

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15185

研究課題名(和文)リンパ球初期分化を制御する新規転写後制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel posttranscriptional mechanism regulating early lymphopoiesis

研究代表者

植畑 拓也(Uehata, Takuya)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50785970

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):本研究はmRNA分解を司るRegnase-1(Reg1)とReg3による骨髄造血の分化系譜決定機構の解明を目的とした。Reg1/3遺伝子欠損マウスの解析により、Reg1/3がリンパ球分化に必須であること、さらに詳細な遺伝子発現解析により、正常造血ではReg1/3によるNfkbizの不安定化がリンパ球分化を堅固なものとし、炎症時の造血ではReg1/3の発現低下によりNfkbizの発現が増加することでミエロイド系細胞への分化を促進することを見出した。以上より、Reg1/3-Nfkbiz制御軸がリンパ球-ミエロイド系分化の方向性を決定づける上で極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、造血幹細胞を含む多能性前駆細胞の遺伝子発現パターンには高度の多様性が存在し、これと一致するように分化バイアスが存在することが示唆されているが、その制御メカニズムは未解明であった。本研究において、転写因子やエピジェネティクスによる既存のメカニズムに加え、新たな制御相としてReg1/3-Nfkbiz制御軸が造血前駆細胞における分化バイアスの調節に重要な役割を果たしていることを世界で初めて見出した。本研究成果は、慢性炎症における造血障害や白血病などに対する新たな治療戦略への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文): In this study, we discovered a novel mechanism of how mRNA decay factors, Regnase-1 (Reg1) and Reg3 determine cell fate in bone marrow hematopoiesis. Analyses of mice lacking Reg1/3 revealed that Reg1/3 are essential for early-stage lymphopoiesis. Single cell RNA-seq of hematopoietic progenitors showed that Reg1/3 ensure lymphoid-lineage bias to maintain balanced hematopoiesis. Among mRNAs targeted by Reg1/3, Nfkbiz was identified as a critical regulator for suppressing lymphopoiesis and promotion of myelopoiesis in hematopoietic progenitors. Inflammatory signals, such as LPS, unleashed Nfkbiz expression due to downregulation of these RNases, resulting in initiation of emergency myelopoiesis. Collectively, we demonstrated that the Reg1/3-Nfkbiz axis acts as a novel rheostat that controls lineage priming in hematopoietic progenitors.

研究分野：免疫学

キーワード：転写後制御 mRNA分解 造血幹細胞 細胞系譜決定 lineage priming

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写後制御機構は、転写制御機構とともに両輪を成し、炎症応答を調節する重要な役割を担っている。これまでの研究で我々は、ヌクレアーゼドメイン(PIN)と CCCH-type ジンクフィンガードメインを特徴とする Regnase-1 (Reg1、別名 Zc3h12a) が炎症応答に関連した mRNA の不安定化に関わることを示してきた。マクロファージでは、Reg1 は *Il6*、*Il12p40* などの炎症性サイトカインをコードする mRNA を標的とし、一方 T 細胞では *Il2*、*Ox40*、*Icos*、*cRel* といった遺伝子を標的としている。このため Reg1 欠損マウスでは過剰な炎症性サイトカイン産生と T 細胞の活性化が認められ、およそ生後 12 週齢で死亡する。申請者は初めて Reg1flox マウスを作製し、Reg1 欠損による炎症応答が主に T 細胞によって惹起されていることを明らかにした。これを発端とし Reg1flox マウスを用いた研究により、肺や腸管上皮細胞といった非血球細胞においても Reg1 の重要性が確認された。一方で、Reg1 には他にも 3 つのファミリー遺伝子が存在し前述の機能的ドメインを共有しているが、その生物学的機能に関する報告はほぼ皆無であった。中でも、Reg3 (別名 Zc3h12c) は Reg1 と同様、LPS 誘導性遺伝子であり炎症制御因子として想定されていたが、Reg1 欠損マウスと異なり Reg3 欠損マウスでは免疫細胞の活性化はほとんど確認できない。このように、これまで各 Regnase 遺伝子に関する機能欠損の解析は行われていたが、Regnase ファミリー分子の免疫システムにおける役割に関して理解は依然十分ではなかった。そこで申請者は、前述の観点から Reg1 と Reg3 の二重欠損(Reg1/3 DKO)マウスを作製し、これら遺伝子がどのように炎症応答を制御するのかについて解析を開始した。Reg1/3 DKO は新生児期死亡となることから、Reg1 単独欠損マウスと比較し、より激しい炎症応答が想定されたが、予想に反しマクロファージにおける各 TLR リガンドに対する炎症性サイトカイン産生は Reg1 単独欠損と同等であった。このことから Reg3 は炎症応答に関与していないことが示されたが、興味深いことに、Reg1/3 DKO 胎仔肝細胞(FL, fetal liver)移植の解析により、脾臓及び骨髄において B 細胞が著しく減少することを見出した。しかしながら、Reg1 と Reg3 が如何に B 細胞分化を制御しているのかに関する分子機構は全く未解明であった。

