

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22689016

研究課題名（和文） RNA 分解酵素 Zc3h12a による免疫制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms of an RNase, Zc3h12a-mediated immune regulation.

研究代表者

竹内 理 (TAKEUCHI OSAMU)

京都大学ウイルス研究所・教授

研究者番号：10379092

研究成果の概要（和文）：RNA 分解酵素 Zc3h12a (Regnase-1) の自己免疫疾患発症抑制機構、及び炎症時の Regnase-1 制御メカニズムに関し検討を行い、Regnase-1 蛋白質が感染に対し IκB キナーゼによりリン酸化を受け、分解されること、また、Regnase-1 が自然免疫細胞のみでなく T 細胞の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the role of an RNase Regnase-1 (also known as Zc3h12a) in the prevention of the development of autoimmune diseases, and found that Regnase-1 expressed in T cells as well as macrophages is critical for this task. Furthermore, Regnase-1 protein expression is dramatically regulated in the course of inflammation in these cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2012 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：炎症・サイトカイン・mRNA 安定性・自然免疫・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

病原体の感染は自然免疫により認識され、初期感染防御応答が惹起される。マクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞は、病原体に特徴的な分子パターンを Toll-like receptor (TLR) などの受容体を用いて認識する。また、自然免疫システムは獲得免疫系の活性化にも深く関わっている。自然免疫細胞が TLR を介して病原体感染を検知すると、細胞内シグナル伝達経路を活性化し、NFκB や IFN-regulatory factor (IRF) など転写因子の核移行が起こり、様々な遺伝子の発現を促す。これら遺伝子群からサイトカインやケモ

カイン、異なる転写因子など多様な蛋白質が生成され、炎症応答を制御している。過剰な免疫応答は敗血症性ショックや自己免疫疾患などにつながるのに対し、免疫応答が十分に起こらないと易感染性となる。免疫応答は様々な分子により調節されているが、この制御機構は十分に明らかとなっていない。

私は、マクロファージにおいて TLR により発現誘導される遺伝子群を microarray を用い網羅的に解析し、TLR 刺激により早期に発現誘導される遺伝子として Zc3h12a を同定した (Matsushita, Takeuchi et al. Nature 2009)。Zc3h12a は CCCH 型 Zinc finger (Zf)

モチーフを持つ蛋白質で、Zc3h12a 遺伝子欠損マウスを作製すると、このマウスは自己免疫性炎症性疾患を自然発症し、ほとんどのマウスが生後 12 週までに死亡した。Zc3h12a 欠損マウス由来マクロファージは TLR 刺激に対する IL-6 や IL-12p40 を始めとしたいくつかの遺伝子発現が野生型と比較して著明に増加していた。このメカニズムを解析すると、Zc3h12a が IL-6 や IL-12p40 などの mRNA をその 3' -untranslated region (UTR) を介して不安定化していることを明らかにした。Zc3h12a の強制発現は IL-6 mRNA 3' -UTR の stem-loop 領域を介して mRNA の発現を低下させた。Zc3h12a は Zf モチーフを介して RNA と結合した。また、Zc3h12a は新規 nuclease 領域を持ち、実際に IL-6 3' -UTR RNA を切断する endonuclease 活性を持つ事を明らかにした。この RNase 活性は Zc3h12a による IL-6 mRNA の不安定化に必須であった。この様に、TLR により発現誘導される Zc3h12a が自然免疫応答制御に重要であることから、この分子を Regulatory RNase (Regnase)-1 と命名した。

2. 研究の目的

Regnase-1 は自然免疫だけではなく獲得免疫系の調節にも関わっている事が示唆される。実際に Regnase-1 欠損マウスは、野生型と比較してエフェクター/メモリー T 細胞やプラズマ細胞、クラススイッチ後の B 細胞の著明な増加を認め、血中の様々なクラスの抗体産生が野生型と比べ増加していた。Regnase-1 は T 細胞や B 細胞においても発現しており、直接 T、B 細胞において遺伝子発現を mRNA 分解を介して調節している可能性が考えられる。しかしながら、実際にどのような遺伝子をコントロールしているか、またそのメカニズムも分かっていない。獲得免疫活性化における mRNA 制御の役割は若干ではあるが解析されている。これまでの報告により RING フィンガー領域と CCCH 型 Zf を持つ蛋白質である Roquin は共刺激分子である ICOS の発現を制御することで follicular T 細胞の過剰な増殖を抑制し自己免疫疾患の発症を制御している事が明らかとなっている。

更に、Regnase-1 がどのように制御を受け、炎症応答を制御しているかのメカニズムも不明であった。本研究では、Regnase-1 の獲得免疫系における役割、Regnase-1 の制御機構解析から、免疫応答の RNA 制御による調節メカニズムを明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Regnase-1 の獲得免疫系における役割

