The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

〔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的であった。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CD4T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CD4T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CD4T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。

[Format-H07]

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。