

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07079

研究課題名(和文)mRNA分解酵素Regnase-1の新規ユビキチン化を介した免疫制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a Novel Mechanism of Regnase-1-mediated mRNA Decay via Ubiquitination

研究代表者

植畑 拓也(Uehata, Takuya)

京都大学・医学研究科・准教授

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)：mRNA分解酵素Regnase-1 (Reg1)は免疫細胞の活性化制御において重要な役割を持つ。本研究ではReg1と相互作用するタンパク質に関する網羅的解析から、Reg1のユビキチン化に関与するKlh121を同定した。T細胞特異的Klh121欠損マウスを作製したところ、興味深いことに、脾臓やリンパ節は腫大化しており脾臓細胞中のT細胞の大部分がエフェクター細胞に変化していた。血清中には抗ds-DNA抗体が検出されたことから、Klh121はT細胞による自己応答を抑制していることが示唆された。以上の結果、Klh121はT細胞による免疫恒常性維持におい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

癌免疫治療を中心とした研究において、Reg1を標的としたT細胞活性化制御に注目が高まっている。本研究はReg1の機能を制御する候補分子の中から、タンパク質修飾の一つであるユビキチン化に関わる新たな免疫制御分子Klh121を同定した。Klh121遺伝子を欠損したT細胞は野生型と比較してより強いエフェクター機能を発揮することを見出した。Klh121を介したReg1の機能制御の仕組みを理解することにより、将来的に癌免疫療法において新たな治療戦略を生み出すことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The mRNA decay enzyme Regnase-1 (Reg1) plays a crucial role in the regulation of immune cell activation. In this study, through a comprehensive analysis of proteins interacting with Reg1, we identified Klh121 as being involved in the ubiquitination of Reg1. Interestingly, T cell-specific Klh121-deficient mice showed the enlargement of spleen and lymph nodes, with the majority of splenic T cells converting into effector cells. Analysis of serum from these mice revealed presence of anti-dsDNA antibodies, suggesting that Klh121 suppresses self-responses by T cells. These results demonstrate that Klh121 plays a crucial role in maintaining immune homeostasis via the control of T cell activation.

研究分野：免疫学

キーワード：ユビキチン化 mRNA分解 T細胞 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症応答における遺伝子発現において転写制御は炎症誘導の初動に重要である一方、転写後制御は炎症応答の強さや持続時間に大きな影響を与えることが広く認知されている。我々は、mRNA 分解酵素である Regnase-1 が炎症性サイトカインなどをコードする mRNA の不安定化により、炎症応答を負に制御することを明らかにしてきた。さらに炎症応答のみならず、T 細胞の活性化制御においても Regnase-1 は重要な役割を有しており生体内での免疫恒常性を維持している。このような活性化における遺伝子発現変化において、mRNA 分解を司る Regnase-1 は免疫シグナルの活性化の下流において厳密な制御を受けるが、多くの場合リン酸化やプロテアーゼによる切断を介した発現量調節によって説明される。しかしながら、Regnase-1 の機能を制御する翻訳後修飾のメカニズムに関してはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者は、3xFLAG タグを付加した RNA 分解不活性型変異体である 3xFLAG-Regnase-1 (D141N) を安定的に発現した Jurkat 細胞株を樹立し、Regnase-1 蛋白質と相互作用するタンパク質群を質量分析により網羅的に解析し、その中からユビキチン化に重要なアダプター蛋白質 Kih121 を同定した(図1)。そこで本研究では、Kih121 を介したユビキチン化による Regnase-1 の mRNA 分解における新たな制御機構を解明することを目的とし、以下のように研究を行った。

