

自己免疫疾患発症メカニズムの一因が明らかに

- T細胞の Regnase-1 を制御して免疫疾患の新しい治療戦略を拓く -

<概要>

大阪大学免疫学フロンティア研究センター (WPI-IFReC) の植畑拓也研究員、審良静男教授(拠点長)らは、獲得免疫系の中心であるT細胞においてRegnase-1というタンパク質を特異的に欠損したマウスを作成することに成功し、Regnase-1がT細胞の活性化の調節に重要な因子であることを証明しました。さらにT細胞におけるRegnase-1が自己免疫疾患発症に大きく関与していることを世界で初めて証明しました。

<研究内容>

自己免疫疾患の原因は多岐にわたり、そのメカニズムは明らかではありません。一般的に、体内における自己の組織を認識する自己応答性T細胞が異常な活性化及び自己抗体産生を誘導することがその主因とされますが、なぜこのようなT細胞の活性化が引き起こされるのか未だ不明な点が多い状況です。

過去に審良教授らの研究グループは、自然免疫系の遺伝子としてRegnase-1を同定し、これが炎症を引き起こす遺伝子のRNAを分解し炎症を収束させる酵素であることを初めて証明しました (*Nature*, 2009)。しかし、これまでRegnase-1は自然免疫においてのみ重要と考えられていました。

ヒトの自己免疫疾患やその発症メカニズムは多種多様ですが、「免疫の司令塔」とも呼ばれるT細胞が重要な役割を果たしていることは間違いありません。今回作製したT細胞特異的Regnase-1欠損マウスが自己免疫疾患を自然発症することから、ヒトT細胞で発現するRegnase-1も免疫応答(炎症抑制など)に重要な役割を果たしていることは明らかです。そこで、T細胞におけるRegnase-1を標的とした治療戦略は多様な免疫疾患に対する有力手段になる可能性があります。さらに、病原体や癌に対して機能するT細胞においてRegnase-1をコントロールすることで治療効果の増大を期待することができます。以上より、今後Regnase-1を制御する因子の同定は、こうした研究領域の飛躍的な発展と社会への大きな貢献が期待されます。

<掲載論文・雑誌>

- "Malt-1-induced cleavage of Regnase-1 in CD4+ Helper T cells regulates immune activation"
「CD4陽性ヘルパーT細胞においてRegnase-1はMalt-1による切断により免疫活性化を制御している」
- 掲載誌: *Cell* 2013年5月23日(12:00pm 米東部)(日本時間: 5月24日午前2時) online

研究の説明

【研究の背景】

自然免疫担当細胞によって認識された病原体や自己組織は獲得免疫担当細胞、即ち T 細胞及び B 細胞へ抗原提示され抗原特異的な免疫反応を引き起こす。これまでに我々はマクロファージにおいて Toll like receptor 刺激によって誘導される因子として Regnase-1 を同定し(図1)、世界で初めてこれが RNA を分解するヌクレアーゼであることを発見した(Matsushita *et al.*, Nature, 2009、Iwasaki *et al.*, Nat Immunol., 2011)。そこで我々は Regnase-1 を「RNase を特徴とする制御因子」にちなみ Regulatory RNase-1 (Regnase-1)と命名した。我々が独自に作製した Regnase-1 欠損マウスは血中に自己抗体が認められ、マクロファージをはじめ T 細胞や B 細胞にも異常な活性化が認められていたが、その病態メカニズムは明らかではなかった。

【Regnase-1 欠損 T 細胞による自己免疫疾患】

我々は *Regnase-1* 欠損 (*Reg1* KO) マウスに認められる自己免疫疾患が、どの細胞種によって引き起こされるのかを調べるため、T 細胞特異的 *Regnase-1* 欠損 (*T-Reg1* KO) マウスを作製した。このマウスは著明な脾腫(図2)及びリンパ節腫大を認め、17週齢までにほとんどが死亡に至った。血液中の免疫グロブリン値は高値であり、ヒトの自己免疫疾患にも認められる抗核抗体も陽性であった。さらに、脾臓細胞を用いて FACS 解析を行ったところ、T 細胞はほぼ全て CD62^{lo}CD44^{hi} エフェクター T 細胞となっており(図3)、さらに多くの B 細胞は抗体産生を司る形質細胞に分化していた。また、この *Regnase-1* 欠損 T 細胞は野生型と比較して刺激依存的に IFN- γ 、IL-4、IL-17 といったサイトカインを多く産生した。これらの結果は *Reg1* KO マウスに観察される結果と矛盾しないことから、*Regnase-1* 欠損によって観察された病態は T 細胞によって引き起こされることが示された。

