

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03502

研究課題名(和文) RNA分解酵素Regnase-1の不活性化を通じた機能制御機構の解明

研究課題名(英文) A novel mechanism for regulation of mRNA stability through functional inactivation of Regnase-1.

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・特任講師(常勤)

研究者番号：50747920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、RNA分解酵素Regnase-1の蛋白質リン酸化や蛋白質分解を通じた不活性化が、免疫機能に与える影響を解明することを目的として実施された。Regnase-1蛋白質のリン酸化を完全に阻害する遺伝子変異(Regnase-1 CTD変異)を持つマウスでは、炎症性サイトカイン等の外部刺激に対して強い抑制作用を示すが、この遺伝子変異は抗原提示作用を持つ免疫細胞群に対しては活性化作用を示し、自己免疫疾患モデルマウスの症状を悪化させることが判明した。本課題で得られた知見は、疾患治療ターゲットとしてのRegnase-1の機能的役割の解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Regnase-1蛋白質はmRNA分解によって免疫機能を制御するという、他の免疫細胞と一線を画するユニークな性質を有している。また、この蛋白質は外部からの刺激に対して鋭敏に反応して不活性化することで様々な免疫反応を制御しているが、この蛋白質の機能不活性化を阻害することで強力な抗炎症効果が得られることが知られている。今回得られた知見は、Regnase-1の持つ新たな免疫制御作用の一端の解明に貢献しており、Regnase-1蛋白質の持つ機能のより深い理解につながり、Regnase-1を標的とした創薬応用においても多岐に役立つのではないかと我々は考えている。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focus on the functional inactivation of the endoribonuclease Regnase-1, which enzymatic activity is transiently lost through its phosphorylation and proteolysis. To address the mechanism by which the functional inactivation mediates innate and acquired immunity, we used Regnase-1 CTD mice, carrying the C-terminal truncated mutation of Regnase-1 protein that completely inhibits Regnase-1 phosphorylation. This mutation is known to have a strong inhibitory effect on innate immune response primed by external stimuli with inflammatory cytokines or TLR ligands. Contrary to our expectation, this mutation showed activation of a group of immune cells such as antigen-presenting cells and was found to exacerbate disease phenotypes of mutated mice that develop spontaneous autoimmunity. The findings obtained in this project will greatly contribute to the elucidation of the functional role of Regnase-1 as a therapeutic target for diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：mRNA安定性 蛋白質リン酸化 蛋白質分解

1. 研究開始当初の背景

RNA 分解酵素(RNase)の Regnase-1 は、炎症関連遺伝子の mRNA を分解することで炎症反応を抑制し、細胞や組織の恒常性維持に貢献している(Matsushita K et al. *Nature* 458 1185 (2009)). Regnase-1 は免疫細胞・非免疫細胞に関わらず多くの種類の細胞で発現しており、定常状態において、標的となる炎症関連遺伝子の mRNA を分解することで、特定の蛋白質の翻訳を阻害する。一方で、Toll 様受容体リガンドや炎症性サイトカインなどの外部刺激によって細胞が活性化状態へと移行した際に、Regnase-1 はリン酸化や蛋白質分解等のプロセッシングを受けることで一過的に RNase 活性を喪失し、Regnase-1 による炎症関連遺伝子の発現抑制が解除され、炎症反応が惹起される(Iwasaki T et al. *Nat Immunol* 12 1167 (2011)). 申請者は、Regnase-1 のリン酸化が Regnase-1 のリボソーム上での集積状態を解消させ、なおかつ Regnase-1 のリボソーム膜上への再集合を阻害することが、Regnase-1 のリン酸化に伴う RNase 活性消失の原因であることを突き止めた。(Tanaka H. et al. *J. Exp. Med.* 216 1431 (2019)). また、Regnase-1 のリン酸化を阻害するアミノ酸点変異マウスを作成し、それらが慢性炎症疾患モデルに対して強い抵抗性を示すことを報告した。またリン酸化以外の Regnase-1 の活性化消失のプロセスとして、T 細胞活性化に伴う蛋白質切断が知られており(Uehata et al. *Cell* 153 1036(2013))、このプロセスも標的遺伝子の発現調節に関与していることが判明している。