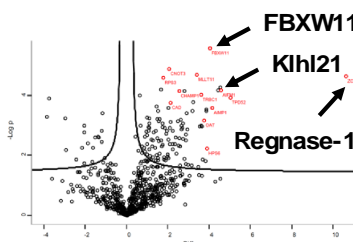


図1 Regnase-1結合蛋白質に関するプロテオーム解析

3. 研究の方法

(1) Kih121 を介した Regnase-1 ユビキチン化による免疫制御機構の解析

免疫細胞における Kih121 の機能解析を行うため、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術により、Kih121 ノックアウト(*Kih121^{-/-}*)マウス、さらに Exon2 を標的とし lox P を挿入した Kih121 flox マウスを作製した。これらのマウスから免疫細胞を単離し、炎症応答、T 細胞活性化の観点から Kih121 の機能解析を行った。Kih121 による Regnase-1 タンパク質に対する制御機構を解析するため、T 細胞活性化における Regnase-1 の発現量、活性化後のタンパク質切断に関して、ウェスタンブロットにより評価した。

(2) Kih121 を介した Regnase-1 ユビキチン化の分子機構の解析

HEK293 細胞株を用いて Regnase-1 と Kih121 を強制発現し、これらタンパク質の相互作用に関する解析を免疫沈降により評価した。さらに Regnase-1、及び Kih121 に対する様々な変異体を作製し、前述同様の相互作用に関する解析を行い、相互作用に重要なドメインの同定を行った。次に、Regnase-1 に対するユビキチン化を評価するために、HEK293 細胞株に対して Regnase-1、Kih121、CUL3、Rbx1 を強制発現し、4 つの UBA モチーフから構成された TUBE を用いて免疫沈降を行い、Regnase-1 のユビキチン化を評価した。また、HeLa 細胞を用いて Regnase-1 と Kih121 を強制発現し両者の局在を評価した。さらに、Kih121 が Regnase-1 の mRNA 分解能に与える影響を評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子下流に Regnase-1 標的遺伝子の 3' UTR 配列を挿入したコンストラクトを作製し、Regnase-1 及び Kih121 の強制発現系におけるルシフェラーゼ活性を評価した。

(3) Regnase-1 ユビキチン化機構の破綻による免疫恒常性に及ぼす影響の解析

Kih121^{-/-} マウスは胎生致死を示したため、個体レベルにおける Kih121 の役割を解明するため、T 細胞特異的 Kih121 欠損マウスを作製し解析を行った。主要臓器における組織炎症を解析するため、HE 染色を行い免疫細胞浸潤の程度を評価した。次に、脾臓やリンパ節における T 細胞活性化状態を評価するため、フローサイトメトリーを用いてナイーブ・エフェクター細胞の比率や、活性化、増殖の指標である CD69 や Ki67 を染色、さらに B 細胞の CD138 陽性形質細胞への分化を解析した。さらに、血清中の免疫グロブリンに加え、抗核抗体及び抗 ds-DNA 抗体の存在を ELISA により評価した。

4. 研究成果

(1) Kih121 を介した Regnase-1 ユビキチン化による免疫制御機構の解析

免疫細胞の活性化における Kih121 の発現変化を qPCR により評価したところ、マクロファージでは LPS などの TLR リガンド刺激により発現低下を示す一方、T 細胞では TCR 刺激後に一過性に発現上昇しその後低下することから、Kih121 による何らかの免疫制御の存在が示唆された。Kih121^{-/-}胎仔 (E13.5) より線維芽細胞 (MEF) を作製し、TLR リガンド刺激による IL-6 産生を評価したところ、野生型と比較し Kih121^{-/-} MEF において IL-6 産生増加を認めた。次に、Kih121^{-/-} マウスは胎性致死となるため、T 細胞特異的 Kih121 欠損マウスを作製し、T 細胞のエフェクター機能、及び増殖能を評価したところ、CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} T 細胞において IFN- γ の産生増加 (図 2)、Ki67 発現増加を認めた。Kih121 欠損 T 細胞における Regnase-1 の発現量を評価するため、CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} マウスより T 細胞を単離し、ウェスタンブロットを行ったところ、Malt1 による Regnase-1 タンパク質切断に関しては影響は認められなかったが、Kih121 欠損 T 細胞では Regnase-1 発現量が著しく低下していることがわかった。このことから Kih121 は Regnase-1 タンパク質の安定化に関与することが示唆された。Kih121 による Regnase-1 タンパク質に対するユビキチン化の有無は今後さらに検証する必要がある。

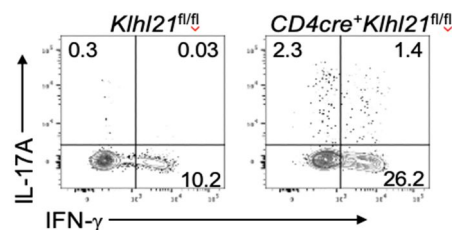


図2 Kih121欠損T細胞によるIFN-gなどのエフェクター分子の産生増加

(2) Kih121 を介した Regnase-1 ユビキチン化の分子機構の解析

Kih121 は、CUL3 との結合に重要な BTB ドメイン、さらに BACK ドメインに加え、C 末端にリング状構造を示す Kelch repeat が存在する。HEK293 細胞における強制発現系を用いて Kih121 と Regnase-1 との結合様式を解析したところ、Kih121 は Kelch repeat を介して Regnase-1 と会合すること、一方 Regnase-1 は PIN ドメインを介して Kih121 と相互作用することがわかった。一方で、同様の強制発現系を用いて、Regnase-1 のユビキチン化を評価したところ、Regnase-1 は Kih121、CUL3、RBX1 の共発現下でユビキチン化が誘導された (図 3)。一方でこのような Kih121 依存的なユビキチン化はその他の Regnase-1 ファミリーでは認められなかった。また、Regnase-1 の局在は Regnase-1 単独の強制発現では、これまでの報告と一致して細胞質全体に局在するが、Kih121 を発現させると核周囲に斑状の局在パターンを示すことがわかった。Regnase-1 による mRNA 分解の標的遺伝子 (*I16*, *Nfkbiz*, *Regnase-1*) の 3' UTR をルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入したレポーター系を用いて、Kih121 が Regnase-1 による RNA 分解に与える影響を評価したところ、Kih121 存在下で Regnase-1 による標的 3' UTR に対する RNA 分解が高まることが明らかになった (図 4)。この効果は CUL3 との結合に重要な BTB ドメイン欠損 Kih121 では認められなかった。これらの結果から、Kih121 による Regnase-1 のユビキチン化は局在変化を引き起こし、RNA 分解能が高まることが示唆された。

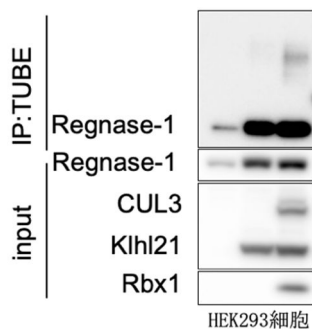


図3 Kih121/CUL3/Rbx1によるRegnase-1 ユビキチン化の誘導

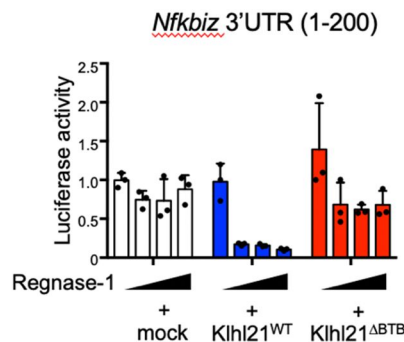


図4 Kih121存在下でRegnase-1による標的遺伝子 (*Nfkbiz* 3' UTR) に対する分解活性が増加する

(3) Regnase-1 ユビキチン化機構の破綻による免疫恒常性に及ぼす影響の解析

免疫恒常性における Kih121 の役割を検討するため、CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} マウスを解析したところ、興味深いことに、このマウスは脾腫やリンパ節肥大を認め、16-20 週齢において致死性を示した (図 5)。主要臓器における炎症状態を評価するため HE 染色を行ったところ、特に肺への著明なリンパ球浸潤、脾臓やリンパ節ではリンパ球増殖のためか濾胞構造の破壊が認められた。脾臓細胞における T 細胞の活性化状態をフローサイトメトリーで評価したところ、CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} マウスでは CD4 陽性、CD8 陽性とともな大部分のナイーブ T 細胞がエフェクター細胞に変化していた (図 5)。T 細胞の活性化は cognate B 細胞の活性化を引き起こすことから、脾臓 B 細胞における CD138 陽性形質細胞へ分化していることも認められた。これと一致して、野生型と比較して CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} マウスの血清中には、様々なサブクラスの免疫グロブリンが高値を示した。さらに、CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} マウスの血清中には抗核抗体、及び抗 dsDNA 抗体の存在が確認された。

以上の結果、Kih121 は T 細胞の活性化を負に制御すること、さらに自己免疫応答の発症を抑制していることが示唆された。また CD4cre⁺Kih121^{fl/fl} マウスの表現型は CD4cre⁺Regnase-1^{fl/fl}

マウスと類似していることから, Klh121 による Regnase-1 の mRNA 分解制御は in vivo においても矛盾しないと考えられる。

本研究の成果により, Regnase-1 を標的とした T 細胞活性化制御に関して創薬への発展が期待される。

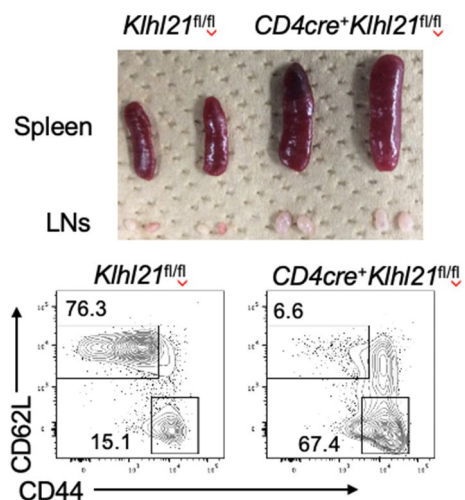


図5 CD4cre+Klh121^{fl/fl}マウスは脾腫・リンパ節腫大を示し, T細胞の自発的活性化を呈する

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 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Uehata T, Yamada S, Ori D, Vandenbon A, Giladi A, Jelinski A, Murakawa Y, Watanabe H, Takeuchi K, Toratani K, Mino T, Kiryu H, Standley DM., Tsujimura T, Ikawa T, Kondoh G, Landthaler M, Kawamoto H, Rodewald HR, Amit I, Yamamoto R, Miyazaki M, Takeuchi O	4. 巻 143
2. 論文標題 Regulation of lymphoid-myeloid lineage bias through regnase-1/3-mediated control of Nfkbiz	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 243 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2023020903	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 Yaku A, Inagaki T, Asano R, Okazawa M, Mori H, Sato A, Hia F, Masaki T, Manabe Y, Ishibashi T, Vandenbon A, Nakatsuka Y, Akaki K, Yoshinaga M, Uehata T, Mino T, Morita S, Ishibashi-Ueda H, Morinobu A, Tsujimura T, Ogo T, Nakaoka Y, Takeuchi O	4. 巻 146
2. 論文標題 Regnase-1 Prevents Pulmonary Arterial Hypertension Through mRNA Degradation of Interleukin-6 and Platelet-Derived Growth Factor in Alveolar Macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.059435	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 Ejima Aki, Abe Shinya, Shimba Akihiro, Sato Susumu, Uehata Takuya, Tani-ichi Shizue, Munakata Satoru, Cui Guangwei, Takeuchi Osamu, Hirai Toyohiro, Kato Shigeaki, Ikuta Koichi	4. 巻 209
2. 論文標題 Androgens Alleviate Allergic Airway Inflammation by Suppressing Cytokine Production in Th2 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1083 ~ 1094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200294	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 Tse Ka Man, Vandenbon Alexis, Cui Xiaotong, Mino Takashi, Uehata Takuya, Yasuda Keiko, Sato Ayuko, Tsujimura Tohru, Hia Fabian, Yoshinaga Masanori, Kinoshita Makoto, Okuno Tatsusada, Takeuchi Osamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Enhancement of Regnase-1 expression with stem loop?targeting antisense oligonucleotides alleviates inflammatory diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	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) 10.1126/scitranslmed.abo2137	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 Chong Yee Kien, Tartey Sarang, Yoshikawa Yuki, Imami Koshi, Li Songling, Yoshinaga Masanori, Hirabayashi Ai, Liu Guohao, Vandebon Alexis, Hia Fabian, Uehata Takuya, Mino Takashi, Suzuki Yutaka, Noda Takeshi, Ferrandon Dominique, Standley Daron M., Ishihama Yasushi, Takeuchi Osamu	4. 巻 15
2. 論文標題 Cyclin J-CDK complexes limit innate immune responses by reducing proinflammatory changes in macrophage metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	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) 10.1126/scisignal.abm5011	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 Garg Ankur, Roske Yvette, Yamada Shinnosuke, Uehata Takuya, Takeuchi Osamu, Heinemann Udo	4. 巻 49
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 5369 ~ 5381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab316	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

