



Title	RNAスプライシング分子Rbm10の炎症回路活性化制御機構に関する研究
Author(s)	鈴木, 宏尚
Citation	北海道大学. 博士(医学) 乙第7081号
Issue Date	2019-09-25
DOI	10.14943/doctoral.r7081
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/75795">http://hdl.handle.net/2115/75795</a>
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 1699
File Information	Hironao_Suzuki.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

RNA スプライシング因子 Rbm10 の炎症回路活性化制御機構に  
関する研究

(Studies on regulatory mechanisms of inflammation  
amplifier activation by RNA splicing factor Rbm10)

2019年9月

北海道大学

鈴木 宏尚



学 位 論 文

RNA スプライシング因子 Rbm10 の炎症回路活性化制御機構に  
関する研究

(Studies on regulatory mechanisms of inflammation  
amplifier activation by RNA splicing factor Rbm10)

2019年9月

北海道大学

鈴木 宏尚

## 目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	8 頁
方法	16 頁
結果	23 頁
考察	49 頁
結論	53 頁
謝辞	54 頁
利益相反	55 頁
引用文献	56 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Toru Atsumi<sup>#</sup>, Hironao Suzuki<sup>#</sup>, Jing-Jing Jiang<sup>#</sup>, Yuko Okuyama, Ikuma Nakagawa, Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Takuto Ohki, Kokichi Katsunuma, Koichi Nakajima, Yoshinori Hasegawa, Osamu Ohara, Hideki Ogura, Yasunobu Arima, Daisuke Kamimura, and Masaaki Murakami. (<sup>#</sup> Equal contribution)  
Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b.  
International Immunology, 29 • 581-591 (2017)
2. Lavannya Sabharwal, Daisuke Kamimura, Jie Meng, Hidenori Bando, Hideki Ogura, Chiemi Nakayama, Jing-Jing Jiang, Noriko Kumai, Hironao Suzuki, Toru Atsumi, Yasunobu Arima, and Masaaki Murakami.  
The Gateway Reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs pathogenic immune cells into the CNS.  
The Journal of Biochemistry, 156 • 299-304 (2014)
3. Rajeev Singh, Toru Atsumi, Hidenori Bando, Masaya Harada, Akihiro Nakamura, Moe Yamada, Jing-Jing Jiang, Hironao Suzuki, Kokichi Katsunuma, Takao Nodomi, Daisuke Kamimura, Hideki Ogura, and Masaaki Murakami.  
Reverse Direction Method: A Possible Tool to Link Animal Models with Corresponding Human Diseases and Disorders.  
Journal of Clinical & Medical Genomics, 1 • 1000106 (2013)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Hironao Suzuki, Toru Atsumi, Yasunobu Arima, Koichi Nakajima, Daisuke Kamimura, and Masaaki Murakami.  
RNA Splicing Mediator 1 (RSM1) regulates inflammation via alternative splicing of DNA methyltransferase Dnmt3b.  
第46回日本免疫学会学術集会, 2017年12月・仙台

2. Kokichi Katsunuma, Hironao Suzuki, Yuko Okuyama, Hideki Ogura, Daisuke Kamimura, Toshio Hirano, and Masaaki Murakami.

Zinc finger motif containing protein A, ZFA regulates IL-6 amplifier activation via regulating NF- $\kappa$ B activity and promotes an autoimmune arthritis.

第40回日本免疫学会学術集会, 2011年11月・千葉

## 要旨

【背景と目的】炎症回路は非免疫系細胞に存在する炎症性因子の過剰産生機構であり、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) と signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の同時活性化を必要とする。自己免疫疾患の発症には免疫系細胞と非免疫系細胞の相互作用による非免疫系細胞からの炎症性因子の過剰産生が重要な役割を担っていることから、炎症回路の分子基盤を解明することは様々な疾患に対する新たな治療法の発見に繋がると期待される。我々はこれまでに、マウス細胞を用いたゲノムワイドスクリーニングにより炎症回路の活性化を正に制御する 1000 以上の候補遺伝子を見出した。本研究では、ゲノムワイドスクリーニングで見出した候補遺伝子の中から RNA スプライシングに関わる因子である RNA binding motif 10 (Rbm10) に着目し、炎症回路における役割を解析した。

【材料と方法】Rbm10 をノックダウンしたマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) は、short hairpin RNA (shRNA) レンチウイルス (Mission TRC shRNA clone) を MEF に感染させることで作製した。炎症回路の活性化状態は、MEF を interleukin (IL) -17 及び IL-6 で刺激したときの培養上清中 IL-6 濃度を指標に評価した。Rbm10 ノックダウンによる *in vivo* での炎症回路活性化阻害効果は、F759 マウスの後肢関節腔内に IL-17 及び IL-6 を注射して誘導する関節炎モデルに shRNA レンチウイルスを投与することで評価した。Rbm10 の炎症回路活性化機構は、定量 RT-PCR、ウエスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降法、メチル化 DNA 免疫沈降法、メチル化 DNA 特異的 PCR 法等で解析した。さらに、これら解析から Rbm10 の標的分子として見出した DNA methyltransferase (Dnmt) 3b について、炎症回路活性化への関与を免疫沈降実験や近接ライゲーションアッセイ、ルシフェラーゼレポーターアッセイ等で解析した。

【結果】Rbm10 ノックダウン MEF では IL-17 及び IL-6 で刺激したときの培養上清中 IL-6 濃度が有意に低下した。また、F759 マウスの関節炎症状は Rbm10 shRNA レンチウイルスを関節内に注射することで明確に抑制された。Rbm10 ノックダウン MEF では tumor necrosis factor  $\alpha$  で刺激したときの標的遺伝子の発現量が減少した一方で、IL-6 で刺激したときの suppressor of cytokine signaling 3 遺伝子発現量には影響がなかった。そこで NF- $\kappa$ B シグナル経路に着目して Rbm10 の機能解析を実施した結果、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B シグナル伝達因子 p65 のリン酸化及び核内移行には影響がなく、p65 や p300 の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーターへの集積、並びに NF- $\kappa$ B 標的



遺伝子プロモーター領域でのヒストンアセチル化が抑制されていた。メチル化 DNA 免疫沈降法での解析の結果、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的にプロモーター領域の CpG メチル化が亢進していた。また、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域ではヒストンのトリメチル化及びメチル化 DNA 結合性の転写抑制因子である methyl-CpG binding domain protein 2 の集積が亢進していた。Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域において CpG メチル化が亢進していたことから、DNA メチルトランスフェラーゼに着目して解析を進めた結果、MEF では Dnmt3b アイソフォームのうち酵素活性を有する Dnmt3b2 と活性を有しない Dnmt3b3 が主に発現しており、Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b3 に対する Dnmt3b2 の発現量比が増加することが明らかとなった。Dnmt3b2 と Dnmt3b3 は p65 と相互作用し、Rbm10 ノックダウン MEF ではサイトカイン刺激の有無に依らず、Dnmt3b の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター上への集積が亢進していた。さらに、MEF 及び HEK293T での Dnmt3b2 の過剰発現は NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写活性化を抑制した。

【考察】本研究の結果から、Rbm10 ノックダウン MEF で認められた炎症回路の活性化抑制は、Dnmt3b2 の発現増加に伴い p65 との相互作用を介した Dnmt3b2 の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター領域への集積が亢進し、同領域での CpG メチル化が亢進することで、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的にヘテロクロマチン様の転写抑制状態が誘導されたためと推察された。したがって、Rbm10 は Dnmt3b の選択的スプライシングを介して NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーターの CpG メチル化を負に制御しており、Rbm10-Dnmt3b 軸の異常は炎症回路の異常活性化或いは機能不全を誘導し得ると考えられた。

ヒトにおいて、Rbm10 の機能欠損は talipes equinovarus, atrial septal defect, robin sequence, and persistence of left superior vena cava (TARP) 症候群の発症原因であると報告されているが、本症は多くが胎生致死又は生後早期に死に至る X 連鎖劣性遺伝性疾患であり、Rbm10 の機能欠損と自己免疫疾患との関係性についての知見は得られていない。ヒトにおいて Rbm10 の機能欠損が免疫系に与える影響については今後の研究課題である。また、Rbm10-Dnmt3b 軸を介した DNA メチル化経路は NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域に特異的であったことについて、本研究では Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 が p65 と相互作用し得ることに加えて、Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター上への集積が亢進していることを示した。一方で、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター上には p65 と Dnmt3b 以外にもヒストンメチルトランスフェラーゼ等様々な複合体構成因子が存在すると考えられることから、Dnmt3b2 と p65 の相互作用増強に関与し、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的な Dnmt3b2 の集積に寄与する因子が他に存在している可能性は十分に考えられる。Dnmt3b2/p65 複合体

形成に関与する他因子の同定も今後の課題である。

**【結論】** MEF において、Rbm10 が Dnmt3b の選択的スプライシングを介して炎症反応を正に制御するという新たな機構を明らかにした。本研究成果により、炎症回路が関与するヒト疾患に対して Rbm10/Dnmt3b 軸が有望な治療標的になり得ることを示すことができた。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BSF	human B-cell differentiation factor
CCL	CC chemokine-ligand
CCR	CC chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CXCL	CXC motif ligand
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dnmt	DNA methyltransferase
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ErbB	erb-b2 receptor tyrosine kinase
GFP	green fluorescent protein
Gp130	glycoprotein 130
Gusb	beta-glucuronidase
GWAS	genome wide association study
H3K9Ac	histone H3 Lysine 9 acetylation
H3K27me3	trimethylation of histone H3 Lysine27
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
HSP90 ab1	heat shock protein 90 ab1
I $\kappa$ B	inhibitor of kappa B
ICF	immunodeficiency, centromeric instability, facial anomaly
IL	interleukin
MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2
MeDIP-Seq	Methylated DNA immunoprecipitation-sequencing
MEF	mouse embryonic fibroblast
MHC	major histocompatibility complex

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NLS	nuclear localization signal
OCRE	octamer repeat
PLA	proximity ligation assay
PP1a	Protein phosphatase 1a
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RanBP	Ran binding protein
Rbm	RNA binding motif
RHD	rel homology domain
Rpl13a	ribosomal 60S subunit protein L13a
RRM	RNA recognition motif
RT	reverse transcription
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
shRNA	short hairpin RNA
sIL-6R	soluble interleukin-6 receptor
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TA	transactivation domain
TARP	talipes equinovarus, atrial septal defect, robin sequence, and persistence of left superior vena cava
TNF	tumor necrosis factor
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1
TSS	transcription start site

## 緒言

免疫系は様々な微生物やウイルス、或いは癌細胞などの脅威に対する生体防御機構として必須のシステムであり、多くの細胞や因子が複雑に関与しながら生体の恒常性をコントロールしている。しかしながら、免疫システムは時に何らかの要因により過剰に活性化して自己の正常な組織までも攻撃する場合があります。関節リウマチや多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患を引き起こす。したがって、免疫システムの複雑な制御機構を解明し理解することはこれら疾患の治療及び予防法の開発に極めて重要であり、今も世界中で研究が進められている。

1986年、大阪大学の岸本忠三先生、平野俊夫先生らのグループは、ヒトBリンパ球からの抗体産生を誘導する新規のサイトカインとして human B cell differentiation factor (BSF) 2 を同定した(Hirano et al., 1986)。BSF2 はその後、他の研究グループが同定し別個の名称と呼ばれていた複数のサイトカインと同一であることが判明し、interleukin (IL) -6 に名称統一された。現在、IL-6 はBリンパ球からの抗体産生誘導のみならず、肝臓からの急性期タンパク質産生や破骨細胞の活性化誘導など多彩な生体維持機構に関与する多面的な因子であることが明らかになっている。

岸本忠三先生、平野俊夫先生らのグループはその後、関節リウマチ患者の滑液中に IL-6 が豊富に存在していることを報告し(Hirano et al., 1988)、関節リウマチ病態への IL-6 の関与を解明するための研究が進められた。その結果、平野俊夫先生らのグループにより、IL-6 の受容体である glycoprotein 130 (gp130) の 759 番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したノックインマウス (F759 マウス) は加齢に伴い自己抗体の産生増加とともに関節リウマチに類似した関節炎を自然発症すること、また、この変異 gp130 は IL-6 シグナル伝達のうち Src homology region 2 domain-containing phosphatase (SHP)2 シグナル経路を欠損しており、かつ suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) によるネガティブフィードバック機構が働かなくなっているために、IL-6 シグナルが過剰に亢進していることが明らかとされた (Atsumi et al., 2002)。これにより、IL-6 シグナルの異常が関節リウマチの発症に関与することが初めて証明され、関節リウマチの治療標的として IL-6 が有望であることが示された。本発見と並行して、岸本忠三先生らのグループは関節リウマチ患者を対象とした臨床試験を進め、2008年、ヒト化抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体が IL-6 シグナルを標的とした関節リウマチ治療薬として実用化された。

