

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17442

研究課題名(和文) miR223を介したS1PR1発現制御によるSLE病態の解明

研究課題名(英文) The pathogenesis of S1PR1 reduction via miR223-3p in Lupus T cells.

研究代表者

浅野 澄恵 (Sumie, Asano)

川崎医科大学・医学部・講師

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よりmRNAとmiRNAを抽出し、網羅的シークエンス解析を行い、MRLにおいてスフィンゴシン1-リン酸受容体 (S1pr1)の有意な発現低下とmiR223の有意な発現亢進を確認した。Mir223欠損MRLを作成し解析したところ、脾臓CD4陽性T細胞のS1pr1の有意な増加とその糸球体への有意な浸潤を認め、尿蛋白および糸球体スコアの増悪傾向を認めた。以上から、Mir223欠損はS1pr1の発現を上昇させ、リンパ球の炎症臓器浸潤を促進することを明らかとした。

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miRNAとそのターゲットmRNAを探索した。SLEのCD4陽性T細胞で、miR223の発現を代償的に亢進させることにより標的遺伝子であるスフィンゴシン1-リン酸受容体 (S1pr1)の発現を低下させ、脾臓CD4陽性T細胞の増加とその糸球体への浸潤を抑制し、尿蛋白および糸球体スコアの増悪を抑制していることを確認した。ループス腎炎においてMir223の発現亢進は代償的にループス腎炎悪化を抑制する役割を果たすことが示唆された。Mir223がSLEの病態解明や新規治療ターゲットになりうることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The micro RNAs (miRNAs) and their target mRNAs in CD4+ cells in systemic lupus erythematosus patients were suggested to play a key role in the pathogenesis. To identify new miRNAs related genes, we integrated mRNA and miRNA profiling data in CD4+ cells of MRL/lpr (MRL) and C57BL6/J (B6) mice. We identified downregulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1pr1) and upregulation of Mir223 in MRL compared with B6 mice. We generated the B6-Mir223-/-FasIpr/lpr mice and the lupus phenotypes were analyzed. In B6-Mir223-/-FasIpr/lpr mice, S1PR1+CD4+ T cells in the spleen was significantly increased compared with that in B6-Mir223+/+FasIpr/lpr mice by flow cytometry. B6-Mir223-/-FasIpr/lpr mice demonstrated the elevation of glomerular and renal vascular scores associated with enhanced intraglomerular infiltration of S1PR1+CD4+ T cells. The deletion of Mir223 exacerbated the lupus phenotypes.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：SLE S1PR1 microRNA エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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る。ステロイドや免疫抑制薬の使用にも関わらず、重篤な臓器障害に進展する患者が未だ存在し、新規治療法の確立が望まれている。**SLE** 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 **40%** と報告されている。つまり、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 **SLE** は発症するものと推測される。後天的遺伝子制御メカニズムの一つとして、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、**micro RNA (miRNA)** は **RNA** サイレncingや **DNA** メチルトランスフェラーゼ (**DNMT**) を介した **DNA** メチル化制御を通して自然免疫と獲得免疫の維持に関連している。過去に **SLE** 患者において、**miR21**、**miR155** など **miRNA** の生合成や機能の障害が報告され、その病態への関与が示唆されてきた。

我々は、**SLE** の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、**SLE** モデル **MRL/lpr** マウスの脾臓 **CD4+T** 細胞における **miRNA** および **mRNA** 発現ライブラリーを構築し、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、正常コントロールマウスと有意差を認めた候補 **miRNA** 群の中で、**miR223** を介したスフィンゴシン 1-リン酸受容体 (**S1pr1**) の発現低下に着目した。

