



Title	Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4+ Helper T Cells Regulates Immune Activation
Author(s)	Uehata, Takuya
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26310
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

〔論文題名: Thesis Title〕

Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4⁺ Helper T Cells Regulates Immune Activation

(Malt1によるRegnase-1の切断がCD4陽性T細胞の活性化を制御する)

専攻名 : 内科系臨床医学専攻
Division学位申請者 : 植畑 拓也
Name

〔目的(Purpose)〕

我々はこれまでに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 (Reg1) を同定し、3'非翻訳領域(UTR)を介して IL-6 や IL-12p40 の mRNA を分解するヌクレアーゼであることを発見した。我々が作製した Regnase-1 欠損(Reg1^{-/-})マウスは血中に自己抗体が認められ、マクロファージの他に T 細胞や B 細胞にも異常な活性化が認められたが、その病態メカニズムは明らかではなかった。本研究において我々はリンパ球活性化のメカニズムを明らかにし、さらに Reg1 がどのように制御されているのかを解明するため詳細な検討を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず Reg1^{-/-}マウスにおいて IL-6 や IL-12p40 が in vivo において病態に寄与しているかどうか調べるため、Reg1 と IL-6、さらに IL-12p40 とのダブルノックアウトマウス(dKO)を作製した。IL-6/Reg1 及び IL-12p40/Reg1 dKO はいずれも著明な脾腫を呈し、依然として T 細胞は活性化しており致死性であった。次に細胞型特異的 KO マウスを得るため、Reg1 flox マウスを作製しこれを CD4-Cre transgenic マウスと交配することで、T 細胞特異的 Reg1^{-/-}マウスを得た。このマウスは著明な脾腫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。脾臓において T 細胞は大部分が CD62L^{lo}CD44^{hi} effector/memory 細胞であり、また多くの形質細胞が蓄積していた。さらに T 細胞移入実験においてもこの表現型を認めたことより、Reg1^{-/-}マウスにおける病態は T 細胞によって引き起こされることがわかった。Reg1^{-/-} T 細胞がどのような遺伝子発現を示すかを調べるため、網羅的遺伝子発現解析を行った。Reg1^{-/-} T 細胞ではコントロールと比較し多くの活性化に関わる因子が高発現しており、424 の遺伝子において 10 倍以上の差を認めた。これらの因子において Reg1 の標的 mRNA かどうかを調べたところ、c-Rel に加えて IL-2 や OX40 が 3'UTR を介して直接 Reg1 の標的となっていることを確認した。そこで我々は c-Rel に注目しこれが Reg1^{-/-}マウスにおいてどのような役割を果たしているのかを調べるため、c-Rel/Reg1 dKO を作製した。この dKO マウスでは依然として脾腫は認めるものの、T 細胞の活性化や naïve から effector/memory 細胞への形質変化は部分的ではあるが改善しており、また形質細胞の蓄積も減少していた。

次に、T 細胞において Reg1 の制御がどのようになされているのかを検討するため、野生型マウス由来の CD4 T 細胞を用いて Reg1 を蛋白レベルで調べた。結果、T 細胞では刺激前より恒常的に Reg1 を発現しており、CD3/CD28 あるいは PMA/Ionomycin 刺激によって Reg1 は減少することがわかった。さらに in vitro での実験により、Reg1 は刺激後に 1 カ所で切断されていることがわかった。TCR シグナル下流において Malt1 が paracaspase 活性を有していることから、我々は Malt1 特異的 paracaspase inhibitor を用いて同様に刺激を行ったところ Reg1 の切断は阻害された。また、Malt1^{-/-}マウス由来の CD4 T 細胞を PMA/Ion で刺激するとこれらの細胞では全く Reg1 の発現は変化しなかった。これらの結果より Reg1 は Malt1 の paracaspase 活性により切断されていることが判明した。ここで、Malt1 paracaspase は アルギニン(R) を認識することから、Reg1 のアミノ配列における R 残基を 1 塩基置換した mutant Reg1 を HEK293 細胞で活性型である API2/Malt1 と共発現させたところ、R111A mutant Reg1 では切断されないことがわかった。実際、jurkat 細胞にこの mutant Reg1 を発現させ PMA/Ion 刺激を行っても Reg1 は分解されないことより、Reg1 は T 細胞において刺激依存的に Malt1 paracaspase 活性を介して 111 番目の R で切断されることがわかった。最後に Malt1 による Reg1 の切断が mRNA 安定性を制御しているかどうか検討するため、Malt1 inhibitor で処理した CD4 T 細胞を PMA/Ion で刺激しアクチノマイシン添加後の RNA を経時的に回収した。結果、コントロールと比較し Malt1 inhibitor 処理した細胞では、c-Rel、IL-2 や OX40 といった mRNA が安定化されることがわかった。

〔総括(Conclusion)〕

T 細胞特異的 Reg1^{-/-}マウスの表現型解析により Reg1 は T 細胞において様々な mRNA を標的とし抑制的に機能する上で重要な役割を有することがわかった。また T 細胞において Reg1 は抗原刺激依存的に Malt1 によって切断され、標的 mRNA の安定性、T 細胞活性化を制御することが示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 植畑 拓也

	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授 審良 静男
	副 査 大阪大学教授 荒瀬 尚
	副 査 大阪大学教授 熊ノ郷 淳

論文審査の結果の要旨

本研究は、近年RNase活性を有する因子として注目されているRegnase-1に関して、T細胞特異的に遺伝子欠損を起こしたマウスを世界で初めて作製し、T細胞におけるRegnase-1の重要性について詳細に検討したものである。この研究によりT細胞におけるRegnase-1の欠損は自然発症的に自己免疫疾患を発症することがわかった。さらにT細胞においてRegnase-1の標的遺伝子としては新たにc-Rel、IL-2、OX40といった遺伝子を同定し、特にc-Relに関してはダブルノックアウトマウスの解析の結果、Regnase-1ノックアウトマウスの病態を一部説明しうる因子であることが判明した。さらに、Regnase-1は抗原刺激依存的に分解を受け、Regnase-1の分解には、TCRシグナルにおいて重要な構成要素である、Malt1のparacaspase活性を介してRegnase-1を切断していることを詳細に示した。

以上より、発表者の研究は、自己免疫疾患発症のメカニズムの一端を解明し、生理学的にもT細胞の活性化に重要な現象を明らかにしたことにより、学位に値するものと認める。