

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21591268

研究課題名(和文) TCR 鎖 mRNA 3'UTR 異常に伴う全身性エリテマトーデス発症機序

研究課題名(英文) Mechanism of systemic lupus erythematosus accompanied with the aberrant TCR zeta mRNA 3'UTR

研究代表者

津坂 憲政 (Tsuzaka, Kensei)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00245490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞 鎖 mRNA(TCR )の安定性を規定している 3'UTR CS1領域がTCR 鎖発現制御に関わるかどうかを検討するために、CS1を欠損させたarmを作製し、ターゲティングベクターを構築した。続いてこのターゲティングベクターをES細胞に導入し組み替えES細胞を作製した。さらにこれをインジェクション法により注入しキメラマウス作製を行った。次にこの作製したキメラマウスと野生型マウスを交配させてF1マウスが得られた。しかし、F1マウスのゲノム中に組み込まれている loxP で挟まれた pgk-neoカセットを除去するために、Creマウスとの交配を試みたが上手く行かなかった。

研究成果の概要(英文)：To consider whether 3'UTR CS1 region prescribing stability of T-cell receptor zeta chain (TCR zeta) mRNA is associated with TCR zeta chain expression control, We made arm which is lack of CS1 and built a targeting vector. We introduced this targeting vector into an embryonic stem cell successively and made a recombinant embryonic stem cell. Furthermore, we injected it by the injection method and performed the manufacturing of chimera mouse. We crossbred this chimera mouse and wild-type mouse, and an F1 mouse was obtained. However, we tried the mating with the Cre mouse, but did not work well to remove pgk-neo cassette sandwiched in loxP incorporated in the genome of the F1 mouse.

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：TCR zeta SLE knockout mouse 3'UTR

### 1. 研究開始当初の背景

これまで全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者では、T細胞受容体 (TCR) を含むT細胞表面抗原レセプターからのシグナル伝達に何らかの異常が存在するために末梢血T細胞の機能が低下していることが報告されてきた。TCRと鎖(ζ鎖)はTCRからのシグナル伝達に関与する重要な膜タンパクであることが知られているが、申請者らや他のグループはこれまで、SLE患者末梢血T細胞(PBT)ではζ鎖の発現が低下あるいは欠損し、さらにSLE患者におけるζ鎖 mRNA では exon7 欠損ζ鎖 mRNA(ζ mRNA/ex7-)を含んだ mRNA open reading frame 異常や、alternative splicing によって生じた 560bp 短い 3' untranslated region (3' UTR) をもつζ鎖 mRNA(ζ mRNA/as-3' UTR)が優位に発現するために post transcriptional regulation に変化が生じて、その結果ζ鎖の発現が低下する可能性を報告した。また実際にζ mRNA/as-3' UTR あるいはζ mRNA/ex7-などのζ鎖 mRNA スプライス・ヴァリエントが優位に発現されるためにT細胞表面上のζ鎖のみならず他の TCR/CD3 複合体発現が低下し、TCRからのシグナル伝達が下がるために IL-2 産生も低下することを申請者らや他のグループは近年報告した。

3' UTR は近年 mRNA の安定性にも関与し、post-transcriptional regulation にも関与するとされている。ζ mRNA の場合には、ζ mRNA/as-3' UTR は wild type ζ mRNA と比較して非常に不安定で、そのため SLE 患者 PBT ではζ鎖発現が低下することを申請者らは報告した。さらにζ mRNA はその 3' UTR 内に種を超えて保存される二つの conservative sequences (CS1, CS2)があり、これらの配列がζ mRNA の安定性を規定していることを最近になり申請者らは報告した。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究ではζ mRNA の安定性を規定している CS1 あるいは CS2 をノックアウトさせたマウスを作製し、SLE 様の phenotype を呈するかどうかを検討することを目的とした。これまで、ζ鎖のノックアウトマウスは報告されているが、このマウスでは SLE 様の phenotype は認められなかった。最近になり、ζ鎖 ITAM ドメインを欠損させたマウスでは SLE 様の phenotype を呈することが報告されたが、ヒトの SLE でζ鎖 ITAM ドメインを欠損する例はほとんど見当たらず、SLE 患者でζ mRNA/as-3' UTR が優位に発現することから、SLE 様 phenotype を惹起するにはζ mRNA/as-3' UTR のような 3' UTR の部分欠損をもつζ mRNA の優位な発現が必要である可能性が考えられる。このように、mRNA 3' UTR 異常に基づいた in vivo の実験で SLE 様 phenotype が生じるかどうかを検討する点において本研究は非常に独創的と考えられる。

