

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460574

研究課題名(和文)慢性炎症関連遺伝子Rbm10の機能解析

研究課題名(英文) Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b, a DNA methyltransferase

研究代表者

熱海 徹 (Atsumi, Toru)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：80360478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は非免疫細胞における炎症の増強機構「炎症回路」における制御遺伝子RBM10の役割を明らかにするものである。RBM10欠損細胞では炎症回路の活性化に伴う炎症関連遺伝子のプロモーター部位におけるDNAのメチル化の増加が観察された。DNAのメチル化は転写を負に制御する主要な分子機構である。DNAメチル化酵素であるDnmt3bは酵素活性の有無で2種類のタイプに区別できるが、RBM10欠損細胞ではDNAメチル化活性のもつタイプの比率が増えていた。この結果からRBM10は炎症関連遺伝子のプロモーター部位のDNAのメチル化を適正に制御することにより炎症反応の強さを制御していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We previously discovered an inflammation induction mechanism in non-immune cells, the inflammation amplifier. Rbm10 deficiency suppressed NF- $\kappa$ B-mediated chemokine and cytokine expression in vitro and inhibited an NF- $\kappa$ B-dependent arthritis in vivo. In Rbm10-deficient cells, NF- $\kappa$ B reporter activity was suppressed, and p65 and p300 accumulation at the promoter sites of NF- $\kappa$ B-responsive genes was decreased. Epigenetic alterations, including H3K9 acetylation, were also suppressed in contrast, DNA methylation is increased. Rbm10 increasing DNA methylation due to increase enzymatically active Dnmt3b2 and decrease enzymatically inactive Dnmt3b3. These two isoforms, thus increasing DNA methylation. Dnmt3b2 efficiently associated with NF- $\kappa$ B to methylate modulate the frequency of methylation in the promoter regions of NF- $\kappa$ B targets such as inflammatory cytokines and chemokines. These results reveal a novel role of Rbm10 on inflammation development

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 DNAメチル化 選択的スプライシング

### 1. 研究開始当初の背景

2008年に私が所属する研究室では、炎症誘導に関連する非免疫細胞に存在するケモカイン発現機構として「炎症回路」を発見していた。これは、血管内皮細胞などの非免疫細胞において転写因子であるNF- $\kappa$ BとSTAT3が同時に活性化すると、非常に強いNF- $\kappa$ Bの活性化が生じる現象である。その結果産生されるIL-6がSTAT3の活性化を維持することでポジティブフィードバックループを作り、機能分子として働く遊走因子ケモカイン、増殖因子が過剰に産生され、免疫細胞が無秩序に集積、その場の線維芽細胞などが増殖して炎症が誘導される。炎症回路は、さまざまな動物モデルに加え、ヒトの臨床サンプルにおいてもその活性化の証拠が得られている。炎症回路に必須であるNF- $\kappa$ BとSTAT3の活性化を誘導する分子としては、活性化ヘルパーT細胞由来のIL-17、IFN $\gamma$ や、炎症部位に豊富に含まれることで知られるIL-6などのサイトカインがある。この炎症回路の活性化が、ゲートウェイ反射による局所血管へのゲート形成に必要であることが実験的に証明されている。実際に、ノルアドレナリンやATPといった神経伝達物質がNF- $\kappa$ Bの活性化亢進を介して、炎症回路の活性化をさらに増強させることが分かっている。近年、慢性炎症が自己免疫疾患やアレルギーばかりではなく、神経変性疾患やメタボリック症候群など様々な病気に関与することが明らかになっている。このことは、慢性炎症の分子機構を解明することによって多くの病気の克服に貢献できることを意味する。炎症反応は、免疫細胞と標的の臓器を構成する非免疫細胞との相互作用の結果生じるが、多くの研究が免疫細胞に着目している。私が所属する研究室では独自の視点として、血管内皮細胞や線維芽細胞といった非免疫細胞に注目し、その機能解析から組織特異的な炎症増強機構の解明に取り組んでいる。前述のように非免疫細胞において、IL-17、IL-6やTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカイン刺激によって転写因子NF- $\kappa$ BとSTATが同時活性化すると、ケモカインや増殖因子などの炎症性因子の産生が相乗的に増強される現象(炎症回路)を発見している。NF- $\kappa$ B刺激が主信号として、STAT信号は炎症回路を維持するための副信号(燃料)のように機能する。現在までの解析から、NF- $\kappa$ B活性化増強による炎症性因子の相乗的産生は、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患モデル、また慢性移植片拒絶モデルなど多くの疾患、病態モデルの形成に関与することが明らかになっている。また様々なヒトの臨床検体においてもNF- $\kappa$ BとSTATの同時活性化の証拠が得られている。この炎症性因子の相乗的産生を分子的に理解するために、RNA干渉法を用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。これにより、1000を超える遺伝子が、相乗的産生に必要であることが分かった。ま