2. 研究の目的

本研究における目的は、mRNA 分解機構による骨髄造血の分化系譜決定機構の解明である。前述のように本研究を始めるに至っては、Reg1/3 DKO FL 移植マウスでは成熟 B 細胞が著しく減少していることを見出し、これが骨髄におけるリンパ球分化障害であることを明らかにしていた。本研究では Reg1 と Reg3 が如何にリンパ球分化を制御しているかを明らかにし、mRNA 分解機構による血球分化における新たな分子機構の解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) Reg1/3 DKO マウスを用いて骨髄リンパ球分化障害の原因を明らかにする。前述のように FL 移植により骨髄造血細胞(HSPC, hematopoietic stem/progenitor cells)を再構築し、フローサイトメトリーを用いた解析により、リンパ球分化障害の原因を明らかにする。また、*Il7r-cre* と Reg1flox マウスの交配により、Reg1/3 による分化制御がリンパ球分化決定段階とどのような関係にあるかを明らかにする。

(2) HSPC において Reg1/3 がどのように分化系譜バイアスを調節しているかを明らかにするため、野生型と Reg1/3 DKO を 1:1 で FL transfer したマウスを用いて、1 細胞 RNA シークエンスを行う。

(3) FL 移植を用いた解析では、DKO 由来の免疫細胞による炎症惹起の影響を最小限にするため、移植後 4-6 週後に解析を行う必要があった。また、このような移植による血球再構築は正常な造血を反映していない可能性がある。このため、*CreERT2*^{fl/fl}*Reg1*^{fl/fl}*Reg3*^{-/-}マウスを作製し、タモキシフェン投与により Reg1 を欠如させることにより、正常造血における Reg1/3 の役割を明らかにする。

(4) Reg1/3 による mRNA 分解機構がどのようにリンパ球分化に寄与するかを明らかにするため、*Reg1*^{fl/fl}*Reg3*^{-/-}マウスから単離した Lin⁻Sca1⁺Kit^{hi}(LSK)細胞を用いて、*in vitro* リンパ球前駆細胞を樹立する。この細胞株を用いて Reg1/3 の標的遺伝子に関する解析を行う。最終的に、Reg1/3 DKO 細胞に認められるリンパ球分化障害の原因遺伝子を特定し、これをノックアウトすることによりリンパ球分化障害が改善されることを確認する。

4. 研究成果

(1) FL transfer マウスをフローサイトメトリーで解析した結果、DKO 細胞を移植したマウスでは、コントロール群、Reg1 単独欠損、Reg3 単独欠損と比較し、Flt3^{hi}LSK 集団で定義される Lymphoid primed multipotent progenitor (LMPP)の細胞数が有意に減少していた。次に、Reg1/3 がリンパ球分化に与える影響が cell intrinsic であるかを検討するため、前述と同様 FL を用いた competitive transfer を行った。結果、CD150⁺LSK で定義される HSC に関しては生着に差は認め

られなかったが、DKO 細胞はコントロール細胞と比較し、LMPP、CLP やその他 B リンパ球系前駆細胞において著しい分化障害を示した。一方、myeloid 系あるいは megakaryo-erythroid 系の前駆細胞には分化障害は認めなかった。また、このようなリンパ球系分化障害は、*Il7r-cre⁺Reg1^{fl/fl}Reg3^{-/-}* マウスを用いた FL transfer 解析では認められなかったことから、Reg1/3 はリンパ球分化決定前の HSPC の段階で重要な役割を果たしていることが示された。一方で、*in vivo* での BrdU ラベリングあるいは Annexin V 染色により、これら HSPC 内の細胞増殖や細胞死を調べたところ、コントロールと DKO の間に差は認めなかった。

(2) 細胞表面抗原による細胞分画の定義は、炎症などの環境要因によって変化する。このため、DKO における表面抗原の発現変化により、野生型と同じ分画を比較することが困難であることが予想された。それ故、HSPC における Reg1/3 による遺伝子発現制御機構を明らかにするため、1 細胞 RNA シークエンス解析を行った。具体的に、野生型と DKO の 1:1 mix transfer したマウスを用いて、骨髄における LSK 分画に着目し MARS-seq を行った。結果、DKO 細胞はコントロール細胞と比較し、lymphoid 系前駆細胞の遺伝子発現を示さず、むしろ myeloid 系・megakaryo-erythroid 系前駆細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを示した。これと一致して、野生型と比較し DKO 細胞で有意に発現増加した遺伝子には、*MPO*、*Eln*、*Ebi3* などの myeloid 系細胞に特徴的な遺伝子が認められた。興味深いことに、骨髄造血において機能が十分に理解されていない *Nfkbiz* や *Ehd3* といった遺伝子も同定された。実際に、これらの遺伝子の 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に付加したレポーターアッセイにより、*Nfkbiz* と *Ehd3* は Reg1 と Reg3 によって制御されることを確認した。

(3) 正常造血における Reg1/3 の機能を明らかにするため、*CreERT2⁺Reg1^{fl/fl}Reg3^{-/-}* マウスを作製した。タモキシフェン投与後 2 週間の時点で、このマウスでは骨髄成熟 B 細胞が減少し、単球前駆細胞が増加していた。さらに、タモキシフェン投与後 3 日時点ではすでに、HSPC 内では MPP2、MPP3 の増加及び、MPP4 の減少が見られた。一方、LT-HSC や ST-HSC の細胞数には変化を認めなかった。このマウスにおいて、前述の *Nfkbiz* や *Ehd3* の発現変化を検討するため、HSPC 内の各サブセットを単離し qPCR を行ったところ、ST-HSC 以外の各サブセットにおいて *Nfkbiz* と *Ehd3* の発現増加が認められた。この発現増加は Reg1 あるいは Reg3 単独欠損細胞では認められないことから、これらの遺伝子は Reg1 と Reg3 の両者により厳密に発現制御を受けていることが示された。

(4) Reg1 と Reg3 によるリンパ球分化制御の分子機構を明らかにするため、*Reg1^{fl/fl}Reg3^{-/-}* マウスから単離した LSK 細胞を用いて、リンパ球前駆細胞株(MPP^{hd3-ERT2})を樹立した。この細胞株にドキシサイクリン(DOX)で発現誘導される cre を導入することに成功した。結果、*Reg1^{fl/fl}Reg3^{-/-}* MPP^{hd3-ERT2} を B 細胞誘導条件で培養すると、DOX 存在下では B 細胞分化が著しく減少した。興味深いことに、stem-cell 培養条件の場合、DOX 非存在下では未分化な状態が維持されるが、DOX 存在下では CD11b⁺細胞の増加が認められた。さらに、この条件において Reg1/3 の標的遺伝子である *Nfkbiz* と *Ehd3* の発現が上昇すること、さらにこの細胞株を用いた RNA immunoprecipitation (RIP)により、これら標的遺伝子に対する Reg1/3 との結合が確認された。次に、野生型 MPP^{hd3-ERT2} に対して *Nfkbiz* や *Ehd3* を強制発現し B 細胞分化を評価したところ、*Nfkbiz* は、C/EBP α や C/EBP β と同程度に B 細胞分化に障害を与えたが、*Ehd3* は B 細胞分化にほとんど影響を与えなかった。最後に、DKO における B 細胞分化障害の原因が *Nfkbiz* の発現増加であるかどうか検討するために、*CreERT2⁺Reg1^{fl/fl}Reg3^{-/-}Nfkbiz^{fl/fl}* マウスを作製した。これを用いて E16.5 FL から Lin⁻Kit⁺IL-7R α ⁺細胞を単離し 4-OHT 含有 B 細胞分化条件で培養した。結果、DKO では B 細胞分化障害及び CD11b⁺細胞増加を認めしたが、*Nfkbiz* 欠損により B 細胞分化障害と CD11b⁺細胞増加が改善することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Garg, A., Roske, Y., Yamada, S., Uehata, T., Takeuchi, O., Heinemann, U. | 4. 巻 – |
| 2. 論文標題 PIN and CCCH Zn-finger domains coordinate RNA targeting in ZC3H12 family endoribonucleases | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 – |
| 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 有 |
| 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 Hirabayashi S., Bhagat., Matsuki Y., Takegami Y., Uehata T., Kanemaru A., Itoh M., Shirakawa K., Takaori-Kondo A., Takeuchi O., Carninci P., Katayama S., Hayashizaki Y., Kere J., Kawaji H., Murakawa Y. | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed cis-regulatory elements | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Genetics | 6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1379 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41588-019-0485-9 | 査読の有無 有 |
| 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 Mino T., Iwai N., Endo M., Inoue K., Akaki K., Hia F., Uehata T., Emura T., Hidaka K., Suzuki Y., Standley D.M., Okada-Hatakeyama M., Ohno S., Sugiyama H., Yamashita A., Takeuchi O. | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Translation-dependent unwinding of stem-loops by UPF1 licenses Regnase-1 to degrade inflammatory mRNAs | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 8838 ~ 8859 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz628 | 査読の有無 有 |
| 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 Yamasoba D., Sato K., Ichinose T., Imamura T., Koepke L., Joas S., Reith E., Hotter D., Misawa N., Akaki K., Uehata T., Mino T., Miyamoto S., Noda T., Yamashita A., Standley D.M., Kirchhoff F., Sauter D., Koyanagi Y., Takeuchi O. | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 N4BP1 restricts HIV-1 and its inactivation by MALT1 promotes viral reactivation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Microbiology | 6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1544 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0460-3 | 査読の有無 有 |
| 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 Nakatsuka Y., Vandenbon A., Mino T., Yoshinaga M., Uehata T., Cui X., Sato A., Tsujimura T., Suzuki Y., Sato A., Handa T., Chin K., Sawa T., Hirai T., Takeuchi O. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Mucosal Immunology | 6. 最初と最後の頁 1203 ~ 1218 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-018-0024-5 | 査読の有無 有 |
| 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 該当する |

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Uehata, T., Yamada, S., Miyazaki, M., Kawamoto, H., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Critical Roles of Endonucleases Regnase-1 and Regnase-3 in Early Lymphopoiesis |
| 3. 学会等名 Keystone symposia (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Uehata, T., Yamada, S., Miyazaki, M., Kawamoto, H., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Critical roles of endonucleases Regnase-1 and Regnase-3 in early lymphopoiesis |
| 3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Uehata, T., Yamada, S., Miyazaki, M., Giladi, A., Vandenbon, A., Amit, I., Kawamoto, H., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Endonucleases Regnase-1 and Regnase-3 regulate transcriptome biases to ensure lymphopoiesis |
| 3. 学会等名 CiRA 2019 International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 植畑拓也、山田信之輔、織大祐、今見考志、宮崎正輝、石濱泰、河本宏、竹内理 |
| 2. 発表標題 免疫細胞を制御するRNA結合タンパク質の機能解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yamada, S., Ori, D., Miyazaki, M., Uehata, T., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Ribonuclease Regnase-1 and Regnase-3 have a critical role in controlling transcriptome biases in LMPP to ensure lymphopoiesis |
| 3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Uehata, T., Ori, D., Miyazaki, M., Kawamoto, H., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Regnase-1 and Regnase-3 regulate cell fate of early lymphoid progenitors in the bone marrow |
| 3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tse, K.M., Cui, X., Uehata, T., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Manipulation of Regnase-1 mRNA stability alleviates inflammatory responses in diseased models |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会(MBSJ2020 Online) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tse, K.M., Cui, X., Uehata, T., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 Manipulation of Regnase-1 mRNA stability alleviates inflammatory responses in diseased models |
| 3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of the RNA Society (RNA2020 Online) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Uehata, T., Yamada, S., Miyazaki, M., Giladi, A., Vandenbon, A., Amit, I., Kawamoto, H., Takeuchi, O. |
| 2. 発表標題 LYMPHOID-MYELOID CELL FATE DETERMINATION BY ENDORIBONUCLEASES REGNASE-1 AND -3 |
| 3. 学会等名 8th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Online (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 植畑 拓也、竹内 理 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 生化学 | 5. 総ページ数 10 |
| 3. 書名 RNAを介した自然免疫制御 | |

| | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 植畑 拓也、竹内 理 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 医学のあゆみ | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 RNA分解酵素による自然免疫応答のフィードバック制御 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学医学研究科 医化学分野（竹内研究室）ホームページ
<https://mc.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|