

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08678

研究課題名(和文)新規乾癬病因候補遺伝子PTRF/Cavin-1の細胞機能解析と乾癬病態への関与

研究課題名(英文) Cellular function analysis of a novel psoriatic pathogenesis gene, PTRF / Cavin-1, and its involvement in psoriatic pathology

研究代表者

津田 英利 (Tsuda, Hidetoshi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30414923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：最近、GWAS解析により、乾癬と強く関連するSNPが新たに報告され、PTRF/Cavin1という遺伝子のSNPが乾癬病態と深い関連があるという報告がされた。しかしこのSNPは遺伝子のintron上に存在しており、遺伝子機能に対する影響は解らない。そこで、HaCaT細胞に、ゲノム編集にてSNPを導入し、PTRF遺伝子の発現や機能に影響するの否か、検討することにした。いくつかゲノムが欠損したクローンを得られたが、目的のSNPを導入出来たクローンの取得は出来なかった。いくつかSNP付近で欠損が起こったクローンにて、遺伝子発現解析を行ったが、コントロール細胞と比べて違いを見出すことは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患における遺伝的背景にはまだまだ不明なことが多い。また、GWAS解析にて病態との関連が指摘されるSNPは数多く報告されているが、多くの場合はintronに報告されている。exon上にSNPがあり、アミノ酸変異を伴う変異であれば比較的容易に判断できるが、intron上にある場合、一見して遺伝子機能に影響するの否か判断は出来ない。今回この問題に対して研究を行ったが、明らかな違いを示すことは出来なかった。今後更にゲノム編集技術が進歩し、より簡便にゲノム編集を行えるようになれば、新たな遺伝子機能への影響を明らかにすることが可能となると考えている。

研究成果の概要(英文)：Recently, GWAS analysis has newly reported SNPs that are strongly associated with psoriasis pathology, and it has been reported that SNPs in the gene PTRF/Cavin1 are deeply associated with psoriasis pathology. However, this SNP is located on an intron of this gene, and its effect on gene function is unknown. Therefore, we decided to introduce SNPs into HaCaT cells by genome editing and examine whether they would affect the expression and function of the PTRF gene. Although we obtained some clones with deletions in the genome, we were unable to obtain clones in which the desired SNP could be introduced. Gene expression analysis was performed on clones with deletions near some SNPs, but no differences were found compared to control cells.

研究分野：分子細胞生物学、遺伝子工学

キーワード：乾癬 Psoriasis SNP GWAS PTRF Cavin1 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

これまでに乾癬の遺伝的背景はいくつか報告されており、STAT3、IL36RN や CARD14 といった遺伝子の機能や、SNPs による機能変化と乾癬病態との関連が明らかにされている。しかし、これらの SNPs が検出される乾癬患者は一部であり、残りの乾癬患者についての遺伝的背景は明らかになっていない。近年のシーケンス技術の進歩により、より幅広く、かつ精密にゲノム情報の収集が可能となり、Genome Wide Association Study (GWAS)として様々な疾患において活用されている。しかしこれらの遺伝子は数が多く、遺伝子機能も多岐にわたるため、その全てにおいて十分に検討されている訳ではない。今回着目した遺伝子 PTRF/Cavin-1 は、培養細胞やマウスを用いた研究報告はいくつか見られるが、皮膚疾患と関連付けられた報告は見当たらない。本申請による研究によって、乾癬病態との関連が明らかになれば、世界初の報告となる。そして乾癬病態を理解する上で全く新しい切り口になると考えている。

2. 研究の目的

乾癬はアトピー性皮膚炎と並び、代表的な炎症性皮膚疾患である。自己免疫疾患の 1 つでもあり、様々な免疫細胞、サイトカインの関与が明らかにされている。近年ではサイトカインに対する抗体製剤(生物学的製剤)が数種類開発され、非常に効果を上げている。しかしながらそれらは全ての乾癬患者に有効では無く、また無効例も報告されている。また、症状が収まり、投薬を休止してからも症状が安定する患者もいれば、再燃する患者もおり、完治が難しい疾患でもある。近年の遺伝子解析技術の進歩により、大規模なゲノム解析が広範囲に行われるようになり、乾癬と関連する新しい SNPs についても多くの報告がなされている。その中の一つである rs963986 は、PTRF (polymerase I and transcript release factor)/Cavin-1 遺伝子の intron 部分に存在する SNP が、乾癬患者に多く見られる SNP であることが報告された (Lam et al., 2012)。この分子は通常では細胞質に存在しており、受容体非依存性エンドサイトーシスに関与するカベオラ膜を構成するのに重要な Caveolin-1 と相互作用する分子である。細胞外からの刺激により核内に移行することもあるとされ、細胞増殖や老化等に関与している (Volonte and Galbianti, 2011)。そこで、本研究では詳細に PTRF/Cavin-1 の表皮角化細胞における機能を検討することにした。in vitro における検討では、SNP と PTRF/Cavin-1 の発現への影響を検討し、この遺伝子の発現減少が細胞に与える影響を検討する。また、PTRF/Cavin-1 の欠損が、細胞に与える影響についても詳細に検討する。

