

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06221・19K21323

研究課題名(和文) 2型自然リンパ球におけるRegnase-1を標的とした特発性肺線維症新規治療戦略

研究課題名(英文) Regnase-1-mediated regulation of group 2 innate lymphoid cells and its significance in idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

中塚 賀也 (Nakatsuka, Yoshinari)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：40826492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Regnase-1による2型自然リンパ球(ILC2)の機能制御機構と、それが特発性肺線維症(IPF)の病態にいかに関与するか明らかにすることを目的とした。Regnase-1欠損マウスの肺ではILC2が著増しており、Regnase-1欠損ILC2はマウスの肺線維症を促進することが明らかとなった。この結果と一致して、IPF患者の気管支肺胞洗浄液中ILC2数はRegnase-1発現量と負に相関し、末梢血中ILC2数増多はIPF患者の予後不良と関連した。本研究結果からRegnase-1がILC2の増殖や活性化を制御することで、マウス及びヒトにおける肺線維症の悪化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、RNA分解酵素であるRegnase-1が、2型自然リンパ球の増殖や活性化を調節することにより、肺線維症の進行を抑制している可能性が示された。ILC2の制御機構として、RNAの安定性制御に関わる因子を同定したのは本研究が初めてである。また、特発性肺線維症は治療法が乏しく、病態についても不明な点が多いことから、本研究から得られた成果は将来的にRegnase-1を標的とした未知の病態解明や、新規の治療法開拓につながり得るものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated Regnase-1-mediated regulatory mechanism of group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) and its role in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). We found the overt increase of pulmonary ILC2s in mice lacking Regnase-1, and Regnase-1-deficient ILC2s promoted pulmonary fibrosis in mice. Consistently, we revealed that there was a negative correlation between ILC2s in bronchoalveolar lavage and their Regnase-1 expression levels, and that the number of ILC2s in peripheral blood was associated with poor survival of IPF patients. Collectively, Regnase-1 contributed to the progression of pulmonary fibrosis of mice and human by regulating the proliferation and activation of ILC2s.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：特発性肺線維症 2型自然リンパ球 Regnase-1

1. 研究開始当初の背景

2型自然リンパ球(ILC2)は、抗原刺激非依存性に Type 2 ヘルパーT細胞(Th2)と類似したサイトカイン分泌能を有する細胞として近年同定された自然リンパ球である。ILC2はIL-5やIL-13などアレルギー性疾患の発症・増悪に寄与する Type 2 サイトカインを多量に分泌することから、呼吸器疾患では特に喘息の病態と強く関連することが示されているが、他の呼吸器疾患における ILC2 の役割については知見が乏しい。また、その機能を制御するメカニズムについても、不明な点が多い。

IL-13などの Type 2 サイトカインは、アレルギー疾患のみならず、組織の線維化にも大きく寄与することが最近になって明らかになってきている¹。特に ILC2 は、プレオマイシン刺激によるマウスの肺線維症モデルにおいて、線維化の増強に寄与することが示されている²。しかしながら、ILC2 のヒト肺線維症における臨床的な意義については報告がない。ヒトの肺線維化疾患として代表的なものに、特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis, 以下 IPF)がある。IPF は平均的な生存期間が 3 年程度と予後不良な疾患であるが、いまだその病態には不明な点が多く、また薬物治療の効果は限定的であることから、未知の病態解明や新たな治療標的の同定が望まれている。

申請者らは、これまで mRNA 分解酵素である Regnase-1 に着目し、この分子が T 細胞をはじめとした免疫細胞や、気道上皮細胞での炎症応答の調節に重要であることを報告した^{3,4}。Regnase-1 は、IL-6 や CXCL1 など炎症に関連する分子の mRNA を標的とし、これらを分解することで過剰な炎症応答を抑制する分子であるが⁵、最近になって Regnase-1 が Th2 の分化や機能を制御するとの報告がなされた⁶。Th2 と ILC2 は共通した制御機構を有することから、Regnase-1 が ILC2 の増殖や機能にも関与するのではないかと、また肺線維症の病態にも関連するのではないかと仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子改変マウスやプレオマイシン投与による肺線維症モデルマウスを用いて Regnase-1 による ILC2 の制御機構を解析するとともに、IPF における Regnase-1 や ILC2 の臨床的意義を、患者由来検体を用いて評価することを目的とした。

