitinib によるヒト関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルに対する影響、有戸光美、他 9 名日本プロテオーム学会 2014 年会 (JHUP0 第 12 回大会)、2014 年 7 月 17 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
12. アルツハイマー病の結成におけるフィブリノーゲン 鎖由来ペプチドの上昇、黒川真奈絵、他 8 名 5 番目、日本プロテオーム学会 2014 年会 (JHUP0 第 12 回大会)、2014 年 7 月

17 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
13. 網羅的定量的細胞表面タンパク質想定法の薬剤作用機序解明への応用に関する研究、表山和樹、他 6 名 3 番目、日本プロテオーム学会 2014 年会 (JHUP0 第 12 回大会)、2014 年 7 月 17 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
14. ピリドキシンと協調して抗炎症作用を発揮する抗炎症タンパク質 MTI- を利用した抗炎症剤の開発、岡本一起、他 9 名 4 番目、日本ビタミン学会第 66 回大会、2014 年 6 月 14 日、姫路商工会議所 (兵庫県姫路市)
15. 関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルに対する sulfasalazine と tofacitinib の影響、有戸光美、他 9 名、第 10 回日本臨床プロテオーム研究会、2014 年 5 月 10 日、京王プラザホテル (東京都新宿区)
16. Oxidative modification in myeloperoxidase in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. Uchida T、他 11 名 5 番目、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)
17. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behcet's disease. Yoshioka T、他 15 名 6 番目、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)
18. ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 の細胞表面タンパク質に対する抗リウマチ薬の影響、表山和樹、他 7 名 3 番目、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)
19. 抗リウマチ薬刺激による滑膜肉腫細胞株 SW982 分泌 exosome protein profile の変化の解析、津野宏隆、他 11 名 4 番目、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)
20. 関節軟骨細胞の蛋白質プロファイルに対する sulfasalazine と tofacitinib の影響、小泉英樹、有戸光美、他 11 名、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)
21. 演題 関節リウマチにおける糖蛋白質の糖鎖構造の変異、佐藤利行、有戸光美、他 8 名、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 25 日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有戸 光美 (ARITO, Mitsumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509911

(2) 研究分担者 無し

(3)連携研究者

永井 宏平 (NAGAI, Kouhei)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：70500578

佐藤 利行 (SATO, Toshiyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10350430

黒川 真奈絵 (KUROKAWA, Manae)

聖マリアンナ医科大学・医学部・大学院教授

研究者番号：90301598

末松 直也 (SUEMATSU, Naoya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50202122

岡本 一起 (OKAMOTO, Kazuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40177085

加藤 智啓 (KATO, Tomohiro)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80233807