

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19265

研究課題名（和文）RNA代謝異常に起因する多様な疾患表現型を示すモデルマウスの作出と解析

研究課題名（英文）Generation and analysis of disease model mice with multiple phenotypes caused by disorder in RNA metabolism.

研究代表者

角田 茂（Kakuta, Shigeru）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：80345032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：RNase T2は一本鎖RNAを非特異的に分解するエンドリボヌクレアーゼである。ヒトにおいては先天性嚢胞性白質脳症の患者にRNASET2遺伝子の欠損が報告されている。C57BL/6N背景のRNase T2遺伝子欠損マウスを作出したが、神経変性疾患は認められず、代わりに肝脾腫をはじめとする免疫異常を自然発症することがわかった。BALB/cA系統への戻し交配を行ったところ、C57BL背景よりもBALB背景では症状が軽減することが明らかになった。一方、オートファジーを可視化できるKOマウスを樹立したところ、RNaseT2が欠損するとオートファジーの後期に異常が生じることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNase T2欠損のヒト遺伝病の疾患モデルマウスの樹立を試みたが、残念ながらRNase T2に遺伝子変異を持つマウスはヒトの場合と異なり、神経変性疾患よりも免疫異常の表現型がより強く現れるものであった。すなわち、RNase T2に関連する分子機構には動物種差が存在し、RNase T2の機能解析結果をヒトに外挿する上では、マウスは適切な動物種でないことがわかった。現在はゲノム編集技術により様々な動物種で遺伝子改変が可能となっていることから、より適切な動物種を用いて疾患モデルを作出する必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：RNase T2 is a widely conserved endoribonuclease that non-specifically digests single stranded RNA. In humans, it was reported that loss-of-function mutations in the gene encoding RNASET2 lead to congenital cystic leukoencephalopathy. We generated Rnaset2 deficient mice in C57BL/6N background by genome editing. However, immune disorders including splenohepatomegaly, but not neurodegenerative diseases, were developed in Rnaset2 deficient mice. Rnaset2 deficient mice in BALB/cA background were established by backcross, and these mice showed milder phenotypes. In addition, autophagy-visualized Rnaset2 deficient mice were generated, and we found that lack of RNase T2 caused abnormality in autophagy processing.

研究分野：実験動物学、発生工学、疾患モデル

キーワード：リボヌクレアーゼ 疾患モデル マクロファージ 免疫異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNase T2 は一本鎖 RNA (ssRNA) を非特異的に分解するリボヌクレアーゼである。原核生物から真核生物、更にはウイルスにも存在することから、生物学的に普遍的かつ根源的な役割を担うと考えられるが、哺乳動物での機能に関する報告は非常に少ない。ヒトでは「先天性嚢胞性白質脳症」(神経変性疾患)の患者に *RNASET2* 遺伝子の欠損が報告されている。また、ゲノムワイド関連解析から *RNASET2* 遺伝子座の一塩基多型が様々な疾患の発症と関連することも報告され、RNase T2 の異常が多様な疾患と関連することが示唆されている。申請者は、このうち遺伝子欠損により発症すると考えられる神経変性疾患の発症機構を明らかにするために、RNase T2 遺伝子欠損 (KO) マウスを作出した。しかし、予想に反して神経変性疾患は認められず、代わりに全身におけるマクロファージ・樹状細胞の特徴的な増加、脾臓肥大や肝炎などの免疫異常の自然発症が観察された。これは自然免疫における Toll 様受容体 (TLR) 7 の発現が亢進する複数のマウス系統の表現型に一部類似していた。TLR7 は、異物 ssRNA をエンドソーム・リソソーム (エンドリソソーム) で感知し、免疫応答を誘導するセンサー分子である。そこで、TLR7 を欠損させた RNase T2 KO マウスを作出したが、予想に反して一部免疫異常の緩和にとどまった。RNase T2 はエンドリソソームで RNA を分解することで、異物 RNA に対する自然免疫系を制御することが考えられたが、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、RNA 代謝異常に関わる多様な疾患の発症に共通する分子機構の解明、ヒト RNA 代謝疾患研究に外挿できる疾患モデルマウス樹立、の2つを目的とした。ここで得られた結果を総合的に検討することで、RNase T2 の自然免疫系への関わり、この異常による自然免疫系の破綻・多様な疾患誘導の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

