

関節リウマチ患者の末梢血単核球における

Ras Guanine nucleotide releasing protein 4 (RasGRP4)

発現異常に関する検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

関節リウマチの罹患関節局所では、マクロファージ(Mφ)、線維芽細胞、破骨細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、樹状細胞(DC)、肥満細胞などの免疫担当細胞が滑膜へ集簇し、それらの活性化と相互作用により関節炎の病態が形成される。Leeらは関節炎マウスモデルにおいて、肥満細胞の存在が炎症性関節炎の発症に必須であることを明らかにした。RAの滑膜炎では、主に単球由来のMφが滑膜増殖に関与するサイトカインを主に産生する。一方、RasGRP (Ras-guanyl releasing protein)は、低分子GタンパクのRasを活性化するグアニンヌクレオチド変換因子(GEF)であり、ファミリー分子としてRasGRP1-4がある。ヒトのRasGRP4は肥満細胞と末梢血単核球分画(PBMC)に発現することが知られており、肥満細胞の分化に重要な分子であることが明らかとなっているが、PBMCにおける同分子発現の意義は不明である。PBMCのうちT、B細胞にはRasGRP4の発現は認められず、単球細胞での発現が示唆される。本研究は、単球系細胞におけるRasGRP4の発現を明らかにし、RA患者末梢血におけるRasGRP4の発現を検討する。RA病態形成とRasGRP4の発現異常との関係を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

健常人より採取したPBMCからCD14陽性細胞、T細胞、また非単球・非T・非B細胞を採取した。CD14陽性細胞を用い、M-CSFの添加によりMφを、GM-CSFとIL-4の添加によりDCをそれぞれ分化誘導した。これらの細胞よりTotal RNAを抽出したのちcDNAを作製し、RT-PCR法、Real-time PCR法により遺伝子発現量を評価した。ウサギ由来抗ヒトRasGRP4ポリクローナル抗体を作製し、CD14陽性細胞、T細胞、RasGRP4を強制発現させたHEK293細胞、Mφ、DCを用いて免疫染色を行い、RasGRP4タンパクの発現を評価した。次に、健常人38名、RA患者41名、他の自己免疫疾患患者36名(SLE 10例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM) 8例、全身性強皮症(SSc) 8例、シェーグレン症候群(SS) 10例)を対象として末梢血を採取し、各群のPBMCにおけるRasGRP4遺伝子発現量をReal-time PCR法にて定量的に評価した。さらに、健常人12名、治療中RA患者18名、未治療RA患者5名、他の自己免疫疾患患者名(SLE 10名、PM/DM 8名、SSc 10名、SS 8名)のPBMCより作製したcDNAを用いてサブクローニングを行い、RasGRP4の塩基配列を決定した。バリエーション頻度解析には χ^2 テストを用いた。健常人群とRA患者群の遺伝子発現量をStudentのT検定で比較した。遺伝子発現量と臨床像との相関はPearsonの積率相関係数(r)により検討した。RasGRP4スプライスバリエーションの有無と遺伝子発現量、またスプライスバリエーションの有無と臨床像との関連についてMann-WhitneyのU検定を行った。

【結果】

PBMC、CD14+細胞、非単球・非T・非B細胞、Mφ、DCではRasGRP4転写産物が認められたの

に対し、T細胞では認められなかった。RasGRP4はCD14陽性細胞において最も高い発現が認められた。免疫組織染色では、CD14+細胞およびRasGRP4を強制発現させたHEK293細胞、MΦ、DCにおいてRasGRP4タンパクの発現を認めた。RA患者群の41%においてRasGRP4の発現は異常高値を示し、健常人群に比較してその頻度は有意に高かったが(p=0.027)、遺伝子発現量と臨床像には相関を認めなかった。10種類のRasGRP4新規スプライスバリエントを同定した。本研究において最も高い頻度で認められたRasGRP4の異常アイソフォームはエクソン9の276塩基全てを欠損するバリエント5であり、次に高い頻度で認められたものはバリエント6であった。エクソン9におけるスプライスバリエントは、健常人に比してRA患者において高頻度に認められ(p<0.0001)、特にバリエント6は疾患群においてのみ認められた。対象をバリエント6の有無によって2群に分け、両群におけるRasGRP4の遺伝子発現量を比較検討したところ、バリエント6を有する群において有意に遺伝子発現量が高かった。

【考察】

肥満細胞の前駆細胞は末梢血中を循環し局所組織で肥満細胞へと分化する能力をもつが、PBMCsにおいて肥満細胞の前駆細胞の占める割合は極めて低い。そのため、本研究ではPBMCsにおけるRasGRP4の発現は他の細胞集団によるものであるとの仮説をたて、単球がおもにRasGRP4を発現していることを明らかにした。さらに、肥満細胞や単球系細胞は関節炎におけるイニシエータまたはエフェクターとして広く認識されていることから、RA患者におけるRasGRP4発現に注目した。本研究により、RA患者のPBMCsにおいてRasGRP4は高発現でありRasGRP4のスプライス異常が高頻度に認められることが明らかとなった。RasGRP4のエクソン9にはGEFとしての機能性ドメインが含まれるため、同部位に異常のあるアイソフォームタンパクが生体内のCD14陽性細胞で発現していた場合、RasGRP4の機能不全をきたす可能性がある。Real-time PCR法で用いたプライマーはエクソン7-8の接合部位に設計されているため、スプライスバリエント6を含むバリエントの大部分はこのプライマーによって認識される。RasGRP4の遺伝子発現量はそのタンパク発現の亢進を示すものではないが、非機能性アイソフォームによる質的異常を量的に補完しようとする代償機構を観察しているものと推察された。一方、肥満細胞においてRasGRP4はIL-13産生に抑制的に働くIL-13レセプター $\alpha 2$ の発現を亢進することが報告されている。IL-13レセプター $\alpha 2$ は単球での発現も認められており、IL-13の刺激により単球は炎症性サイトカインを産生することが知られている。ここで得られた知見より、肥満細胞や単球系細胞におけるRasGRP4の発現異常がRAの病態に関与する可能性が考えられ、同分子のスプライス異常を制御することがRAのあらたな治療法となる可能性があるといえる。

