

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19126

研究課題名(和文) Th17細胞分化におけるRNA編集の役割の解明

研究課題名(英文) The role of RNA editing in Th17 cell differentiation

研究代表者

中濱 泰祐 (Nakahama, Taisuke)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10636187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の根治療法は依然として確立されていないが、ヘルパーT(Th)細胞がその発症病態に深く関与することが知られている。本研究では、2本鎖RNAのアデノシンをイノシンへと置換するRNA編集酵素ADAR2のTh細胞における機能解析を実施した。その結果、T細胞特異的ADAR2欠損マウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が重症化しやすいこと、Th1やTh17細胞などの炎症性Th細胞が増加していることが発見した。さらに、ADAR2がRNA編集活性非依存的にTh1細胞の分化を抑制する機能があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：T-helper (Th) cells play a critical role in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. ADAR2 is the enzyme responsible for adenosine-to-inosine RNA editing in double-stranded RNA. Although it has been reported the pivotal functions of ADAR2 in the brain, the role of ADAR2 in Th cells remains elusive. In this study, we revealed that T cell-specific ADAR2 deficient mice exhibited significantly higher sensitivity to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis and higher frequencies of both Th1 and Th17 cells. Furthermore, we found that ADAR2 negatively regulates Th1 cell differentiation in a RNA editing-independent manner.

研究分野：RNA生物学、免疫学

キーワード：RNA編集 自己免疫疾患 T細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の一種である関節リウマチ (RA) は、本邦における超高齢化社会の到来に伴い、患者数が増加している。また、多発性硬化症 (MS) などを含めた多くの自己免疫疾患は、依然として根治療法が存在しないことから、一日も早い病態解明が望まれている。これまで、自己免疫疾患の発症は Th1 細胞と Th2 細胞のバランスの破綻に起因すると考えられてきた。しかしながら、近年、新規のヘルパー T 細胞のサブセットとして Th17 細胞が同定され、自己免疫疾患発症においては、この Th17 細胞が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた (Cua et al, Nature, 2003)。このため、Th17 細胞の分化制御機構が明らかとなれば、自己免疫疾患克服へ向けて大きく前進するものと期待されている。

Th17 細胞は、インターロイキン (IL)-17 を産生し、IL-6 と TGF- β の刺激を受けることによりナイーブ T 細胞から分化誘導される。これまでに、IL-6 と TGF- β の刺激により活性化される細胞内分化シグナル経路においては SMAD、STAT3、ROR γ t などの転写因子が活性化されることが知られてきた (Korn et al, Annu Rev Immunol, 2009)。一方で、microRNA などの転写後レベルでの Th17 細胞分化制御機構については不明な点が多い。このため、申請者は RNA 制御に着目した Th17 細胞分化制御機構の解明に着手することとした。マイクロアレイ法を用いた網羅的スクリーニングにより、Th17 細胞分化誘導刺激後に変動する遺伝子群の中から RNA 制御機能を有する遺伝子の探索を行ったところ、Adenosine Deaminase Acting on RNA 2 (ADAR2) の発現が上昇することを見出した。ADAR2 は哺乳類に保存された RNA 編集酵素であり、二本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへ置換する転写後修飾を担っている。このため、ADAR2 による RNA 編集が Th17 細胞分化制御を介して、RA や MS などの自己免疫疾患発症において重要な役割を果たしているのではないかと着想した。

RNA 編集は転写産物の 85% に生じているが、そのほとんどは蛋白質をコードしない non-coding 領域に存在する (Arhanasidis et al, PLoS Biol, 2004)。一方、coding 領域での編集は稀ではあるが (Li et al, Science, 2009)、翻訳後の蛋白質のアミノ酸配列を変化させるため、生理学的に極めて重要である。例えば、ADAR2 によるグルタミン酸受容体 mRNA の RNA 編集は、受容体の Ca²⁺ イオン透過性を規定しており、RNA 編集低下は、筋萎縮性側索硬化症の発症に関与している (Kawahara et al, Nature, 2004)。このように RNA 編集は、生体の恒常性維持に必要な不可欠な修飾であるが、免疫系においてどのような生理的重要性を持つのかは、これまで全く研究されてこなかった。

