

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07010

研究課題名（和文）自己免疫疾患発症制御に関与するTYK2新規機能の同定

研究課題名（英文）Identification of novel TYK2 functions involved in the regulation of autoimmune disease pathogenesis

研究代表者

室本 竜太（Muromoto, Ryuta）

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：30455597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：サイトカインシグナル伝達を担うJAKファミリーキナーゼTYK2が一部の免疫疾患の発症リスク増大においてキナーゼ非依存的役割をもつ可能性があることに着目し解析を進めた。本研究ではTYK2による発現制御を受けてマクロファージ機能に影響をもつ新規エフェクタータンパク質の候補を同定した。また、TYK2がキナーゼ非依存的に核内受容体機能を抑制する場合があること及びその機能がTYK2一塩基多型バリエーションで増強されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TYK2機能と免疫・炎症疾患との新たなつながりが示唆された。TYK2が既知の役割であるJAK-STATシグナル伝達とは独立に免疫・炎症反応促進に影響をもつことが示唆され、この解析を継続しさらに詳細を解明することで、TYK2を標的としキナーゼ活性阻害とは異なる作用機序の新規自己免疫疾患治療法を考案する基礎となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We focused on the possibility that TYK2, a JAK family kinase responsible for cytokine signaling, may have a kinase-independent role in increasing the risk of developing some immune diseases. In this study, we identified candidate novel effector proteins whose expression is regulated by TYK2 and affects macrophage function. We also found that TYK2 may suppress nuclear receptor function in a kinase-independent manner and that this function is enhanced by a TYK2 SNP variant.

研究分野：生物系薬学

キーワード：TYK2 炎症 サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

JAKファミリーキナーゼの一つであるTYK2はI型インターフェロン、IL-12、IL-23などのサイトカイン受容体下流のシグナル伝達を担い、転写因子STATのチロシンリン酸化/活性化を通じてウイルスや細菌に対する生体防御に役割をもつ。一方、このシグナル伝達の過剰亢進は自己免疫疾患の病態形成を促進させる側面をもつ。このようなJAK-STATシグナル伝達の構成因子としてのTYK2の役割は確立された概念として広く知られている。近年のゲノム配列解析によりヒトTYK2遺伝子の一塩基多型レバリエアロパントが複数同定されている。rs34536443はキナーゼの触媒ドメインをコードする領域内の一塩基置換によりアミノ酸配列変化が起こる(P1104A)。rs12720356はキナーゼ活性を調節する役割をもつ擬キナーゼ(pseudo-kinase)ドメイン内の一塩基置換により点変異体(I684S)を生じる。いずれの点変異によってもキナーゼ活性が低下するとされている。これらの一塩基多型を有すると自己免疫疾患発症リスクが低下することが、複数のゲノムワイド関連解析を結合したメタ解析の結果として報告された。rs34536443は全身性エリテマトーデス、関節リウマチなど10種もの自己免疫疾患の発症に対して保護的な影響をもたらす。それはP1104A変異によってインターフェロン、IL-12、IL-23などのサイトカインシグナル伝達が減弱することによることが先行研究で示された。こうした先行知見などからTYK2のキナーゼ活性阻害が自己免疫疾患治療に有効であるとされておりTYK2選択的阻害剤は乾癬、全身性エリテマトーデス、クローン病の治療薬として国内外で開発され臨床試験が行われている。一方、rs12720356はI684S変異タンパク質を生じ、それはキナーゼ活性が低下する点でP1104A変異体と性質が共通することが培養細胞を用いた検討から報告されているものの、一方で興味深いことにrs12720356は一部のヒト自己免疫疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病、強直性脊椎炎)の発症リスクをむしろ増加させることが示されている。rs12720356が自己免疫疾患リスクを一律には低下させず、特定の疾患でむしろ「疾患促進的」な影響を及ぼすことを説明づける分子機構は解明されていない。このI684Sの例からTYK2はそのキナーゼ活性を介して果たす役割とは異なる役割をもつことが示唆される。その解明は疾患制御機構やTYK2の生理的意義の新規性の観点から意義深いとともに自己免疫疾患治療薬の開発に将来的に貢献しうると考えられた。

まとめると、TYK2はそのキナーゼ活性に依存したシグナル伝達機能により生体防御や炎症に役割を果たす。一方、一塩基多型と疾患感受性の関係の解析結果から、一部の自己免疫疾患の発症リスク増大にはTYK2がもつ「キナーゼ非依存的機能」が影響を及ぼしている可能性が示唆された。本研究では、これまでに研究が進んでいないTYK2のキナーゼ非依存的機能をもつ生理的/病態生理的意義を解明する。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトTYK2遺伝子多型に着目してTYK2機能発現の新規メカニズムを同定することを通じて、TYK2機能の理解を「JAK-STATシグナルの概念の枠」を超えて広げることである。ヒトの自己免疫疾患発症リスクの調節ではTYK2がキナーゼとして重要である側面ばかりでなく、本研究で解明しようとするTYK2のキナーゼ非依存的機能が役割を果たすことの解明を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では以下に概略する実験を行いTYK2新規機能や下流のエフェクター分子同定・解明を行った。