先行研究において、F759 マウスでは加齢に伴い末梢血中に増加する major histocompatibility complex (MHC) クラス II 拘束性の cluster of differentiation (CD) 4 陽性 T リンパ球が重要な役割を担う一方で、骨髄移植実験からは、関節炎発症において gp130 の変異は CD4 陽性 T リンパ球には必要なく、非免疫系細胞において重要であることが示されている (Sawa et al., 2006)。非免疫系細胞に過剰な IL-6 シグナルが入ると IL-7 が過剰産生され、これが CD4 陽性 T リンパ球の恒常的な分裂促進を誘導する (Sawa et al., 2006)。そして続く研究にて、F759 マウスで加齢に伴い恒常的に増殖する CD4 陽性 T リンパ球からは大量の IL-17A が分泌されていること、及びこれが IL-6 とともに非免疫系細胞である I 型コラーゲン陽性細胞に同時に作用すると、IL-6 のみならず大量の炎症性サイトカイン及びケモカインが一斉に発現誘導されることを明らかとした (Ogura et al., 2008)。この産生増強機構には IL-17 による nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 活性化と IL-6 による signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 活性化が同時に起こることが重要であり、我々はこの機構を「炎症回路: Inflammation Amplifier」と命名した。炎症回路の活性化は F759 マウスだけではなく、多発性硬化症のモデルとして知られるマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) でも起こっており (Ogura et al., 2008)、広く自己免疫疾患に共通する病態発症メカニズムである可能性が示唆された。以上の実験的事実から我々は、非免疫系細胞と免疫細胞の相互作用による非免疫系細胞での炎症回路の慢性的活性化が様々な自己免疫疾患の発症原因になることを提唱し、4 ステップモデルとして報告した (Murakami et al., 2011a; Murakami et al., 2011b)。

一方、我々は上記研究と並行して、EAE マウスの病態発症機構解析も進めてきた。通常、中枢神経系は血液脳関門により物質の往来が厳密に制御されており、正常時ではウイルス等の病原体や免疫系細胞は中枢神経系に侵入できない。しかしながら、時にこれら病原体や免疫系細胞が中枢に侵入して感染症や炎症などを引き起こすことがある。EAE マウスでは、病態発症に伴い自己反応性の CD4 陽性 T リンパ球が中枢神経系に多量に侵入することから、本マウスを用いて中枢神経系への侵入口を探索した結果、野生型 C57BL/6 マウスに移入した自己反応性の CD4 陽性 T リンパ球は第 5 腰椎の背側血管に顕著に集積することが、全身薄切標本を用いた経日的な解析で示された (Arima et al., 2012)。そして驚くべきことに、第 5 腰椎の背側血管では炎症回路が活性化しており、CC chemokine-ligand (CCL) 20 の顕著な発現亢進が自己反応性の CD4 陽性 T リンパ球の集積を誘導していることが明らかとなった (Arima et al., 2012)。興味深いことに、第 5 腰椎の背側血管における CCL20 発現は自己反応性の CD4 陽性 T

リンパ球を移入していないC57BL/6 マウスでも認められ、これは第5 腰椎近傍の神経節と感覚神経でつながっているヒラメ筋が重力刺激によりこの感覚神経を活性化することで、直接或いは間接的に第5 腰椎の背側血管で炎症回路を活性化させていることが原因であった (Arima et al., 2012) 。この研究結果は、中枢神経系に免疫系細胞が侵入するためのゲートが局所の神経刺激を起点とする炎症回路の活性化を介して形成されることを示している。このような、感覚神経或いは交感神経の活性化により生じる神経ネットワークが局所の炎症状態を変化させる機構を、我々は「ゲートウェイ反射 : Gateway Reflex」と命名し、報告した (Sabharwal et al., 2014) (図1) 。ゲートウェイ反射は神経刺激が起こる部位により様々な場所で免疫系細胞の集積を引き起こし、多様な臓器特異的自己免疫疾患や慢性炎症性疾患の発症に関わる可能性がある。実際、我々はEAE マウスにおいて、痛み刺激が脳の前帯状回部位の活性化を介して第5 腰椎の腹側血管を支配する交感神経を活性化し EAE 症状を重症化させることや (Arima et al., 2015) 、慢性ストレスである睡眠障害を誘導すると通常は第5 腰椎の背側血管に形成されるゲートが脳内血管に形成され、脳内炎症を起点として胃や十二指腸の機能低下を誘導し最終的に心不全に至ること (Arima et al., 2017) を示している。

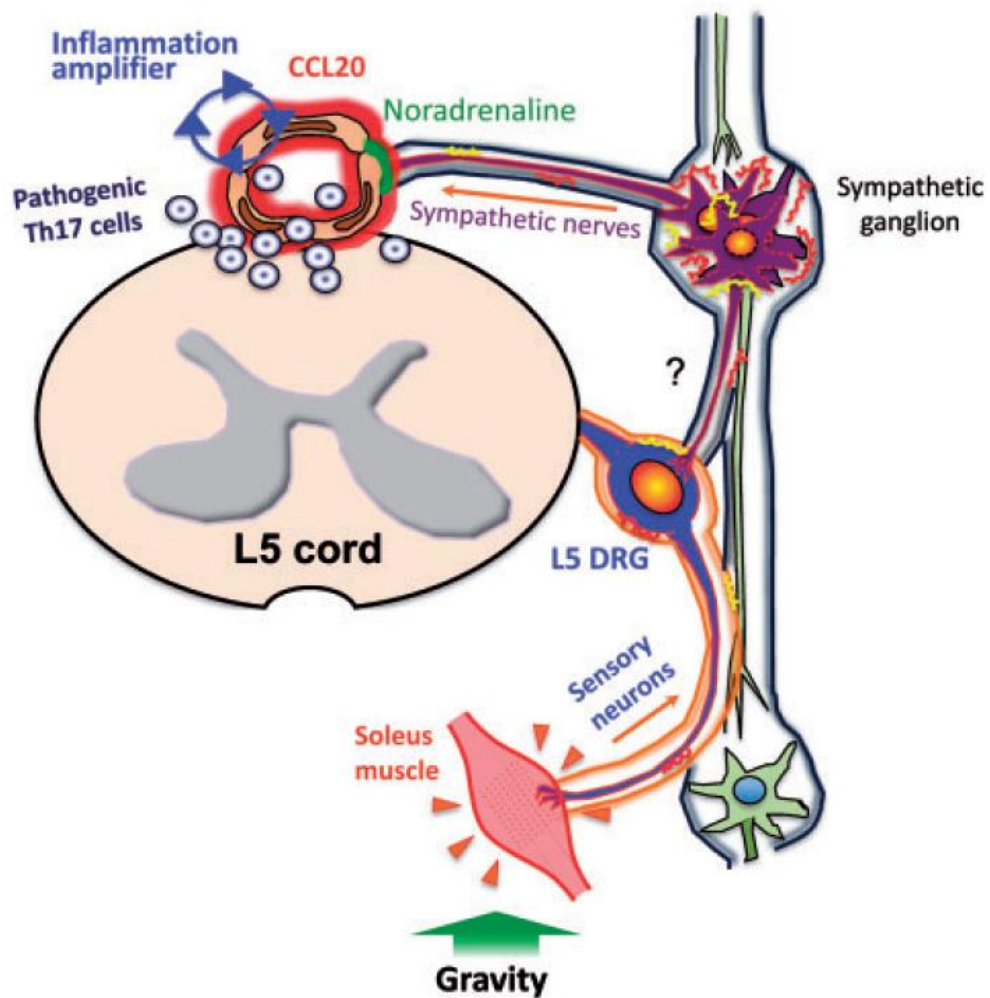


図1 ゲートウェイ反射の模式図

後肢ヒラメ筋は常に重力からの刺激を受けており、この刺激は第5腰椎近傍の神経節に繋がる感覚神経を介して第5腰椎に伝わり、直接或いは間接的に第5腰椎の背部血管で炎症回路を活性化させている。感覚神経を介した信号の一部は交感神経の活性化を誘導し、ノルアドレナリン等の神経伝達物質が第5腰椎の背部血管局所に放出される。ノルアドレナリンは炎症回路の活性化因子であり、交感神経を介した信号により炎症回路は増幅される。炎症回路の活性化はCCL20などのケモカインを大量に産生し、末梢血中に自己反応性CD4リンパ球が存在する場合、これらの細胞が蓄積し、中枢へのゲートが形成される。



以上の先行研究から、炎症回路の活性化は広く自己免疫疾患に共通する病態発症メカニズムである可能性が示唆され、炎症回路の分子基盤を明らかとすることは様々な疾患に対する新たな治療法の発見に繋がると期待された。そこで我々は、マウスの全ゲノム(約 16000 遺伝子)をカバーする約 65000 種の short hairpin RNA (shRNA) レンチウイルスライブラリーを用いて、マウス血管内皮細胞株である BC-1 細胞 (Zhang et al., 1998) において炎症回路の制御に関わる遺伝子を網羅的に探索し、炎症回路を正に制御する遺伝子を 1289 個同定した (Murakami et al., 2013)。そしてこの結果をもとに、炎症回路を正に制御する遺伝子群がヒトのどの疾患において特に関連が強いかを、ゲノムワイドスクリーニングのデータとヒト疾患関連遺伝子データベースを照合することで推測するという新たな手法で検討した。ヒト疾患関連遺伝子データベースには様々なヒト疾患における一塩基多型情報が蓄積されており、各疾患への関連が疑われる疾患関連遺伝子を推定することができる (Lander et al., 2011)。炎症回路を正に制御する 1289 遺伝子のうちヒトホモログが存在する 1177 遺伝子のなかに、ヒト疾患関連遺伝子データベースから抽出された疾患候補遺伝子がどれだけ含まれているかを解析した結果、無作為に抽出した遺伝子群と比較して、炎症回路を正に制御する遺伝子群には自己免疫疾患だけではなく、アレルギー性疾患や内臓脂肪症候群、神経変性疾患に関連する遺伝子が有意に多く含まれていることが示された (Murakami et al., 2013)。本結果は、マウス細胞を用いたゲノムワイドスクリーニングで見出した炎症回路を正に制御する遺伝子群がヒトにおいても様々な疾患に関連しており、様々なヒト疾患に炎症回路の活性化が関与している可能性をも示唆するものと考えられる。

今回我々が用いた解析手法は、ヒト疾患関連遺伝子データベースから抽出された疾患候補遺伝子について個別にこれらの機能を解析する通常の解析方法ではなく、網羅的解析によって同定した候補遺伝子群をヒト疾患関連遺伝子データベースと照合することで候補遺伝子群のヒト疾患への関与を推定するという、通常の genome wide association study (GWAS) データの利用法とは逆の手順となっている。我々はこれをリバースディレクション法と命名し、報告した (Singh et al., 2013) (図 2)。

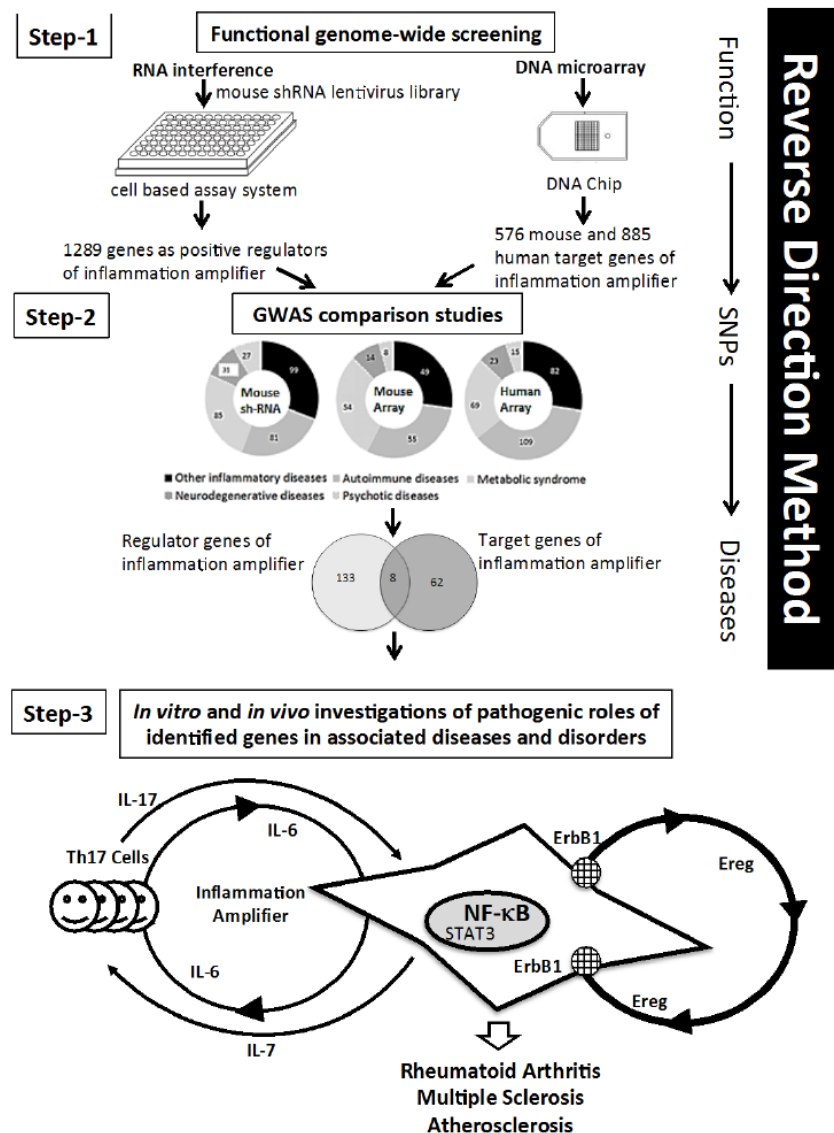
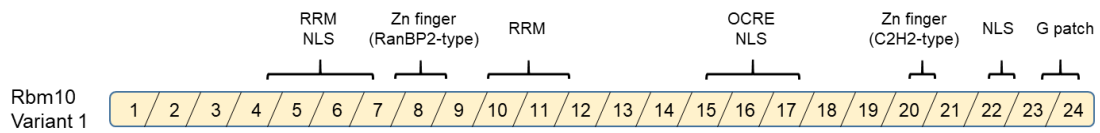


図2 リバースディレクション法の概略図

shRNA や DNA マイクロアレイを用いたゲノムワイドな実験結果を取得し (Step-1)、GWAS データから示される疾患候補遺伝子群と照合することで、ゲノムワイドな実験で同定した遺伝子群のヒト疾患への関連性を解析する (Step-2)。解析結果から着目した遺伝子について、*in vitro* 及び *in vivo* でその機能を解析する (Step-3)。概略図では、Step-3 での解析例として、炎症回路の制御遺伝子かつ標的遺伝子である erb-b2 receptor tyrosine kinase (ErbB) 1 (Murakami et al., 2013 ; Harada et al., 2015) を例示した。

以上より、炎症回路はヒトにおいて炎症反応が関与する様々な疾患の発症或いは増悪に関与することが示唆され、炎症回路の制御因子はこれら疾患に対する有望な治療標的となる可能性が期待された。そこで本研究では、ゲノムワイドスクリーニングで同定した炎症回路を正に制御する遺伝子群の中から、RNA binding motif (Rbm) ファミリーに分類されている Rbm10 (Sutherland et al., 2005) に着目し、Rbm10 の炎症回路制御機構について解析を行った。Rbm10 遺伝子は X 染色体上に位置し、24 個のエキソンが存在する (Johnston et al., 2010)。選択的スプライシングにより少なくとも 2 つのバリエントが存在し、バリエント 1 は全長 930 アミノ酸、バリエント 2 はバリエント 1 のうちエキソン 4 を欠失し 852 アミノ酸のタンパク質として産生され (Johnston et al., 2010)、その一次構造には 2 つの RNA recognition motif (RRM)、2 つの Zn フィンガードメイン、octamer repeat (OCRE)、G パッチドメイン及び 3 つの核移行シグナルが含まれる (Inoue et al., 1996; Sutherland et al., 2005; Xiao et al., 2013; Loiselle et al., 2018) (図 3)。Rbm10 は先行研究において RNA の選択的スプライシングに関与することや (Bechara et al., 2013; Wang et al., 2013; Inoue et al., 2014)、ヒトにおいて早期致死性の X 連鎖劣性遺伝性疾患である Talipes equinovarus, atrial septal defect, Robin sequence, and persistence of left superior vena cava syndrome (TARP) 症候群の原因遺伝子であることが報告されていたが (Gorlin et al., 1970; Johnston et al., 2010; Gripp et al., 2011; Johnston et al., 2014)、炎症疾患における関与は不明であった。本研究の結果、Rbm10 はマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) において DNA methyltransferase (Dnmt) 3b の選択的スプライシングに関与しており、Rbm10 をノックダウンした MEF では活性型アイソフォームである Dnmt3b2 の発現量比が増加することがわかった。Dnmt3b は DNA の de novo メチル化に関わるトランスフェラーゼであり、体細胞では Dnmt3b2~Dnmt3b5 の 4 種類のアイソフォームが発現し、Dnmt3b2 のみが酵素活性を有することが知られている (Okano et al., 1998; Ishida et al., 2003; Liao et al., 2015)。Rbm10 をノックダウンした MEF では Dnmt3b2 の存在比率が上昇して NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域のメチル化が亢進し、これら遺伝子の転写が抑制されることで炎症回路の活性化が抑制されることを示した。本研究により、Rbm10 は Dnmt3b のアイソフォーム発現比を調節することで様々なケモカイン、サイトカインの転写制御に関与する、炎症回路の活性化を正に制御する因子であることを明らかとした。Rbm10-Dnmt3b 経路はマウスだけではなくヒトにおいても様々な疾患に関与する可能性があり、新たな治療標的として有望である。



### 図3 Rbm10 の遺伝子構造 (模式図)

バリエント1 (24 エキソン) の遺伝子構造を示す。2つの RNA recognition motif、2つの Zn フィンガードメイン、octamer repeat、G パッチドメイン及び 3つの核移行シグナルを含む。バリエント2はエキソン4を欠失している。

図中の数字はエキソン番号を示す。

RRM: RNA recognition motif、OCRE: octamer repeat、NLS: nuclear localization signal、RanBP: Ran binding protein。

## 方法

すべての実験は、北海道大学遺伝子病制御研究所、大阪大学医学部並びに大阪大学大学院生命機能研究科の動物実験並びに遺伝子組換え実験に係る各種規定、指針に則り実施した。

### 1. 細胞

MEF は当教室で C57BL/6 マウスから単離されたものを使用した (Sawa et al., 2006; Ogura et al., 2008)。MEF 及び HEK293T は 10%ウシ胎児血清 (56°C、30 分間の非働化处理済み) 及び 100 U/mL ペニシリン、100 U/mL ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 又は RPMI 1640 を培養培地として、接着細胞培養の常法に従い継代培養した。

### 2. 動物

F759 マウスは、当教室で作出したマウスを C57BL/6 マウス (日本エスエルシー株式会社より購入) と 10 世代以上戻し交配して使用した (Atsumi et al., 2002; Murakami et al., 2011a)。マウスは北海道大学遺伝子病制御研究所及び大阪大学医学部にて specific pathogen free 環境下で飼育した。除外基準は設定せず、ランダム化、盲検化も実施しなかった。

### 3. 抗体、サイトカイン

以下の抗体は、ウエスタンブロッティング、免疫沈降及び共焦点顕微鏡観察に用いた。なおウエスタンブロッティングには 1000 倍希釈で使用した。抗 p65 抗体 (Santa cruz 社)、抗リン酸化 p65 (S536) 抗体 (Cell Signaling 社)、抗リン酸化 Stat3 (Y705) 抗体 (Cell Signaling 社)、抗 Rbm10 抗体 (Santa cruz 社)、抗 inhibitor of kappa B ( $I\kappa B$ )  $\alpha$  抗体 (Cell Signaling 社)、抗 Tubulin 抗体 (Santa cruz 社)、抗 Dnmt3b 抗体 (Abcam 社)、抗 histone H3 Lysine 9 acetylation (H3K9Ac) 抗体 (Sigma 社)、抗 trimethylation of histone H3 Lysine27 (H3K27me3) 抗体 (Active motif 社)、抗 methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) 抗体 (Santa cruz 社)、抗 p300 抗体 (Santa cruz 社)、抗 Lamin B 抗体 (Santa cruz 社)、AlexaFluor 488 標識二次抗体 (Invitrogen 社)、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体 (Cell Signaling 社)、抗 cMyc 抗体 (Santa Cruz 社、Texas)、抗 Flag M2 抗体 (Sigma 社)。以下のサイトカインは、文中に記載がない限り、下記濃度で使用した。ヒト IL-6 (Toray Industries、100 ng/mL)、ヒト sIL-6R (R&D Systems、100

ng/mL)、マウス IL-17 (R&D Systems、50 ng/mL)、マウスおよびヒト tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  (Peprotech 社、50 ng/mL)。

4. shRNA レンチウイルスを用いた Rbm10 ノックダウン MEF の作製

Rbm10 ノックダウン用の shRNA レンチウイルスパーティクル溶液は、Mission TRC shRNA clone の TRCN0000102552 (sh3 と表記) 及び TRCN0000102553 (sh4 と表記) を用いた。また、コントロールには SHC002V (Non-target と表記) を用いた。MEF を 96 ウェル平底培養プレートに  $1 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L/well で播種して 1 晩培養後、培養上清を除き、shRNA レンチウイルスパーティクル溶液 1  $\mu$ L、10% ウシ胎児血清及び 8  $\mu$ g/mL のポリブレン (Sigma 社) を含む DMEM を 35  $\mu$ L 添加して 1 晩培養した。10%ウシ胎児血清及び 5  $\mu$ g/mL のピューロマイシン (Sigma 社) を含む DMEM を 200  $\mu$ L 添加して培養を継続し、以降、2 ないし 3 日ごとに 10%ウシ胎児血清及び 5  $\mu$ g/mL のピューロマイシンを含む DMEM に培地交換しながら、100 mm 培養ディッシュまでスケールアップ培養して各ノックダウン MEF (それぞれ Rbm10 sh3、Rbm10 sh4、Non-target と表記) を取得した。細胞は適宜 10%ジメチルスルホキシドを含む 10%ウシ胎児血清に懸濁して凍結保存した。

5. 培養上清中サイトカイン濃度及び生細胞数の測定

MEF を 96 ウェル平底培養プレートに  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L/well で播種した。翌日、培養上清を除き、DMEM を 50  $\mu$ L 添加して 2 時間培養した後、最終濃度の 2 倍濃度のヒト IL-6、ヒト sIL-6R 及びマウス IL-17 を含む DMEM を 50  $\mu$ L 添加して 1 晩培養した。培養後、培養上清を回収して IL-6 ELISA kit (eBiosciences 社) を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により IL-6 濃度を測定した (培養上清は 50 倍又は 100 倍希釈して使用した)。また、生細胞数測定として、培養上清回収後のウェルに TetraColor One reagent (生化学工業) を 5%濃度で含む DMEM を 100  $\mu$ L 添加して 2 時間培養し、450 nm の吸光度を測定した。

6. 定量 RT-PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction : qRT-PCR) 及び RT-PCR

MEF を 12 ウェル平底培養プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well で播種した。翌日、培地を DMEM に交換して 2 時間培養した後、種々サイトカインで 1 又は 2 時間 (これ以外の刺激時間の場合は図中に記載) 刺激し、刺激後の細胞から total RNA を調製した。Total RNA の調製には GenElute Mammalian total RNA kit (Sigma 社) と DNaseI (Sigma 社) を用いた。逆転写反応による complementary DNA (cDNA)

合成にはM-MLV Reverse Transcriptase (Promega 社) を用いた。qRT-PCR による標的遺伝子及び hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA 発現量の定量には、7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社) 及び KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (KAPA Biosystems 社) を用いた。PCR は、94°C で 15 秒間、60°C で 60 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクル実施した。標的遺伝子の発現量は Hprt の発現量で標準化した。プライマーの配列を以下に示す。

Rbm10 : 5' -gcagaggattcctacgaggc-3' 及び 5' -ggtccgatagtcctggtcc-3'、  
Cxcl1 : 5' -ccacactcaagaatggtcgc-3' 及び 5' -cgttacttggggacaccttttagc-3'、  
Cc15 : 5' -ctccctgctgctttgctac-3' 及び 5' -cggttccttcgagtgacaaaca-3'、  
Socs3 : 5' -tcgatgctaaacgacgtcac-3' 及び 5' -gagatttcgcttcgggacta-3'、  
Cxcl5 : 5' -tcagaaaatattgggcagtgacaa-3' 及び 5' -ccgtgggtggagagaatcag-3'、  
Il6 : 5' -aggagacttcacagaggatacca-3' 及び 5' -gcaagtgcacatcgtttgttca-3'、  
Hprt : 5' -agcccaaaatggttaaggttg-3' 及び 5' -caaggcatatccaacaacaaac-3'、  
Dnmt3b2 : 5' -cggaatgaacaggcccgtgatggctt-3' 及び  
5' -aggaagccgaagatcctttcgag-3'、  
Dnmt3b3 : 5' -cggaatgaacagatccttcggctt-3' 及び  
5' -ctattcacaggcaaagtagtccttcaagg-3'、  
Dnmt3b4 : 5' -cggaatgaacaggttaaagaaagtgcag-3' 及び  
5' -ctattcacaggcaaagtagtccttcaagg-3'、  
Dnmt3b5 : 5' -aagcccatgcaatgatctctctaacg-3' 及び  
5' -ggaagccgaagattttgetgtcc-3'。

## 7. レトロウイルスを用いた遺伝子導入

レトロウイルス産生細胞は、HEK293T に Flag-Dnmt3b2、Flag-Dnmt3b3 又は Flag-Dnmt3b4 cDNA 配列を組み込んだ pMXs-IRES BSR retroviral expression vector (Cell Biolabs 社)、ないし shRNA 耐性の Rbm10 cDNA 配列を組み込んだ pMXs-IRES GFP retroviral expression vector (Cell Biolabs 社) を pCL10A1 retrovirus packaging vector (Imgenex 社) とともにトランスフェクションして作製した。トランスフェクション後 2 又は 3 日後の培養上清を、24 ウェルプレートに  $2 \times 10^5$  cells/well で播種した MEF に添加し、2500 rpm、90 分間 (32°C) で遠心してスピニンフェクション法にてレトロウイルスを MEF に感染させた。Flag-Dnmt3b2、Flag-Dnmt3b3 又は Flag-Dnmt3b4 発現細胞は、10  $\mu$ g/ml の blasticidin S (Sigma 社) 及び 10% ウシ胎児血清及びを含む DMEM 培地で選択した。shRNA 耐性 Rbm10 発現細胞は green fluorescent protein (GFP) 発現を指標にセ

ルソーティングで選択した。

#### 8. クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation : ChIP)

MEF を種々サイトカインで刺激後 (刺激時間は図中に記載)、培養上清を除き、1%パラホルムアルデヒド溶液で細胞を固定した。細胞溶解バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、140 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM EDTA、1% SDS] で細胞を溶解し、ソニケーション処理してクロマチン DNA 溶液を調製した。各種抗体 (抗 H3K9Ac 抗体、抗 H3K27me3 抗体、抗 MBD2 抗体、抗 p65 抗体、抗 p300 抗体又は抗 Dnmt3b 抗体) と Dynabeads protein G (ライフテクノロジーズ社) を添加し 4°C で 1 時間反応させた後、遠心分離して上清を破棄し、ペレットを細胞溶解バッファーで洗浄した。ペレットに 40  $\mu$ L の 10% Chelex 100 懸濁液 (バイオラッド社) を添加して煮沸後、Proteinase K 処理 (55°C、30 分) を行い、遠心分離して上清を回収した。各遺伝子のプロモーター配列に特異的なプライマーを用いた qPCR により免疫沈降された DNA 量を定量した。標的 DNA 量はクロマチン DNA 溶液を鋳型としたときの DNA 量で標準化した。プライマーの配列を以下に示す。