樹立時の C57BL/6N (B6N) から BALB/cA (BALB) 系統への戻し交配を行い、BALB 背景の RNaseT2 KO マウスの樹立を行った。また、オートファジーを可視化するため、理研 BRC より GFP-LC3 トランスジェニック (Tg) マウス (B6. D2-Tg(CAG-GFP/LC3)53Nmi) を導入し、GFP-LC3 Tg-RNaseT2 KO マウスの樹立を行った。これらのマウスから胎児線維芽細胞 (MEF) の樹立を行うことにより、*in vitro* 解析も行った。

4. 研究成果

マウスの遺伝的背景による表現型の変化を確認するため、新たに代表的な近交系マウスである BALB 背景の RNaseT2 KO マウスを樹立したところ、B6N 背景の RNaseT2 KO マウスと同様に肝脾腫を自然発症し、全身におけるマクロファージ・樹状細胞の特徴的な増加が認められた。ただし、その表現型は B6N 背景と比較して穏やかであり、生存日数も有意に増加することがわかった。しかしながら、依然としてその表現型はヒトの欠損患者のものとは大きく異なっていた。すなわち、マウスは RNase T2 の分子機構の解析をする上で、特に免疫系細胞においては残念ながらその結果を単純にヒトに外挿することは出来ないことが明らかになった。

続いて、ヒトとマウスの種間において共通の生物現象を解析するため、オートファジーに注目した。オートファジーを可視化することが出来る GFP-LC3 トランスジェニック (Tg) マウスと交配させることにより GFP-LC3 Tg-RNaseT2 KO マウスを作出した。このオートファジー解析用マウスを用いて *in vivo* 解析を行ったところ、オートファジーが亢進していることを示す LC3 シグナルの顕著な増加が様々な臓器で認められた。また、オートファジー関連分子である p62/SQSTM1 の発現を免疫染色およびウエスタンブロット法により検討したところ、肝臓や大脳において有意に増加していることが明らかになった (図)。続いて、RNaseT2 KO マウスにおけるオートファジー異常をより詳細に解析するため、MEF を用いた *in vitro* 解析を行った。栄養飢餓ストレスやラパマイシン処理によりオートファジーを誘導しオートファゴソーム動態の検討を行ったところ、*in vivo* 実験での LC3 および p62/SQSTM1 の結果と同様に、一部条件においてそれぞれの発現亢進が認められ、オートファジーの後期過程であるオートリソソームの形成に異常があることがわかった。

ヒトの *RNASET2* 遺伝子欠損による白質脳症は、RNA の蓄積に起因する炎症が原因と信じられているが、その分子機構は不明のままである。本研究での、RNase T2 機能異常はオートファジーによる RNA 分解の低下を引き起こしうるとの知見は、ヒト患者における神経変性疾患発症の分子機構にも外挿出来る可能性があると考えられる。

一方、マウスは RNase T2 欠損の疾患の動物モデルとしては限界もあると言える。現在はゲノム編集技術により様々な動物種で遺伝子改変が可能となっていることから、より適切な動物種を用いて疾患モデルを作出する必要があると考えられる。

