

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15189

研究課題名(和文) RNA分解酵素Regnase-1のリン酸化を介した炎症反応制御

研究課題名(英文) Regulatory role of RNase Reganase-1 in inflammatory response through its phosphorylation

研究代表者

田中 宏樹(Hiroki, Tanaka)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：50747920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症反応は、様々な細胞刺激物質が免疫細胞やその周辺の臓器由来細胞の表面に存在する受容体に結合し、炎症に関する複数の遺伝子産生のスイッチが「オン」になることによって引き起こされる。本研究課題では、これらの遺伝子の産生の「オン」と「オフ」の切り替えを制御する酵素Regnase-1の役割の解明に取り組んだ。そして、炎症を引き起こす物質の一つであるインターロイキン17がRegnase-1のリン酸化とこの酵素の不活性化に関与していること、Regnase-1のリン酸化がこの物質の関与する慢性炎症疾患の増悪に関与していることを明らかにし、このリン酸化の抑制が疾患治療の主要な標的になり得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Regnase-1遺伝子がインターロイキン17の関与する慢性炎症疾患の症状を制御する重要な因子であり、インターロイキン17による細胞刺激によって誘発されるRegnase-1蛋白質のリン酸化が炎症状態の維持における鍵となる現象であることを明らかにした。またRegnase-1のリン酸化の阻害は、これらの疾患を治療する有力な戦略となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：Regnase-1 is an endoribonuclease that regulates immune response through its enzymatic activity. Regnase-1 is induced upon stimulation with TLR ligands or proinflammatory cytokines, and degrades inflammation-associated mRNAs, thereby forming a negative feedback circuit to diminish excess inflammatory response. In this grant, I focused on inactivation mechanism of Regnase-1 mediated by proinflammatory cytokine Interleukin-17 and tried to elucidate the molecular mechanism of this inactivation. And I found that Regnase-1 phosphorylation resulted in a change in subcellular localization of Regnase-1 proteins from the endoplasmic reticulum to the cytosols. This translocation leads to attenuation of the RNase activity of Regnase-1. These results suggest that Regnase-1 phosphorylation is important for fine-tuning of the expression levels of IL-17-associated inflammatory genes and controlling IL-17-mediated inflammatory diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：mRNA分解酵素 Regnase-1 mRNA安定性 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メッセンジャーRNA(mRNA)分解酵素 Regnase-1 は、標的となる mRNA の 3'側非翻訳領域に結合して分解を促し、炎症関連遺伝子の発現を抑制することで、炎症反応や免疫細胞の活性化や増殖を制御する。一方で Toll 様リガンドやインターロイキン 1(IL-1)等の炎症性サイトカインによって細胞が活性化されると、Regnase-1 はリン酸化及び蛋白質分解を受けて mRNA 分解活性が一時的に低下する。これにより、Regnase-1 により抑制されていた炎症関連遺伝子の mRNA の発現が誘導されて炎症反応が誘導されると考えられている。これまでに研究代表者は、炎症性サイトカインの IL-17 によって Regnase-1 がリン酸化されることを明らかにした。一方で、Toll 様リガンドや IL-1 と異なり、IL-17 刺激では Regnase-1 はリン酸化を受ける一方で顕著な蛋白質分解を示さなかった。また、IL-17 は炎症関連遺伝子の mRNA の安定化・増幅に関与し、慢性炎症疾患の増悪因子として作用することが知られおり、mRNA 安定化を制御する遺伝子である Regnase-1 がこれらの作用に対して影響する可能性が考えられる。このことから代表者は、IL-17 における炎症関連遺伝子の mRNA の安定化・増幅作用と Regnase-1 のリン酸化の機能的関連を調べ、IL-17 関連炎症応答における Regnase-1 の役割の解明を目指すことにした。

2. 研究の目的

炎症性サイトカイン IL-17 による細胞活性化による Regnase-1 のリン酸化と、その mRNA 分解活性に対する影響に関する分子メカニズムを解明し、IL-17 による炎症反応とそれに付随する炎症関連遺伝子の安定化・増幅効果に対する Regnase-1 の関与とその分子的基盤を明らかにする。また、IL-17 による Regnase-1 のリン酸化部位を決定し、そのリン酸化を阻害する効果を有する Regnase-1 遺伝子改変マウスを作製する。これらのマウスを用いて、IL-17 に対する炎症応答や炎症関連遺伝子の mRNA 安定化に対する影響や、IL-17 が関与する炎症性疾患モデルマウスに対する抵抗性を調べ、Regnase-1 のリン酸化と IL-17 による炎症効果との関連を詳細に明らかにする。