このように、細胞活性化に伴う Regnase-1 の mRNA 分解活性の on/off の転換は様々な細胞に存在し、それらは細胞の定常状態から活性化状態への移行において、より一般的かつ重要なプロセスである可能性が示唆される。この仮説を証明するためには、Regnase-1 の RNase 不活性化機構を利用して機能制御を行っている免疫細胞や免疫反応プロセスの同定、およびそれらの分子メカニズムの解明に関して、より広範な探索を実施することが必要と考えられる。内因性の Regnase-1 蛋白質は発現量が非常に少なく、既存の抗 Regnase-1 抗体ではウエスタンブロッティングによる蛋白質の検出感度が低く、蛋白質修飾や分解の有無や蛋白質の時間依存的な発現量変化等を追跡することは困難であった。申請者らはこれを解決するために非常に鋭敏な感度で特異性の高い抗 Regnase-1 抗体を取得しており、これを使用することで各状態における免疫細胞内の Regnase-1 のリン酸化及び分解蛋白質挙動を詳細に追跡することが可能である。

これまでの研究から、Regnase-1 が炎症反応における細胞の定常状態↔活性化状態の遷移に関与していることは解明されていたが、今回申請者は新たに特定の免疫細胞集団で Regnase-1 蛋白質が恒常的に分解されている可能性を発見した。また、リン酸化阻害変異が自己免疫疾患モデルマウスの免疫細胞活性化と自己免疫性炎症を亢進することが判明した。本来リン酸化阻害変異マウスは自然免疫応答を強く抑制するので、これらの自己免疫応答を抑制せずむしろ推進するという結果が得られたのは大変意外であった。このように、Regnase-1 の蛋白質修飾および分解が免疫細胞の恒常性や活性化制御に関与している例は複数発見されており、それらの解明によって Regnase-1 の多彩な免疫応答制御機能の解明が進むことが想定された。

2. 研究の目的

本研究では、Regnase-1 による mRNA 分解を制御する上で鍵となる、Regnase-1 の蛋白質修飾及び切断機構(リン酸化などの蛋白質修飾及び蛋白質分解)が免疫システムに与える影響を解明することを目的とする。具体的には、マウスを用いて様々な疾患モデルを適用し、対象群との比較から Regnase-1 のリン酸化や分解の影響を受ける疾患モデルの同定を試みる。その後、疾患モデルにおいてリン酸化の影響を受ける細胞種を同定する。また疾患の増悪または抑制に関与する分子機構を解明し、Regnase-1 の蛋白質修飾および蛋白質切断の免疫系制御機構の全容の解明を目指す。

3. 研究の方法

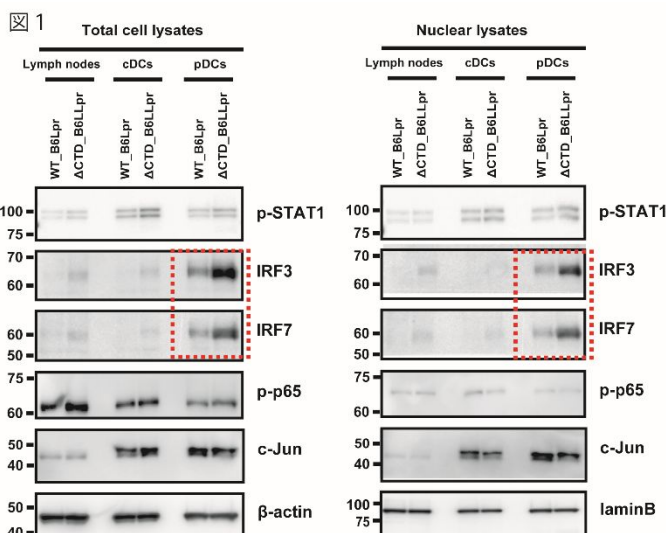
研究代表者の研究室では、これまでの研究において Regnase-1 の炎症性サイトカインにより誘導されるリン酸化を阻害する変異マウス(Regnase-1 C 末端欠損マウス; Regnase-1 ΔCTD)を取得しているので、このマウスを Regnase-1 リン酸化の免疫応答に対する影響の評価に用いる。本研究計画では、Regnase-1 ΔCTD を自己免疫疾患モデルマウスの一つである、C57 BL/6^{Jpr/lpr} (B6-lpr)マウスと交配し作成する(Regnase-1 ΔCTD x B6-lpr)。このマウスは、プログラム細胞死を司る *fas* 遺伝子内部にトランスポゾン由来のゲノム配列が挿入されており、それに伴う *fas* 遺伝子の発現低下および細胞死の抑制の結果、自己免疫性を有する免疫細胞が生じ、様々な自己免疫反応が誘導される(Nagata S. et al. *Immunol. Tod.* 16 39 (1995)). また、これと同時に MRL *Mp^{Jpr/lpr}* (MRL-lpr)系統のマウス受精卵に対して Crispr-Cas9 によるゲノム編集技術を適用することにより、Regnase-1 ΔCTD を導入した変異マウスを作製する(Regnase-1 ΔCTD x MRL-lpr)。これらのマウスの疾患症状を対象マウス(B6-lpr or MRL-lpr)と比較する。また疾患症状に対する Regnase-1 ΔCTD 変異の影響を、リンパ節および脾臓の組織染色や細胞解析を用いて評価する。これらのリンパ組織に含まれ細胞中の各遺伝子の発現については、シングルセル RNA-seq による発現解析や、イムノブロッティング、定量 PCR 等を用いて蛋白質や mRNA レベルで詳細に