3. 研究の方法

—細胞

本研究には、正常表皮角化細胞の細胞株である HaCaT 細胞を用いた。HaCaT 細胞は DMEM/high glucose (SIGMA) /10%FBS/1%ペニシリン/ストレプトマイシンにて継代を行った。

酸素濃度による PTRF 発現への影響

HaCaT 細胞を低酸素 (5% O₂) にしたインキュベーターで 24 時間、48 時間培養し、RNA を抽出後、リアルタイム PCR により PTRF 発現変動を通常培養時 (20% O₂) と比較した。高酸素条件としては、過酸化水素水を 150 μM、300 μM、450 μM となるように培地に添加し、添加後 24 時間、48 時間で細胞を回収し、低酸素時と同様にリアルタイム PCR にて評価した。

—PTRF のノックダウンと細胞増殖解析

PTRF の細胞へ与える影響を見るために、siRNA (Silencer Select siRNA, ThermoFisher) を用いて細胞内の PTRF をノックダウンし、細胞増殖へ与える影響を検討した。ノックダウンの効率は、リアルタイム PCR 並びにウエスタンブロッティングにより評価した。細胞増殖は MTT アッセイ (TaKaRa) と BrdU アッセイ (Roche) により検討を行った。

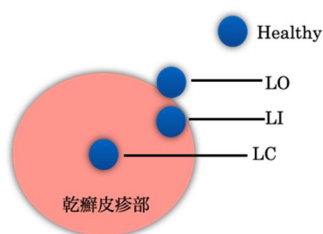
ーゲノム編集

報告された rs963986 の SNP を HaCaT 細胞に導入するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて変異の導入を試みた。SNP 付近を認識する gRNA を 3 種類設計し、Cas9 タンパク質と共に細胞へ Lipofectamine CRISPRMAX を用いてトランスフェクションを行った。ゲノム切断の有無、効率は Alt-R Genome Editing Detection Kit (IDT) にて評価した。その後、80 bp になる、SNP 導入用の相同組換えを利用した、HDR ドナーオリゴヌクレオチドを設計し、Cas9-gRNA と共に HaCaT 細胞にトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 48 時間に細胞を回収し、1 細胞/100 μ L になるように細胞溶液を調整し、96 ウェルプレートに 100 μ L/ウェルで細胞を播種した。翌日にウェルを顕微鏡で確認し、シングルセルになったウェルをセレクションした。その後、90 %コンフルエント/ウェルになるまで増殖させ、適宜大きなウェルへ移し替えた。凍結用の細胞とゲノム DNA 抽出用の細胞に十分量の細胞になるまで増やした。十分量の細胞が得られたところで細胞を回収し、凍結保存用の細胞を確保し、残りの細胞からゲノム DNA の抽出を行った。変異導入の確認は、SNP 導入領域を PCR 法にて増幅し、PCR 産物を直接シーケンスを行い、導入の有無を評価した。

ーゲノム編集 HaCaT 細胞の遺伝子発現解析

siRNA で PTRF をノックダウンした細胞並びに、ゲノム編集にて SNP 周辺が欠損した細胞を用いて、PTRF、STAT3、ATP6V、STAT5A 及び STAT5B の発現を TaqMan probe (ThermoFischer) にて発現量の検討を行った。また、STAT の抑制因子である、SOCS1 と SOCS3 についても発現解析を行った。コントロール細胞はスクランブル RNA をトランスフェクションした細胞、もしくはゲノム編集したが欠損等異常が起こらなかった細胞を用いた。RNA は TRIzol を用いて抽出し、得られた RNA は ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて、逆転写反応を行い、cDNA を得た。