3. 研究の方法

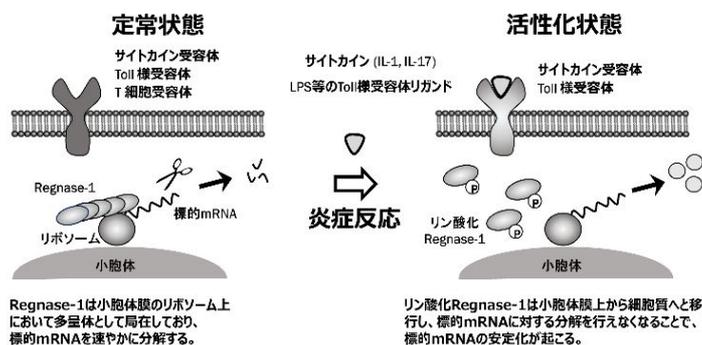
遺伝子相同組み換えや Crispr-Cas9 を用いたゲノム編集技術などの遺伝子工学的手法を用いて、炎症応答における Regnase-1 のリン酸化を阻害する効果を有するアミノ酸点変異を施した遺伝子改変マウスを樹立する。野生型及び遺伝子改変マウスに対して炎症性疾患モデルマウス(実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)やイミキモド誘発性乾癬モデル)を適用し、疾患スコアの評価や組織化学的染色、フローサイトメトリー等を用いた細胞解析などを通じて、Regnase-1 のリン酸化阻害変異の炎症性疾患に対する抑制効果を評価する。

4. 研究成果

炎症性サイトカイン IL-17 は、慢性炎症疾患の増悪に関与するサイトカインとして知られており、自身による炎症惹起効果は低いものの、IL-1 や TNF- α などの他の炎症性サイトカインと共に刺激した場合、IL-17 非添加と比べて非常に強力かつ持続的な細胞の炎症を引き起こすことが知られている。IL-17 は炎症関連遺伝子の mRNA の安定化を向上させる効果を持っており、これがこのサイトカインの持つ synergetic な炎症増幅効果の原因として考えられている。これまでに IL-17 によって誘導されてなおかつ炎症関連遺伝子を安定化する遺伝子も複数報告されているが、これらの遺伝子は個別の炎症関連遺伝子の特定の配列にしか作用せず、より包括的に IL-17 の炎症増幅効果を説明する分子メカニズムはこれまで知られていない。

本研究では、IL-17 による細胞刺激によって引き起こされる Regnase-1 のリン酸化を手掛かりとして、IL-17 の持つ炎症関連遺伝子の安定化効果の分子基盤を解明することを目指した。マウス胚性線維芽細胞(MEF 細胞)に対して IL-17 による細胞刺激を与えると、リン酸化によって Regnase-1 のバンドが高分子両側へシフトする。その一方で、IL-17 受容体シグナルの伝達因子である Act-1 及びシグナル経路で活性化するリン酸化キナーゼの TBK1 及び IKKi 遺伝子を欠失した MEF 細胞では、Regnase-1 のリン酸化が起こらなかった。更に Regnase-1 と Act-1 及び TBK1/IKKi を共発現させると、Regnase-1 は恒常的なリン酸化を受けた。このことから、Regnase-1 は IL-17 受容体シグナル経路において、Act-1 と相互作用し、なおかつ TBK1 及び IKKi によるリン酸化を受けることを明らかにした。次に、Regnase-1 の TBK1 及び IKKi によるリン酸化が Regnase-1 の mRNA 分解活性に与える影響を詳しく調べた。研究代表者はまずプロテオミクス解析によって、リン酸化による Regnase-1 蛋白質のリン酸化部位を探索し、リン酸化部位は Regnase-1 のプロリンリッチ領域に位置していることを明らかにした。以前の報告から、Regnase-1 のプロリンリッチ領域は Regnase-1 蛋白質の多量体形成に関与していることが報告されており、その領域におけるリン酸基の導入が Regnase-1 の多量体形成に影響する可能性を示唆していた。リン酸化による Regnase-1 蛋白質の性状の変化を調べるために、Regnase-1 蛋白質及び TBK1 及び IKKi によるリン酸化を受けた Regnase-1 蛋白質をそれぞれ精製し、それらをゲル濾過クロマトグラフィーにかけて両者の分子量を比較した。その結果、リン酸化 Regnase-1 は非リン酸化 Regnase-1 と比べて分子量の低下を示し、Regnase-1 はリン酸化を受けることによって多量体を形成しにくくなることを明らかにした。研究代表者は、リン酸化に伴う Regnase-1 の会合状態の変化は、Regnase-1 の細胞内局在に影響するのではないかと考え、IL-17 による細胞刺激時の Regnase-1 蛋白質の細胞小器官の局在について調べた。以前

