

令和 2 年 5 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：2017～2019

課題番号：17K08263

研究課題名（和文）IL-17A誘導性mRNA安定化応答が免疫疾患形成に果たす役割の解明

研究課題名（英文）The role of IL-17A-induced mRNA stabilization in immune-related diseases

研究代表者

室本 竜太（Muromoto, Ryuta）

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：30455597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は自己免疫疾患等の病態形成に重要な炎症性サイトカインIL-17の作用が起こるメカニズムの解明を目指した。IL-17特有の作用である「mRNA安定化作用」を原理として応用した測定実験系を用いて解析を進め、mRNA安定化に至るシグナル伝達過程に介在する分子を同定した。また、リン酸化酵素TBK1に対する阻害剤や多発性硬化症治療薬として知られるフマル酸ジメチルがmRNA安定化に至るシグナル伝達を抑制できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、サイトカインIL-17がmRNA安定化反応を介して炎症を促進する際の分子機構の一端が解明された。また、IL-17によって起こるmRNA安定化反応を抑制できる低分子化合物が同定された。このような効果をもつ化合物はIL-17に惹起される炎症を伴う免疫疾患の抑制に役立てられる可能性があり、また、研究のツールとして用いることで分子機構のさらなる詳細を解明するための後続研究に利用できる。

研究成果の概要（英文）：IL-17 is an inflammatory cytokine, which is important in the pathogenesis of autoimmune diseases. In this study we aimed to elucidate the mechanism of the IL-17 action. We have identified the molecules that mediate the signal transduction process in IL-17-induced mRNA stabilization. Further, we have found that dimethyl fumarate and TBK1 inhibitor can suppress the signal transduction leading to mRNA stabilization.

研究分野：生物系薬学

キーワード：IL-17 サイトカイン シグナル伝達 mRNA安定性制御 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の多くやアレルギー疾患は効果的な根治療法がなく対症療法による治療が中心である。ほとんどは慢性の病気で生涯にわたって薬剤で症状をコントロールする必要がある。効果的な治療法の開発には疾患の発症過程を詳しく明らかにすることが不可欠である。

炎症性サイトカインである IL-17 はさまざまな自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症に役割をもつことが明らかとなっている。IL-17 は、広範な種類の細胞に作用し、炎症性サイトカインやケモカイン産生促進、好中球遊走を強力に行うことにより炎症を誘導すると考えられている。しかし、疾患症状が形成される一連の継時推移の中で、IL-17 が生体のどの部位のどの細胞にどのような時間的タイミングで作用し、病態を形成させるのかは実際にはよくわかっていない。そこで、生体内で IL-17 応答が生じたことを検出する手法を確立することで、自己免疫やアレルギー疾患形成メカニズムの理解を深めることができると考えられる。

慢性炎症性皮膚疾患である乾癬は、世界全人口の 2-3%にもものぼる患者数の多い疾患である。その外観イメージなどから患者の生活の質 (QOL) は低下する。根治療法が無い疾患の一つで、治療では長期にわたり慢性症状をコントロールし QOL を向上させることが重要とされている。近年、発症メカニズムの理解が進み主に免疫細胞が産生する IL-17 が表皮ケラチノサイトに作用し、活性化と増殖を促し、それが炎症拡大の正のフィードバックループを形成させ病態につながるということが分かってきた。IL-17 やその受容体を標的とする抗体製剤が本邦でも認可され優れた治療成績をあげつつある。一方、生物学的製剤に対する抗薬剤抗体の出現や、高薬価の問題が解決すべき課題として残されており、異なる作用機序をもつ新規薬剤など治療選択肢のさらなる開発は未だ求められている。その達成には、ケラチノサイトの IL-17 応答メカニズムの解明が、手掛かりとなる可能性がある。

研究代表者はこれまでに、ケラチノサイト活性化を起こす IL-17 特有のシグナル伝達経路の同定をめざして研究を進め、1. IL-17 が表皮ケラチノサイトに作用し、転写調節機能をもつ核タンパク質 I B を発現誘導すること、2. I B は IL-17 によって誘導される遺伝子群の発現に大きく寄与することを見出した (Muromoto et al. Int Immunol. 2016)。国外では全ゲノム関連解析 (GWAS) によって I B 遺伝子座の近傍の一塩基多形が乾癬の感受性に関わると同定された。I B 欠損マウスの解析から、マウスでの乾癬様皮膚炎の発症に I B が必須であるとも報告された。これらの知見から、乾癬の病態形成における「IL-17-I B 軸」の役割が認識されつつあり、国内外で研究が進められている。

タンパク質 I B の発現誘導メカニズムの解明は、IL-17 応答の人為的制御法考案に資すると考えられる。研究代表者は遺伝子の転写後調節の過程、特に mRNA の分解/安定化のバランスによる量的調節の機構に着目し解析を進めており、高輝度蛍光タンパク質 Venus を用いたレポーター (図 1) を構築して予備検討実験した結果、I B mRNA の 3' 側にある非翻訳領域 (3' -UTR) が、IL-17 応答性発現に関わることを見出していた (図 2)。図 2 に示す通り、I B 3' -UTR を連結すると蛍光タンパク質 Venus の発現はコントロールに比べて顕著に減少する。従って I B 3' -UTR は mRNA に不安定性を与えると分かった。一方 IL-17 添加時には Venus 発現が増加することから、I B 3' -UTR のもつ mRNA 不安定化作用は IL-17 により動的に解除されると推察された。また、I B 3' -UTR 上の生物種間で保存された配列に点変異を導入すると、mRNA 不安定性が解除され Venus 発現が増加し、IL-17 応答性も消失した。以上より、IL-17 は特定の配列をもつ mRNA を標的として不安定性の解除 (安定化) を誘導すること、また、I B はその標的の一つとして発現増強され、乾癬など IL-17 依存性疾患に寄与すると考えられた。

興味深いことに、IL-17 による mRNA 安定化応答は、ケラチノサイトとは由来臓器が異なる HeLa 細胞などでも再現性よく観察できる。従って IL-17 受容体を発現する細胞に普遍的にみられる現象であると想定され、「I B mRNA の 3' -UTR」配列は、IL-17 応答を感知する「センサー」として研究に利用できると考えられた。

図1 IL-17A 応答 (mRNA 安定化応答) 蛍光レポーターの構築

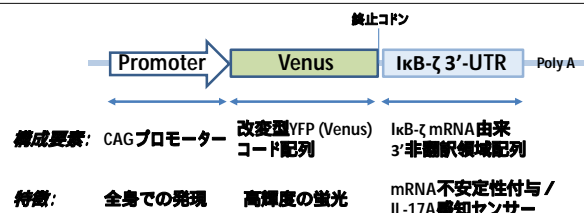
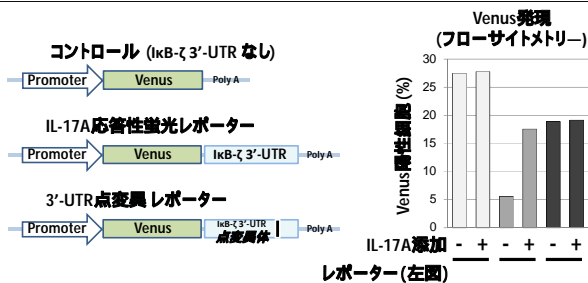


図2 IL-17A 誘導性 mRNA 安定化応答: IκB-ζ 3'-UTR 配列の関与



興味深いことに、IL-17 による mRNA 安定化応答は、ケラチノサイトとは由来臓器が異なる HeLa 細胞などでも再現性よく観察できる。従って IL-17 受容体を発現する細胞に普遍的にみられる現象であると想定され、「I B mRNA の 3' -UTR」配列は、IL-17 応答を感知する「センサー」として研究に利用できると考えられた。

2. 研究の目的

以上より、自己免疫疾患やアレルギーの病態形成に炎症性サイトカイン IL-17 が重要と考えられている一方、疾患形成過程において生体内で IL-17 の作用が起こる部位や経過を観察する手法が未確立であるため、実際には疾患への IL-17 関与のメカニズムには不明点が多い。研究代表者はこれまでに IL-17 が特有の mRNA 安定化作用を通じ、タンパク質 I B をコードする mRNA の量を増加させることを見出した。本研究ではその現象を応用し生体内で起こる IL-17 応答を蛍光レポーター発現により可視化するマウス (mRNA 安定化応答レポーターマウス) を作出することで新規実験系を確立すること、及び IL-17 応答活性化のメカニズムとその意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

図1のコンストラクトを用い mRNA 安定化応答可視化マウスを作出した。CAG プロモーターの制御下に発現し全身性の発現を得る。I B 3'-UTR は、Venus をコードする配列の終止コドン直後に連結され、Venus mRNA に不安定性を賦与し定常時発現を抑えるとともに IL-17 刺激時のセンサーとして機能する。実際にこのレポーターが IL-17 に応答して Venus タンパクを誘導することは培養細胞で確認された (図2)。プロモーターから poly A までの領域を用い、業者委託によりトランスジェニックマウス作出を行った。IL-17 依存性ヒト疾患である乾癬のマウスモデルとしてイミキモド誘導性皮膚炎を実施した。イミキモド含有クリームをマウス皮膚に塗布後、生体内での mRNA 安定化応答を Venus 蛍光を指標として蛍光顕微鏡観察やフローサイトメトリーで検出した。IL-17 による mRNA 安定化作用の分子メカニズム解析に際しては、図1の蛍光レポーターをルシフェラーゼに置き換えたレポーターを用いて同様の原理にて mRNA 安定化反応を検知させた上でルシフェラーゼ発光により mRNA 安定化を評価した。内在性 I B mRNA の量は逆転写-定量 PCR にて測定した。IL-17 応答調節への関与が示唆される分子に対する siRNA を用いて mRNA 安定化応答への関与を検証した。いくつかの市販化合物を用い、IL-17 誘導性 mRNA 安定化応答を阻害する化合物を探索した。

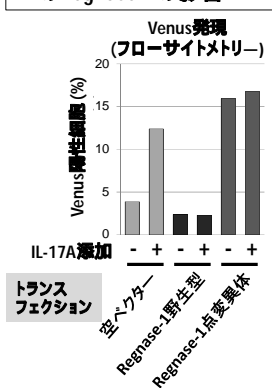
4. 研究成果

生体内での IL-17 作用が起こる部位や経過を観察する手法を確立するために、IL-17 が特定の mRNA の安定性を増大させる作用をもつことを原理とする IL-17 応答性蛍光レポーター遺伝子を導入した新規トランスジェニックマウスの作出に着手しマウスが誕生した。作出したトランスジェニックマウスを用いて IL-17 依存性皮膚炎症モデルであるイミキモド塗布による皮膚炎を解析した結果、病変部において蛍光レポーター発現が増加したことを実際に確認できた。しかしながらこの方法による検出ではさらに詳細なメカニズム解析に必要な十分な感度での蛍光タンパク質発現を本研究期間内の検討では達成することができなかった。検出感度面での課題を解決するために本事業終了後も研究を発展的に継続していく必要性が示された。

IL-17 による mRNA 安定化作用の分子機構の解明により自己免疫やアレルギー疾患形成メカニズムの理解を深めることができると考えられる。そのため IL-17 誘導性の mRNA 安定化応答を検出するレポーター遺伝子を培養細胞に導入することで IL-17 応答の in vitro 評価系を確立し、この評価系を利用して IL-17 のもつ mRNA 安定化作用のメカニズム解析を進めた。先に図2において示した通り、IL-17 応答性蛍光レポーターの 3'-UTR 領域上に点変異を導入すると IL-17 応答性が消失することを見出していた。この変異導入部位については、細胞内で恒常的活性をもつ mRNA 分解酵素のひとつである Regnase-1 による認識 / 分解に関わる箇所であることが他研究グループによる先行研究で報告されたことに基づき、IL-17 による mRNA 安定化応答の分子機構には Regnase-1 の機能抑制が含まれると示唆された。実際に、mRNA 分解酵素である Regnase-1 の一過性強発現が IL-17 誘導性 Venus 発現を抑制した (図3)。また、Regnase-1 の酵素活性を失わせた点変異体の強発現は IL-17 の有無によらず Venus 発現を増加させ、内在性 Regnase-1 に対してドミナントネガティブに働くことを見出した (図3)。よって mRNA 分解酵素 Regnase-1 が I B 3'-UTR の mRNA 不安定性をもたらす本体であり、IL-17 による mRNA 安定化作用の分子機構としては、細胞内で恒常的活性をもつ Regnase-1 の機能が IL-17 刺激時に阻害されることが含まれることを見出し、原著論文として報告した (Muromoto et al., *ImmunoHorizons*, 2019)。

また科研費による本研究では、IL-17 に応答して起こる mRNA 安定化作用を促進または抑制する低分子化合物をそれぞれ同定した。IL-17 誘導性 mRNA 安定化応答を抑制することが新たに見出された化合物の一つであるフマル酸ジメチルについてその作用メカニズム解析を進め、原著論文として報告した (Ohgakiuchi et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2020)。まず IL-17 による mRNA 分解酵素機能阻害作用は、Regnase-1 に対する翻訳後修飾に付随して起こることが

図3 蛍光レポーター発現へのRegnase-1の影響



見出された。研究代表者らはこの翻訳後修飾がリン酸化酵素 TBK1 を介したリン酸化であり、TBK1 阻害化合物 BX-795 によって抑制できることを独自に見出していたが、我々が論文発表するよりも先行して大阪大学・審良静男教授らの研究グループにより Regnase-1 機能のリン酸化による調節についての報告がなされた。従って IL-17 誘導性 mRNA 安定化応答が Regnase-1 リン酸化と関連して起こることは異なる研究グループ間で再現されていたところであったが、この IL-17 刺激時の Regnase-1 リン酸化が多発性硬化症治療薬として臨床で用いられているフマル酸ジメチルによって阻害されることが我々の研究で見出された。フマル酸ジメチルによる処理は IL-17 の細胞内シグナル伝達における必須アダプタータンパク質である ACT1 の細胞内局在を未処理時とは異なる局在へと変化させた。以上より、フマル酸ジメチルは ACT1 に影響を及ぼすことで Regnase-1 の翻訳後修飾 / 機能阻害に至るシグナル伝達を妨げる効果を有する化合物として本研究にて初めて同定された。このような効果をもつ化合物は細胞における Regnase-1 の mRNA 分解機能を維持することできると考えられるため、炎症疾患を抑制することに役立てられることが示唆された。このように本研究で同定されたいくつかの化合物は IL-17 誘導性 mRNA 安定化を介して起こる炎症反応を人為的にコントロールすることに応用したり、分子機構のさらなる詳細解明を目指す後続の研究のために利用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Muramoto Ryuta, Tawa Keisuke, Ohgakiuchi Yui, Sato Ami, Saino Yuka, Hirashima Koki, Minoguchi Hiroya, Kitai Yuichi, Kashiwakura Jun-ichi, Shimoda Kazuya, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 3
2. 論文標題 I B- Expression Requires Both TYK2/STAT3 Activity and IL-17-Regulated mRNA Stabilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 172 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.1900023	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 Ohgakiuchi Yui, Saino Yuka, Muramoto Ryuta, Komori Yuki, Sato Ami, Hirashima Koki, Kitai Yuichi, Kashiwakura Jun-ichi, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 521
2. 論文標題 Dimethyl fumarate dampens IL-17-ACT1-TBK1 axis-mediated phosphorylation of Regnase-1 and suppresses IL-17-induced I B- expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 957 ~ 963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.036	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 Hirashima Koki, Muramoto Ryuta, Minoguchi Hiroya, Matsumoto Tomohiro, Kitai Yuichi, Kashiwakura Jun-ichi, Shimoda Kazuya, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 130
2. 論文標題 The mechanism of Tyk2 deficiency-induced immunosuppression in mice involves robust IL-10 production in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 155077 ~ 155077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2020.155077	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 Takahashi Miki, Muramoto Ryuta, Kojima Hiroyuki, Takeuchi Shinji, Kitai Yuichi, Kashiwakura Jun-ichi, Matsuda Tadashi	4. 巻 489
2. 論文標題 Biochanin A enhances ROR activity through STAT3-mediated recruitment of NCOA1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 503 ~ 508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.05.181	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19件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 齋野由佳、大垣内優衣、室本竜太、松田正
2. 発表標題 IL-17/TBK1シグナルによる I B- mRNA安定化機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小森雄喜、大垣内優衣、齋野由佳、室本竜太、松田正
2. 発表標題 IL-17誘導性 I B- mRNA安定化応答におけるACT1の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室本竜太、佐藤亜美、松田正
2. 発表標題 STAT1 acts as a negative regulator of I B- gene transcription
3. 学会等名 第26回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ami Sato, Ryuta Muromoto, Tadashi Matsuda
2. 発表標題 Opposing roles of STAT1 and STAT3 in I B- gene transcription
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 室本 竜太、平島 洸基、美濃口 広弥、松田 正
2. 発表標題 Tyk2欠損マウスにおける免疫反応抑制にはマクロファージでのIL-10産生増強が関与する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美濃口広弥 平島洸基 室本竜太 松田正
2. 発表標題 抗炎症サイトカインIL-10産生機構におけるTyk2の関与
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斎野由佳 大垣内優衣 室本竜太 松田正
2. 発表標題 転写子コアクチペーターI B- mRNA安定化機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室本竜太、大垣内優衣、斎野由佳、佐藤亜美、多和佳佑、松田正
2. 発表標題 角化細胞におけるIL-17誘導性I B- 発現機構の解析
3. 学会等名 第25回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koki Hirashima, Ryuta Muromoto and Tadashi Matsuda
2. 発表標題 Tyk2 regulates Protein kinase A-IL-10 pathway and promotes inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会 The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yui Ohgakiuchi, Ryuta Muromoto, Tadashi Matsuda
2. 発表標題 Constitutive post-transcriptional suppression of I B- expression mediated by Regnase-1 is counteracted by IL-17 signaling
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斎野由佳、大垣内優衣、室本竜太、松田正
2. 発表標題 IL-17誘導性I B- mRNA安定化へのTBK1の関与
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大垣内優衣、多和佳佑、室本竜太、松田 正
2. 発表標題 表皮角化細胞におけるI B- 発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第144回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平島洸基、室本竜太、松田正
2. 発表標題 P. acnes誘導性炎症応答とTyk2の新規機能
3. 学会等名 第54回日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大垣内優衣、多和佳佑、室本竜太、松田正
2. 発表標題 表皮角化細胞におけるIL-17誘導性I B- 発現機構の解明
3. 学会等名 第54回日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 室本 竜太、多和 佳佑、大垣内 優衣、松田 正
2. 発表標題 JAKファミリーキナーゼ阻害が角化細胞のIL-17応答に及ぼす影響
3. 学会等名 第24回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平島 洸基、室本 竜太、松田 正
2. 発表標題 P. acnes誘導性急性炎症におけるTyk2の新たな役割
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryuta Muromoto, Keisuke Tawa, Yui Ohgakiuchi and Tadashi Matsuda
2. 発表標題 TYK2-mediated basal STAT3 activity and IL-17-induced mRNA stabilization coordinately dictate the expression level of I B- in keratinocytes
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryuta Muromoto and Tadashi Matsuda
2. 発表標題 Basal STAT3 activity maintained by TYK2 is required for IL-17-induced I B- expression in keratinocytes
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koki Hirashima, Ryuta Muromoto and Tadashi Matsuda
2. 発表標題 Tyk2 positively regulates P. acnes-induced acute inflammation
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017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
---------	---------------------------	-----------------------	----