解析する。転写因子の核内移行産物の定量は、各々の細胞種の核を分離してイムノブロッティング解析を用いて定量評価する。また Regnase-1 Δ CTD および Regnase-1AA 変異という二種類のリン酸化阻害変異マウスに対して卵白アルブミン(OVA)を用いたアレルギー疾患モデルを適用する。マウスに対して OVA と酸化アルミニウムアジュバントを免疫し、その後 OVA を吸入投与することでアレルギーを発症させ、症状を野生型マウスと比較する。

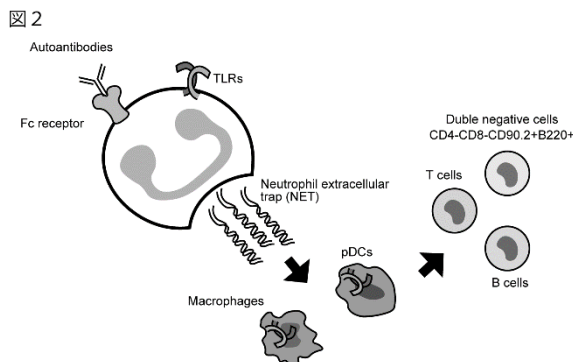
Regnase-1 の蛋白質切断については、骨髄由来細胞をフローサイトメトリーに供して各サブセットに分離し、それらを溶解させたサンプルに対して抗 Regnase-1 抗体を用いたイムノブロッティングを行い、Regnase-1 蛋白質の切断が起こる細胞種の同定を試みる。

4. 研究成果

Regnase-1 Δ CTD x B6-lpr は、B6-lpr 系統と比較して顎下・腋下リンパ節および脾臓の肥大、および血清中の免疫グロブリンの各クラスの顕著な産生量の向上を示した。またこのマウスでは、*lpr* 変異によって増加することが知られている「Double negatives 細胞」(DN 細胞、TCR+CD4-CD8-CD90.2+B220+)細胞が活発に増殖する。これらの結果は、Regnase-1 Δ CTD 変異が *lpr* 系統の自己免疫性の免疫応答を促進する作用を有していることを示唆していた。これは Regnase-1 Δ CTD 変異のもつ炎症性サイトカインによる炎症応答に対する強力な抑制効果とは全く相反しており、これまで知られていない