#### (1) TYK2欠損マクロファージのトランスクリプトーム解析による鍵エフェクター分子の同定

マクロファージは炎症・免疫反応の調節に大きな寄与をもつ。TYK2欠損によるマクロファージ機能への影響とその鍵分子を解明するため野生型及びTYK2欠損マウス由来の骨髄マクロファージを用いRNA-seq法により定常状態でのトランスクリプトームを比較した。

#### (2) TYK2欠損マクロファージの解析

微生物等に由来する自然免疫活性化成分(リポ多糖; LPS)や糖代謝経路副産物(メチルグリオキサール)を用いてマクロファージを刺激しその応答によって起こるストレス応答MAPK経路活性化や炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 産生についてTYK2欠損による影響を解析した。

#### (3) TYK2のキナーゼ非依存性新規機能としての核内受容体機能抑制

合成グルココルチコイドの抗炎症作用に代表されるように核内受容体活性がマクロファージ機能調節や炎症抑制と関連する場合がある。種々の核内受容体活性(GR、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、ROR $\alpha$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ )を測定するための核内受容体発現プラスミド、特異的リガンド、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いTYK2共強発現による影響を解析した。実験においてはキナーゼ不活性変異体(K930R)やI684Sバリエアロパントの機能も併せて解析した。

### 4. 研究成果

TYK2のJAK-STAT経路以外への影響に着目し本研究で解析を進めた。

(1) 野生型マウスおよびTYK2欠損マウスより骨髄細胞を採取しM-CSF存在下で培養して骨髄由来マクロファージを誘導し、次世代シーケンサーによる解析(RNA-seq)によりトランスクリ

プトームを比較し TYK2 欠損により発現変動する 171 遺伝子を新規に同定した。変動遺伝子として TYK2 関与が既知であるインターフェロンシグナル関連遺伝子が多数含まれておりその点先行研究と合致していた一方、TYK2 との関連が未知であった遺伝子を TYK2 制御下で発現する新規エフェクター分子候補として見出した。TYK2 欠損により発現変動した新規分子の一つとして、細胞内糖代謝の副反応で生じる内因的毒性物質メチルグリオキサールを消去する酵素タンパク質グリオキサラーゼ 1 (Glo1) が同定された。Tyk2 欠損マクロファージでは Glo1 mRNA とタンパク質が高発現していた。

(2) Tyk2 欠損骨髄マクロファージでは Glo1 高発現の特徴に合致した性質を示すことを見出した。すなわち、Glo1 基質である毒性物質メチルグリオキサールの曝露により惹起されるストレス応答性 MAP キナーゼ (JNK 及び p38) 活性化や炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  産生が野生型マクロファージに比べて有意に抑制された。一方、比較対照として用いた過酸化水素曝露により惹起される応答には影響が見られなかった。これらの結果から、TYK2 が Glo1 発現を抑制制御することでメチルグリオキサールが介在する炎症反応を促進する機能をもつことが新たに示唆された。野生型マクロファージに対する汎 JAK 阻害薬や TYK2 選択的阻害薬処理により Glo1 mRNA 発現が増加する傾向が認められたがその増加幅は TYK2 欠損による影響に比べて小さかった。このことから、TYK2 は主にそのキナーゼ活性に依存しない分子機構により当該酵素の発現を制御することが示唆された。

(3) TYK2 がキナーゼ活性非依存的に核内受容体グルココルチコイドレセプター (GR) による転写活性を抑制することを見出した。ルシフェラーゼレポーター試験で、炎症抑制機能やマクロファージ機能調節への関与が既知である核内受容体 GR の転写活性が野生型 TYK2 の共過剰発現によって程度は小さいながら有意に抑制されることを見出した。キナーゼ不活性型変異体 (K930R) の過剰発現では野生型と同等程度の抑制効果がみられた。興味のあることに自己免疫疾患発症リスクとの関連が示唆される I684S バリエントは GR 活性に対する抑制作用を野生型よりも強く示した。これらの結果から TYK2 がキナーゼ活性に依存せずに GR 応答を抑制しうること、この抑制機能が I684S 変異により増強される性質があることが示唆された。PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、ROR $\alpha$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$  の転写活性に対する TYK2 の影響は認められなかった。

(4) Tyk2 欠損マクロファージの細胞内で、近年新たに見出された翻訳後修飾機構であるタンパク質ラクチル化が亢進していることを見出した。メチルグリオキサールが Glo1 によって代謝されて生じる代謝中間物質であるラクチルグルタチオンは非酵素的な乳酸基転移をラクチル化反応に供される報告があり TYK2 欠損マクロファージ内におけるラクチル化亢進は上述の Glo1 高発現と関連している可能性が示唆された。TYK2 による炎症・免疫反応は制御が多階層的に行われておりその一つとしてラクチル化変動が含まれることが新たに示唆された。

(5) まとめ：本研究ではこれまで TYK2 との関連が未知である遺伝子群から TYK2 制御下に働く新規エフェクター分子候補を絞り込み機能解析を進めた。細胞内糖代謝に関連して生じる内因的毒性物質メチルグリオキサールによる炎症調節において、Tyk2 が Glo1 を介してこれまでに知られていない役割をもつことが示された。また、近年マクロファージを含む細胞の機能調節に役割をもつことが報告されている新規翻訳後修飾であるタンパク質ラクチル化が Tyk2 による制御を受ける可能性を新たに見出した。今後、Glo1 機能亢進と新規翻訳後修飾機構であるラクチル化とがミエロイド系細胞の機能調節や炎症・免疫疾患の文脈においてどのように相互関連するかについて解析を継続することで TYK2 がもつキナーゼ非依存的役割についての理解が進み関連する炎症・免疫応答調節機構の解明の一助となる。また、TYK2 がキナーゼ活性非依存的に核内受容体 GR の機能を抑制し、さらにその機能は I684S 変異で増強されることが観察された。ヒトで I684S 変異をもたらし一塩基多型 rs12720356 が炎症性腸疾患群で健常群よりも有意に多く検出される (オッズ比 約 1.2) ことが報告されており、炎症性腸疾患患者の内の一定数は TYK2 I684S 変異を有しておりこの変異が疾患素因であるケースが存在することが推測される。炎症性腸疾患治療はアンメットニーズが高く病態形成機構の理解に基づく新規治療法開発など根本的な解決策が望まれている。TYK2 I684S バリエントタンパク質の機能解明は炎症性腸疾患病態形成機構の一部を説明づけるものになり得、その基礎的知見は将来的に TYK2 を標的としキナーゼ活性阻害とは異なる作用機序による新規自己免疫疾患治療法の考案に資するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Muramoto Ryuta, Sato Ami, Komori Yuki, Nariya Kota, Kitai Yuichi, Kashiwakura Jun-ichi, Matsuda Tadashi	4. 巻 613
2. 論文標題 Regulation of NFKBIZ gene promoter activity by STAT3, C/EBP , and STAT1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.140	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 -

1. 著者名 Muramoto Ryuta, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Tyk2-mediated homeostatic control by regulating the PGE2-PKA-IL-10 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AIMS Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 175 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/Allergy.2021013	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 -

1. 著者名 Muramoto Ryuta, Shimoda Kazuya, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 44
2. 論文標題 Therapeutic Advantage of Tyk2 Inhibition for Treating Autoimmune and Chronic Inflammatory Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1585 ~ 1592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00609	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 Muramoto Ryuta, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Current understanding of the role of tyrosine kinase 2 signaling in immune responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4331/wjbc.v13.i1.1	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12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室本竜太、松田正
2. 発表標題 環境化学物質によるIL-17A 応答の攪乱
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室本竜太
2. 発表標題 mRNA安定性制御機構を介する免疫毒性の研究
3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保優菜、室本竜太、松田正
2. 発表標題 急性肺障害におけるTyk2によるGR制御の役割
3. 学会等名 第8回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室本竜太、松田正
2. 発表標題 免疫・炎症応答におけるTyk2の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金光聡馬、大久保優菜、室本竜太、松田正
2. 発表標題 LPS誘導性急性肺障害におけるTyk2の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部丈一郎、宮下清隆、美濃口広弥、室本竜太、松田正
2. 発表標題 Tyk2欠損マクロファージにおけるGlo1遺伝子発現の上昇
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yu 庭馳、小森雄喜、室本竜太、松田正
2. 発表標題 NEDD化阻害はパラカスパーゼMALT1によるRegnase-1切断を惹起する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成家康太、斎野由佳、室本竜太、松田正
2. 発表標題 肺がん細胞におけるI B- 発現に対するB[a]Pの影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第148回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 室本 竜太, 成家 康太, 斎野 由佳, 松田 正
2. 発表標題 ベンゾ[a]ピレンはAhRを介してRegnase-1発現を抑制しIL-17応答を増強する
3. 学会等名 第28回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Komori, Ryuta Muromoto and Tadashi Matsuda
2. 発表標題 A neddylation inhibitor Pevonedistat inactivates Regnase-1 via MALT1-mediated cleavage
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成家康太、室本竜太、松田正
2. 発表標題 ベンゾ[a]ピレンはAhR依存的にRegnase-1発現を抑制しIL-17応答を増強する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室本 竜太、佐藤亜美、松田 正
2. 発表標題 I B- 遺伝子転写調節におけるSTAT1の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------