2. 研究の目的

関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の発症病態には、ヘルパー T 細胞が深く関与することが知られている。申請者は、RNA 編集酵素 ADAR2 の発現がヘルパー T 細胞の一種である Th17 細胞において高発現していることを発見した。本研究では、これまで不明であった Th17 細胞分化と自己免疫疾患病態における RNA 編集の役割を解明し、将来的な治療に向けた分子基盤情報を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各 Th 細胞サブセットにおける ADAR2 発現レベルの解析

マウスから未分化 T 細胞を単離し、in vitro にて、Th1、Th2、Th17 細胞への分化刺激を加え、各 Th サブセット間で ADAR2 の発現レベルを比較する。

(2) T 細胞特異的 ADAR2 欠損マウスの表現型解析

ADAR2 flox マウスと T 細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Lck-Cre トランスジェニックマウスとを交配させ、T 細胞特異的に ADAR2 を欠損している (ADAR2 TcKO) マウスを樹立する。胸腺や脾臓などにおける T 細胞の分画を Flow cytometry により解析し、T 細胞の成熟や末梢組織における T 細胞恒常性に異常が認められるかどうかを検証する。

(3) T 細胞活性化及び分化における ADAR2 の機能解析

ADAR2 TcKO マウス由来の未分化 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、細胞増殖活性、IL2、IFN γ 産生レベルを測定し、野生型との差異を調べる。ADAR2 TcKO 未分化 T 細胞を用いて、in vitro にて Th1、Th17 細胞への分化刺激を加える。そのうえで、これらの Th 細胞への分化率を野生型と比較する。

(4) RNA 編集活性の必要性の検証

(3) で得られた結果をもとに、ADAR2 TcKO マウス由来の未分化 T 細胞に、野生型あるいは RNA 編集活性欠損型 ADAR2 コンストラクトを導入し、異常が正常化するかどうかを検証するレスキュー実験を実施する。

(5) 自己免疫疾患モデルを用いた ADAR2 の病態生理学的な意義の解析

ADAR2 TcKO マウスに自己免疫疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を惹起し、野生型との症状の比較により、in vivo レベルで T 細胞における ADAR2 の機能評価を実施する。また、EAE 誘導マウスから脾臓やリンパ節等を回収し、T 細胞にどのような異常があるか検証する。

4. 研究成果

(1) 未分化 T 細胞に *in vitro* にて各 Th 細胞への分化刺激を加えたところ、Th17 細胞分化特異的に ADAR2 の発現が数倍上昇していた。一方で、未分化 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激すると、はるかに強い ADAR2 発現上昇が認められた。

(2) ADAR2 TcKO マウスにおいては、胸腺での T 細胞成熟にはほとんど異常は認められなかった。一方で、脾臓においては、未分化 T 細胞比率が低く、エフェクター/メモリー T 細胞比率が上昇していた。また、Th1 や Th17 細胞などの炎症性 Th 細胞が増加していた。

(3) ADAR2 TcKO マウス由来の未分化 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激したところ、細胞増殖活性や IL2 産生レベルは野生型と同程度であったものの、IFN γ 産生レベルが著しく亢進していた(図 1)。また、Th1 や Th17 細胞への分化誘導実験を実施した結果、ADAR2 TcKO 未分化 T 細胞の Th1 細胞への分化亢進が認められたものの、Th17 細胞への分化率は野生型と同程度であった。

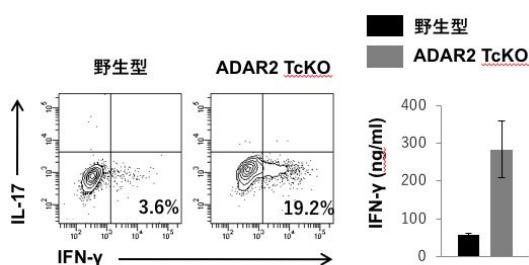


図1. ADAR2 TcKO T細胞におけるIFN γ 産生量の亢進

(4) (3)の結果から、ADAR2 が Th1 細胞への分化に抑制的に働いていることが明らかとなった。このため、ADAR2 TcKO マウス由来の未分化 T 細胞に、野生型あるいは RNA 編集活性欠損型 ADAR2 コンストラクトを導入し、Th1 細胞への分化が抑制されるか検証した。その結果、RNA 編集活性欠損型 ADAR2 によっても、Th1 細胞への分化が抑制された。