さらに我々はマウス個体内で *Regnase-1* 欠損 T 細胞がどのように病態に寄与するのかについて検討を行った。まず、*T-Reg1* KO マウスではほとんどの T 細胞がすでにエフェクター T 細胞となっているため、免疫の実験手法としてこれまで用いられてきた OT-II トランスジェニックマウス(トリ卵白アルブミン(OVA)に対する T cell receptor を発現する)と交配させた。この OT-II 遺伝子を有する *T-Reg1* KO マウスでは、OVA テトラマーをもつ CD4 T 細胞の多くがナイーブ T 細胞として存在していた(図4)。そこでナイーブ CD4T 細胞のみを単離し、野生型マウスへ移入した後 OVA で免疫を行った。注目すべきことに、移入マウス内においてコントロールと比較し *T-Reg1* KO マウス由来のナイーブ T 細胞は3~6倍に増殖していた(図5)。またこの移入マウスから脾臓細胞を単離し OVA ペプチドで刺激すると、KO を移入した側では著明な細胞増殖を呈し、さらに IFN- γ 、IL-4、IL-17 などのサイトカインを多く産生することが分かった。これらの結果より *Regnase-1* 欠損 T 細胞抗原刺激依存的に異常な応答を示すことがわかった。おそらく、自己抗原に対してもこの *Regnase-1* 欠損 T 細胞は異常応答を示すと考えられる。従