IL-6 promoter : 5' -tcgatgctaaacgacgtcac-3' 及び 5' -tgagctacagacatccccagt-3'、  
CXCL1 promoter : 5' -ctgagcactggagactctgaag-3' 及び  
5' -gctgggatcatggtgctgtgtt-3'、  
CXCL5 promoter : 5' -aaggagtctgaccagagca-3' 及び 5' -gtgtggagattggggctcta-3'。

#### 9. 免疫沈降

HEK293T に、ポリエチレンイミン法にて Flag-Dnmt3b2、Flag-Dnmt3b3 又は Flag-Dnmt3b4、及び Myc 融合型 p65 [全長 (full)、306~551 アミノ酸領域欠失体 ( $\Delta$ 305) 又は 522~551 アミノ酸領域欠失体 ( $\Delta$ 521)] を強制発現させた。細胞を IP バッファー [50 mM Tris-HCl (pH7.4)、500 mM NaCl、1% NP-40、3 mM EDTA] に溶解後、IP バッファーで全量を 1 mL に調製し、30  $\mu$ L の protein G-Sepharose (GE ヘルスケア社) を添加して 4°C で 1 時間穏やかに混合した (プレクリア)。遠心分離して上清を回収し、30  $\mu$ L の抗 Flag 抗体ビーズ (Sigma 社) を添加して 4°C で 2 時間穏やかに混合した。遠心分離して上清を除き、ペレットを IP バッファーで洗浄後、5 mg/mL の 3 $\times$ FLAG peptide (Sigma 社) を 3  $\mu$ L 含む tris buffered saline を 100  $\mu$ L 添加して 4°C で 30 分穏やかに混合した。遠心分離して上清を回収し、目的遺伝子産物をウエスタンブロットティングで検出した。



#### 10. ウェスタンブロッティング用サンプルの調製

MEF を種々サイトカインで刺激後（刺激時間は図中に記載）、培養上清を除き、phosphate buffered saline で洗浄した。Protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma 社) を添加した IP バッファー溶液で細胞を溶解し、これをウェスタンブロッティング用サンプルとした。核内タンパク検出用サンプルの調製には、細胞を低張バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA] に溶解し、遠心分離して上清を除いた後、高張バッファー [20 mM Tris-HCl (pH7.5)、420 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM EDTA、25% glycerol] に溶解して核タンパクを抽出した。遠心分離して上清を回収し、これをウェスタンブロッティング用サンプルとした。

#### 11. メチル化 DNA 免疫沈降 (methylated DNA immunoprecipitation-sequencing : MeDIP-Seq)

MeDIP-Seq は、MEF からフェノール/クロロホルム法で抽出したゲノム DNA をサンプルとして BGI Japan 社に委託して実施した。データ解析は GRCm38/mm10 データベース上で UCSC genome browser を用いて実施した。解析対象遺伝子の転写開始点 (transcription start site : TSS) 前後 500 bp を解析対象とした。

#### 12. メチル化 DNA 特異的 PCR

MEF からフェノール/クロロホルム法で抽出したゲノム DNA をサンプルとして、EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermofisher scientific 社) を用いて非メチル化シトシンをウラシルに変換した (バイサルファイト反応、図 10b)。バイサルファイト反応は、20  $\mu$ L のゲノム DNA 溶液に Modification Reagent を 120  $\mu$ L 添加し、98°C で 10 分、続いて 60°C で 150 分処理して行った。キット添付の精製用カラムに反応液をアプライし、洗浄後、Desulfonation buffer を添加して脱スルホン化処理を行った。洗浄後、Elution Buffer でゲノム DNA を溶出し、これをサンプルとして qPCR を行った。プライマーは、CXC motif ligand (Cxcl) 1 遺伝子プロモーター領域の CpG 配列を含む領域 (図 10c) を対象に、メチル化シトシン特異的及び非メチル化シトシン (ウラシル) 特異的なものを設計した。メチル化シトシンの存在比は、バイサルファイト反応を行わずに調製したゲノム DNA をサンプルとしたときの増幅量を基準として算出した。プライマーの配列を以下に示す。

Unmethylated(-71) : 5' -gttggtattttgttttagtgaagtatgt-3' 及び  
5' -ctccaaacccaaaaattcccaaa-3'、

Unmethylated(-54) : 5'-gttgttatttgttttagtgaagtatgt-3' 及び  
5'-tactcaaaaactccaaaactccaaa-3'、  
Methylated(-71) : 5'-tcgttatttgttttagcgaagtacg-3' 及び  
5'-ctccgaacccaaaaaattcccga-3'、  
Methylated(-54) : 5'-tcgttatttgttttagcgaagtacg-3' 及び  
5'-ataactcgaactccaaaactcccga-3'。

### 13. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

IL-6 プロモーター配列を組み込んだ pGL4. 20 [Luc2/Puro] ベクター (Promega 社)、pGL4. 74[hRluc/TK]ベクター (Promega 社)、及び Dnmt3b2 或いは Dnmt3b3 発現ベクターを、ポリエチレンイミン法で HEK293T に一過性に導入した。導入後 24 時間で細胞を回収し、96 ウェル平底培養プレートに播種して、20 ng/mL の TNF  $\alpha$  で 6 時間刺激した。刺激後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いた発光測定によりレポーター活性を測定した。レポーター活性は pGL4. 74[hRluc/TK]の発光強度で標準化した。

MEF への pGL4. 32 [Luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] ベクター (Promega 社) 及び pGL4. 74[hRluc/TK]ベクター (Promega 社) の一過性導入はポリエチレンイミン法で実施した。遺伝子導入後 24 時間で細胞を回収し、96 ウェル平底培養プレートに播種して、50 ng/mL の TNF  $\alpha$  で 6 時間刺激した。刺激後、HEK293T と同様にしてレポーター活性を測定した。レポーター活性は pGL4. 74[hRluc/TK]の発光強度で標準化した。

### 14. 共焦点顕微鏡観察

MEF を Cytifix / Cytoperm solution (BD 社) で 10 分間処理して固定後、Perm/Wash solution (BD 社) で膜透過処理した。抗 p65 抗体或いは抗 Rbm10 抗体 (50 倍希釈) で 1 時間処理後、Perm/Wash solution で洗浄し、AlexaFluor 488 標識二次抗体 (200 倍希釈) 及び Hoechst 33342 (10000 倍希釈) を 1 時間処理した。共焦点顕微鏡観察にて蛍光を検出し、画像データを取得した。

### 15. 近接ライゲーションアッセイ (proximity ligation assay : PLA)

p65 と Dnmt3b の相互作用は Duolink In Situ PLA system (Sigma 社) を用いて検出した。ガラスボトムディッシュ上で培養した MEF を Cytifix/Cytoperm solution (BD 社) で 10 分間処理して固定後、Perm/Wash solution (BD 社) で膜透過処理した。キット添付のブロッキング溶液で 37°C、30 分処理後、抗 p65 抗体

(50 倍希釈) 及び抗 Flag M2 抗体 (500 倍希釈) 又は抗 Dnmt3b 抗体 (100 倍希釈) で 1 時間処理した。洗浄後、PLA プローブ溶液で 1 時間処理し、再度洗浄した後にライゲーションリガーゼ溶液を滴下して 37°C で 1 時間処理した。洗浄後、ポリメラーゼ溶液を滴下し、暗所、37°C で 2 時間処理した。洗浄後乾燥させ、カバースリップをマウントした。共焦点顕微鏡観察にて蛍光 PLA シグナルを検出し、Z スタック画像を画像データとして取得した。蛍光シグナル数を BlobFinder 3.2 ソフトウェアで計数した。

#### 16. F759 マウス関節炎モデル

実験の概略図を図 7a に示した。関節炎誘発初日 (D0) の 6 日前より、隔日で計 3 回、F759 マウスの後肢関節内に shRNA レンチウイルスパーティクル溶液 (sh3、sh4 又は Non-target) を注射した。D0 より 3 日間、IL-17 及び IL-6 (0.1  $\mu$ g) を連日関節内注射して関節炎を誘発した。関節炎症状は目視によるスコア評価で、サイトカイン注射足の腫脹及び拘縮をそれぞれ 0~2 (0: 異常なし、1: 軽度、2: 重度) でスコア化し、個体ごとに合計値を算出した。スコア評価は D0、D2、D3、D6、D8、D10、D12 及び D15 に実施した。

#### 17. 統計解析

2 群間の検定はスチューデントの t 検定 (両側) で実施した。多重比較は一元配置分散分析で実施した。P 値が 0.05 未満の場合、有意差ありと判定した。各図中の\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$ 、\*\*\*は  $p < 0.001$  を示す。

## 結果

### 1. Rbm10 遺伝子をノックダウンした MEF では炎症回路の活性化が抑制された

本研究では、ゲノムワイドスクリーニングで同定した炎症回路を正に制御する遺伝子群のうち、Rbm10 に着目して、この遺伝子が炎症回路を制御する機構について解析を行った。

まず初めに、ゲノムワイドスクリーニングでは血管内皮細胞株である BC-1 を用いていたため (Murakami et al., 2013)、再現性確認のため MEF にゲノムワイドスクリーニングに用いたものと同じ shRNA レンチウイルスを感染させて Rbm10 ノックダウン MEF を作製し、炎症回路の活性化が抑制されているかを確認した。MEF に各 shRNA レンチウイルスを感染させた後、ピューロマイシンを含む培養培地で継代培養して、増殖に異常なく安定的に長期に継代培養できる 2 株を取得した (それぞれ Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4)。この 2 株の Rbm10 遺伝子発現量を非特異的な shRNA を導入して同様に作製した MEF (Non-target) と比較した結果、Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4 ではともに Rbm10 遺伝子発現量が有意に低下していることを確認した (図 4a)。次に、これら 3 株の MEF (Non-target、Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4) を IL-6 (IL-6 と soluble interleukin-6 receptor : sIL-6R)、IL-17、又は IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で 24 時間刺激したときの培養上清中 IL-6 濃度を ELISA 法で測定した。なお、MEF はヒト IL-6 に応答することがこれまでの検討で分かっている。本研究ではヒトの IL-6 及び sIL-6R で MEF を刺激しており、ELISA で使用した 1 次抗体 (抗マウス IL-6 抗体) はヒト IL-6 に交差反応しないため、刺激に用いたヒト IL-6 の影響を受けずに培養上清中の MEF 由来のマウス IL-6 を定量することができる。この結果、Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4 では Non-target と比較して、生細胞数に影響することなく IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で刺激したときの IL-6 産生量が有意に抑制されており、ゲノムワイドスクリーニングの結果と同様に、I 型コラーゲン陽性線維芽細胞において Rbm10 のノックダウンにより炎症回路の活性化が抑制されることを確認できた (図 4b)。また、Rbm10 ノックダウン MEF では、TNF $\alpha$  刺激による IL-6 産生も有意に抑制された (図 4b)。このことから、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B シグナル経路が阻害されている可能性が示唆された。

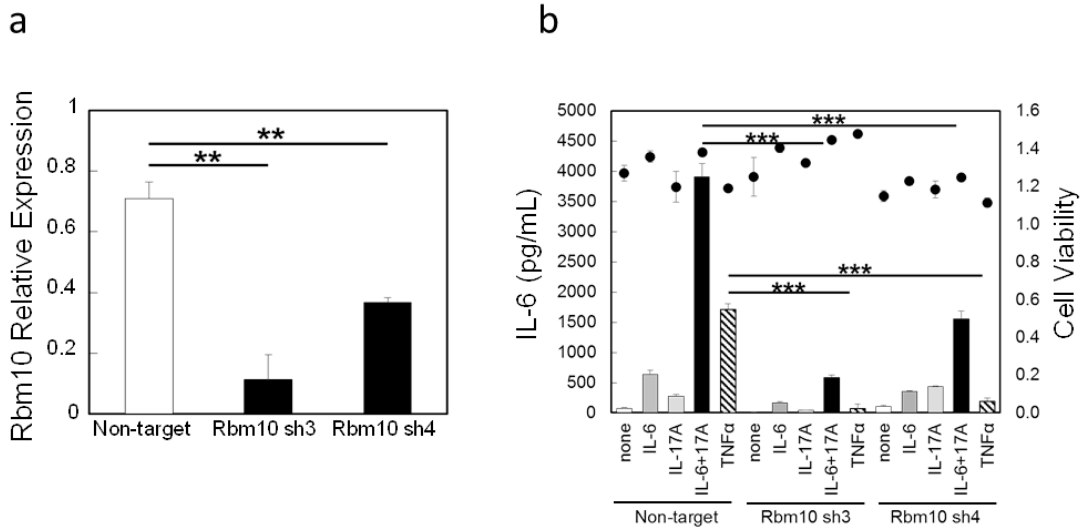


図4 Rbm10 ノックダウンMEF では炎症回路の活性化が抑制された

(a) Rbm10 ノックダウン MEF (Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4) での Rbm10 遺伝子発現量を qRT-PCR で解析した。Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4 では Non-target と比較して、Rbm10 遺伝子発現量の有意な減少が確認された。結果は Hrpt を内部標準とした相対発現量で示した。(b) Rbm10 ノックダウン MEF (Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4) 及び Non-target を各サイトカインで 24 時間培養したときの培養上清中 IL-6 濃度を ELISA で測定した。また、培養上清回収時の細胞生存率を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法で評価した。Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4 では Non-target と比較して、生細胞率に影響することなく IL-6 と IL-17 で刺激したときの IL-6 産生量が有意に抑制された。また、TNF $\alpha$  刺激による IL-6 産生も有意に抑制された。図中の棒グラフは IL-6 濃度 (左側縦軸) を、点は生細胞数の測定値 (右側縦軸) を示す。

2. Rbm10 ノックダウン MEF では TNF  $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現量が低下した

Rbm10 ノックダウン MEF では TNF  $\alpha$  刺激による IL-6 産生が有意に抑制されたことから、NF- $\kappa$ B シグナル経路が阻害されている可能性が示唆された。そこで次に、Rbm10 ノックダウン MEF を TNF  $\alpha$  で刺激したときの NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現量を qRT-PCR で評価した。なお、以降の実験では主に、Rbm10 ノックダウン MEF として Rbm10 遺伝子発現量の低下がより顕著であった Rbm10 sh3 を用いた。その結果、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子である Cxcl1、Ccl5、Cxcl5 及び Il-6 の TNF  $\alpha$  刺激による発現増加は、いずれも Rbm10 sh3 で有意に抑制されていた (図 5)。一方、STAT3 標的遺伝子である Socs3 の IL-6 刺激による発現増加については、Rbm10 sh3 でまったく抑制されていなかった (図 5)。この結果から、Rbm10 ノックダウン MEF では STAT3 シグナルには異常がなく、NF- $\kappa$ B シグナルが抑制されていることが示唆された。

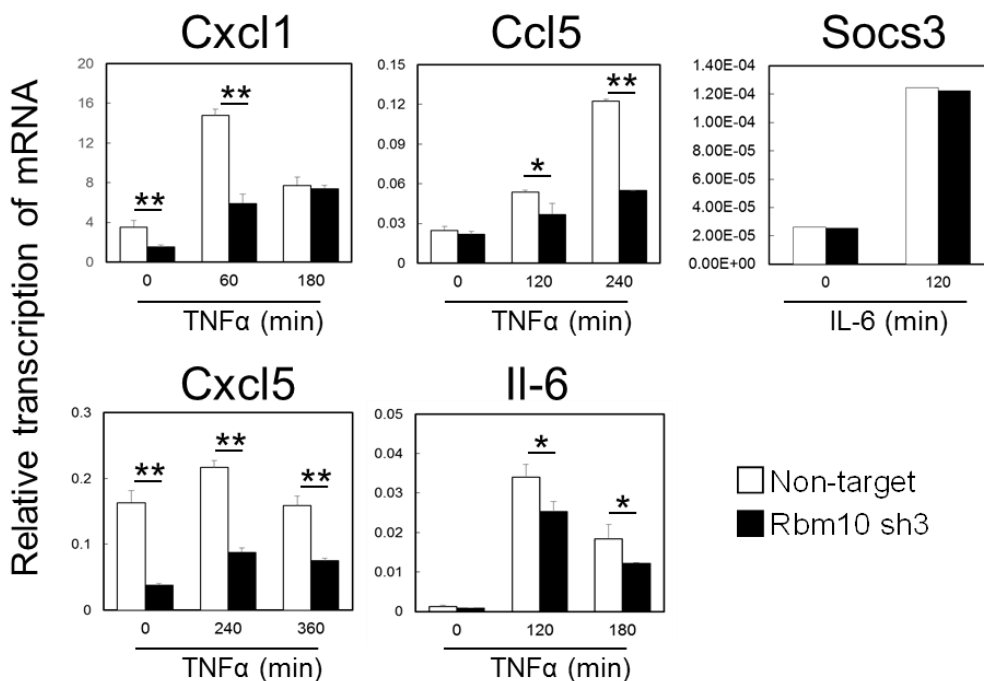


図 5 Rbm10 ノックダウン MEF では TNF  $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現量が低下した

Rbm10 ノックダウン MEF (Rbm10 sh3) を TNF  $\alpha$  或いは IL-6 (IL-6 と sIL-6R) で刺激したときの NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 (Cxcl1、Ccl5、Cxcl5 及び Il-6) 及び STAT3 標的遺伝子 (Socs3) の発現量を qRT-PCR で解析した。結果は Hrpt を内部標準とした相対発現量

で示した。Rbm10 sh3 では Non-target と比較して、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子である Cxcl1、Cc15、Cxc15 及び Il-6 の TNF  $\alpha$  刺激による発現増加が有意に抑制された。一方、STAT3 標的遺伝子である Socs3 の IL-6 刺激による発現増加は、Rbm10 sh3 でまったく抑制されていなかった。

### 3. Rbm10 ノックダウン MEF における NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現低下は Rbm10 の強制発現により回復した

Rbm10 ノックダウン MEF で認められた炎症回路活性化の抑制が、Rbm10 の発現抑制に基づくものであり shRNA の導入に伴うアーティファクトではないことを確認するために、Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させるためのレトロウイルスを作成し、これを Rbm10 ノックダウン MEF 感染させたときの表現型を評価した。Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させた結果、Rbm10 sh3 で認められた Rbm10 遺伝子の発現抑制はレスキューされ、その相対発現量は Non-target より高値であった (図 6a)。この条件下で、Rbm10 sh3 を IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で刺激したときの IL-6 産生量は、Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで、Non-target よりは低値ではあったものの有意に回復した (図 6b)。また、炎症回路の活性化により発現誘導される IL-6 及び CXCL1 の遺伝子発現量は、Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで、Non-target とほぼ同等にまで回復した (図 6c、d)。以上の結果から、Rbm10 ノックダウン MEF で認められた炎症回路活性化の抑制は、shRNA の導入に伴うアーティファクトではなく、Rbm10 の発現抑制に基づくものであることが確認された。

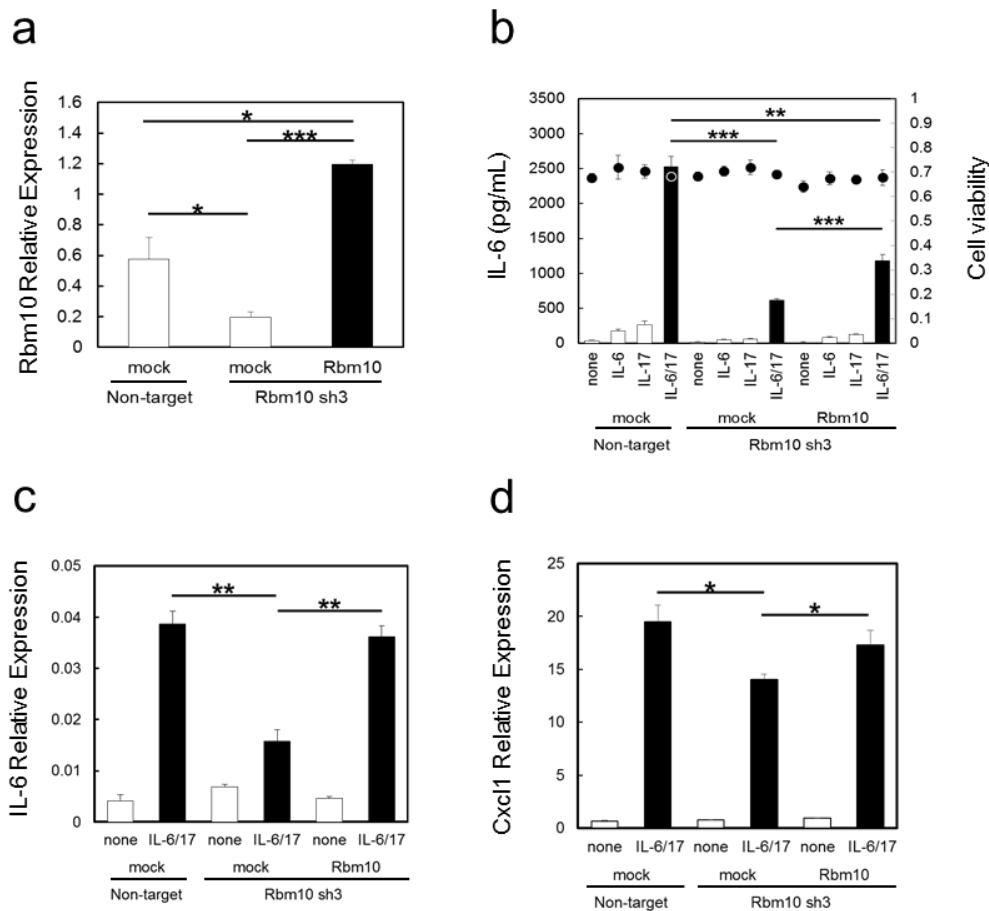


図6 Rbm10 ノックダウン MEF における NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現低下は Rbm10 の強制発現により回復した

(a) Rbm10 sh3 にレトロウイルスを感染させ、Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させた。結果は Hrpt を内部標準とした相対発現量で示した。(b) Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させ、各サイトカインで 24 時間培養したときの培養上清中 IL-6 濃度を ELISA で測定した。また、培養上清回収時の細胞生存率を MTT 法で評価した。Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで、Rbm10 sh3 で認められた IL-6 と IL-17 で刺激したときの IL-6 産生低下が有意に回復した。図中の棒グラフは IL-6 濃度 (左側縦軸) を、点は生細胞数の測定値 (右側縦軸) を示す。(c) (d) Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させ、IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で刺激したときの NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 (IL-6 及び Cxcl1) の発現量を qRT-PCR で解析した。結果は Hrpt を内部標準とした相対発現量で示した。Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで、Rbm10 sh3 で認められた IL-6 及び Cxcl1 の発現低下が有意に回復した。



4. F759 マウスにおける関節炎の発症は Rbm10 shRNA レンチウイルスの関節内注射により抑制された

Rbm10 ノックダウン MEF を用いた一連の解析から、Rbm10 は I 型コラーゲン陽性線維芽細胞である MEF において、炎症回路の活性化を正に制御する因子であると推察された。そこで次に、Rbm10 が *in vivo* においても炎症回路の制御因子として機能しているかを検討するために、F759 マウスを用いて、本マウスでの関節炎病態に対する Rbm10 ノックダウンの効果を評価した。F759 マウスは加齢により炎症回路の活性化に伴う関節炎病態を自然発症するが (Atsumi et al., 2002)、若齢の F759 マウスにおいても関節内に IL-17 と IL-6 を直接注射することで、NF- $\kappa$ B シグナルに依存した関節炎病態を注射後数日内に発症することを我々は見出しており (Murakami et al., 2011a ; Murakami et al., 2013; Harada et al., 2015; Meng et al., 2016)、新たな関節炎モデルとして確立している。本研究においても、本モデルを用いて、サイトカインの関節内注射に先立ち Rbm10 shRNA レンチウイルスを関節内注射することで、関節炎病態の形成に対する Rbm10 ノックダウンの効果を検討した。その結果、Non-target shRNA レンチウイルスを関節内注射したマウスでは関節炎病態が明確に誘発されたのに対して、Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4 どちらの shRNA レンチウイルスを関節内注射した場合でも、関節炎の発症は明らかに抑制された (図 7b)。この結果から、Rbm10 は I 型コラーゲン陽性の非免疫系細胞において、炎症回路の活性化を正に制御する因子であることが *in vivo* でも確認された。

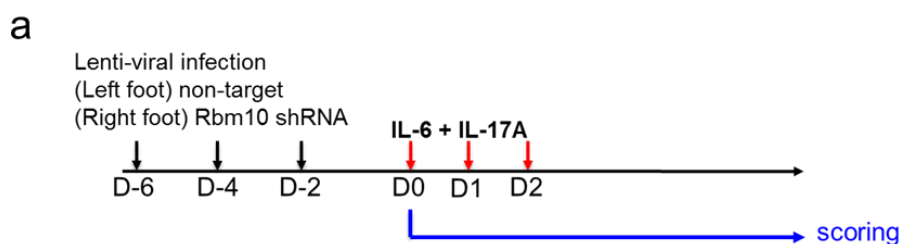


図 7 F759 マウスにおける関節炎の発症は Rbm10 shRNA レンチウイルスの関節内注射により抑制された

(a) F759 マウスを用いた関節炎モデル実験の概略図を示す。IL-6 及び IL-17 を 3 日間連続日関節内注射して関節炎を誘発した。各 shRNA レンチウイルスはサイトカイン関節内注射初日 (D0) の 6 日前 (D-6) より隔日で計 3 回関節内注射した。関節炎症状は目

視によるスコア評価で、D0 より D15 まで評点した。

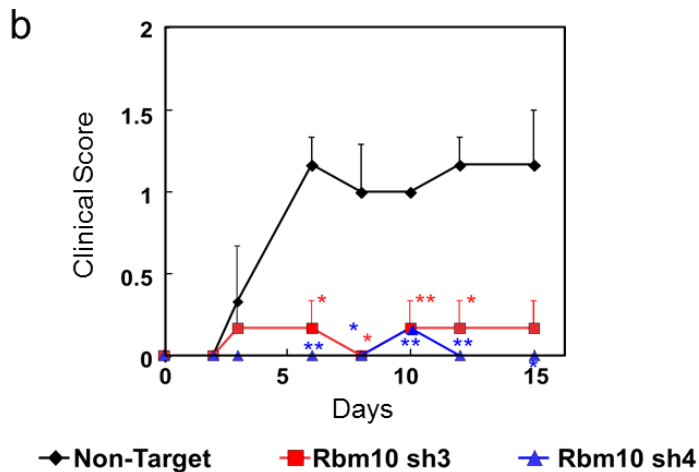


図7 (続き)