### 3. 研究の方法

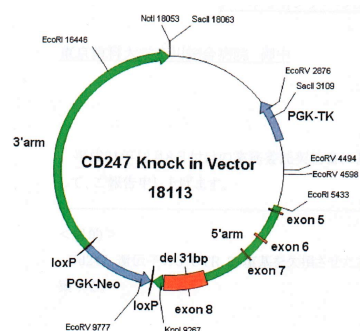
(1) まず二つの CS (CS1, CS2) に結合しζ鎖発現を規定するタンパクを同定することを試みた。まず、WT(wild-type) cDNA, AS cDNA ならびに CS1 あるいは CS2 を欠損させた cDNA (CS1 cDNA, CS2 cDNA)をそれぞれ PCR で増幅し、pCRII ベクターに組み込み、biotin RNA labeling mix を用いて in vitro transcription でビオチン標識した mRNA を作製した。続いてこのビオチンラベル mRNA を Jurkatt 細胞抽出物と混和させた後に streptavidin-agarose beads を加えて洗浄後、抽出液を用いて mRNA 結合タンパクを抽出した。

(2) 3' UTR 内のζ mRNA の安定性を規定する部位である CS1 あるいは CS2 を欠損(ΔCS1, ΔCS2)させたターゲティングベクターを調製した後、ES 細胞に導入しキメラマウスを作製し、作製したキメラマウスと野生型マウスを交配し、生殖細胞が組換え ES 細胞由来の細胞により形成されていることが確認されたマウス同士を交配し、ノックアウトマウスを選別する。さらに、ノックアウトマウスの血液を採取し、T細胞を分離後、Western blot 法・FACS 等で T細胞表面上のζ鎖を含む TCR/CD3 複合体、syndecan 分子、nectin-2、PVRL などの co-stimulatory element の発現を検討すること、ならびに臓器切片(腎、肺、脳、関節等)を作製し腎炎、間質性肺炎、関節炎所見等 SLE 様の phenotype の有無を検討する。

### 4. 研究成果

(1) WT mRNA と CS1 mRNA からは 14-kD タンパクが抽出された。その一方で AS mRNA と CS2 mRNA からは抽出されなかった。以上のことから、14-kD タンパクは、ζ mRNA 3' UTR 内の CS2 に結合しζ mRNA を安定かさせることでζ鎖発現を規定する可能性が示唆された。

(2) ζ遺伝子 exon8 の 3' UTR 内にある 31 塩基の CS1 を欠損(ΔCS1)させた arm を作製し 5' 側の相同領域とするデザインとした。5' 相同領域を 3.5~4.5kb とし、3' 相同領域を 5~8kb でターゲティングベクターを設計し構築した。その後ターゲティングベクターがデザイン通りかどうか確認するために、制限酵素処理後電気泳動を行った。ターゲティングベクターを制限酵素 NotI にて線状化した後、精製を行った。



次にプラスミド DNA および BALB/c 系統の ES 細胞を使用し、エレクトロポレーションを行った。ターゲティングベクター導入後、48 時間培養し、培地に G418 及びガンサイクロビルを添加した。薬剤による選択培養を 6 日間行い、薬剤耐性 ES 細胞を作製した。得られた薬剤耐性 ES クローン 440 個をピックアップした。そして次に、相同的遺伝子組換えのおこった ES 細胞株を選別し、8 細胞期胚又は胚盤胞期胚の中に、その組換え ES 細胞を、インジェクション法により注入し、相同組み換えクローンをを用いて、アグリゲーション法、及び、インジェクション法によるキメラマウス作製を行った。なお、キメラ率は、体全体の黒色以外の毛色の率を目視によって判定した。キメラ胚を作製した。次に、そのキメラ胚を偽妊娠マウスの子宮に移植し、産仔（キメラマウス）を得ることができた。さらに、作製したキメラマウスと野生型マウスを交配し、F1 マウスを得て、生殖細胞が組換え ES 細胞由来の細胞により形成されているかどうかを確認した。

(3) 得られた F1 マウスを解析したところ、ジャームライン・トランスミッションを伴うヘテロマウスであることが確認できなかったため、再度相同組み換え ES クローンからアグリゲーション法、及びインジェクション法によって得られたキメラマウスより、毛色寄与率上位のマウスを用いて F1 産子を作製することを試みた。アグリゲーション法により得られたキメラマウス No. 1♂60%, No. 2♂40%, No. 3♀40%に関しては、自然交配により 27 匹の産仔が得られた。インジェクション法により得られたキメラマウス No. 5♂80%, No. 6♂80%に関しては、自然交配により 8 匹の産仔が得られた。No. 4♂80%に関しては、自然交配で産仔は得られなかった。得られた F1 産子の尾部より DNA 抽出後、PCR 法により遺伝子型を判定した結果、遺伝子型解析の結果、9 匹(♂5、♀4)の F1 マウスついて、ヘテロマウスであることが確認された。すなわち、変異遺伝子の伝達(ジャームライン・トランスミッション)が確認された。

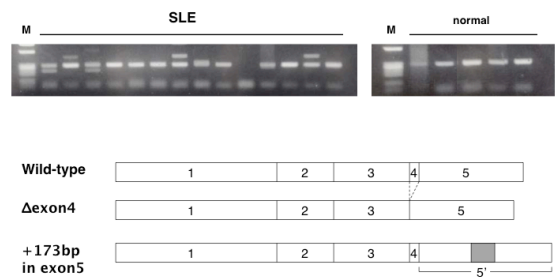
世代	性別	毛色	遺伝子型	交配	結果
1 F1	♂	W	なし	+	+
2 F1	♀	W	なし	+	+
3 F1	♂	W	なし	+	+
4 F1	♀	W	なし	+	+
5 F1	♂	W	なし	+	+
6 F1	♀	W	なし	+	+
7 F1	♂	W	なし	+	+
8 F1	♀	W	なし	+	+
9 F1	♂	W	なし	+	+
10 F1	♀	W	なし	+	+
11 F1	♂	W	なし	+	+
12 F1	♀	W	なし	+	+
13 F1	♂	W	なし	+	+
14 F1	♀	W	なし	+	+
15 F1	♂	W	なし	+	+
16 F1	♀	W	なし	+	+
17 F1	♂	W	なし	+	+
18 F1	♀	W	なし	+	+
19 F1	♂	W	なし	+	+
20 F1	♀	W	なし	+	+
21 F1	♂	W	なし	+	+
22 F1	♀	W	なし	+	+
23 F1	♂	W	なし	+	+
24 F1	♀	W	なし	+	+
25 F1	♂	W	なし	+	+
26 F1	♀	W	なし	+	+
27 F1	♂	W	なし	+	+

(4) 続いて、F1 マウスのゲノム中に組み込まれている loxP で挟まれた pgk-neo カセットを除去するために、得られた F1 マウス♂ (loxP/+♂) を Cre マウス♀ (Cre ホモ) と

交配、ならびに F1 マウス♀ (loxP/+♀) を Cre マウス♂ (Cre ヘミ) と交配することによりノックアウトマウスの作製を試みたが、ゲノム中の pgk-neo カセットは除去することができなかった。

(5) これまで申請者らは、TCRζ 鎖 mRNA 3' UTR 異常を伴う SLE 患者末梢血リンパ球 (PBT) では、syndecan (Sdc) 分子発現異常、とくに HS 糖鎖修飾をうけた Sdc4 発現が低下していることを報告した。また Sdc4 のコアタンパクに、HS 糖鎖の一部である N-アセチルグルコサミンを結合させる exostosin-like 2 (EXTL2) 酵素発現を SLE 患者 PBT において検討したところ、HS 糖鎖修飾 Sdc4 発現が低下していた SLE 患者では EXTL2 発現が低下していることを発見した。本年度は、SLE 患者 PBT における EXTL2 遺伝子発現異常の有無を検討したところ、EXTL2 発現低下例に、EXTL2 mRNA exon4 欠損例あるいは truncated form exon5 例、exon5 に 173bp の挿入部分が観察される例などが存在し、SLE 患者 EXTL2 発現異常に EXTL2 遺伝子発現異常が関与することが示唆された (下図)。

EXTL-2 mRNA



### 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 6 件)

- ① Takeuchi T, Suzuki K, Kondo T, Yoshimoto K, Tsuzaka K. CD3 ζ defects in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 71 Suppl 2: i78-81, 2012
- ② Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M, Setoyama Y, Kameda H, Suzuki K, Tsuzaka K, Ogawa Y, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. Arthritis Res Ther 13(5):R170. Epub 2011 Oct 21.
- ③ Suzuki K, Kameda H, Amano K, Nagasawa H, Takei H, Sekiguchi N, Nishi E, Ogawa H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Single center prospective study of tacrolimus efficacy and safety in treatment of rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 31: 757-763, 2011

- ④ Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Decreased mRNA expression of two FOXP3 isoforms in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24:7-14, 2011
- ⑤ Yoshimoto K, Setoyama Y, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Reduced Expression of TCR zeta Is Involved in the Abnormal Production of Cytokines by Peripheral T Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol Epub* 2010
- ⑥ Tsuzaka K, Itami Y, Takeuchi T, Shinozaki N, Morishita T. ADAMTS5 is a biomarker for prediction of the response to Infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 37: 1454-1460, 2010

[学会発表] (計20件)

- ① Tsuzaka K, Takao M, Nishida J. ADAMTS5 is a biomarker for the efficacy prediction of tocilizumab in rheumatoid arthritis. 2013 ACR Annual Scientific Meeting, SanDiego, October, 2013
- ② Tsuzaka K, Takao M, Nishida J. Plasma short-talin is a new rheumatoid arthritis monitoring biomarker independent of the inflammatory markers. 2013 ACR Annual Scientific Meeting, SanDiego, October, 2013
- ③ Tsuzaka K, Takao Masako, Shinozaki N, Nishida J. Talin is cleaved and expressed as a short form predominantly in patients with rheumatoid arthritis. 2012 ACR Annual Scientific Meeting, Washington DC, November, 2012
- ④ Tsuzaka K, Itami Y, Shinozaki N, Morishita T. Plasma talin is a new diagnostic and monitoring marker for rheumatoid arthritis. 2011 ACR Annual Scientific Meeting, Chicago, November, 2011
- ⑤ Tsuzaka K, Itami Y, Shinozaki N, Morishita T. Baseline ADAMTS5 expression could sort the prediction of response to infliximab or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. 2010 ACR Annual Scientific Meeting, Atlanta, November, 2010

[図書] (計1件)

- ① 津坂憲政。SLE では T 細胞にシグナル異常があるか。皮膚科 膠原病診療のすべて。古江増隆・佐藤伸一編集、中山書店

(東京)。70-72, 2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津坂 憲政 (TSUZAKA, Kensei)  
東京歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：00245490