の解析

Regnase-1 の獲得免疫細胞、特に T 細胞における役割を解析するために Cre-loxP システムを用い、まず、Regnase-1 flox マウスを作製した。このマウスを、T 細胞特異的に Cre を発現する CD4-Cre もしくは Lck-Cre マウスと交配し、T 細胞特異的 Regnase-1 欠損マウスを作製した。このマウスを用いて、組織学的解析を行ったほか、免疫細胞の分布やその活性化状態を、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、このマウスの脾臓もしくはリンパ節より CD4+T 細胞を調整し、T 細胞受容体 (TCR) 刺激に対する応答を解析したほか、T 細胞より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析を行った。

(2) Regnase-1 蛋白質制御機構の解析

Regnase-1 に対する抗体を作製し、Western blot 法を用いて様々な臓器や細胞における Regnase-1 発現を検討すると共に、マクロファージや T 細胞において、それぞれ TLR 刺激や TCR 刺激後の時間経過に対する Regnase-1 発現を同様に解析した。また、Regnase-1 発現変化の分子メカニズムを、I κ B キナーゼ、Bcl10、MALT1/paracaspase などを欠損する細胞を用いて解析した。また、TLR 刺激に対する、IL6 mRNA の半減期を Actinomycin D で細胞を処理することにより転写を停止させ、その後の mRNA の発現変化を QPCR 法で追うことにより解析した。

4. 研究成果

(1) Regnase-1 の獲得免疫系における役割の解析

Regnase-1 の Exon 4 を 2 つの LoxP サイトで取り囲んだ Flox マウスの作製に成功した。このマウスを CD4-Cre もしくは Lck-Cre マウスと掛け合わせることで、T 細胞において特異的に Regnase-1 が欠失していることを確認した。この T 細胞特異的 Regnase-1 欠損マウスは、全身性に Regnase-1 を欠損するマウスと同様に、脾腫、リンパ節腫脹を認め、約 8 週移行に死亡していった。このマウスは、抗核抗体などの自己抗体を産生すると共に、プラズマ細胞の増多、様々な臓器への炎症細胞浸潤を認めた。また、脾臓における T 細胞を解析すると、そのほとんどが CD44^{hi}CD62L⁻のエフェクター細胞であり、TCR や PMA/ionomycin 刺激に対して多量の IFN- γ などエフェクターサイトカインを産生した。この Regnase-1 を欠損する CD4 T 細胞をレシピエントマウスに移入すると 3 ヶ月後にドナー細胞の生着、レシピエント B 細胞の活性化などを認め、Regnase-1 欠損 T 細胞のみで炎症性疾患を発症しうる事が示された。従って CD4 T 細胞に発現する Regnase-1

が自己免疫疾患発症抑制に重要である事が明らかとなった。

次に **Regnase-1** 欠損 CD4 T 細胞においてどのような標的 mRNA を制御しているかトランスクリプトーム解析を行いコントロール T 細胞と比較した。**Regnase-1** 欠損 T 細胞では、**Il6** に加えて **c-Rel** や **ICOS**、**OX40**、**IL2** をコードする mRNA が上昇していた。また、**Regnase-1** 強制発現によりこれら mRNA の分解が亢進し、**Regnase-1** はこれら mRNA を直接の標的として分解していると考えられた。また、**Regnase-1** と **c-Rel** を共に欠損するマウスを作製したところ、**Regnase-1** 単独欠損マウスに比較してエフェクター T 細胞、プラズマ細胞の増加が改善し

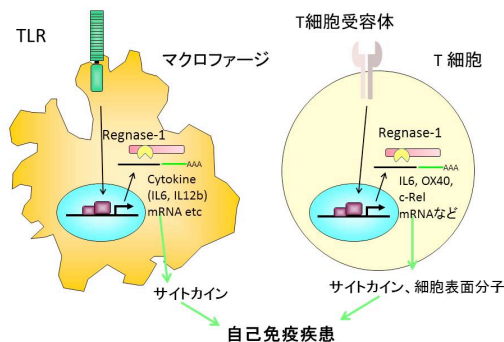


図1 **Regnase-1**による細胞種特異的の自己免疫疾患抑制メカニズム

ており、**c-Rel** が **Regnase-1** の標的として T 細胞活性化に一定の役割を果たしている事が示された。

このように、**Regnase-1** は CD4 T 細胞で特異的標的 mRNA を分解することにより自己免疫炎症性疾患の発症を抑制していることが明らかとなった (発表論文 (1))。