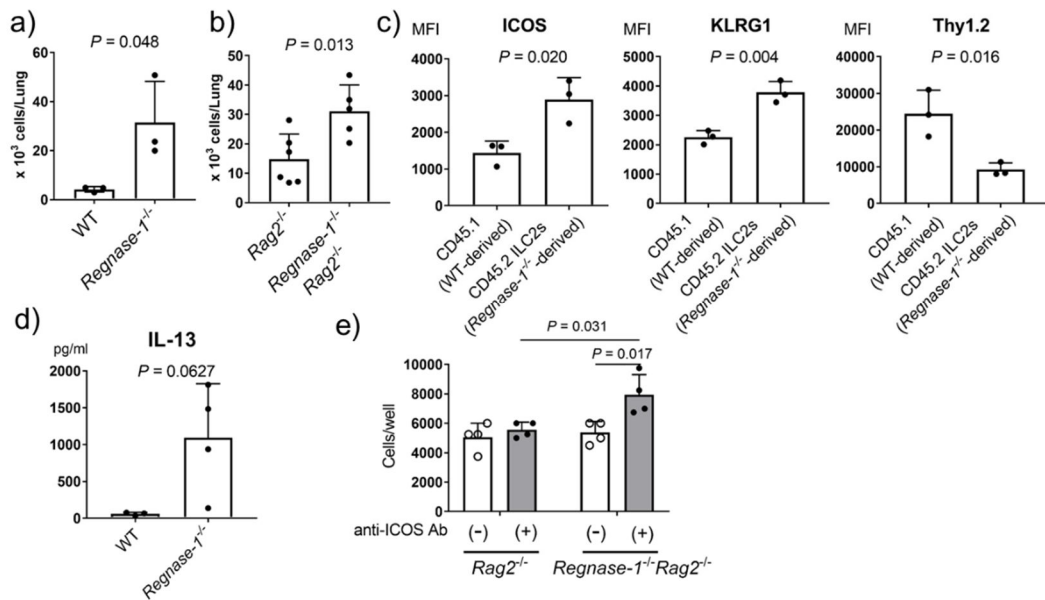
3. 研究の方法

a) ILC2 における Regnase-1 の機能を解析するために、*Regnase-1*^{-/-}マウスおよび、成熟 T 細胞を欠損する *Rag2*^{-/-}*Regnase-1*^{-/-}マウスを用いた。FACS ソーティングにより ILC2 単離、IL-2 および IL-7 (各々 10ng/ml)存在下に培養した。また、Regnase-1 欠損により自然発症する炎症の影響をコントロールするために、CD45.1 コンジェニックマウスをレシピエントとした CD45.1 野生型マウスと CD45.2 *Regnase-1*^{-/-}マウスの competitive bone marrow transfer (cBMT) モデルを用いた。肺線維症モデルマウスとして、リンパ球欠損マウスである *Rag2*^{+/-}*cyt*^{-/-}マウスに対するプレオマイシン 0.15 unit/head の気管内投与モデルを使用した。

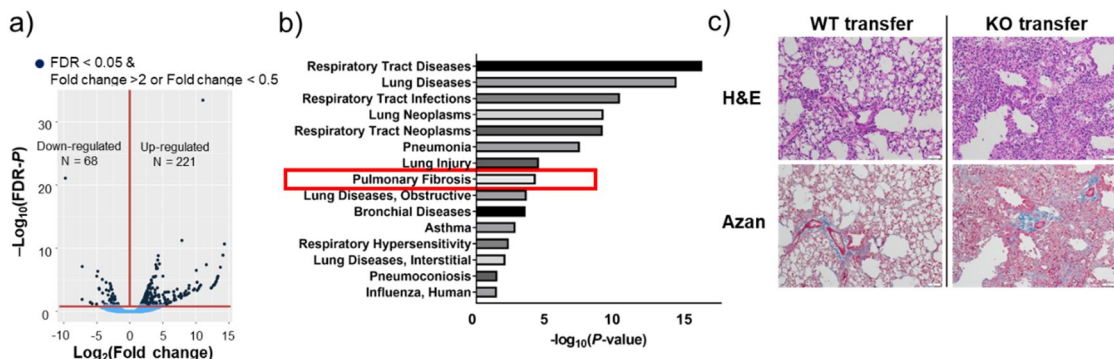
b) 京都大学医学部附属病院で診断した IPF 患者 25 例から得られた気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いて、フローサイトメトリーで BALF 中の ILC2 における Regnase-1 の発現量を定量した。また、IPF 患者 49 例の末梢血液中の IPC2 数を定量し、臨床経過との関連性を検討した。

4 . 研究成果

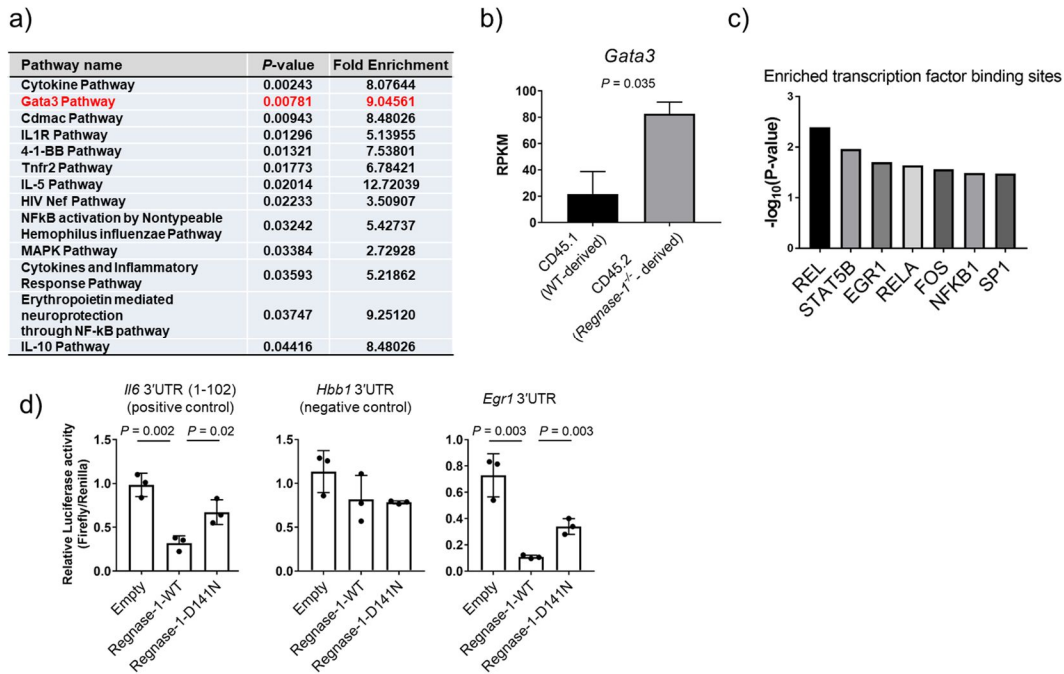
Regnase-1^{-/-}マウスおよび、*Rag2*^{-/-}*Regnase-1*^{-/-}マウスの肺では、コントロールに比べて ILC2 が増加していた(a、b)。cBMT モデルを用いて FACS により各種マーカーの解析を行った結果、KLRG1 の高発現や Thy1.2 の低発現など、ILC2 の活性化を示唆する所見が見られ(c)、炎症による刺激と独立した cell intrinsic な活性化が示唆された。そのため in vitro での培養によりサイトカイン産生を評価したところ、*Regnase-1* 欠損マウス由来 ILC2 は野生型マウス由来 ILC2 に比べ IL-13 産生が著しく亢進していることが明らかとなった(d)。また *Regnase-1* 欠損 ILC2 の細胞表面には細胞増殖に関わる共刺激分子である ICOS の発現が亢進していたことから、ICOS 刺激抗体存在下で培養を行ったところ、有意な増殖の促進が得られた(e)。以上から、*Regnase-1* は ILC2 の活性化と増殖を制御することが明らかとなった。



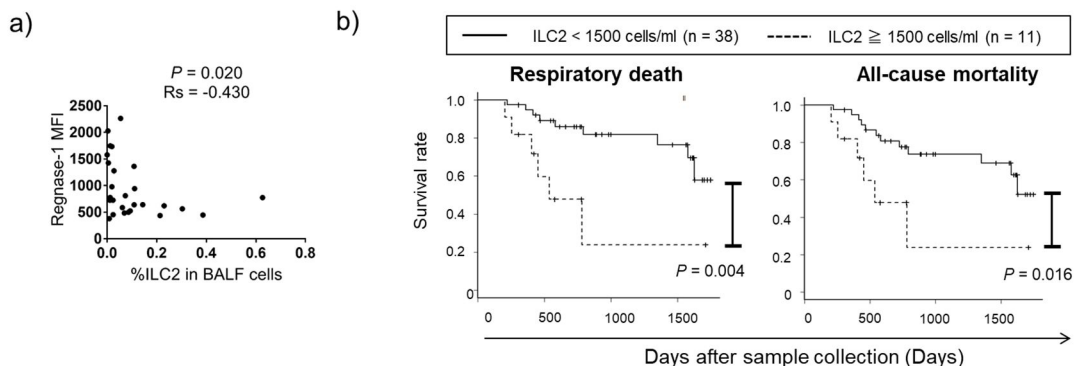
cBMT モデルマウスの肺から単離した ILC2 を用いて、野生型および *Regnase-1* 欠損 ILC2 から RNA を抽出し、RNA シークエンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。疾患と遺伝子の関連性についてのデータベースである Comparative Toxicogenomics Database を用いて、有意な発現亢進遺伝子と関連するヒト疾患をスクリーニングしたところ、気管支喘息よりも強い相関を示した疾患として肺線維症が同定された(a、b)。実際に *Regnase-1* 欠損 ILC2 が肺線維症を増悪させるか否かを検証するため、*Rag2*^{-/-}*cyt*^{-/-}マウスにプレオマイシン気管内投与を行い、投与翌日に培養 ILC2 (1.5×10^5 cells/head)の気管内移入を行ったところ、*Regnase-1* 欠損 ILC2 移入マウスでは野生型 ILC2 移入マウスに比べ肺線維化の増強が認められたことから、*Regnase-1* 欠損 ILC2 の線維化促進機能が示された(c)。



一方、線維化に関連する発現亢進遺伝子群について pathway 解析を行ったところ、GATA3 pathway の enrichment を認めた(a)。既報でも *Gata3* mRNA は Regnase-1 の直接の標的であると示されており、本研究でも一致した結果が得られた(b)。また、線維化関連遺伝子のプロモーター領域に関連する転写因子のスクリーニングを行ったところ、トランスクリプトーム解析で発現亢進遺伝子として同定されている EGR-1 結合配列の enrichment を認めた(c)。Luciferase reporter assay では *Egr1* mRNA の 3 末端非翻訳領域は Regnase-1 存在下に不安定化されることが明らかとなり(d)、Regnase-1 は *Gata3* および *Egr1* の mRNA の安定性を制御することで、ILC2 の線維化促進機能を調節している可能性が示唆された。



次に、IPF 患者由来検体を用いて Regnase-1 と ILC2 の臨床的意義を検討した。細胞内染色により BALF 中の ILC2 における Regnase-1 の発現量と BALF 細胞中の ILC2 の割合を解析したところ、両者に有意な負の相関を認めた(a)。次に、末梢血中の ILC2 数と IPF 患者の臨床経過を検討したところ、末梢血 ILC2 数 ≥ 1500 cells/ml の群では、それ以下の群に比べ有意に生命予後が不良であることが明らかとなった(b)。さらに呼吸機能や年齢・性別などを因子に含む Cox-proportional hazard test による多変量解析においても、末梢血 ILC2 数 ≥ 1500 cells/ml は生命予後不良に関する有意な因子であった(c)。



c)

Factor	Hazard ratio (95%CI)	P-value
Univariate analysis		
ILC2 > 1500 cells/ml	4.28 (1.48 – 12.38)	0.007
Age	1.00 (0.92 – 1.08)	0.918
Male sex	0.49 (0.12 – 1.55)	0.197
Corticosteroid usage	2.41 (0.68 – 8.58)	0.175
%FVC	0.95 (0.92 – 0.99)	0.005
%DLco	0.91 (0.86 – 0.97)	0.002
PaO ₂	0.97 (0.93 – 1.00)	0.067
Brinkman index	0.99 (0.99 – 1.00)	0.478
6MWT SpO ₂ minimum	0.88 (0.82 – 0.93)	< 0.0001
Multivariate analysis (Stepwise)		
ILC2 > 1500 cells/ml	7.18 (1.66 - 31.01)	0.008
Brinkman index	1.00 (0.99 - 1.00)	0.082
PaO ₂	1.06 (0.98-1.13)	0.130
6MWT SpO ₂ minimum	0.74 (0.62-0.88)	0.0008

以上の結果から、Regnase-1 が肺における ILC2 の増殖と活性化を制御し、その線維化促進機能を抑制していることが明らかとなった。また、ヒトにおいても肺の ILC2 における Regnase-1 発現が低下すると ILC2 が増加することが示唆され、末梢血における ILC2 数の増加が IPF の進行と相関する可能性が示された。本研究の成果をもとにして、ILC2 における Regnase-1 を標的とした創薬を目標にさらなる研究を進める予定としている。

参考文献

1. Gieseck RL, 3rd, Wilson MS, Wynn TA. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**(1): 62-76.
2. Li D, Guabiraba R, Besnard AG, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**(6): 1422-32 e11.
3. Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, et al. Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. *Cell* 2013; **153**(5): 1036-49.
4. Nakatsuka Y, Vandenbon A, Mino T, et al. Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia. *Mucosal Immunol* 2018; **11**(4): 1203-18.
5. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, et al. Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell* 2015; **161**(5): 1058-73.
6. Peng H, Ning H, Wang Q, et al. Monocyte chemotactic protein-induced protein 1 controls allergic airway inflammation by suppressing IL-5-producing TH2 cells through the Notch/Gata3 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **142**(2): 582-94 e10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshinari Nakatsuka1,, Tomohiro Handa, Kazuo Chin, Toyohiro Hirai, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Regnase-1 controls pro-fibrotic function of group 2 innate lymphoid cells in the lung
3. 学会等名 Keystone symposium (Transcription and RNA Regulation in Inflammation and Immunity) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 中塚賀也、半田知宏、谷澤公伸、渡邊創、村瀬裕子、庭本崇史、池上直弥、中西智子、陳和夫、竹内理、平井豊博
2. 発表標題 特発性肺線維症における2型自然リンパ球の意義に関する包括的検討
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019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
---------------------------	-----------------------	----