乾癬皮疹部における PTRF 発現の比較



乾癬患者の皮疹部より生検を行い、RNeasy Universal Plus (QIAGEN) にて RNA を抽出した。生検部は、図 1 に示す通り、一人の患者から、皮疹中央部 (LC)、皮疹内側辺縁部 (LI)、皮疹外側辺縁部 (LO)、健全部 (H) の 4 箇所である。得られた RNA は ReverTra Ace にて cDNA を合成し、培養細胞同様にリアルタイム PCR にて評価を行った。

図1 乾癬皮疹部の生検部位

4. 研究成果

酸素濃度による PTRF 発現への影響

低酸素環境に HaCaT 細胞を暴露した時、PTRF は通常酸素濃度時に比較して発現が低下した (図 2)。逆に高酸素濃度にした場合、その酸素濃度に比例して PTRF の発現が上昇した (図 3)。

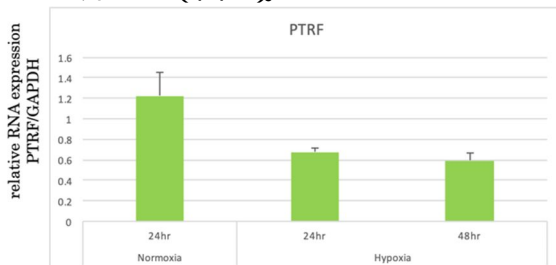


図2 低酸素培養によるPTRF発現への影響

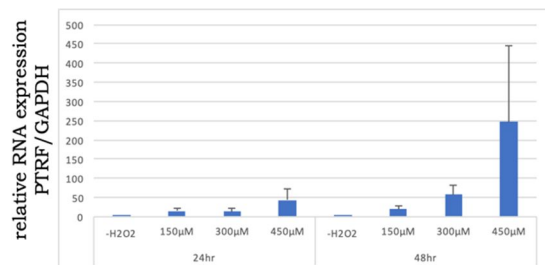
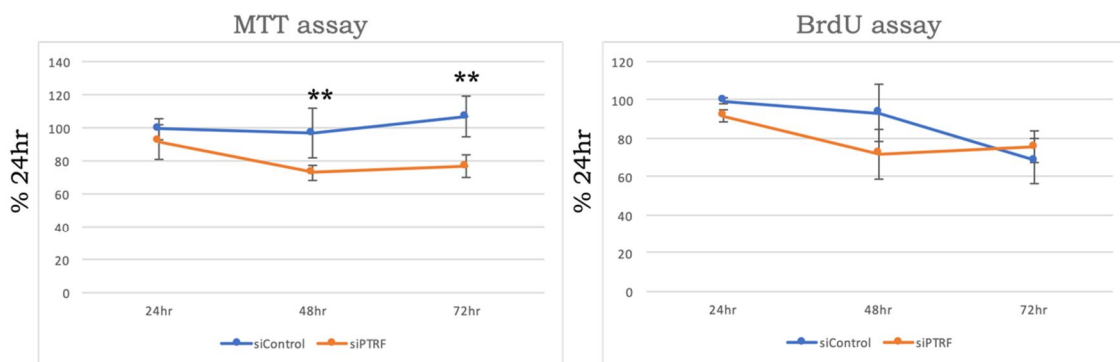


図3 高酸素培養によるPTRF発現への影響

ーPTRF 発現欠損における細胞増殖への影響

siRNA により、PTRF をノックダウンし、細胞増殖性を MTT アッセイと BrdU アッセイによって評価した。PTRF の発現は、リアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング双方で確認したところ、十分発現が落ちていることが確認出来た(データ示さず)。ノックダウン後 24 時間、48 時間、72 時間にそれぞれアッセイを行ったところ、24 時

間では差は殆ど見られなかった(図4)。その後 MTT アッセイでは 48 時間、73 時間で PTRF ノックダウンで有意に低くなった。BrdU アッセイでは 48 時間で最も差が大きくなり PTRF ノックダウンで低くなったが、72 時間では再び差がなくなった。このことより、PTRF 遺伝子ノックダウンにより、一時的に細胞増殖能は低下するが、DNA