た、DNAアレイ実験を行い、NF- $\kappa$ BとSTATの同時活性化によって相乗的産生される500以上の分子群を同定した。これらの分子群がどのように機能するかを詳細に分子レベルで研究することで、慢性炎症の分子機構が明らかになることが期待されることから、今回この炎症回路制御遺伝子の中からRbm10を選び、炎症におけるその機能を解析した。

### 2. 研究の目的

炎症回路制御遺伝子であるRbm10の炎症における分子機構を明らかにすることを目的とした。

Rbm10は選択的スプライシングに関与するRNA結合タンパク質として知られている。また、この遺伝子の変異は、ヒトにおいてX染色体連鎖劣勢遺伝病であるTARP症候群を発症させる。しかし、Rbm10が炎症に関わることはあまり知られておらず、今回、そのメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

胎児線維芽細胞もしくは血管内皮細胞株であるBC1細胞を用いて実験を行った。胎児線維芽細胞もしくはBC1細胞にRbm10に対するshRNAを使ってRbm10欠損細胞を作成した。このRbm10欠損細胞を用いて、分子生物学的、および生化学的実験を行った。

### 4. 研究成果

本研究はRNA結合タンパクであるRbm10の非免疫細胞におけるNF $\kappa$ BシグナルとSTAT3シグナルの同時活性化による炎症性サイトカイン、ケモカインの産生増強機構「炎症回路」における役割を明らかにすることを目的とした。

shRNAによるRbm10欠損細胞株では炎症アンプの活性化による炎症性サイトカイン、ケモカインの産生、転写が強く抑制されていた。そのうち、NF- $\kappa$ Bの標的遺伝子は強く抑制されていたが、その一方でSTAT3の標的遺伝子の発現は抑制されていなかった。このことは、Rbm10が主にNF- $\kappa$ B経路に関連していることを示している。これと一致して、Rbm10欠損細胞ではp65のプロモーターDNAへの会合が顕著に抑制され、ヒストンH3K27のアセチル化、H3K4のトリメチル化も同様に抑制されていた。またDNAのメチル化については、Cxcl1遺伝子のp65結合配列近傍のシトシンがRbm10欠損細胞株で顕著にメチル化されていることを発見したことからRbm10はエピジェネティックな機構により炎症回路を制御していることが示唆された。De novo DNAメチル酵素であるDnmt3bは体細胞においては選択性スプライシングによって8種類のmRNAが転写されるが、RBM10欠損細胞株ではDNAメチル化活性を持つ全長型のアイソフォームであるDnmt3b2の比率が、他のアイソフォームに比較して増加していた。ま

たレポーターアッセイにより、Dnmt3b2 は IL-6 の転写抑制能を持つが、他のアイソフォームでは持たないことが示唆された。さらに無刺激時に p65 結合配列への Dnmt3b のリクルートが Rbm10 欠損細胞で増加すること、さらにメチル化 DNA 結合タンパクである MBD2 のリクルートも同様に亢進していたことから、Rbm10 欠損細胞においては無刺激の状態の時点で p65 結合配列はヘテロクロマチン様の構造を形成しており、転写をサイレンシングしていることが示唆された。

このように Rbm10 によるスプライシング制御に関連する Dnmt3b の活性の変化が p65 のプロモーター部位のメチル化に関与する可能性が示唆されたことから、MeDIP-sequence の結果を利用して Rbm10 により制御される遺伝子と、NFkB 標的遺伝子との相関性を統計学的に検討した。その結果、ハウスキーピング遺伝子についてはコントロール細胞と Rbm10 欠損細胞で差がなかった一方で、NFkB 標的遺伝子は、Rbm10 欠損細胞で顕著にメチル化が亢進していた。これらの結果は、Rbm10 の NFkB シグナルに対する新たな機能を明らかにしており、Rbm10 が炎症疾患に対する新規創薬標的となる可能性を示唆している。