1. 著者名 Uehata Takuya, Takeuchi Osamu	4. 巻 33
2. 論文標題 Post-transcriptional regulation of immunological responses by Regnase-1-related RNases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 859 ~ 865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab048	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shinnosuke Yamada, Takuya Uehata, Kazunori Toratani, Daisuke Ori, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Manipulation of HSPC lineage priming via antisense-oligonucleotide-mediated expression of Nfkbiz
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takuya Uehata, Shinnosuke Yamada, Daisuke Ori, Kazunori Toratani, Hiroshi Kawamoto, Masaki Miyazaki, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Regnase-1/3 controls hematopoietic lineage bias through degradation of Nfkbiz mRNA
3. 学会等名 5th CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中村和史、植畑拓也、竹内理
2. 発表標題 RNA結合蛋白質Zc3h13によるT細胞活性化制御機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植畑拓也、村岡慎太郎、竹内理
2. 発表標題 抗腫瘍免疫増強を目的としたRNA二次構造改変型核酸医薬の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuya Uehata, Shinnosuke Yamada, Alexis Vandenbon, Masaki Miyazaki, Hiroshi Kawamoto, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 The Regnase-1/3-Nfkbiz axis controls hematopoietic lineage priming
3. 学会等名 JSCIR/MMCB2023 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植畑拓也, 竹内理
2. 発表標題 Development of a novel anti-tumor nucleic acid therapy targeting RNA structure
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植畑拓也, 織大祐, 宮崎正輝, 伊川友活, Hans-Reimer Rodewald, 河本宏, 竹内理
2. 発表標題 The Regnase-1/3-Nfkbiz axis controls hematopoietic lineage priming
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Uehata, Daisuke Ori, Masaki Miyazaki, Amir Giladi, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, Ido Amit, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation of hematopoietic stem and progenitor cell lineage priming by Rnases Regnase-1/-3 via Nfkbiz mRNA decay
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 Takuya Uehata, Daisuke Ori, Masaki Miyazaki, Amir Giladi, Hiroshi Kawamoto, Ido Amit, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Regnase-1/-3-Nfkbiz制御軸が造血幹細胞における細胞分化の方向性を調節する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Uehata, Shinnosuke Yamada, Masaki Miyazaki, Amir Giladi, Alexis Vandenbon, Ido Amit, Hiroshi Kawamoto, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Lymphoid-myeloid cell fate determination by endoribonucleases Regnase-1 and -3
3. 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 がんを処置するための組成物	発明者 植畑拓也, 竹内理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-088931	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がんを処置するための組成物	発明者 植畑拓也, 竹内理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/020104	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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