** p < 0.05, unpaired, student's t
n = 3

図4 PTRFノックダウンによる細胞増殖への影響

合成にはほとんど影響が出ず、細胞分裂やミトコンドリア活性が低下し、細胞増殖に影響することが考えられた。

—HaCaT 細胞のゲノム編集

PTRF の SNPs 付近を認識する gRNA を 3 種類設計し、Cas9 による切断をサーベイヤーにて評価した。その結果、3 種類共に切断に由来するバンドを確認することが出来た(図2)。効率としては3種類共に同じ様に思われた。そこで相同組換えを利用して、変異を導入するためのオリゴヌクレオチドを設計した。SNP を中心として前後 40 bp、トータル 80 bp の長さのオリゴヌクレオチドを作成し、3 種の gRNA と共に細胞にトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 24 時間後に細胞を回収し、100 μL あたりに 1 細胞となるように希釈を行い、96 ウェルプレートに播種した。播種後、

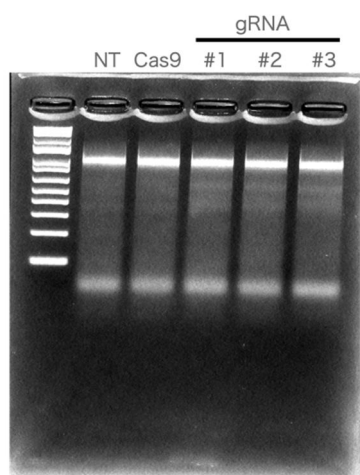


図5 サーベイヤーによるgRNAの評価

ウェル内に 1 細胞のウェルのみ選択し、増殖具合を見ながら、48 ウェル、24 ウェルと細胞を増やしていった。細胞が凍結保存出来、かつ十分に gDNA を抽出できる数になったところで細胞を回収し、凍結保存細胞と gDNA を回収した。回収したゲノム DNA に対して、目的部分を PCR にて増幅し、直接シーケンシングを行うことにより、変異導入の有無、変異の種類を確認した。gRNA 別に得られたクローンをそれぞれ 50 前後解析した結果、2 割り程度の割合で、変異が導入されていることが分かった。しかし、目的の SNP が導入されたクローンは得られず、SNP 周辺部の 1 塩基のインサーション、デリーション並びに数塩基~数十塩基の欠損を持ったクローンのみが得られた。

—ゲノム編集 HaCaT 細胞の遺伝子発現解析

いくつか得られたクローンから、SNP 付近に数塩基の欠損のある 2 クローンを選び、細胞増殖期に細胞を回収し、抽出した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。対照には同じくゲノム編集を行ったものの、変異が見つからなかったクローンを用いた。その結果、STAT5A 及び SOCS1 については、HaCaT 細胞においては発現が見られなかった。他の検出が出来た遺伝子に関しては、コントロール細胞と比較して有意な差は見られなかった。

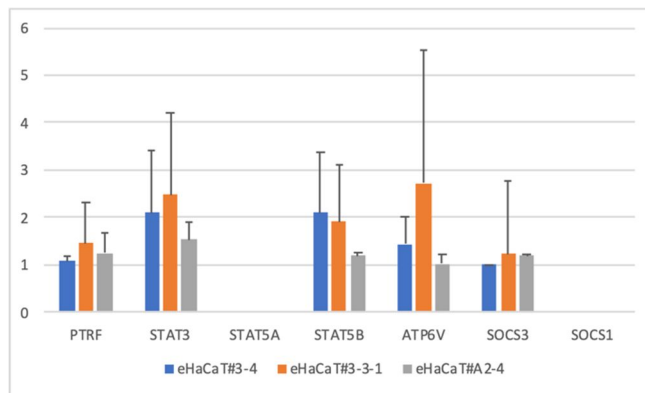
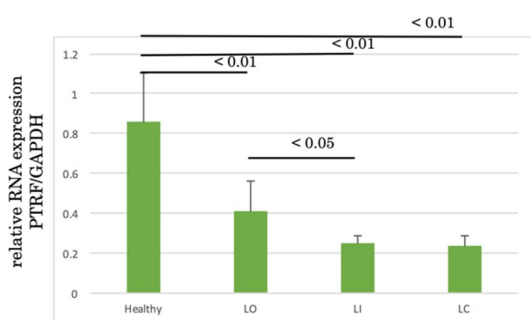


図6 ゲノム編集を行った細胞の遺伝子発現解析

乾癬皮疹部における PTRF 発現の比較



LO: outside of lesional region
LI: inside of lesional region
LC: center of lesional region

図7 乾癬皮疹部別のPTRF発現量の比較

乾癬患者計 6 名より得られた生検試料を用いて、PTRF 発現の検討を行った。その結果、LC = LI < LO < H と皮疹部中央から外側 (健康部) に向かうにつれ、PTRF の発現が高くなった。特に皮疹部の内側と外側では有意な差が見られる程度に発現量に違いが見られた (図 7)。