(5) ADAR2 TcKO マウスに EAE を惹起したところ、野生型マウスに比べ、EAE が重症化することが明らかとなった(図 2)。また、EAE を誘導した ADAR2 TcKO マウスでは Th1 細胞レベルが上昇していた。

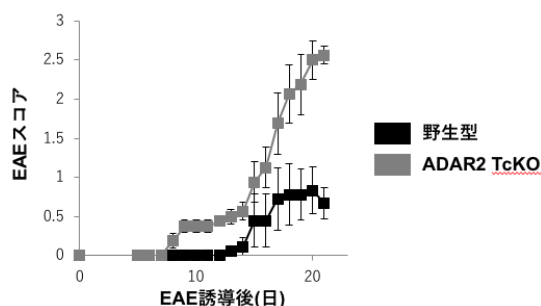


図2. ADAR2 TcKOマウスにおけるEAE重症化

本研究から、ADAR2 が RNA 編集活性非依存的に Th1 細胞の分化制御を介し、自己免疫疾患の重症化を抑制する機能を持つことが明らかとなった。

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 4 件)

1. Nguyen CH, Nakahama T, Dang TT, Chu HH, Hoang LV, Kishimoto T, Nguyen NT. Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor, Inflammatory Cytokines, and Incidence of Rheumatoid Arthritis in Vietnamese Dioxins-Exposed People. *J Immunotoxicol.* DOI: 10.1080/1547691X.2017.1377323. 14:196-203, 2017. (査読有)
2. Millrine D, Haruhiko M, Tei M, Dubey P, Kishan N, Nakahama T, Gemechu Y, Ripley B, Kishimoto T. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4 induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. *Int Immunol.* DOI: 10.1093/intimm/dxw005. 28:307-315, 2016. (査読有)
3. Nguyen NT*, Nakahama T*, Nguyen CH, Tran TT, Le VS, Chu HH, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor antagonism and its role in rheumatoid arthritis. *J Exp Pharmacol.* DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/JEP.S63549> 7:29-35, 2015. *Co-first authors (査読有)
4. Chinen I, Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Takemori H, Kumagai A, Kayama H, Takeda K, Lee S, Hanieh H, Ripley B, Millrine D, Dubey PK, Nyati KK, Fujii-Kuriyama Y, Chowdhury K, Kishimoto T. The aryl hydrocarbon receptor/microRNA-212/132 axis in T cells regulates IL-10 production to maintain interstitial homeostasis. *Int Immunol.* DOI: 10.1093/intimm/dxv015. 27:405-415, 2015. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. 中濱泰祐
T 細胞成熟における RNA 編集の役割の解明、先進ゲノム支援 2017 年度拡大班会議、2018 年 1 月 11 日～1 月 12、東京
2. Taisuke Nakahama, Carl Walkley and Yukio Kawahara
RNA editing-mediated prevention of activating MDA5 pathway is required for early T cell development、RNA フロンティアミーティング 2017、2017 年 11 月 8 日～11 月 10、滋賀
3. Taisuke Nakahama, Carl Walkley and

Yukio Kawahara

RNA editing-mediated prevention of activating MDA5 pathway is required for early T cell development、The 43rd Naito Conference、2017年6月27日～6月30、北海道

4. Taisuke Nakahama, Carl Walkley, Yukio Kawahara

RNA editing-mediated prevention of activating MDA5 pathway is required for early T cell development、Gordon Research Conferences -2017 Meeting-RNA editing、2017年3月12日～3月17日、Ventura, California, United States

5. Taisuke Nakahama, Carl Walkley, Yukio Kawahara

RNA editing-mediated prevention of activating MDA5 pathway is required for early T cell development、第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日～12月7日、沖縄

6. Taisuke Nakahama, Yukio Kawahara

RNA editing-mediated prevention of activating MDA5 pathway is required for early T cell development、RNA 2016、2016年6月28日～7月2日、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中濱 泰祐(Nakahama, Taisuke)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10636187

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし