日本財団 助成申英
The Nippon Foundation

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 10 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研 究 報 告 書

中国人研究者名： 黄 明国

指導責任者名： 江口 勝美 職名： 教授

所属機関名： 長崎大学第一内科

〒 852-8501

所 在 地： 長崎市 坂本 1－7－1

電話： 095-849-7262 内線： 7270

1．助 成 金 額 ： 600.000 円

2．研 究 テ ー マ

Granzyme B による細胞内の La(SS-B) 分子の変化

3．成 果 の 概 要 （100字程度）

我々は一部のシェーグレン症候群患者血清中にはグランザイムBによって特異的に切断される N末端フラグメントに対する新しい自己抗体が存在することを報告した。今回の研究で我々はpAcGFP1-c2 ベクターを利用して、GFP-La と GFP-LaΔ220 (グランザイムBによって切断されるN末端フラグメント)融合蛋白を作成し、蛍光顕微鏡でLa (SS-B) の変化を確認した。また，ウェスタンブロット法でグランザイムBによって切断されたLa (SS-B) 分子の細胞核と細胞質での発現を比較した。今回の実験で、La (SS-B) 分子がグランザイムBによって引き起こされるアポトーシスの中で、特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動することを明らかにした。

4．研 究 業 績

(1) 学会における発表 ☐無 ・ ☑有 （学会名・演題）

第50回日本リウマチ学会総会・学術集会

演題名 Granzyme Bによる細胞内のLa(SS-B)分子の変化

(2) 発表した論文 ☑無 ・ ☐有 （雑誌名・題名）

—日中医学協会助成事業—

自己抗原 La (SS-B) は Granzymre B によるアポトーシスの中で特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動する

研究者氏名　黄　明国
中国所属機関　牡丹江市疾病予防コントロールセンター
日本研究機関　長崎大学付属病院第一内科
指導者氏名　教授　江口　勝美
共同研究者名　井田弘明、有馬和彦

要旨

私たちは近頃一部のシェーグレン症候群患者の血清中には、La (SS-B) 自己抗原がグランザイムBによって特異的に切断されて新しい自己抗体を産生していることを報告している。でも、グランザイムBによる細胞核内の La (SS-B) の変化については詳細は不明な点が多い。今回我々はグランザイムBによるアポトーシスの中で自己抗原 La (SS-B) の変化を明らかにすることを目的にした。まず、pAcGFP1-c2 ベクターを利用して GFP-La と GFP-LaΔ220 (グランザイムBによって特異的に切断されるN末端部分) 融合蛋白を作成した。また、その融合蛋白を発現する A293T 細胞を細胞障害性細胞 (CTL 細胞) と混合培養し、免疫染色、免疫ブロット法で切断された GFP-La 融合蛋白を確認した。同様の方法で、唾液腺細胞株 HSG 細胞を使って細胞核内の La (SS-B) の変化を確認した。A293T 細胞内で、GFP-La は核内に局在し、GFP-LaΔ220 は細胞質内に存在していた。CTL 細胞のグランザイムB刺激で、A293T 細胞内の GFP-La は切断されて細胞質に移動していた。HSG 細胞を使った実験でも同様の結果が認められた。このような結果は、シェーグレン症候群ではグランザイムBが引き起こすアポトーシスによって細胞核内の La (SS-B) 自己抗原が特異的に切断されて細胞質に移動し、結果的に新しいエピトプに対する自己抗体が産生する可能性が示唆された。

Key words グランザイムB，La (SS-B) 自己抗原、アポトーシス、自己抗体、シェーグレン症候群、

緒言

La (SS-B) 分子は主にほとんどの真核細胞核内に存在し、ポリメラーゼIIIに結合し、その転写に重要な働きをしている (1)。抗—La (SS-B) 自己抗体はシェーグレン症候群、ルプスなど自己免疫疾患に現れて、新生児心ブロックなどに関わっている (2,3)。

グランザイムBは主に NK 細胞、細胞障害性細胞(CTL 細胞) などの顆粒内に存在し、標的細胞内のプロカスパーゼをカスパーゼに活性化させて、感染免疫、癌免疫において重要な役割を果た

す (4)。また、グランザイムＢは直接標的細胞内の重要な蛋白を切断する (4-6)。我々は一部のシェーグレン症候群患者血清中にはグランザイムＢによって特異的に切断される N 末端 La (SS-B)フラグメントに対する新しい自己抗体が存在することを報告した (7)。これらの結果は、NK 細胞、CTL 細胞によるアポトーシスは自己抗体の産生に何らかの関わりがあることを示唆している。今回はグランザイムＢが引き起こすアポトーシスの中で La (SS-B)分子の細胞内の変化を明らかにすることを目的にした。

今回の研究で我々は pAcGFP1-c2 ベクターを利用して、GFP-La と GFP-LaΔ220 (グランザイムＢによって切断されるＮ末端フラグメント)融合蛋白を作成した。その融合蛋白を発現している A293T 細胞を CTL 細胞株 YT 細胞と混合培養し、蛍光顕微鏡で La (SS-B) の変化を確認した。また，ウェスタンブロット法でグランザイムＢによって切断された La (SS-B) 分子の細胞核と細胞質での発現を比較した。この一連の実験で、La (SS-B) 分子がグランザイムＢによって引き起こされるアポトーシスの中で、特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動することが確認された。これによって、NK, CTL 細胞による唾液腺細胞のアポトーシスがシェーグレン症候群の自己抗体の産生に関連していることが示唆された。

材料と方法

細胞と培養

６ウェル細胞培養器具にで、A293T 細胞(ATCC) は 10%FCS を含む DMEM(ドイツ)で、HSG 細胞 (Yoshio Hayashi 先生、徳島大学歯学部) は 10% FCS を含む RPMI で培養した。YT 細胞(ATCC) は 10% FCS を含む RPMI を使用して、浮遊系細胞培養器具で培養した。

GFP-La と GFP-LaΔ220 融合蛋白の発現

La(SS-B) cDNA(Dr. Walther Van Venrooij, University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands) の全長またはＮ末端から 660bp の部分に PCR をかけて増幅した。この PCR 産物を GFX™DNA 精製キット (Amersham) を利用して精製し、ゲル電気泳動で確認した。また、その塩基配列をシーケンサで確認し、pAcGFP1-c2 ベクターの EcoR1 と BamH1 サイトにサブクローニングした。A293T 細胞を 6 ウェルプレートに培養し、 5×10^4/ウェルになった時 3 μl DNA/ウェルの比率で、リポフェクタミン 2000 (Invityrogen) を使用して遺伝子導入して GFP-La, GFP=LaΔ220 を発現させた。

細胞障害性実験

YT 細胞による細胞障害性実験は以前に発表した (7) ように、1×10^5 YT 細胞と接着系細胞 HSG 細胞または A293T 細胞を同じ細胞数比率で共培養した。反応 3h, 6h, 12h, 24h 後、浮遊系の YT 細胞は捨て、プレートは 1×PBS で 2 回洗った。これを用いてウェスタンブロット又は細胞染色を行った。

ウェスタンブロット法

サンプルを 12.5% SDS-PAGE (ATTO, Japan)にアプライする。電気泳動後、ニトロセルロス膜に転写し、5% スキムミルク PBS でブロッキングした。その膜を抗—La (SS-B) MAb SW5, 抗—PARP MAb c-2-10 (MBL), 抗—DFF MAb (MBL), 抗—GFP MAb JL-8 (Clontech)など一次抗体で 1h 反応

させた。10 分間×3 回 0.5% Tween PBS で洗い、HRP-ラベルした抗―マウス抗体 (MBL)で反応後、ECL プラス (Amersham)で増幅し、フィルムに感光させた。

免疫沈降

GFP-La, GFP-LaΔ220 形質転換 A293T 細胞の無細胞系をセイズ真核細胞免疫沈降キット (PIRCE)を使用して抗―La MAb SW5 で免疫沈降し、沈降産物を抗―GFP MAb JL-8 と反応させた。

免疫染色

HSG 細胞をスライドグラスが入っている 24-ウェルプレットに培養する。HSG 細胞を 70% エタノールで 15 分間固定し、BSA が入っている PBS で 15 分間浸す。これを室温で 1h 抗―La MAb SW5 で反応させた後、FITC-ラベルした抗―マウス IgG と反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

結果

1) GFP-La と GFP-LaΔ220 融合蛋白は A293T 細胞で 異なるパタンを示した。

La (SS-B はグランザイムBによって Asp-220 のサイトで特異的に切断されて 27 KDa のフラグメントが産生した (4, 5, 7)。細胞核内の La(SS-B) 分子の変化を明らかにするために、我々は pAcGFP1-c2-La と pAcGFp1-c2-LaΔ220 サブクローニングベクタを構築した。制限酵素 EcoR1 と BamH1 で処理すると 1227 bp の La cDNA の ORF と 660 bp のN末端フラグメントが出現した(Fig. 1B レン 3, 4)。また、それぞれサブクローニングしたベクターを形質転換させた A293T 細胞の無細胞系を抗―GFP MAb Jl-8 で反応させた。結果、75 KDa GFP-La 融合蛋白 (レン 6, 9)、53KDa GFP-La△220 融合蛋白 (レン 7, 10)、28KDa GFP 蛋白が確認された。これは GFP 融合蛋白が A293T 細胞内で機能的に発現していることを表している。蛍光顕微鏡で確認したところ、GFP-La 融合蛋白は細胞核内に、GFP-La△220 融合蛋白は細胞質内に、GFP 蛋白は細胞内で均一な分布を示していた。

2) GFP-La はグランザイム B 特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動した。

GFP-La 融合蛋白を恒常的に発現している A293T 細胞と CTL 細胞株 YT 細胞を時間依存的に共培養し、ウェスタンブロット法と蛍光顕微鏡で GFP-La 融合蛋白の局在を確認した。ウェスタンブロット法ではグランザイム B 処理した A293T 無細胞系と同じサイズの GFP-La フラグメントが抗―La MAb SW5 で確認された。同時に、細胞核と細胞質分画を SW5 で反応させた結果、そのフラグメントは細胞質内で確認された。蛍光顕微鏡法でも反応時間につれて、蛍光蛋白の細胞質への移動が確認された。(Fig. 2)。

3)HSG 細胞と YT 細胞の共培養においてもグランザイム B 特異的に切断された 27KDa フラグメントが細胞質に移動した。

より明確な証拠を得るために、唾液腺細胞株 HSG 細胞を YT 細胞と共培養し、La 蛋白の変化を確認した。グランザイム B 特異的な 27KDa フラグメントは抗―La MAb SW5 によって確認された (Fig. 3a)。同様に、YT 細胞と反応させた後、HSG 細胞を抗―La MAb SW5 で反応し、また FITC ラベルした抗―マウス IgG 二次抗体で反応し、蛍光顕微鏡で観察した。27KDa La フラグメントが時間依存的に細胞質に移動していることが確認された (Fig. 3b)。

考察

今回の研究で我々は細胞核内の La (SS-B)分子がグランザイム B 特異的に切断されて、その27KDa N 末端フラグメントは細胞質に再分布していることを明らかにした。我々は以前の研究で一部のシェーグレン症候群患者血清を使って、グランザイム B 特異的に切断される 27KDa La フラグメントに新しいエピトプが産生することを報告した (7)。しかし、このような新しい自己抗体の産生メカニズムに関してはよく分からないところが多い。今回の研究で示したように、La (SS-B)蛋白がグランザイム B 特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動する現象は、27KDa フラグメントに対する新しい自己抗体の産生に関与しているかもしれない。

参考文献

[1] R. J. Maraia, and R. V. Intine. Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 367-379.

[2] C. Vital, HM. Moutsopoulos, S. Bombardieri. Ann Rheum Dis. 53 (1994) 637-647.

[3] P. Gordon, MA. Khamashta, E. Rosenthal, JM. Simpson, G. Sharland, A. Brucato, et al. J. Rheumatol. 31 (2004) 2480-2487.

[4] PJ. Utz, TJ. Gensler, P. Anderson. Arthritis Res. 2 (2001) 101-114.

[5] LA. Casciola-Rosen, F. Andrade, D. Ulanet, W. Wong, A. Rosen. J. Exp Med. 190 (1999) 815-826.

[6] F. Andrade, S. Roy, D. Nicholson, et al. Immunity. 8 (1998) 451-460.

[7] M. Huang, H. Ida, M. Kamachi, N. Iwanaga, Y. Izumi, F. Tanaka, K. Aratake, K. Arima, M. Tamai, A. Hida, H. Nakamura, T. Origuchi, A. Kawakami, N. Ogawa, S. Sugai, P.J. Utz, and K. Eguchi. Clin. Exp Immunol. 142 (2005) 148-154.

[9] J.M. Ger, R.L. Pruijn, W.J. Van venrooij. Nucleic Acids Res. 19 (1991) 5173-5180.

[10] SJ. Martin, GP. DD. Newmeyer, S. Mathias et al. EMBO. J. 14 (1995) 5190-5200.

注：本研究は 2006 年 4 月 23 日「第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会」にて口演発表、[FEBS LETTERS] に投稿中

作成日：2007 年 3 月 10 日

Fig 1

La(SS-B)蛋白を pAcGFP1-C2に組み込み、A293T細胞に発現させた

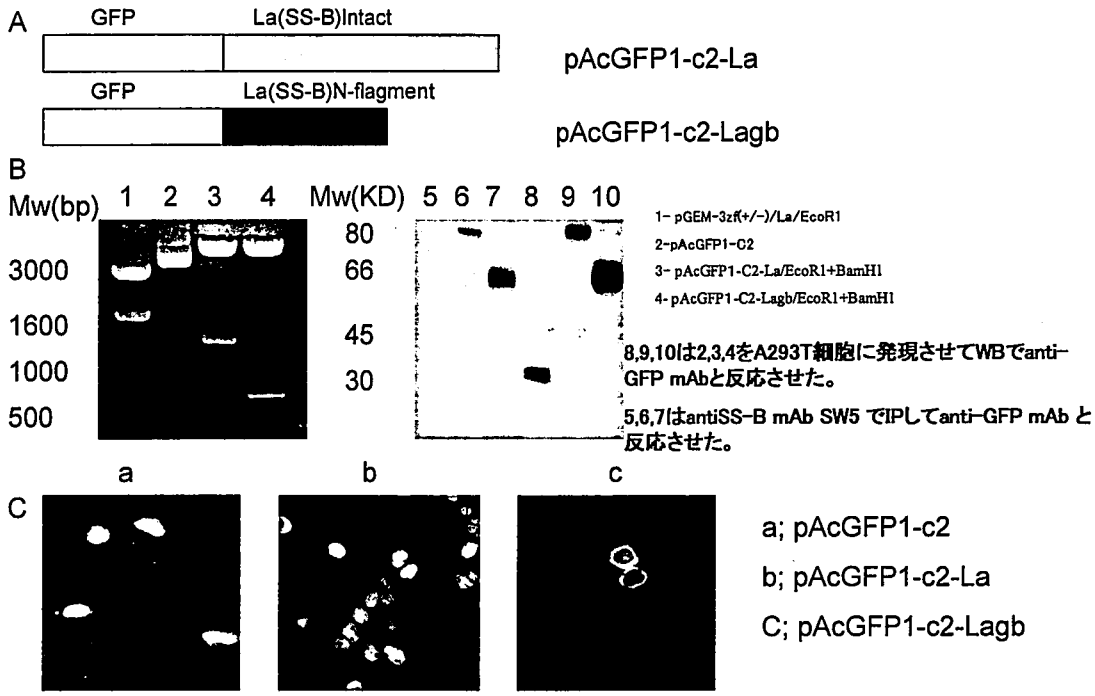


Fig 2

pAcGFP1-C2-La transfection A293T細胞とYT細胞とのCo-culture において細胞質と細胞核でのLa(SS-B)分子の発現の比較

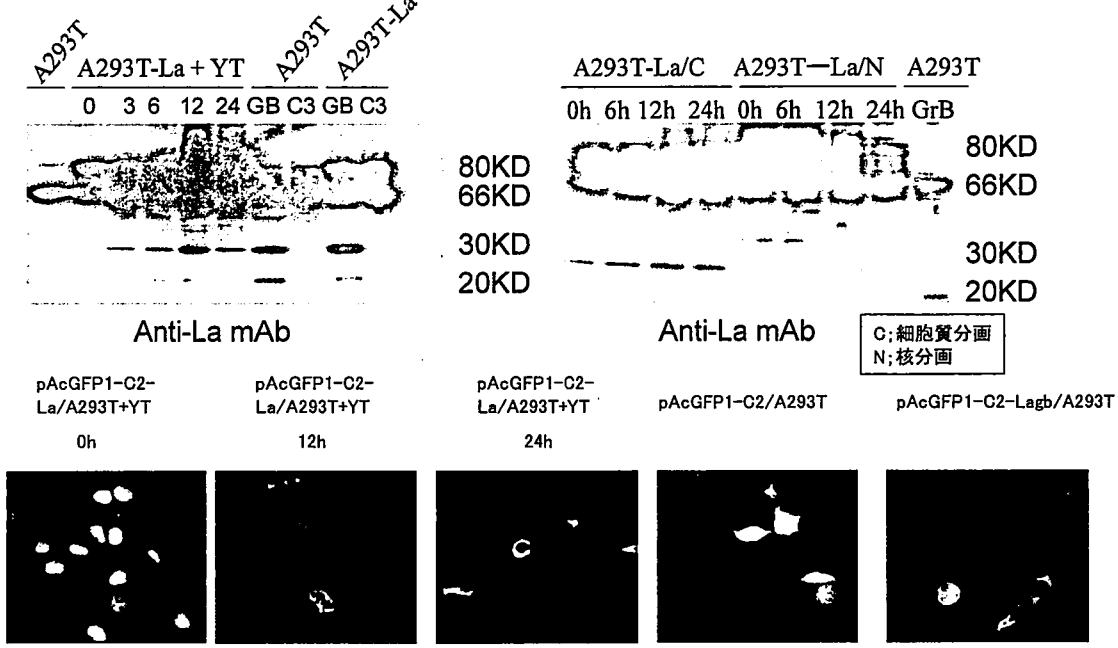
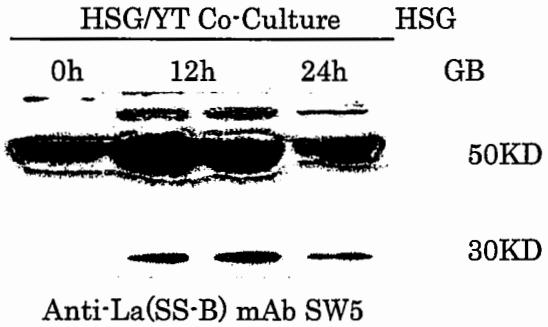


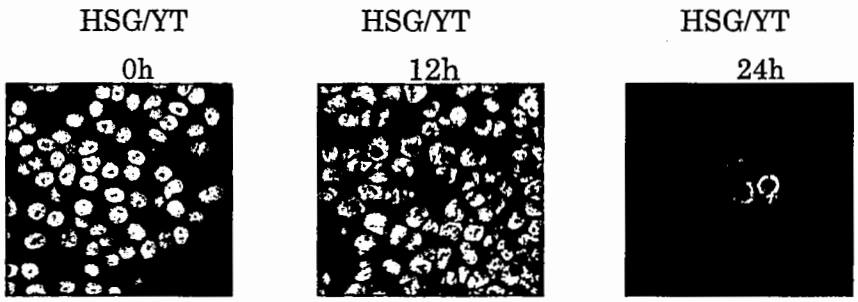
Fig 3

HSG細胞とYT細胞との混合培養においてLa(SS-B)蛋白は核から細胞質へ移動した

a



b



HSG 細胞と YT 細胞を時間依存的に共培養し、anti-La mAb SW5 で反応した後、FITC anti-mouse IgG で反応させた。