(b) F759 マウスに IL-6 及び IL-17 を関節内注射して関節炎症状を誘発した。Non-target shRNA レンチウイルスをあらかじめ関節内注射したマウスでは明確な関節炎症状が認められたが、Rbm10 shRNA レンチウイルス (shRNA3 及び shRNA4) を関節炎注射したマウスでは関節炎症状が明らかに抑制された。

5. Rbm10 ノックダウン MEF では核内において NF- $\kappa$ B シグナル経路が阻害されていると推察された

これまでの解析結果から、Rbm10 による炎症回路の活性化制御機構は NF- $\kappa$ B シグナルの阻害に基づくものと推察された。そこで次に、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B シグナルのどこが障害されているのかを検討するために、Rbm10 sh3 及び Non-target に NF- $\kappa$ B 応答配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4.32 [Luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]) を一過性導入し、これを TNF $\alpha$  で刺激したときの両細胞のルシフェラーゼ活性を比較した。その結果、Rbm10 sh3 では Non-target と比較して、TNF $\alpha$  刺激によるルシフェラーゼ活性の増加が有意に抑制されていた (図 8a)。そこで、NF- $\kappa$ B シグナル伝達因子 p65 に着目してその活性化をウエスタンブロットティングで確認した。しかしながら、Rbm10 ノックダウン MEF (sh3 及び sh4) を TNF $\alpha$  で刺激したときの p65 のリン酸化及び I $\kappa$ B $\alpha$  の分

解は、Non-target と同様に観察され (図 8b)、p65 の核内移行についても、Non-target と Rbm10 sh3 でほぼ同程度であった (図 8c)。なお、IL-6 及び sIL-6R で刺激した時の STAT3 リン酸化 (Y705) についても、Non-target と Rbm10 ノックダウン MEF (sh3 及び sh4) 双方で認められた (図 8b)。

免疫染色において、Rbm10 は無刺激状態の MEF ではほぼすべてが核内に局在していた (図 8d)。これらの結果から、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B シグナル経路が阻害されているが、これは細胞質内ではなく、p65 が核内移行して以降の段階で核内において起こっているのではないかと推察された。

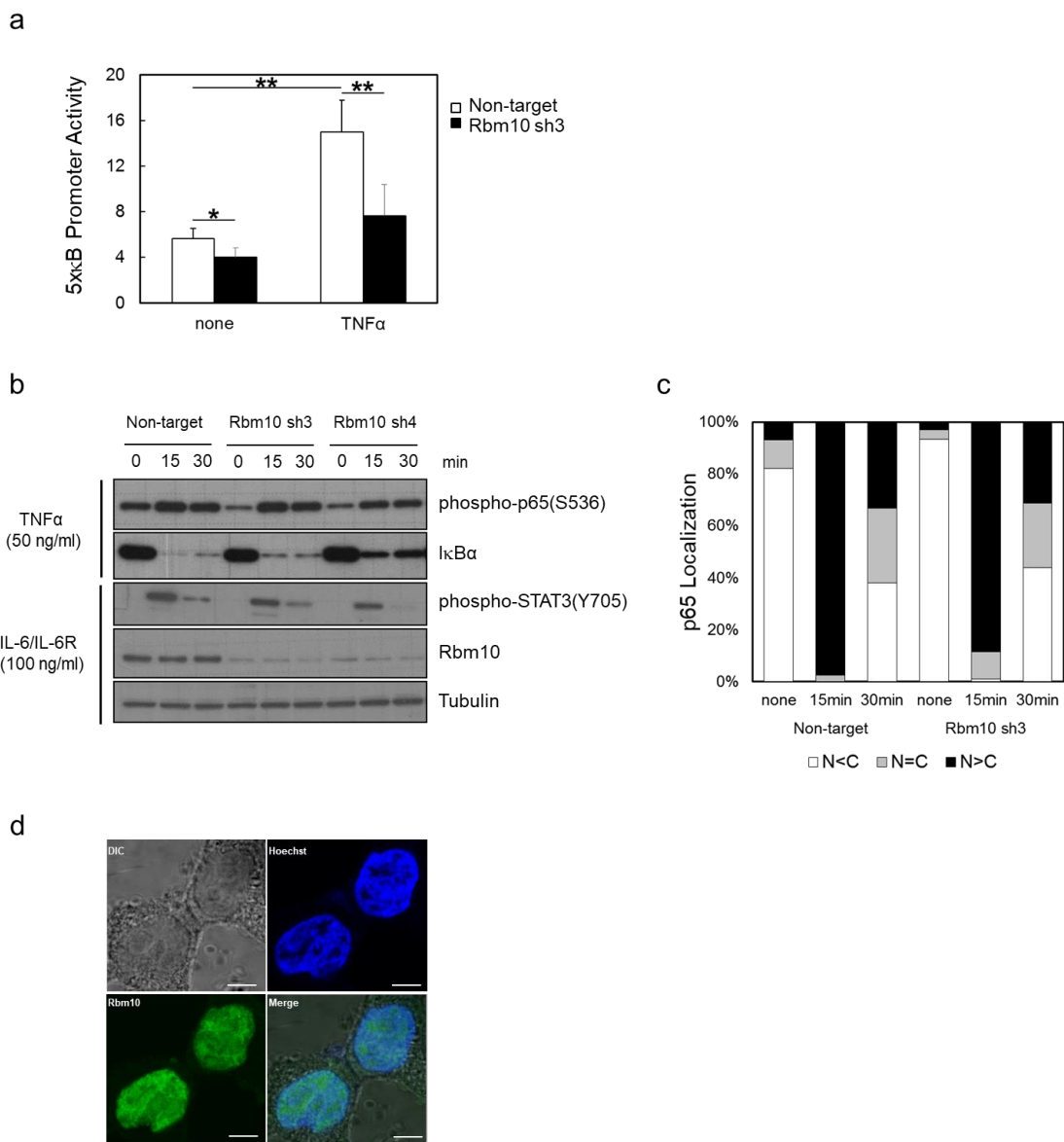


図 8 Rbm10 ノックダウン MEF では核内において NF- $\kappa$ B シグナル経路が阻害されてい

ると推察された

(a) Non-target 及び Rbm10 sh3 に NF- $\kappa$ B 応答配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクター (pGL4.32 [Luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]) を一過性導入し、TNF $\alpha$  で6時間刺激後のルシフェラーゼ活性を測定した。Rbm10 sh3 では Non-target と比較して、TNF $\alpha$  刺激によるルシフェラーゼ活性の増加が有意に抑制された。結果は共導入した pGL4.74[hRluc/TK] の発光強度で標準化して算出した。(b) Rbm10 ノックダウン MEF (Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4) 及び Non-target を TNF $\alpha$  或いは IL-6 (IL-6 及び sIL-6R) で所定時間刺激後、細胞溶解液を調製し、ウエスタンブロッティングに供した。TNF $\alpha$  で刺激時の NF- $\kappa$ B シグナル伝達因子 p65 のリン酸化及び I $\kappa$ B $\alpha$  の分解、並びに IL-6 及び sIL-6R で刺激時の STAT3 のリン酸化は、Rbm10 ノックダウン MEF (Rbm10 sh3 及び Rbm10 sh4) と Non-target でともに同程度認められた。(c) Non-target 及び Rbm10 sh3 を TNF $\alpha$  で所定時間刺激後、細胞を固定し、抗 p65 抗体で染色した。共焦点顕微鏡下で細胞を観察し、p65 の核内移行の程度を定性的に数値化した。N<C : p65 の局在が核内より細胞質の方が多く、N=C : p65 の局在が核内と細胞質でほぼ同等、N>C : p65 の局在が細胞質より核内の方が多く。(d) 野生型の MEF をパラホルムアルデヒド固定後、抗 Rbm10 抗体 (左下)、Hoechst33342 (右上) で染色し、共焦点顕微鏡下で細胞を観察した。左上の画像 (DIC) は微分干渉観察、右下の画像 (Merge) は重ね合わせ画像を示す。図中のバーは 5  $\mu$ m。

6. Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写プロモーター領域における p65 及び p300 の集積並びにヒストン H3K9 のアセチル化修飾が抑制されていた

Rbm10 ノックダウン MEF において、NF- $\kappa$ B シグナル伝達因子 p65 の核内移行後にどのような機序で NF- $\kappa$ B シグナルが阻害されているかを検討するために、抗 p65 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域への p65 の集積を確認した。その結果、Non-target と比較して、IL-6 及び IL-17 共刺激下の Rbm10 sh3 では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子である IL-6 及び CXCL5 のプロモーター領域への p65 の集積が明らかに減少していた (図 9a)。そこで、転写コアクチベーターであるヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300 の集積についても同様に検討した結果、IL-6 及び IL-17 共刺激下での p300 の IL-6 及び CXCL5 プロモーター領域への集積も、Rbm10 sh3 で減少していた (図 9b)。さらに、9 番目の Lys9 残基がアセチル化したヒストン H3 (H3K9Ac) を認識する抗体で ChIP アッセイを実施した結果、Rbm10 sh3 では IL-6 及び CXCL5 遺伝子プロモータ

一領域での H3K9 アセチル化が抑制されていた (図 9c)。一般的に、転写誘導においてはヒストン修飾によるクロマチン構造変化がどのような状態であるかが重要であり、プロモーター領域への p300 の集積及び H3K9 アセチル化の亢進は転写誘導に関わるとされている。Rbm10 ノックダウン MEF では IL-6 及び CXCL5 プロモーター領域への p300 の集積、並びに H3K9 アセチル化が抑制されていたことから、サイトカイン刺激下で NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域が転写活性化状態に傾いておらず、これにより p65 がプロモーター部位に集積出来ないために、NF- $\kappa$ B シグナルが抑制されていると推察された。さらに、Rbm10 sh3 における p300 の集積並びに H3K9 アセチル化の抑制は、サイトカイン非刺激条件でも認められたことから (図 9b、c)、Rbm10 ノックダウン MEF での NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写抑制は定常状態から起こっている可能性が示唆された。

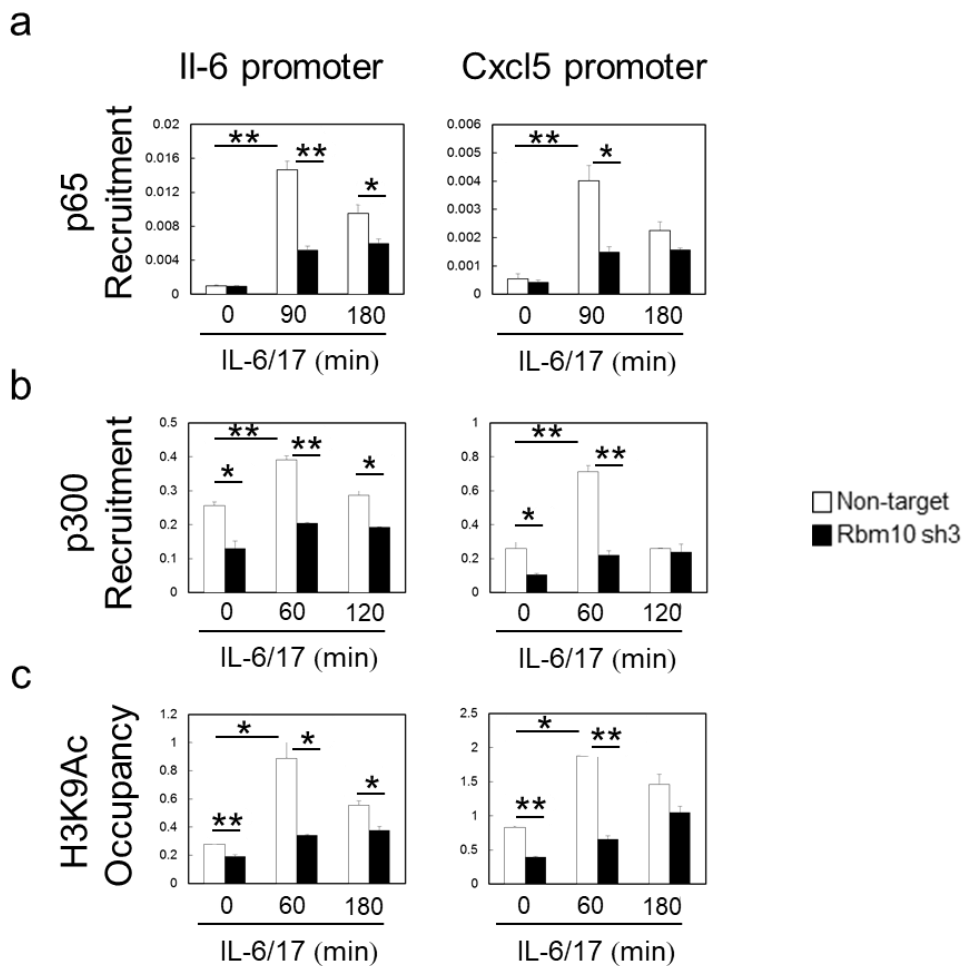


図9 Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写プロモーター領域におけ

る p65 及び p300 の集積並びにヒストン H3K9 のアセチル化が抑制されていた Non-target 及び Rbm10 sh3 を IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で所定時間刺激後、パラホルムアルデヒドで固定し、クロマチン DNA を調製した。各種抗体で免疫沈降後、IL-6 或いは CXCL5 遺伝子のプロモーターに特異的なプライマーを用いて qPCR を行った。Non-target と比較して、Rbm10 ノックダウン MEF ではサイトカイン刺激条件下での IL-6 及び CXCL5 プロモーター領域への p65 及び p300 の集積、並びに H3K9 アセチル化が抑制されていた。(a) 抗 p65 抗体を用いた結果、(b) 抗 p300 抗体を用いた結果、(c) 抗 H3K9Ac 抗体を用いた結果。

7. Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的に転写プロモーター近傍において DNA メチル化が亢進していた

一般的に、遺伝子の転写調節機構としてはヒストン修飾と併せて DNA メチル化も重要な役割を担っていることが知られている。そこで次に、Rbm10 ノックダウン MEF における NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を、メチル化 DNA 免疫沈降 (MeDIP-Seq) 法を用いて検討した。MeDIP-Seq 法は、抗 5-メチル化シトシン抗体を用いた ChIP アッセイと次世代シーケンスを組み合わせた解析手法で、全ゲノム上のメチル化状態を網羅的に解析することができる。本検討の結果、Non-target と比較して、Rbm10 sh3 では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 [IL-6、epidermal growth factor receptor (EGFR)、CXCL1、CXCL5 及び CC chemokine receptor (CCR6) の結果を図示] のプロモーター領域で高頻度なメチル化が検出された (図 10a)。一方、ハウスキーピング遺伝子 [beta-glucuronidase (GUSB)、HPRT、heat shock protein 90 ab1 (HSP90 ab1)、Protein phosphatase 1a (PP1a) 及び ribosomal 60S subunit protein L13a (RPL13a) の結果を図示] では、Rbm10 sh3 でのメチル化頻度の増加は認められなかった。さらに、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態について、CXCL1 遺伝子プロモーター領域に着目したメチル化 DNA 特異的 PCR 法でも確認した。この方法は、非メチル化シトシンはバイサルファイト反応によってウラシルに変換される一方、メチル化シトシンは影響を受けないことを利用して、DNA 上のメチル化状態を qPCR 等で検出する手法である (図 10b)。本方法においても、MeDIP-Seq 法と同様に、CXCL1 遺伝子プロモーター領域 (-71CpG) におけるメチル化が Rbm10 ノックダウン MEF で亢進していることが確認された (図 10c)。また、Rbm10 sh3 における CpG メチル化の亢進は、Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 を強制発現させると低下したことが

ら (図 10c)、この表現型はアーティファクトではなく Rbm10 の発現抑制に基づくものであることが確認された。さらに、以上の結果はすべてサイトカイン非刺激条件であることから、ChIP アッセイで得られた結果 (図 9) と同様に、Rbm10 ノックダウン MEF における DNA メチル化の亢進は定常状態から起こっていると考えられた。併せて、抗 p65 抗体を用いた ChIP アッセイにより、本検討で解析した CXCL1 プロモーター領域への p65 の集積は Rbm10 ノックダウン MEF で低下しており (図 10d)、本プロモーター領域でのメチル化の亢進は実際に NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現抑制に寄与していると考えられた。以上の結果から、Rbm10 ノックダウン MEF では定常状態から NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域において特異的に DNA メチル化が亢進していることが確認され、これが転写抑制性状態へと傾いている原因であると推察された。

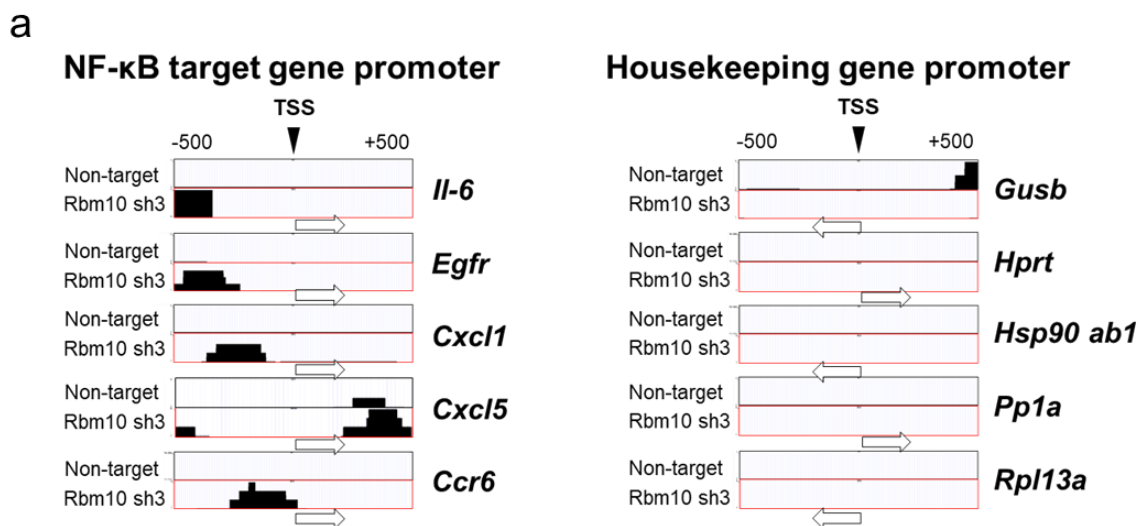
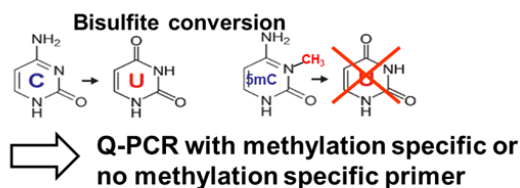


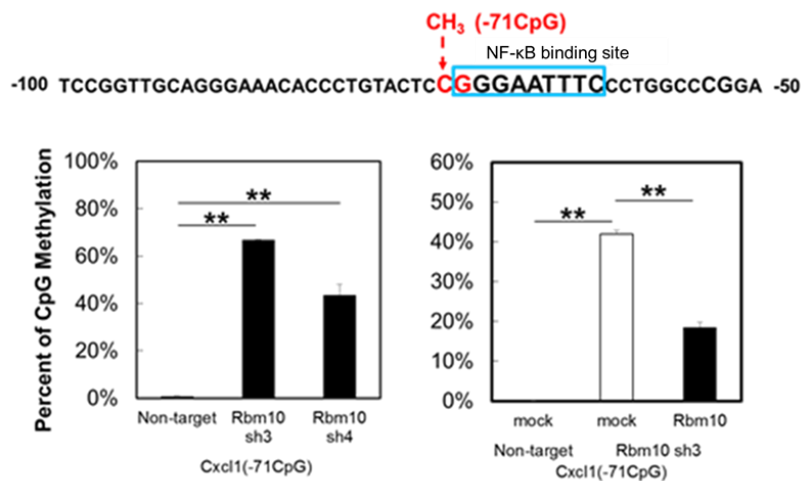
図 10 Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的に転写プロモーター近傍において DNA メチル化が亢進していた

(a) Non-target 及び Rbm10 sh3 をホルムアルデヒド固定後、クロマチン DNA を調製して MeDIP-Seq に供した。図には NF- $\kappa$ B 標的遺伝子として IL-6、EGFR、CXCL1、CXCL5 及び CCR6 の結果を、ハウスキーピング遺伝子として GUSB、HPRT、HSP90 ab1、PP1a 及び RPL13a の結果を示した。Non-target と比較して、Rbm10 sh3 では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的にプロモーター領域の高頻度のメチル化が検出された。

b



c



d

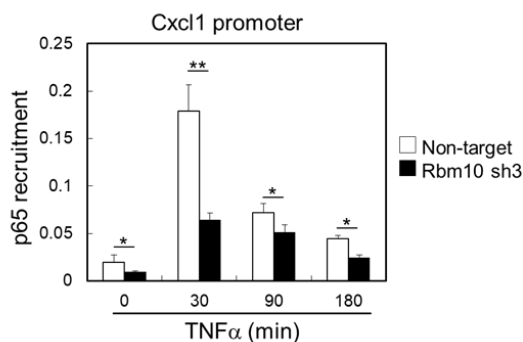


図 10 (続き)

(b) バイサルファイト反応の概略図。非メチル化シトシンはバイサルファイト反応によってウラシルに変換される一方、メチル化シトシンは影響を受けないことを利用して、DNA 上のメチル化状態を qPCR で検出する。

(c) Non-target 及び Rbm10 sh3 からクロマチン DNA を調製し、バイサルファイト処理した後に、CXCL1 遺伝子プロモーター上のメチル化の有無を特異的なプライマーを用いて qPCR で検出した。CXCL1 遺伝子プロモーター上の NF-κB 結合サイトに近接するシトシン (-71CpG、赤字表示) のメチル化が Rbm10 ノックダウン MEF で亢進してい



た (左図)。また、Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで、Rbm10 sh3 で認められた-71CpG 領域のメチル化頻度は有意に低下した (右図)。

(d) Non-target 及び Rbm10 sh3 を TNF  $\alpha$  で所定時間刺激後、パラホルムアルデヒドで固定し、クロマチン DNA を調製した。抗 p65 抗体で免疫沈降後、CXCL1 遺伝子のプロモーター特異的なプライマーを用いて qPCR を行った。Non-target と比較して、Rbm10 ノックダウン MEF では TNF  $\alpha$  刺激条件下での CXCL1 プロモーター領域への p65 の集積が減少していた。

#### 8. Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写プロモーター領域が転写抑制性の状態に傾いていた

MeDIP-seq 及びメチル化 DNA 特異的 PCR 法により確認された Rbm10 ノックダウン MEF における NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的なプロモーター領域のメチル化が、実際にこれら標的遺伝子の転写活性を負に制御しているか否かを検討するために、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーターへのメチル化 DNA 結合性の転写抑制因子 MBD2 の集積及び 27 番目の Lys 残基がトリメチル化されたヒストン H3 (H3K27me3) の存在量を ChIP アッセイで解析した。その結果、Non-target と比較して、IL-6 及び IL-17 共刺激下の Rbm10 sh3 では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子である CXCL1、CXCL5 及び IL-6 遺伝子プロモーター領域での MBD2 の集積及び H3K27me3 存在量が増加していた (図 11)。また、MBD2 の集積及び H3K27me3 存在量の増加はサイトカイン非刺激条件でも認められた。以上、これまでの一連の検討結果から、Rbm10 ノックダウン MEF では定常状態から NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域がヘテロクロマチン様の転写抑制状態に傾いており、これは NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター特異的に CpG 領域のメチル化が亢進しているためであると強く示唆された。このために、Rbm10 ノックダウン MEF ではサイトカイン刺激下でも NF- $\kappa$ B シグナル伝達因子である p65 が核内移行までは問題なく起こるものの標的遺伝子のプロモーター領域に集積できず、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写誘導が抑制されたと推察された。

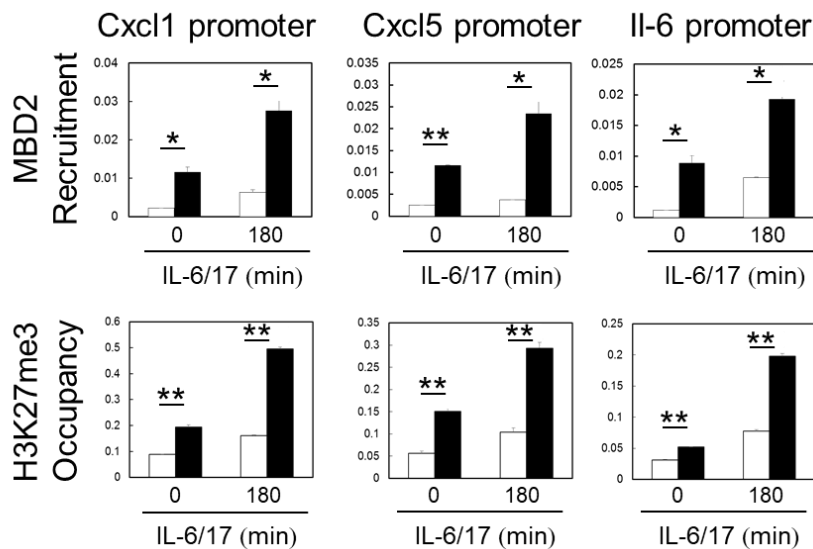


図11 Rbm10 ノックダウンMEF ではNF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写プロモーター領域が転写抑制性の状態に傾いていた

Non-target 及び Rbm10 sh3 を IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で所定時間刺激後、パラホルムアルデヒドで固定し、クロマチン DNA を調製した。抗 MBD2 抗体或いは抗 H3K27me3 抗体で免疫沈降後、CXCL1、CXCL5 或いは IL-6 遺伝子のプロモーター特異的なプライマーを用いて qPCR を行った。Non-target と比較して、Rbm10 sh3 ではサイトカイン刺激条件下での NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター領域での MBD2 の集積並びに H3K27me3 存在量が増加していた。

9. DNA メチル化酵素である Dnmt3b2 は p53 と Rel homology domain を介して相互作用した

これまでの一連の解析から、Rbm10 ノックダウンMEF ではNF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター特異的に CpG 領域のメチル化が亢進しており、これがNF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写誘導が抑制された原因であると推察された。そこで、Rbm10 ノックダウンMEF ではDNA メチル化酵素である Dnmt に異常があるのではないかとの仮説を立てた。DNA メチル化を触媒する酵素 Dnmt には細胞分裂時の DNA メチル化の維持に関わる Dnmt1 と、transfer RNA のメチル化に関わるとされている Dnmt2、及び de novo メチル化に関わる Dnmt3a 及び Dnmt3b が存在する (Okano et al., 1998 ; Xie et al., 1999 ; Ashapkin et al., 2016)。このうち Dnmt3a には Dnmt3a 及び Dnmt3a2 の2つの活性型アイソフォームが報告されているが、Dnmt3a2 は Dnmt3a とは異なる