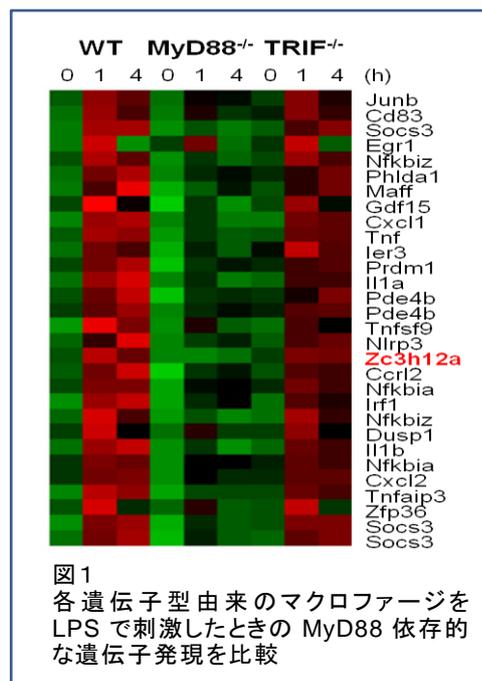


図1 各遺伝子型由来のマクロファージを LPS で刺激したときの MyD88 依存的な遺伝子発現を比較

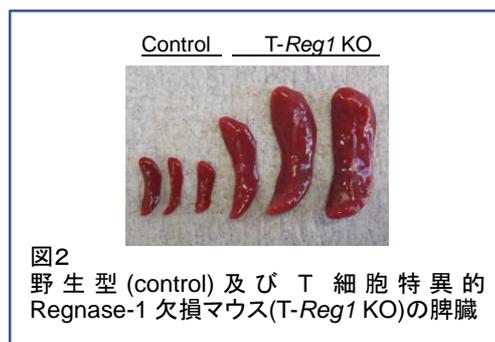


図2 野生型(control)及び T 細胞特異的 *Regnase-1* 欠損マウス(*T-Reg1* KO)の脾臓

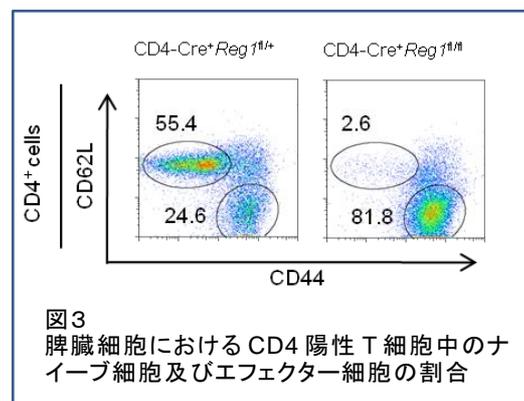


図3 脾臓細胞における CD4 陽性 T 細胞中のナイーブ細胞及びエフェクター細胞の割合

って、Regnase-1 は T 細胞に対して抑制的に機能しており、さらに自己免疫疾患発症にとって重要であることが判明した。

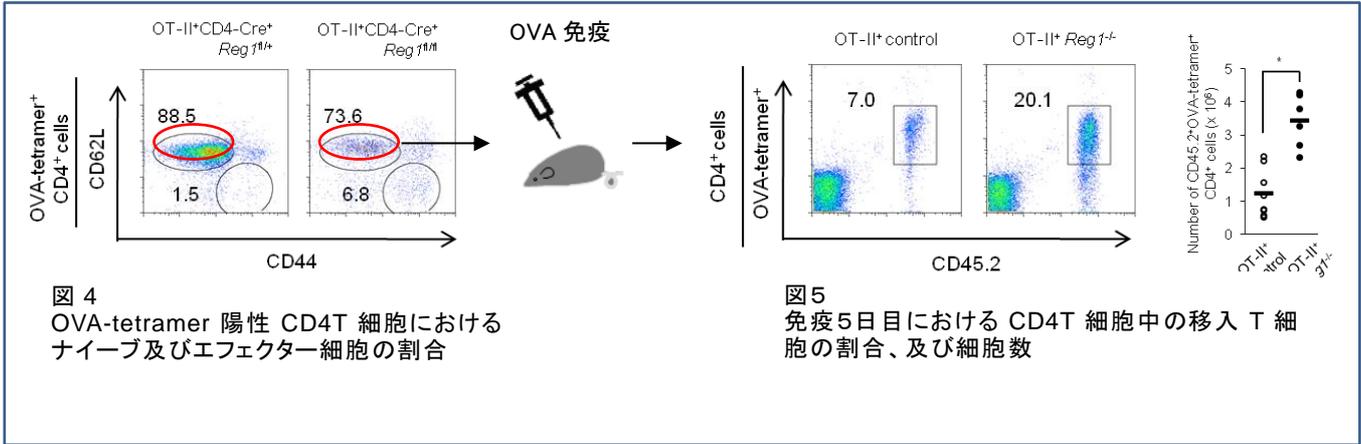


図 4
OVA-tetramer 陽性 CD4T 細胞における
ナイーブ及びエフェクター細胞の割合

図 5
免疫 5 日目における CD4T 細胞中の移入 T 細胞
の割合、及び細胞数

【転写因子 c-Rel は Regnase-1 欠損マウスにおいて増悪因子として働く】

我々はこれまでに Regnase-1 が制御している mRNA として IL-6 や IL-12p40 などの炎症性サイトカインを同定したが、これらサイトカインをコードする遺伝子を欠損しても、Regnase-1 欠損によって引き起こされる病態は改善しなかった。そこで我々は T 細胞における新規 Regnase-1 標的 RNA を同定するため網羅的遺伝子発現解析を行った。Regnase-1 欠損 CD4T 細胞では多くの活性化に關与するサイトカイン、レセプター、転写因子などを高発現しているが、これらが Regnase-1 によって直接コントロールされているかどうかはこの段階では明らかではない。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子下流に mRNA 3' UTR を結合させレポーターアッセイを行った。結果、c-Rel mRNA は 3' UTR を介して Regnase-1 によって直接分解されることがわかった。一方、その他の NF-κB family に属する転写因子は Regnase-1 による制御を受けていなかった。我々はこの転写因子 c-Rel に注目し、*Reg1 KO* マウスにおいて c-Rel が病態に寄与しているかどうかを調べるため、c-Rel と Regnase-1 のダブルノックアウト (DKO) マウスを作製した。この DKO マウスの脾臓細胞中における CD4T 細胞の活性化は *Reg1 KO* マウスと比較し減弱しており、ナイーブからエフェクター T 細胞への変化も部分的ではあるが改善した。さらに、DKO マウスの脾臓における形質細胞の蓄積もまた *Reg1 KO* マウスと比較し大きく減少していた。このことから、c-Rel は Regnase-1 標的因子として病態悪化に寄与していることがわかった。