スフィンゴシン 1-リン酸 (**S1P**) は **379Da** のスフィンゴ脂質で、セラミドが分解されて生じたスフィンゴシンが、スフィンゴシンキナーゼにリン酸化を受け、産生される。**S1P** 受容体は **G** タンパク質共役受容体であり、**5** 種のアイソタイプが存在する。このうち、**S1PR1** はリンパ球や血管内皮細胞など、免疫担当細胞を中心に広く発現している。リンパ球表面に存在する **S1PR1** は血漿および組織中の **S1P** 濃度勾配に従い、細胞表面の発現が調整される (*Annu Rev Immunol* **30:69-94, 2012**)。 **S1P** リアーゼなどの **S1P** 分解酵素の存在する胸腺や二次リンパ組織では **S1P** が低濃度となり、リンパ球表面の **S1PR1** 発現が上昇し、**S1P** が高濃度に存在する循環血中への移出が促進される。一方、**S1P** 高濃度の血液・リンパ液中では、リンパ球表面の **S1PR1** は内在化し、細胞運動が誘導される。その後リンパ組織内に移入したリンパ球の **S1PR1** はリサイクルされ、再度細胞表面の発現が回復し循環血漿中への移出が可能となる。**S1PR1** 欠損マウスは血管内皮細胞間の接着阻害のため胎生致死となるが (*J Clin Invest* **106:951-61, 2000**)、リンパ球特異的 **S1PR1** 欠損マウスでは、胸腺から血漿中へのリンパ球の移出が阻害され、末梢血・二次リンパ組織へのリンパ球浸潤の減少を認める (*J Biol Chem* **279:15396-401, 2004**)。多発性硬化症で適応承認されている免疫抑制剤 **Fingolimod** は、生体内でリン酸化後、リンパ球上の **S1PR1** に対してアゴニストとして作用し、細胞表面の **S1PR1** 内在化を介して二次リンパ組織から循環血漿中へのリンパ球の移出を阻害することで、免疫抑制機能を発揮することが知られている。**SLE** 患者の末梢血単核細胞及び **B6/lpr** マウスの脾細胞において、**S1PR1** 発現低下が報告されている (*J Immunol* **194:5437-45, 2015**)。加えて、**MRL/lpr** マウスに **S1PR1** 選択的アゴニスト **KRP-203** を投与した場合、**CD4-CD8-T** 細胞での **Fas** 非依存性アポトーシスの亢進、そして腎臓組織への **T** 細胞の浸潤抑制による腎炎進展抑制効果が報告されている (*Kidney Int* **74:1319-26, 2008**)。このような背景から、**S1PR1** を介したリンパ球循環動態の変化は **SLE** の病態に関与すると考えられるが、**S1PR1** の発現低下の機序は不明である。

我々は、上述の **miRNA/mRNA** 統合ライブラリーにて、**S1pr1** のリード数が **MRL/lpr** マウス群で有意に低下していることを確認し、同遺伝子を標的とし、同マウスで発現上昇を認める **miRNA** として **miR223** に着目した。ループスマウスの病態において、**miR223** を介した **S1pr1** の発現制御が、どのように関与するかを本研究で明らかにする。

2. 研究の目的

S1PR1 を介した免疫応答調整の解明は、**SLE** の病態解明のみならず、新規治療標的としての可能性を模索する上で重要と考える。過去に、**S1PR1** 発現の調整因子として **miR155** の関与が報告されている。**miR155** 欠損 **B6/lpr** マウスでは、腎・脾で **S1PR1** の発現が上昇し、腎尿細管間質への **T** 細胞浸潤を抑制することで腎炎の進展を抑制し、この効果は **S1PR1** アンタゴニスト **W146** の投与により減弱した (*J Immunol* **194:5437-45, 2015**)。しかしながら、我々の検討結果では、**miR155** のリード数比 (**SLE/対照**) が **2.5** に対し、**miR223** は **27.1** と、**SLE** 由来 **T** 細胞で **miR223** の著明な発現亢進を認めており、**SLE** における **S1pr1** 発現の後天的制御機構として、**miR223** の寄与度はより高いと推測される。疾患モデルマウスにて **miR223** を欠損させることで、**miR223** が制御しうる **S1pr1** を介した病態的機序の解明のみならず、他の標的分子の検索や、好中球や血管内皮細胞など、**T** 細胞以外での関与を検索することも可能となり、より病態に即した機能解析が可能となる。

3. 研究の方法

1. **miR223** による標的遺伝子 **S1PR1** 発現調整の検討

マウス **T** 細胞系培養細胞 (**EL4 mouse T cell line**) **EL4** に、リポフェクタミンを用いて **microRNA mimic** を導入し **miR223** を過剰発現する。**S1PR1** の発現量の差異について、転写レベル及び蛋白レベルの定量を、**real-time PCR** 法及び **Western Blotting** 法にて施行する。また、

ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に **S1pr1-3'UTR region** と **reporter resion** をライゲーションした **S1pr1** の **3' UTR** 領域含有レトロウイルス(MISSION® 3' UTR LentiGoClone® SIGMA)を遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイを用いて定量的に評価を行う。

2. miR223 欠損 SLE モデルマウスの作成と解析

MRL/lpr マウス(**MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr/Crlj**)と、**miR223** ホモ接合体欠損マウス(**B6.Cg-Ptprca Mir223tm1Fcaml/J**)を交配しヘテロ接合体欠損マウスを作成、以後戻し交配を順次行い、第7世代以降に **miR223** ヘテロ接合体欠損 **MRL/lpr** 雌雄を交配し、**miR223** ホモ接合体欠損 **MRL/lpr** マウス(**MRL-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}**)を作成する。**MRL-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** 及び **MRL-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** マウスを用い、発症早期 8 週齢以降発症後期 16 週齢までの表現型の差異について体重、尿タンパク定量、ELISA 法による血清中 **S1P** 濃度及び抗 **dsDNA** 抗体の測定、腎組織を光学顕微鏡標本および免疫蛍光染色法を用いた腎炎評価、**Flow Cytometry** によるリンパ組織(リンパ節、脾臓)のリンパ球サブセットおよび **S1PR1** 発現量の解析を行う。さらに、各サブセットのアポトーシスアッセイを行い、アポトーシス効率の差異を検討する。また、腎組織における浸潤リンパ球のサブセットを確認するため、**CD4**、**CD8**、**S1PR1** に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。なお、既報では **C57BL/6** を背景に持つ **miR155** 欠損 **B6/lpr** マウスの解析が行われているため(**J Immunol 194:5437-45, 2015**)、**B6/lpr** マウスと **miR223** ホモ接合体欠損 **B6** マウスの交配も行い、**miR223** 欠損 **B6/lpr** マウス (**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}**) および **B6-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** を作成し、44 週齢までの表現型の差異について上記手法を用いて検討する。

3. MRL/lpr マウス及び SLE 患者検体での S1PR1 と miR223 の生体内分布

16 週齢 **MRL/lpr**、44 週齢 **B6/lpr** マウス及びコントロールマウスの胸腺、リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓、肺などの各臓器における **miR223** 及び **S1PR1** 発現量を、**real-time PCR** 法及び **Western Blotting** 法にて評価する。さらに、血清中 **S1P** 濃度、各リンパ組織及び末梢血単核球における各サブセットでも同様に **miR223** および **S1PR1** の発現量を測定し、差異を確認する。

ヒト患者検体については、初発未治療の **SLE** 患者と健康人の末梢血液から、**STEMCELL** 社 **RosetteSep** 分離試薬で **CD4+** 及び **CD8+T** 細胞に分離し、抽出した **total RNA** を用いて、**miR223** 及び **S1PR1** の発現量の差異を比較検討する。

4. 研究成果

1. Mir223 による標的遺伝子 S1pr1mRNA の発現調整

ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に **S1pr1-3'UTR region** と **reporter lesion** を含むレンチウイルスを導入し、ルシフェラーゼアッセイで相互作用を評価したところ、**miR-223-3p mimic** は、**nontargeting miRNA** に比較し、**S1pr1-3'UTR** 含有 HUVEC でのルシフェラーゼ活性を低下させた。また、マウス T 細胞系培養細胞(**EL4 mouse T cell line**) **EL4** に **miR-223-3p mimic** をリポフェクションし、**quantitative PCR** で **S1pr1 mRNA** の発現変化を評価したところ、**EL4** で **S1pr1** の発現を有意に減少させた。以上の結果より **Mir223** は **S1pr1 mRNA** の **3'UTR** 領域に結合することで、**S1pr1mRNA** の発現を負に調節していると考えられた。

2. SLE 患者での S1PR1 および miR-223-3p 発現と臨床パラメーター

初発未治療の **SLE** 患者の末梢血より **CD4** 陽性 T 細胞を分離し、**S1PR1 mRNA** および **miR-223-3p** の発現を健康人と比較したところ、マウス同様に **S1PR1mRNA** は **HC** に比較し有意に発現の低下、**miR-223-3p** は **HC** に比較し発現が上昇する傾向にあった。また、皮膚病変のある患者ではない患者に比較し、有意な **miR-223-3p** の発現低下と **S1PR1** 発現上昇を認めた。

3. Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr} マウスの表現系検討

Mir223 を介した **S1pr1** 発現制御による病態関与を解明するため、**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** と **B6-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** を作成し、44 週齢で表現型の解析を行った。**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** では、**B6-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** に比較し、体重や生存率、皮膚スコア、臓器重量、脾臓およびリンパ節の総細胞数、末梢血細胞数に有意差は認められなかった。また、血清 **dsDNA** 抗体価や **IgG**、**IgG** サブクラスにも有意差は認められなかった。

一方で、**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** では、**B6-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** に比較し、脾臓における **CD3+T** 細胞、**CD4-CD8-T** 細胞、**B** 細胞、形質細胞の割合は有意に増加しており、さらに脾 **S1PR1+CD3+T** 細胞と **S1PR1+CD4+T** 細胞の有意な増加も認めた。**miR223** に欠損により **S1PR1** の細胞表面への発現が亢進している可能性が示唆された。また、**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** では、**B6-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** に比較し、リンパ節における早期アポトーシス(**AnnexinV+7-AAD-**)に至った **CD4+T** 細胞および **CD8+T** 細胞の割合の増加を認めたが、アポトーシス細胞全体の割合および抗アポトーシス作用を有する **Bcl-2** や **Bcl-xl** の発現に有意差は認められなかった。

腎所見については、**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** では、**B6-Mir223^{+/-}Fas^{lpr/lpr}** に比較し、糸球体径、糸球体内細胞数、腎重量の有意な増加を認めたが、メサンギウム領域に有意差は認められなかった。

また、**B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** では、**B6-Mir223^{+/+}Fas^{lpr/lpr}** に比較し、糸球体および腎血管領域のグレイディングスコアの有意な増悪及び、糸球体への **S1PR1+CD4+T** 細胞の有意な浸潤を認めることから、尿蛋白に有意差は認められなかったものの、ループス腎炎の悪化と判断された。

また **MRL-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** 及び **MRL-Mir223^{+/+}Fas^{lpr/lpr}** では、**B6/lpr** バックグラウンドの **B6-Mir223^{-/-}Fas^{lpr/lpr}** 及び **B6-Mir223^{+/+}Fas^{lpr/lpr}** の差異には及ばない結果もあったが、類似した結果となった。

以上の結果より、**Mir223** 欠損は標的遺伝子である **S1PR1** の発現を上昇させ、リンパ球の炎症臓器への浸潤を促進することでループス腎炎を悪化させたと考えられる。ループス腎炎において **Mir223** の発現亢進は代償的にループス腎炎悪化を抑制する役割を果たすことが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiramatsu-Asano Sumie, Sunahori-Watanabe Katsue, Zeggar Sonia, Katsuyama Eri, Mukai Tomoyuki, Morita Yoshitaka, Wada Jun	4. 巻 11
2. 論文標題 Deletion of Mir223 Exacerbates Lupus Nephritis by Targeting S1pr1 in Faslpr/lpr Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.616141	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sumie Asano, Tomoyuki Mukai, Yoshitaka Morita, Jun Wada
2. 発表標題 Deletion of Mir223 Exacerbates Lupus Nephritis by Targeting S1pr1 in Fas lpr/lpr Mice
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumie Hiramatsu-Asano, Tomoyuki Mukai, Yoshitaka Morita, Jun Wada
2. 発表標題 Deletion of miR-223 exacerbates lupus nephritis by targeting S1pr1 in Faslpr/lpr mice
3. 学会等名 2020 American College of Rheumatology(ACR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumie Hiramatsu-Asano, Tomoyuki Mukai, Yoshitaka Morita, Jun Wada
2. 発表標題 Deletion of miR-223 exacerbates lupus nephritis by targeting S1pr1 in Faslpr/lpr mice
3. 学会等名 The 22nd Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野澄恵, 向井知之, 守田吉孝, 和田淳
2. 発表標題 miR223を介したS1PR1発現制御によるSLE病態への関与
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumie Asano, Katsue Watanabe, Jun Wada
2. 発表標題 The reduction of S1pr1 by miR223-3p and their roles in the pathogenesis of SLE
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------