今回、ゲノム編集による変異導入を試みたが、目的の変異株を得ることは出来なかった。その原因の一つとして、HaCaT 細胞のトランスフェクション効率の低さが考えられる。gRNA によるゲノム DNA の切断効率はまずまずであったが、長鎖のオリゴヌクレオチドの導入効率が非常に低く、上手く相同組換えが行われなかったと考えられる。gRNA と同時にトランスフェクションや、gRNA 導入後しばらくしてからオリゴをトランスフェクションするなど条件を変えてみたが、改善されなかった。今後の課題として、トランスフェクションの条件や、導入するオリゴを短くするような工夫を考えていかなければならない。また今回 2 クローンではあるが、PTRF 遺伝子のイントロン部に変異のある細胞と正常な細胞を用いて遺伝子発現解析を行った。しかし、PTRF そのものも含め、遺伝子発現への影響は見られなかった。各細胞トリPLICATEでデータを取得したが、通常の培養細胞と比べ、ばらつきが大きかった。このことは、細胞のクローン化がまだ不十分だったことも考えられる。更に純化して、ばらつきの少ないデータにした時に、違いが見られるか、さらなる検討も必要だと考えられる。また、今回は未刺激の状態でのみ比較したので、サイトカイン等で刺激した際に違いが出るか否かも検討する必要があると思われる。乾癬の皮疹部では健康部と比較して PTRF の発現が、遺伝子レベル、タンパク質レベルで減少していることから、乾癬病態、その中の皮疹の形成に関与している可能性が考えられる。発現低下によって皮疹の出現が亢進するのであれば、皮疹部で PTRF の発現を亢進するような治療ができれば、皮疹が軽快するかもしれない。今後さらに調査をする必要を感じている。

Reference

- Lam et al., (2012) Nat Genet, 44(12), 1341-1348
Volonte and Galbianti, (2011) J Biol Chem, 286(33), 28657-28661

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe K., Nakayama K., Ohta S., Matsumoto A., Tsuda H., Iwamoto S	4. 巻 11
2. 論文標題 LDR2 stabilization is regulated by its interaction with GRP78	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87884-7	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 -
1. 著者名 Watanabe K., Matsumoto A., Tsuda H., Iwamoto S	4. 巻 12
2. 論文標題 N4BBP2L1 interacts with dynactin and contributes to GLUT4 trafficking and glucose uptake in adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 1958-1966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13623	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 -
1. 著者名 Sashikawa M., Tsuda H., Komine M., Ohtsuki M.	4. 巻 48
2. 論文標題 Novel missense mutation c.539A>G; pGlu180Gly in keratin 1 causing epidermolytic ichthyosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 e579-e580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kutsuwada Y., Yokota K., Yoshida K., Tsuda H., Watanabe K., Matsumoto A., Iwamoto S	4. 巻 105
2. 論文標題 Association of HLA-DPB1, NLRP10, OVOL1, and ABCC11 with the axillary microbiome in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 98-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda H., Tominaga S., Ohtsuki M., Komine M	4. 巻 105
2. 論文標題 Nuclear IL-33 regulates cytokinesis and cell motility in normal human epidermal keratinocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 113-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe K, Matsumoto A, Tsuda H, Iwamoto S	4. 巻 12
2. 論文標題 KBTBD11, encoding a novel PPAR target gene, is involved in NFATc1 proteolysis by interacting with HSC70 and HSP60	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24929-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida K, Yokota K, Watanabe K, Tsuda H, Matsumoto A, Mizukami H, Iwamoto S	4. 巻 13
2. 論文標題 Lack of GPR180 ameliorates hepatic lipid depot via downregulation of mTORC1 signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29135-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 歩、津田 英利、古井 貞浩、川田 雅子、安済 達也、関 満、渡邊 和寿、西野 一三、小坂 仁、岩本 禎彦、山形 崇倫
2. 発表標題 ACTA1変異を有し拡張型心筋症を呈した先天性筋線維不均等症の1例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidetoshi Tsuda, Kazuhisa Watanabe, Ayumi Matsumoto, Mayumi Komine and Sadahiko Iwamoto
2. 発表標題 Peripheral resident M2 macrophages deficiency exacerbated inflammation in imiquimod- induced psoriasis mouse model
3. 学会等名 1st International Societies for Investigative Dermatology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------