【Malt-1 は Regnase-1 を切断し T 細胞の活性化を促す】

すでに述べたように T-*Reg1 KO* マウスは自然発症的に T 細胞の活性化を引き起こすが、野生型マウスにおいて実際に Regnase-1 蛋白量が変化し T 細胞の活性化に寄与しているのかが不明である。そこで我々は T 細胞において Regnase-1 がどのように制御されているのかを検討した。まず野生型マウスより CD4T 細胞を単離した後、*in vitro* において抗 CD3/CD28 抗体あるいは PMA/Ionomycin で刺激し Regnase-1 蛋白レベルを調べたところ、刺激前では Regnase-1 はすで発現しており、刺激後その蛋白レベルは減少した (図 6)。このことから Regnase-1 は恒常的に発現しており TCR 刺激依存的に減少することがわかった。次に、我々はこの刺激依存的な Regnase-1 蛋白レベル減少のメカニズムについて検討を行った。従来 TCR シグナルにおいて重要な要素とされている Malt1 は caspase

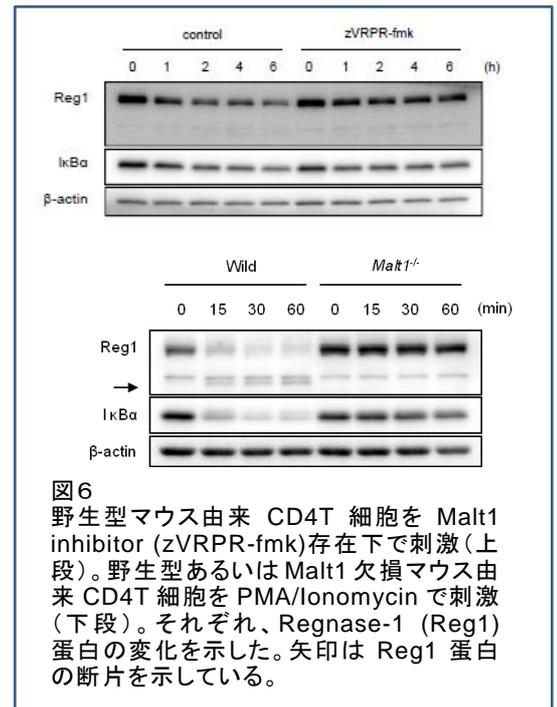


図 6
野生型マウス由来 CD4T 細胞を Malt1 inhibitor (zVRPR-fmk) 存在下で刺激 (上段)。野生型あるいは Malt1 欠損マウス由来 CD4T 細胞を PMA/Ionomycin で刺激 (下段)。それぞれ、Regnase-1 (Reg1) 蛋白の変化を示した。矢印は Reg1 蛋白の断片を示している。

様のドメインを有しており、実際にいくつかの分子を標的とし切断することによって T 細胞の活性化に寄与することが知られている。我々はこの Malt1 に着目し、この paracaspase 特異的な inhibitor を用いて、刺激後の Regnase-1 蛋白の変化を調べた。この結果、T 細胞で認められた Regnase-1 蛋白レベルの減少は inhibitor 存在下では抑制されることがわかった。さらに、Malt1 ノックアウトマウス由来の T 細胞ではこの Regnase-1 蛋白レベルの減少は全く起こらなかった (図6)。これらの結果より Regnase-1 は Malt1 によって制御されていることがわかった。また、実際に OT-II マウスに OVA を用いて免疫した場合においても、T 細胞内の Regnase-1 蛋白レベルは減少していたことから、この現象は in vivo においても再現されることがわかった。