#### 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 7 件) 全て査読あり

1. Meng, J., J-J Jiang, T. Atsumi, H. Bando, Y. Okuyama, L. Sabharwal, I. Nakagawa, H. Higuchi, M. Ota, M. Okawara, R. Ishitani, O. Nureki, D. Higo, Y. Arima, H. Ogura, D. Kamimura and M. Murakami. Breakpoint cluster region-mediated inflammation is dependent on casein kinase II. *J Immunol* 197(8), 3111-3119, 2016 DOI: 10.4049/jimmunol.1601082
2. Kamimura, D., Y. Arima, M. Tsuruoka, J-J Jiang, H. Bando, J. Meng, L. Sabharwal, A. Stofkova, N. Nishikawa, K. Higuchi, H. Ogura, T. Atsumi, M. Murakami. Strong TCR-mediated signals suppress integrated stress responses induced by KDELR1 deficiency in naïve T cells. *Int Immunol*. 28(3), 117-126, 2016. doi: 10.1093/intimm/dxv059.
3. Nakagawa, I., D. Kamimura, T. Atsumi, Y. Arima, M. Murakami. Role of inflammation amplifier-induced growth factor expression in the development of inflammatory diseases. *Crit Rev Immunol*. 35(5), 365-78, 2015 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853849>
4. Kamimura, D., T. Atsumi, A. Stofkova, N. Nishikawa, T. Ohki, H. Suzuki, K. Katsunuma, J-J Jiang, H. Bando, J. Meng,

- L. Sabharwal, H. Ogura, T. Hirano, Y. Arima, M. Murakami. Naive T cell homeostasis regulated by stress responses and TCR signaling. *Front Immunol* 6, Article 638, 2015 DOI: 10.3389/fimmu.2015.00638
5. Arima, Y., D. Kamimura, T. Atsumi, M. Harada, T. Kawamoto, N. Nishikawa, A. Stofkova, T. Ohki, K. Higuchi, Y. Morimoto, P. Wieghofer, Y. Okada, Y. Mori, S. Sakoda, S. Saika, Y. Yoshioka, I. Komuro, T. Yamashita, T. Hirano, M. Prinz, M. Murakami. A pain-mediated neural signal induces relapse in multiple sclerosis models. *eLife* 4: e08733, 2015 DOI: 10.7554/eLife.08733
6. Kamimura, D., K. Katsunuma, Y. Arima, T. Atsumi, J-J Jiang, H. Bando, J. Meng, L. Sabharwal, A. Stofkova, N. Nishikawa, H. Suzuki, H. Ogura, N. Ueda, M. Tsuruoka, M. Harada, J. Kobayashi, T. Hasegawa, H. Yoshida, H. Koseki, I. Miura, S. Wakana, K. Nishida, H. Kitamura, T. Fukada, T. Hirano, and M. Murakami. KDEL receptor 1 regulates T-cell homeostasis via PP1 that is a key phosphatase for ISR. *Nat. Commun.* 6, Article number: 7474, doi:10.1038/ncomms8474, 2015
7. Atsumi, T., R. Singh, L. Sabharwal, H. Bando, J. Meng, Y. Arima, M. Yamada, M. Harada, J-J Jiang, D. Kamimura, H. Ogura, T. Hirano, and M. Murakami. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research* 74(1): 8-14, 2014 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2322

[学会発表] (計 1 件)

「炎症回路制御遺伝子 Rbm10 は DNA メチル化酵素 Dnmt3b の活性を調節することにより、標的遺伝子の転写を制御する。」熱海徹、第 2 回北大部局間シンポジウム、2017 年 3 月 14 日、ポスター、北海道大学、北海道札幌市

[図書] (計 2 件)

1. Ota, M., D. Kamimura, I. Nakagawa, H. Higuchi, Y. Tanaka, M. Fujita, S. Hiratsuka, M. Okawara, K. Murakami, T. Atsumi, Y. Arima and M. Murakami. Control of chronic inflammation by the inflammation amplifier and gateway reflexes. *Advances in Medicine and Biology* 104: Chapter 4, 65-86, 2016 [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=59321](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=59321)
2. Kamimura, D., Y. Arima, T. Atsumi, J. Meng, L. Sabharwal, H. Bando, J-J. Jiang, ES. Huseby, M. Murakami. Role of cytokine-mediated crosstalk between T

cells and nonimmune cells in the pathophysiology of multiple sclerosis. Chapter 6 in Multiple Sclerosis (Elsevier) 2015.

<https://www.elsevier.com/books/multiple-sclerosis/minagar/978-0-12-800763-1>

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/neuroimmunology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熱海 徹 (ATSUMI, Toru)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・  
特任助教  
研究者番号：80360478

### (2) 研究分担者

上村 大輔 (KAMIMURA, Daisuke)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師  
研究者番号：20391922

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし