

内容要旨目次

主 論 文

Down-regulation of miR-200a-3p, targeting CtBP2 complex, is involved in the hypoproduction of IL-2 in SLE-derived T cells

(miR-200a-3p 低発現は CtBP2 複合体を介して、SLE 由来 T 細胞における IL-2 産生低下にかかわる)

勝山恵理、顔 明露、渡部克枝、松島 舜、山村裕理子、平松澄恵、大橋敬司、渡辺晴樹、勝山隆行、Sonia Zeggar、吉田修也、Vaishali R. Moulton、George C. Tsokos、佐田憲映、和田 淳

The Journal of Immunology (掲載予定)

平成 27 年 11 月 American College of Rheumatology 2016 (Washington, D.C.)で発表

主論文

Down-regulation of miR-200a-3p, targeting CtBP2 complex, is involved in the hypoproduction of IL-2 in SLE-derived T cells
(miR-200a-3p 低発現は CtBP2 複合体を介して、SLE 由来 T 細胞における IL-2 産生低下にかかわる)

[緒言]

全身性エリテマトーデス (SLE) は多様な自己抗体や炎症細胞浸潤により多臓器障害を引き起こす。IL-2 産生低下は、ヒト・マウス双方における SLE 病態に共通し、制御性 T 細胞の阻害などを引き起こし、SLE の自己免疫応答に寄与すると考えられている。

Zinc finger E-box binding homeobox (ZEB) 1 及び 2 (ZEB1/2) はジンクフィンガーモチーフにより様々なターゲットのプロモーターに結合し、脊椎動物の胚の発達や、近年は腫瘍の遠隔転移に重要な上皮間葉転換の誘導因子として注目されている。また ZEB1 は IL-2 遺伝子の negative regulatory element A (NRE-A) に結合し、発現を抑制する。CtBP2 は ZEB1/2 の抑制効果発揮に必須のコリプレッサーであるが、ZEB1/2、CtBP2 の自己免疫性疾患における IL-2 抑制効果については知られていない。

micro RNA (miRNA) は小分子ノンコーディング RNA であり、3'UTR に結合してターゲットの転写あるいは翻訳を抑制する。SLE における microRNA の機能はいまだ多くが不明である。本研究では、miR-200a-3p の発現が MRL/lpr ループスモデルマウスで著明に低下していたことに着目し、SLE 病態における miR-200a-3p の機能解析を行った。

[材料と方法]

試薬と材料

SLE モデルマウスとして MRL/lpr-*Tnfrsf6*^{pr} (MRL/lpr)♀、そのコントロールとして C57BL/6J (B6)♀をジャクソン研究所、チャールズリバー研究所よりそれぞれ購入した。16 週齢の MRL/MpJ マウス♀はベス・イスラエル・ディーコネス研究所より入手した (IACUCC approval #088-2015)。8 週または 14-16 週齢にて、脾臓細胞よりマウス由来 CD4 陽性 T 細胞を磁気ビーズにて分離した (Miltenyi Biotec)。これらに関しては岡山大学動物実験委員会の承認を得た (OKU-2015569 and OKU-2013092)。

EL4 細胞株は ATCC より購入し DMEM で培養した。細胞は phorbol-12-myristate-13-acetate/イオノマイシン (PMA/Iono)、抗 CD3/CD28 抗体でそれぞれ刺激した (PMA:10ng/ml、Iono: 1μM、抗 CD3/CD28 抗体: 2μg/ml)。

RNA抽出と定量リアルタイムPCR解析

各細胞より miRNA を含む total RNA を抽出した。mRNA/miRNA ライブラリーを調整し Illumina Hiseq を用いて RNA シークエンシングを行い、統合データベースを樹立した。

Taqman リアルタイム PCR 法にて miR-200a-3p を測定し、内在性コントロール sno-202 または sno-234 で標準化した。IL2、ZEB1、ZEB2、CtBP2 は内在性コントロール GAPDH で標準化した (Applied Biosystems)。