Regnase-1 リン酸化の免疫制御効果を示唆するものであった。次に自己免疫応答の活性化の原因を調べるために、Regnase-1 Δ CTD x B6-lpr および B6-lpr 由来の顎下および腋下リンパ節中の免疫細胞に対して、シングルセル RNA シーケンスを用いた解析を行った。B6-lpr 由来リンパ節免疫細胞の発現パターンとの比較を通じて、Regnase-1 Δ CTD x B6-lpr において活性化している細胞種を調べたところ、特にミエロイド細胞において、インターフェロン刺激により発現誘導される遺伝子群や IL1 等の炎症性サイトカインの RNA 発現上昇が認められた。したがって、Regnase-1 Δ CTD x *lpr* マウスは、ミエロイド系細胞(特にマクロファージ、単球、樹状細胞)の活性化、特にインターフェロン産生を誘導する自然免疫応答を通じて自己免疫性を亢進している可能性が示唆された。Regnase-1 Δ CTD x *lpr* マウスのミエロイド系細胞の活性化機構をより詳細に検討するために、磁気ビーズまたはフローサイトメトリーを用いて、当該マウスのリンパ節由来細胞から各種ミエロイド系細胞を単離して、それらの細胞における遺伝子および蛋白質の発現を解析した。その結果、Regnase-1 Δ CTD x B6-lpr のマクロファージおよび形質細胞様樹状細胞(pDCs)において、インターフェロン産生経路の主要な転写因子である IRF3 および IRF7 の発現量が顕著に増加し、また活性化の指標となる IRF3 及び IRF7 の核内移行が促進していることが判明した(図1)。これらの結果は、Regnase-1 Δ CTD x B6-lpr 由来のマクロファージや pDCs 等の抗原提示細胞が恒常的に活性化しており、それらの活性化に基づいて T 細胞や B 細胞、DN 細胞の分化や増殖が誘発されることを示唆している。また、Regnase-1 Δ CTD x B6-lpr マウスから取得した骨髄細胞由来のマクロファージや樹状細胞では、未刺激状態において IRF3 や IRF7 の活性化が起こっておらず、活性化を促す因子は外部からの刺激である可能性が強く示唆された。マクロファージや pDCs の IRF3 遺伝子や IRF7 遺伝子の発現および活性化をもたらす因子として、ウイルスや細菌等の外来の核酸、自己免疫疾患では自己由来の RNA や DNA が知られている。これらの因子を探索したところ、好中球細胞外トラップ(NET)に起因する



核酸が抗原提示細胞の活性化の際のリガンドとして作用している可能性が示唆された。NET は好中球が Toll リガンドや補体、免疫グロブリンにより活性化した際に形成され、NET 由来の核酸成分が細胞外に放出され、それらが異物を補足することでそれらの宿主内部への侵入を阻止する一方で、細胞外に放出されるシトルリン化蛋白質が自己免疫疾患の抗原として作用することが知られている(Corsiero E. et al. *Front. Immunol.* 7 00485 (2016))。以前の研究において、MRL-*lpr* 系統では、*lpr* 変異を含まないコントロールマウスと比較して、好中球の NET 形成に必要な蛋白質シトルリン化が亢進して NET 形成が起こりやすくなっており、それらが自己免疫性の臓器炎症を促進しているこ

とが報告されている(Knight JS, et al. *Ann Rheum Dis* **74** 2199–2206 (2015))。これらの報告から、Regnase-1 Δ CTD x B6-*lpr* マウスにおける IRF3 および IRF7 の活性化は、Regnase-1 Δ CTD 変異による好中球の活性化と NET の産生の亢進が原因となっていると考えており、実際にこれらの結果を示唆するデータを現在取得している(図 2)。今後は、この変異マウスにおける好中球の活性化亢進の分子機構を詳細に解析し、Regnase-1 のリン酸化とのかかわりを解明する予定である。