(2) **Regnase-1** 蛋白質制御機構の解析

Regnase-1 の発現を検討する目的で、マウス **Regnase-1** 抗体を作製した。Western blot 解析の結果 **Regnase-1** 蛋白質は未活性化マクロファージにも発現しているが、TLR 刺激に対し、急速に発現が低下する事が明らかとなった。更なる解析により **Regnase-1** は **IRAK-IkB kinase** 経路によりリン酸化を受けユビキチンプロテアソーム型により分解されることを見出した。このシステムにより TLR 刺激に対し **IL-6 mRNA** が安定化することで迅速で十分な **IL-6** 産生が起こると考えられた (発表論文 (7))。

次に、T 細胞においても同様の **Regnase-1** 制御システムが存在するかを検討した。T 細胞では、**IL-18** などのサイトカイン刺激に対しては **IkB** キナーゼ経路により分解されたが、T 細胞による抗原認識に対しては全く異なるメカニズムにより制御を受けている事

が明らかとなった。T 細胞受容体刺激に対し **Regnase-1** はプロテアーゼである **MALT1** により切断を受け、分解を受けていた。**MALT1** の活性を阻害すると T 細胞受容体刺激に対する **Regnase-1** 標的 mRNA の半減期が短くなることから、**MALT1** による **Regnase-1** 分解は mRNA 安定性の調節にも重要であると考えられた。結果として T 細胞の活性化関連遺伝子の発現を促進することが明らかとなった。

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 9 件)

- (1) Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, Matsushita K, Hernandez Cuellar E, Kuniyoshi K, Satoh T, Mino T, Suzuki Y, Standley DM, Tsujimura T, Rakugi H, Isaka Y, Takeuchi O and Akira S, Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4+ Helper T Cells Regulates Immune Activation, *Cell*, 査読有, 2013 23;153:1036-49. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.034.
- (2) Fukasaka M, Ori D, Kawagoe T, Uematsu S, Maruyama K, Okazaki T, Kozaki T, Imamura T, Tarte S, Mino T, Satoh T, Akira S, Takeuchi O Critical Role of AZI2 in GM-CSF-Induced Dendritic Cell Differentiation., *J Immunol*. 査読有, 2013 190:5702-11. doi: 10.4049/jimmunol.1203155.
- (3) Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S., Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature*, 査読有, 2013, 495, 524-8
- (4) Ori D, Kato H, Sanjo H, Tarte S, Mino T, Akira, S, Takeuchi O., Essential Roles of K63-Linked Polyubiquitin-Binding Proteins TAB2 and TAB3 in B Cell Activation via MAPKs. *J Immunol*. 査読有, 2013, 190, 4037-45 DOI: 10.4049/jimmunol.1300173. Maruyama K, Fukasaka M, Vandenbon A, Saitoh, T, Kawasaki T, Kondo T, Yokoyama KK, Kidoya, H., Takakura N,
- (5) Standley D, Takeuchi O, Akira S. The transcription factor Jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial

- immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation. *Immunity*, 査読有, 2012, 37, 1024-36
DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.022.
- (6) Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, Akira S, Takeuchi O. TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation. *J Biol Chem*, 査読有, 2012, 287, 29114-24
DOI: 10.1074/jbc.M112.347799
- (7) Iwasaki, H., Takeuchi, O., Teraguchi, S., Matsushita, K., Uehata, T., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Saitoh, T., Matsushita, M., Standley, D.M., Akira, S. The I κ B Kinase Complex Regulates the Stability of Cytokine-encoding mRNA Induced by TLR-IL-1R by Controlling Degradation of Regnase-1. *Nat. Immunol.*, 査読有, 12, 1167-1175 (2011). doi: 10.1038/ni.2137.
- (8) Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Matsushita, K., Kumagai, Y., Vandenbon, A., Tani, T., Muta, T., Akira, S., Takeuchi, O. I κ B ζ Is Essential for Natural Killer Cell Activation in Response to IL-12 and IL-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 107, 17680-17685 (2010). doi: 10.1073/pnas.1012977107.
- (9) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

〔学会発表〕(計6件)

- ① 竹内 理、RNA分解酵素Regnase-1による自然免疫制御、日本生化学会大会、2012年12月14日～2012年12月16日、福岡
- ② Takeuchi, O. Posttranscriptional control of inflammation. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日～2012年12月14日, 福岡
- ③ Takeuchi, O. Review Talk: Systems Immunology—最近の動向. Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 2012年11月21日～2012年11月22日, Kobe

- ④ Takeuchi, O. Recognition of viral infection by innate immunity. Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”, 2012年11月21日～2012年11月22日, Tokyo
- ⑤ Takeuchi, O. Posttranscriptional control of inflammation by an RNase, Regnase-1., IEIIS2012, 2012年10月23日～2012年10月26日, Tokyo
- ⑥ Takeuchi, O. Posttranscriptional control of inflammation by an RNase, Regnase-1., 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, 2012年8月23日～2012年8月24日, Seoul

〔その他〕

ホームページ

http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Takeuchi_HP/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 理 (TAKEUCHI OSAMU)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号: 10379092