核酸導入とルシフェラーゼアッセイ

過剰発現系として EL4 細胞に miR-200a-3p mimic とコントロール mimic をリポフェクション法で導入した (Invitrogen)。pRL-TK コントロールプラスミド (Promega) と IL-2 プロモーター組み込みプラスミド (pIL2(-585)-Luc) はエレクトロポレーション法 (Thermo Fisher Scientific) で同時に EL4 細胞に導入した。ルシフェラーゼ活性 (Promega) は PMA/Iono にて 24 時間刺激後測定した。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性 (pRL-TK) にて標準化した。

ELISA

細胞を PMA/Iono あるいは抗 CD3/CD28 抗体で刺激後、細胞上清の IL-2 レベルを測定した (eBioscience)。

ゲルシフトアッセイ

EL4 細胞から核蛋白を抽出し、3'末端をビオチンラベルしたオリゴヌクレオチドと結合させた。NRE-A 配列として 5'-CTGCCACACAGGTAAAGTCTT-3'、変異 NRE-A 配列として 5'-CTGCCACACATTTAAAGTCTT-3' を使用した (下線; 変異部位)。シフトバンド確認のために ZEB1 抗体 (Cell Signaling Technology; CST)、ZEB2 抗体 (Abcam)、CtBP2 抗体 (CST) を使用した。結合反応液を 6% ネイティブポリアクリラミドゲルにて泳動し、ゲルシフトアッセイを行った。

クロマチン免疫沈降アッセイ (ChIP)

各細胞はホルムアルデヒドにて蛋白-DNA を架橋後、酵素によるクロマチン断片化を行い、ZEB1、ZEB2、CtBP2 抗体により免疫沈降した。脱クロスリンク後精製した DNA より NRE-A 領域をはさむプライマーにて SYBR green によるリアルタイム PCR を行った (Takara)。結果は 2% インプットとの比により NRE-A 配列における ZEB1、ZEB2、CtBP2 の結合度を示した。

統計解析

結果は少なくとも異なる 3 回または 3 検体以上の実験データの平均値と標準誤差 (SEM) により示した。各群の有意差は、Tukey-Kramer 法あるいは t 検定によって解析し、 p 値 < 0.05 を有意とした。

[結果]

miRNA/mRNA 発現プロファイルより、B6 マウスと比較し MRL/lpr マウスでより発現が低下していた 45 種類の miRNA のうち、再現性をもって有意な低下を認めた miR-200a-3p に注目した。miR-200a-3p は Fas 変異のない MRL/MPJ マウスでも発現低下しており、Fas 変異に依存しないことが示唆された。この発現低下は SLE 発症前から認め、週齢につれ発現が上昇するも、依然同週齢の B6 マウスと比較し著明に低発現を維持していた。一方、MRL/lpr マウスで発現上昇を認めた遺伝子群の中から、同 miRNA が結合しうる標的遺伝子の候補として、ZEB2 と CtBP2 に着目した。ZEB2 と構造的に相同性が高い ZEB1 も候補に追加したが、RNA シークエンシング結果に一致して、MRL/lpr マウスでより mRNA レベルは低下していた。

続いて EL4 マウス T 細胞へ miR-200a-3p mimic を導入し、miR-200a-3p 過剰発現系での標的遺伝子発現の差異を定量したところ、ZEB1、ZEB2、CtBP2 の mRNA レベルはいずれも有意に低下した。また、同様の系で PMA/Iono または抗 CD3/CD28 抗体刺激を行い IL-2 の産生制御につき解析したところ、miR-200a-3p の過剰発現により、IL-2 の mRNA ・蛋白レベル、及びプロモーター活性は亢進した。以上より miR-200a-3p は、ZEB1、ZEB2、CtBP2 の産生抑制を介して IL-2 産生を増強する可能性が示唆された。