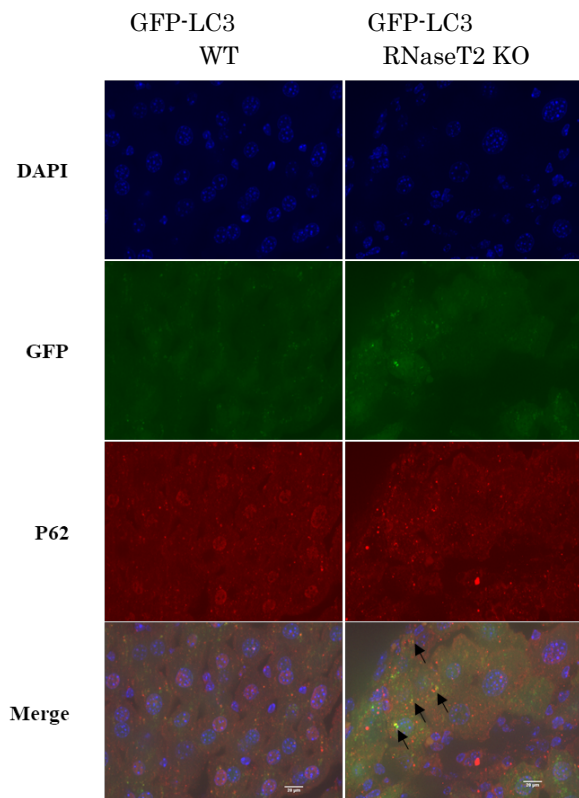


図 GFP-LC3 Tg-RNaseT2 KO マウスを用いた肝臓におけるオートファジーの観察

DAPI (青:核)、GFP (緑:GFP-LC3)、P62 (赤:p62/SQSTM1) の免疫組織化学染色像。LC3 と p62 の増加および共局在が観察され、オートファジー異常が認められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 角田 茂	4. 巻 69 (1)
2. 論文標題 研究室・施設便り「東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医学専攻 実験動物学研究室」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験動物ニュース	6. 最初と最後の頁 16-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 角田 茂、小川哲弘、藤井 渉、チェンバーズ ジェームズ、王 辰、餅井眞太郎、Mark Joseph Desamero、岩本京夏、内田萌菜、村山正承、小川修平、米澤智洋、中山裕之、岩倉洋一郎、久和 茂
2. 発表標題 普遍的リボヌクレアーゼのin vivo機能解析
3. 学会等名 第9回オルソオルガノジェネシス検討会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王 辰、角田 茂、小川哲弘、岩本京夏、餅井眞太郎、Mark Joseph M. Desamero、藤井 渉、チェンバーズ ジェームズ、内田 萌菜、村山正承、小川修平、米澤 智洋、中山裕之、岩倉洋一郎、久和 茂
2. 発表標題 生物に普遍的に存在する分泌型リボヌクレアーゼ遺伝子欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 餅井眞太郎、小川哲弘、藤井渉、角田茂、久和茂
2. 発表標題 分泌型非特異的RNA分解酵素によるマウスコロナウイルス増殖抑制作用の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen Wang
2. 発表標題 Analysis of the role of RNase T2 using KO mice
3. 学会等名 ADVANCES IN ANIMAL MODELS FOR TRANSLATIONAL RESEARCH (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Minami, Makoto Hidaka, Tomohisa Kuzuyama, Yoh-ichi Tagawa, Shigeru Kakuta, Tetsuhiro Ogawa
2. 発表標題 Study on the mechanism and its application of biofilm formation regulated by the conserved ribonuclease, RNase T2, in Escherichia coli.
3. 学会等名 第5回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田茂、小川哲弘、藤井渉、チェンバース ジェームズ、岩本京夏、Desamero Mark Joseph M.、内田萌菜、秋津葵、村山正承、小川修平、米澤智洋、中山裕之、岩倉洋一郎、久和茂
2. 発表標題 普遍的分泌型非特異的リボヌクレアーゼ遺伝子欠損マウスが呈する免疫異常の解析
3. 学会等名 第56回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室 HP
<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/jitsudo/index.html>

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
研究 分 担 者	小川 哲弘 (Ogawa Tetsuhiro) (40323480)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関