以上より、Regnase-1 は T 細胞において刺激依存的にその蛋白量を変化させることで T 細胞の活性化に寄与していることがわかった。

【まとめと今後の展開】

本研究において我々は Regnase-1 が T 細胞において活性化を制御する重要な因子であることを示した。当初、Regnase-1 はマクロファージにおいて LPS 刺激によって誘導される因子として同定されたが、T 細胞では Regnase-1 欠損によりまるで抗原刺激を受けたような強い活性化を引き起こす点で非常に興味深い。さらに、このような活性化 T 細胞は自己反応性 B 細胞をも活性化し、自己抗体産生を引き起こすことから、Regnase-1 は末梢での自己寛容を制御していると言える。一方で、T 細胞は抗原刺激を受けることで Regnase-1 の発現量を厳密にコントロールしており、一過性に Regnase-1 の発現量を減らすことで免疫応答を容易にしているが明らかとなった (図7)。

注目すべきことに、刺激後における Regnase-1 の発現変化はマクロファージにおいても認められるが (Iwasaki, Nature Immunology, 2011)、T 細胞の場合、これまで NF-κB 活性化に必須とされていた Malt1 が Regnase-1 を切断することにより、標的 RNA の安定性を制御する点は革新的である。以上から、Regnase-1 は自然免疫系だけでなく獲得免疫系においても免疫活性化を調節する重要な役割を担っていることが明らかとなった。

Regnase-1 はリンパ球に多く発現することが知られているが、CD4 陽性 T 細胞の

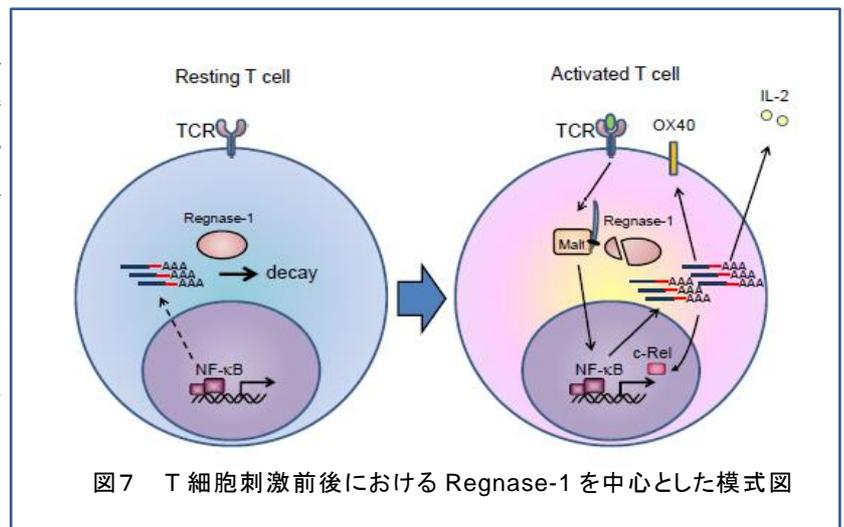


図7 T 細胞刺激前後における Regnase-1 を中心とした模式図

中でも抑制性 T 細胞や CD8 陽性である細胞障害性キラー T 細胞なども疾患に関与していることが予想される。このような細胞は自己免疫疾患やウイルス感染、癌免疫との関わりが深いことから、今後このような細胞種において Regnase-1 の機能を明らかにすることは重要である。一方、ヒトにおける Regnase-1 のデータは現在のところ乏しいが、関節リウマチ患者由来の滑膜細胞における Regnase-1 は IL-6 mRNA 発現を制御しているという報告は我々のデータと合致する。また心筋細胞特異的に Regnase-1 を発現させたマウスでは敗血症による心筋の炎症、さらに心機能低下を緩和することができると報告されている。T 細胞における Regnase-1 の発現量は細胞活性化に大きく影響を与えることから、疾患に関連する抗原特異的な T 細胞のみを活性化させることで免疫機能をコントロールできる可能性がある。今後、ヒトにおける疾患と Regnase-1 がどのように関わっているか明らかにすることは大変意義深い。