次に ZEB1、ZEB2、CtBP2 の IL-2 遺伝子への直接結合に対する miR-200a-3p の影響を検討した。ゲルシフトアッセイにて、EL4 細胞より抽出した核蛋白が IL-2 遺伝子上の NRE-A 配列と特異的な複合体を形成することを確認し、さらにスーパーシフト法で ZEB2 以外の ZEB1・CtBP2 の同部位への結合を証明した。この特異的バンドの形成は miR-200a-3p の過剰発現にて抑制されており、miR-200a-3p が NRE-A への ZEB1、CtBP2 の結合を低下させていると考えられた。さらに EL4 細胞を用いた ChIP 法では miR-200a-3p の過剰発現にて ZEB1、ZEB2、CtBP2 すべての NRE-A への結合が低下していた。以上より、EL4 細胞において miR-200a-3p 過剰発現により ZEB1、ZEB2、CtBP2 の IL-2 遺伝子上の NRE-A への直接結合が抑制されていることが示された。

さらに MRL/lpr マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を用いて ChIP 法を施行した。NRE-A への ZEB1 の結合は、PMA/Iono 刺激 6 時間後にピークを迎えたのち 9 時間後に乖離するという動態の既報に基づき、刺激後 0、6、9 時間のタイムコースを設定した。B6 マウスでは 6 時間のピークをもって NRE-A からの ZEB1、CtBP2 の乖離がみられたが、MRL/lpr マウスでは乖離がみられず、刺激後 ZEB1、CtBP2 の結合は B6 マウスよりも有意に高いまま維持されていた。ZEB2 の結合も、刺激後増強されていたが、その結合状態は B6 マウスよりむしろ低い状態であった。以上より、MRL/lpr マウス由来 CD4 細胞では、刺激後も抑制性の転写因子である ZEB1 と CtBP2 複合体が NRE-A から乖離しないことにより、IL-2 産生が抑制されることが示唆された。

[考察]

本研究では、MRL/lpr マウス CD4 陽性 T 細胞で著明に miR-200a-3p が低下していることに注目した。既報では、健常者と比較し、SLE 患者でも血清・尿の miR-200a を含めた miR-200 ファミリーの低下が報告されており、ヒトでも miR-200a の低下が SLE 病態に関与している可能性がある。

miR-200 ファミリーと ZEB1、ZEB2 はお互いの 3'UTR に結合領域を持ち、ダブルネガティブフィードバックループを形成することが知られている。今回、EL4 細胞における miR-200a-3p 過剰発現系にて ZEB1、ZEB2、CtBP2 すべての NRE-A への結合低下が誘導されていた一方、MRL/lpr マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では、コントロールに比し ZEB1 の mRNA レベルは低発現、かつ ZEB2 の刺激後の NRE-A への結合状態は低かったという点で一部乖離があり、生体内における ZEB1、ZEB2 は一部他の miRNA や転写因子によっても制御されている可能性がある。CtBP2 の mRNA・NRE-A 結合レベルは、MRL/lpr マウス由来 CD4 陽性 T 細胞・EL4 細胞における miR-200a-3p 過剰発現系の双方において一貫して上昇しており、miR-200a-3p に強く制御されていると考えられた。

miR-200a-3p を制御する因子として ZEB そのもののほかに SLE 発症のトリガーとしても知られる Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス) の関与も報告があり興味深い。また、すでに低用量 IL-2 療法が SLE に有効として臨床試験が進んでおり、SLE における IL-2 産生能低下のメカニズムの検討により SLE 病態がより明らかになると考えられる。

[結論]

我々は miR-200a-3p が ZEB1、ZEB2 と CtBP2 の複合体の IL-2 遺伝子プロモーター NRE-A への結合抑制を介して IL-2 産生を増強することをマウス T 細胞にて示した。一方 MRL/lpr マウス由来 CD4 陽性 T 細胞においては、miR-200a-3p 低発現が、NRE-A に結合する ZEB1-CtBP2 複合体の刺激後の乖離不全を介して IL-2 を抑制していることを明らかにした。以上より miR-200a-3p は ZEB1 かつ ZEB2 と CtBP2 との複合体の NRE-A への結合抑制を介して、SLE における IL-2 産生障害を是正しうると考えられた。