の研究から、Regnase-1 は定常状態において、リボソームを含むオルガネラ、特に小胞体膜上に局在することが知られていた。そこで、IL-17 による細胞刺激前後の MEF 細胞から小胞体膜画分と細胞質成分を分離して Regnase-1 蛋白質の有無を調べたところ、IL-17 刺激後のリン酸化 Regnase-1 は全て細胞質画分に移行していることが明らかとなった。



このことは、IL-17 細胞刺激に伴うリン酸化を受けることによって細胞膜上から細胞質へと Regnase-1 蛋白質の細胞内局在が変化することを示唆するものであった。更にリン酸化した Regnase-1 蛋白質の mRNA 分解活性は非リン酸化 Regnase-1 よりも低下しており、Regnase-1 がリボソーム近傍から解離することによって mRNA 分解活性を失うことが示された（上図）。今回解明した IL-17 による細胞刺激に伴う Regnase-1 の mRNA 分解活性の低下と標的 mRNA 安定化のメカニズムは、IL-17 による炎症関連遺伝子の mRNA 安定性の向上の効果を説明する際の有力なモデルの一つとして提示でき、Regnase-1 のリン酸化が IL-17 による炎症応答を制御する上での主要な因子であることを示す重要な成果であるといえる。

次に、炎症性サイトカインによる Regnase-1 蛋白質のリン酸化を阻害するようにアミノ酸点変異やフレームシフト変異を加えた遺伝子改変マウスを作製し、そのマウスの炎症関連疾患モデルに対する抵抗性を調べた。研究代表者は、これまでに判明した Regnase-1 のリン酸化部位、IKK キナーゼによる部位及び TBK1/IKKi による部位のリン酸化を阻害する変異マウスとして、それぞれ Regnase-1 AA 変異マウス及び Regnase-1 の C 末端領域の欠損マウス (Regnase-1 ΔCTD) を作製した。これらのマウスに対して、炎症性自己免疫疾患モデルマウスである EAE モデルを適用し、その疾患スコアを野生型マウスと比較した。その結果、この2つの変異マウスは EAE 疾患スコアが野生型と比較して減少した。また、これらの変異マウスの骨髄細胞を野生型マウス由来に置換した骨髄キメラマウスに対して EAE モデルを適用しても同様の疾患スコアの低減を示したことから、これらの変異マウスでは免疫系細胞が非免疫系組織にもたらす炎症作用を抑制していることが明らかとなった。また、イミキモド誘発性乾癬モデルをこれらの変異マウスに適用した場合においても、乾癬様の症状（表皮細胞の落屑や紅斑）の症状が野生型マウスよりも著しく改善し、これらの炎症作用の抑制に Regnase-1 のアミノ酸変異や C 末端欠損が有効であることも示された。EAE 及びイミキモド誘発性乾癬モデルは、いずれも IL-17 を産生する Th17 細胞の分化と、Th17 細胞がもたらす組織炎症が疾患の増悪につながる重要なファクターであることが知られている。今回の研究成果によって明らかとなった、IL-17 による誘導される炎症関連遺伝子の mRNA の安定化作用を阻害する Regnase-1 アミノ酸変異は、これらの炎症疾患増悪因子を抑制するための有効な戦略となり得ることが示された。今後は Regnase-1 のリン酸化阻害変異がもたらす炎症・免疫応答の抑制作用と疾患との関連をより詳細に明らかにすることによって、Regnase-1 のリン酸化阻害を標的とした疾患の治療の可能性を広げていきたいと研究代表者は考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Hiroki, Arima Yasunobu, Kamimura Daisuke, Tanaka Yuki, Takahashi Noriyuki, Uehata Takuya, Maeda Kazuhiko, Satoh Takashi, Murakami Masaaki, Akira Shizuo	4. 巻 216
2. 論文標題 Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1431 ~ 1449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20181078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中 宏樹
2. 発表標題 Phosphorylation and functional inactivation of Regnase-1 enhance target mRNA stability during IL-17-mediated inflammatory response
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Tanaka
2. 発表標題 Regnase-1: A key regulator of the mRNA stabilization during interleukin-17-induced inflammation
3. 学会等名 MMCB2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 宏樹
2. 発表標題 Subcellular translocation of phosphorylated Regnase-1 is critical in controlling target mRNA stability in IL-17 signaling
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Regnase-1が関与する疾患の治療および/または予防法	発明者 田中 宏樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-229845	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----