【結論】

1. ヒト単球において、RasGRP4が発現していることを新たに示した。
2. RA患者において、末梢血におけるRasGRP4の遺伝子発現が亢進している事を示した。
3. RasGRP4の新規スプライスバリエントを10種類新たに同定した。
4. RA患者においてRasGRP4のスプライスバリエントが高頻度に認められることを示し、バリエント6を有する患者においては同分子の転写が亢進していることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 島 山 鎮 次

学位論文題名

関節リウマチ患者の末梢血単核球における

Ras Guanine nucleotide releasing protein 4 (RasGRP4)

発現異常に関する検討

RasGRP4 とは、肥満細胞と末梢血単核球分画(PBMC)に発現する低分子 G タンパク Ras のグアニンヌクレオチド変換因子(GEF)として2002年にはじめて同定されたシグナル分子であり、肥満細胞白血病患者および気管支喘息患者では、同分子のスプライス異常が報告されている。一方、関節リウマチ(RA)の病態において滑膜増殖や関節破壊に関与するサイトカインは単球系細胞や肥満細胞で主に産生され、それらの前駆細胞は全身を循環する PBMC に含まれる。本研究は、関節リウマチ患者の PBMC および滑膜における RasGRP4 の発現につき検討している。その結果、末梢血における RasGRP4 の発現は単球によるものであることが明らかとなり、同分子のスプライスバリエントが 10 種類新たに同定された。また、PBMC における RasGRP4 遺伝子の発現は健常人に比較して RA 患者において高いこと、RA 患者ではスプライスバリエントが高頻度に認められること、RA 滑膜で RasGRP4 は CD68 陽性細胞および肥満細胞に発現し、炎症滑膜に分布していることなどが示された。

公開発表に際し、副査の島山鎮次教授から、1. アレルギー疾患患者群における RasGRP4 の遺伝子発現についての検討有無、2. スプライスバリエント由来のアイソフォームがタンパク構造変化や機能異常を有する可能性、3. スプライスバリエントがドミナントネガティブである可能性の有無、4. スプライスバリエントの塩基配列に関するスプライシングの理論的妥当性の検証など、数点の質問があった。申請者は、既報(J Biol Chem. 277:25756-74,2002.)を引用し、喘息患者における RasGRP4 のスプライスバリエントが確認されているが本研究ではアレルギー疾患患者は未解析である旨を説明した。さらに、RasGRP4 のスプライスバリエントを呈した群において同分子の遺伝子発現が亢進しており、また RA 患者において高頻度に認められたスプライスバリエントは GEF としての機能性ドメインを一部欠損するという本研究の実験結果を引用し、スプライスバリエント由来のアイソフォームタンパクに機能異常が存在する可能性を示唆したうえで、今後はバリエントタンパクの機能解析を行う所存を表明した。

次いで副査の笠原正典教授から、1. RA の滑膜組織における他の免疫担当細胞の GEF についての異常有無、2. 滑膜での IL-13 レセプター $\alpha 2$ の発現有無について、3. RT-PCR のゲルアッセイにおけるスプライスバリエントの可視性についての質問があった。申請者は、RA の滑膜組織において、他の免疫担当細胞についての解析は本研究では未施行であるが、IL-13 レセプター $\alpha 2$ の発現については現在免疫組織染色における評価を実施中であると回

答した。また、RT-PCR において観察されるサイズの小さなバンドがスプライスバリエーションである可能性が高いが、頻度の高いスプライスバリエーションを特異的に認識するプローブを作成し定量評価する実験計画を説明した。

最後に主査の小池隆夫教授から、1. RasGRP4 の異常発現を制御することが RA の治療戦略に寄与する可能性について、2. RasGRP4 における IL-13 レセプター $\alpha 2$ およびその下流にある炎症性サイトカインの発現制御と IL-17 の関与についての質問があった。申請者は、既報(Science. 5587: 1689-92, 2002)や本研究の実験結果を引用し、RasGRP4 の異常発現の制御することで RA 病態における滑膜炎を抑制出来る可能性があるという回答した。また、RasGRP4 は IL-13 産生に抑制的に働く IL-13 レセプター $\alpha 2$ の発現を亢進するという既報(J Biol Chem. 283:1610-21, 2008)を引用し、本研究の実験結果から、RasGRP4 の異常アイソフォームが、単球における IL-13 に対する感受性に影響を与える可能性はあるが IL-17 の関与については明らかでないと説明した。

この論文は、PBMC における RasGRP4 の発現細胞をはじめて明らかにした点、また同分子について新規のスプライスバリエーションを同定し、RA 患者における遺伝子発現量の亢進とバリエーション発現頻度の上昇についてその関連性を示した点において高く評価され、今後の RA の病態解明に寄与する研究として期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。