また、MRL-*lpr* 系統に対して Regnase-1 Δ CTD を導入した変異マウス(Regnase-1 Δ CTD x MRL-*lpr*)についても機能解析を行い、このマウスは MRL-*lpr* よりもより重篤な自己免疫疾患を発症することを見出した。具体的には、Regnase-1 Δ CTD 変異を含む MRL-*lpr* マウスは、MRL-*lpr* マウスと比較して、顕著なリンパ節や脾臓の肥大、Double negative 細胞の増殖、自己反応性抗体の産生の亢進など、自己免疫症状の増悪の兆候を示した。MRL-*lpr* 系統は自己反応性抗体の腎臓への沈着と慢性炎症の亢進を伴い、ヒトにおけるループス腎炎のモデルマウスとして知られているが、Regnase-1 Δ CTD x MRL-*lpr* はループス腎炎様の疾患症状を著しく増悪させた。さらに、このマウス由来の T 細胞は腎臓や肝臓、肺内部に顕著に浸潤し、臓器に対する炎症を促進していることを見出した。これらの結果は、Regnase-1 Δ CTD x B6-*lpr* よりも症状が深刻であり、Regnase-1 Δ CTD 変異による自己免疫性疾患の増悪メカニズムの解明のために非常に有用と考えている。またこの系統は、好中球の NET 形成を報告した以前の研究に用いられていたマウスと同系統の MRL-*lpr* バックグラウンドを有しているため、好中球の活性化と NET 形成を評価するためにも適切であり、*lpr* 変異による自己免疫疾患発症の機序をよりの確に調べることが可能になるのではないかと考えている。

Regnase-1 のリン酸化阻害変異マウスのアレルギー疾患モデルマウスに対する影響の解析については、Balb/c バックグラウンドのリン酸化阻害変異マウスを、バッククロス交配または Crispr/Cas9 ゲノム編集を用いて作製し(AA 変異、 Δ CTD 変異)、それぞれ OVA 免疫アレルギー疾患モデルに対する Regnase-1 のリン酸化阻害の影響を評価した。アレルギー性炎症に関与する IL5 や IL13 等のサイトカインや IgE の産生を、OVA 吸入投与後の血清及び肺洗浄液から測定したところ、それぞれの値が野生型マウスと比較して減少した。また、OVA 吸入後の肺組織の炎症及び線維化を調べたところ、それらについても症状の低減が認められた。これらのことから、Regnase-1 のリン酸化は、アレルギー性免疫応答の制御にも関与していることが判明した。

Regnase-1 の蛋白質分解メカニズムの解明については、骨髄由来細胞のうち、顆粒球およびその前駆体細胞において Regnase-1 蛋白質が恒常的に分解されることを見出したが、これらの蛋白質切断は、細胞を界面活性剤によって溶解した際に、分泌顆粒に含まれる大量のプロテアーゼが細胞質の Regnase-1 を分解することによって生じたアーティファクトであることが判明した。

今回の研究成果は、Regnase-1 のリン酸化阻害変異が免疫応答にもたらす影響についての新たな知見を複数得ることに成功した。すなわち、自己免疫疾患を誘導する *lpr* 変異を含むマウスに対しては疾患増悪効果をもたらす、アレルギー性炎症に対しては抑制効果をもたらすことが判明した。Regnase-1 Δ CTD x B6-*lpr* や Regnase-1 Δ CTD x MRL-*lpr* では、いずれも抗原提示細胞の活性化に伴う自己免疫応答の増幅が起こり、Regnase-1 Δ CTD x MRL-*lpr* では臓器に対する血球細胞の浸潤および炎症の増悪を示し、明確な病気の悪化の兆候を示した。これらの作用は、Regnase-1 のリン酸化阻害変異が示す、慢性炎症に対する強い抑制効果とは逆の効果であり、Regnase-1 のリン酸化の影響が非免疫系における炎症応答にとどまらない可能性を示唆するものであった。また、Regnase-1 のリン酸化阻害はアレルギー性炎症応答に対して、 T_H1/T_H17 性炎症と同様の抑制的な影響をもたらすことが判明した。これらの知見は、Regnase-1 のリン酸化が T_H1/T_H17 性炎症と T_H2 性炎症の双方の制御において等しく作用することを示唆しており、Regnase-1 のリン酸化阻害が T 細胞性炎症の制御を目的とした広範な疾患治療のターゲットになる可能性を示唆している。今後は今回発見された Regnase-1 のリン酸化の役割を分子レベルでより詳細に解明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2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 田中宏樹	4. 巻 73
2. 論文標題 メッセンジャーRNA分解酵素Regnase-1 による自然免疫応答制御機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 513
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Piboonprai Kitiya, Millius Arthur, Shimoda Mayuko, Tanaka Hiroki, Akira Shizuo, Maeda Kazuhiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Breaking self regulation of Regnase 1 promotes its own protein expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 383 ~ 389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13018	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------