り生殖細胞において支配的に発現し、ユークロマチン領域に限局して局在している一方、Dnmt3a はユビキタスに発現が認められるなど、両者は異なる細胞と DNA 領域を標的とする、機能を異にする酵素であると考えられている (Chen et al., 2002)。一方、Dnmt3b には 8 個のスプライスバリエントが存在し、このうち体細胞では Dnmt3b2~Dnmt3b5 の 4 種類のアイソフォームが発現すること、また、このうち DNA メチル化活性を有するアイソフォームは Dnmt3b2 のみであることが知られている (Okano et al., 1998 ; Ishida et al., 2003 ; Liao et al., 2015)。Rbm10 の MEF における機能は現状不明であるが、先行研究から種々 mRNA の選択的スプライシングに関与することが報告されている。これらのことから、本研究では Dnmt3b に着目し、詳細に解析することとした。

MEF での NF- $\kappa$ B シグナルに Dnmt3b が関与すると仮定した場合、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター特異的に CpG 領域のメチル化が亢進することから (図 10)、p65 と Dnmt3b は当該プロモーター領域において近接して存在する可能性が考えられた。そこで、特定の 2 分子が近接したときのみ蛍光を発することで分子間相互作用の有無が評価できる PLA 法を用いて、p65 と Dnmt3b を標的に評価を実施した。その結果、サイトカイン非刺激状態の MEF において核内にて蛍光 PLA シグナルが検出され、p65 と Dnmt3b が相互作用している可能性が示唆された (図 12a)。これをさらに詳細に検討するため、活性型アイソフォームである Dnmt3b2 について、p65 との相互作用の有無を HEK293T での強制発現系を用いた免疫沈降法で検討した。その結果、p65 は Dnmt3b2 と共沈することが確認され (図 12b)、これらの結果から、Dnmt3b は核内にて p65 と相互作用する可能性が示唆された。また、p65 の共沈は 305 アミノ酸以降の C 末端側を欠失させても認められたことから、p65 と Dnmt3b2 の相互作用は p65 の Rel homology domain を介していると推察された (図 12b)。

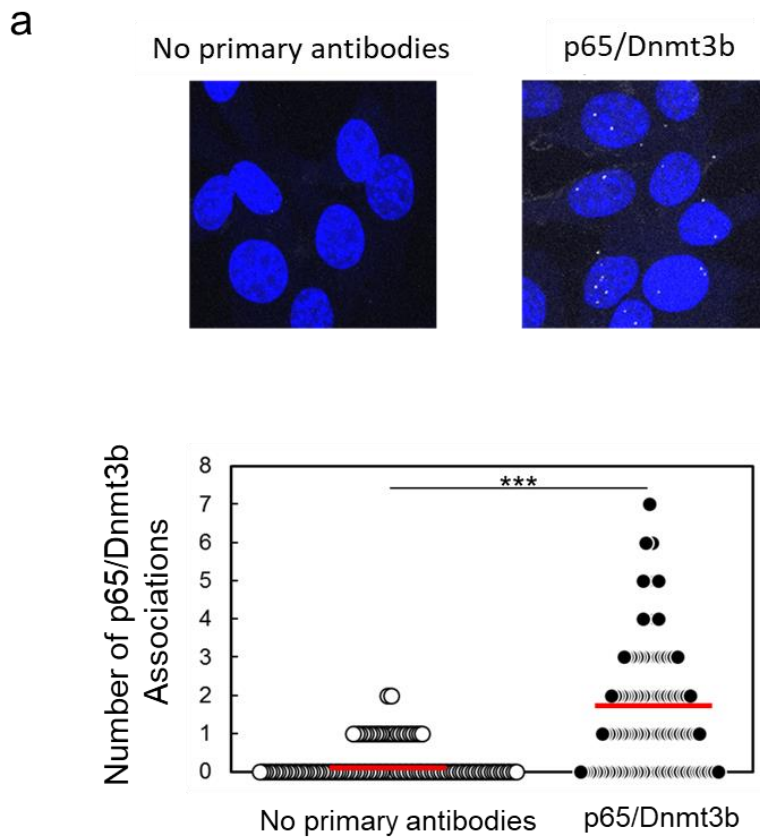


図12 DNAメチル化酵素であるDnmt3b2はp65とRel homology domainを介して相互作用した

(a) MEFをパラホルムアルデヒドで固定後、抗p65抗体及び抗Dnmt3b抗体を用いたPLA法によりp65とDnmt3bが近接して存在し得るか検討した。非サイトカイン刺激下のMEFにおいて、核内で蛍光PLAシグナルが検出された。上段は共焦点顕微鏡画像(核はhoechst33342で染色)、下段の図は核ごとに計数した蛍光PLAシグナル数を示す。

b

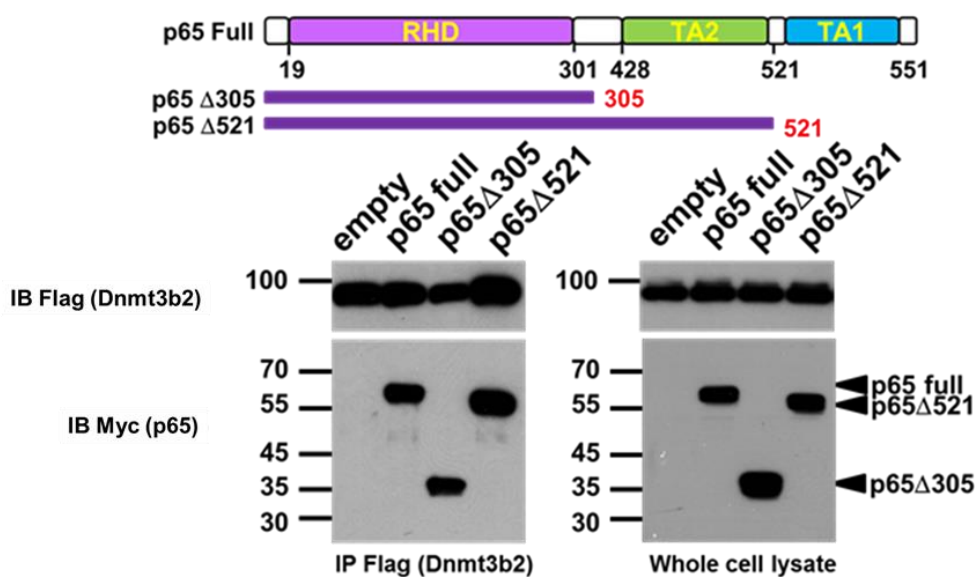


図 12 (続き)

(b) HEK293T に Flag-Dnmt3b2 及び Myc-p65[全長 (full)、306~551 アミノ酸領域欠失体 ( $\Delta 305$ ) 或いは 522~551 アミノ酸領域欠失体 ( $\Delta 521$ )] を強制発現させ、抗 Flag 抗体ビーズを用いて免疫沈降後、抗 Flag 抗体又は抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。すべての組み換え p65 で、Dnmt3b2 との共沈が認められた。上段の模式図はそれぞれの組み換え p65 の一次構造を示す。下段は、左図は免疫沈降後、右図は免疫沈降前の細胞溶解液をサンプルとしたウエスタンブロッティングの結果を示す。また、黒塗りの矢印はそれぞれの組み換え p65 の想定分子量の位置を示す。RHD: rel homology domain、TA: transactivation domain。

10. Dnmt3b の不活性型アイソフォームである Dnmt3b3 も MEF で発現しており p65 と相互作用した

Dnmt3b2 の不活性型アイソフォームであり体細胞での発現が報告されている Dnmt3b3、4 及び 5 についても検討した (表 1)。まず、MEF におけるこれらアイソフォームの発現を RT-PCR で確認したところ、Dnmt3b3 は明確な増幅が認められ、MEF において発現していると考えられた (図 13a)。一方、Dnmt3b4 及び Dnmt3b5 についてはサイズによる両者の分離は困難であったものの、予想される位置に明

確なバンドが認められなかったことから、MEF ではほとんど発現していないか、或いは極めて少ない可能性が示唆された。次に、Dnmt3b2、Dnmt3b3 又は Dnmt3b4 を安定発現させた MEF を用いて、免疫沈降法にて p65 の共沈の有無を検討した。その結果、p65 は Dnmt3b2 に加えて Dnmt3b3 と共沈することが確認された (図 13b)。一方、Dnmt3b4 と p65 の共沈は確認できなかった。さらに、各 Dnmt3b アイソフォームを安定発現させたこれら MEF を用いて、PLA 法により p65 と各 Dnmt3b アイソフォームの相互作用を検討したところ、免疫沈降実験と同様に、Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 では p65 との相互作用に基づく蛍光 PLA シグナルが認められたが、Dnmt3b4 では認められなかった (図 13c)。以上より、MEF において不活性型アイソフォームである Dnmt3b は発現しており、Dnmt3b2 と同様に p65 と相互作用すると考えられた。

表 1 Dnmt3b2、3、4 及び 5 の mRNA 一次構造の特徴及び酵素活性の有無

アイソフォーム	Exon欠失	酵素活性
<b>Dnmt3b2</b>	<b>none</b>	<b>+</b>
<b>Dnmt3b3</b>	<b>exon 21, 22</b>	<b>-</b>
<b>Dnmt3b4</b>	<b>exon 21</b>	<b>-</b>
<b>Dnmt3b5</b>	<b>exon 22</b>	<b>-</b>

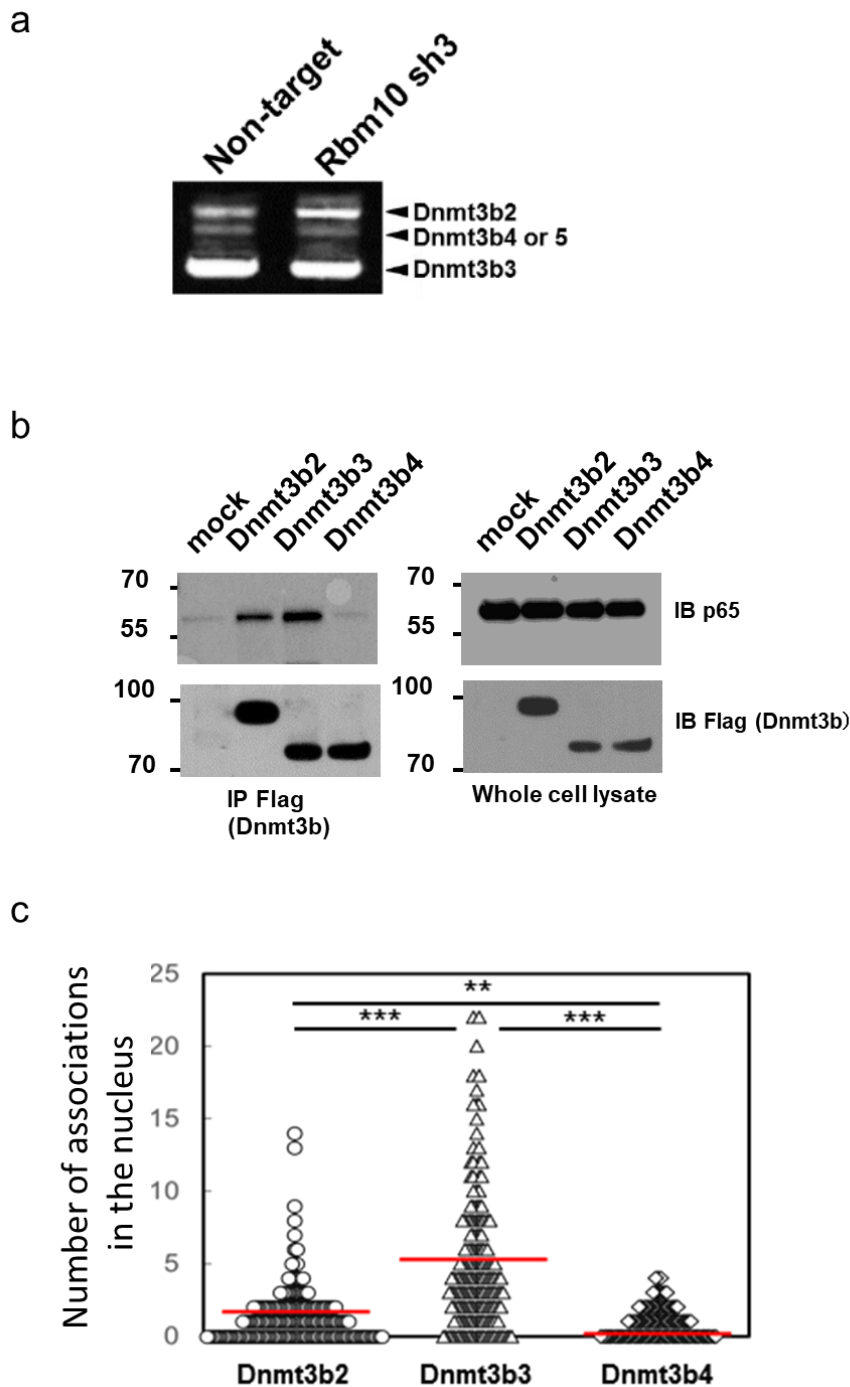


図 13 Dnmt3b の不活性型アイソフォームである Dnmt3b3 も MEF で発現しており p65 と相互作用した

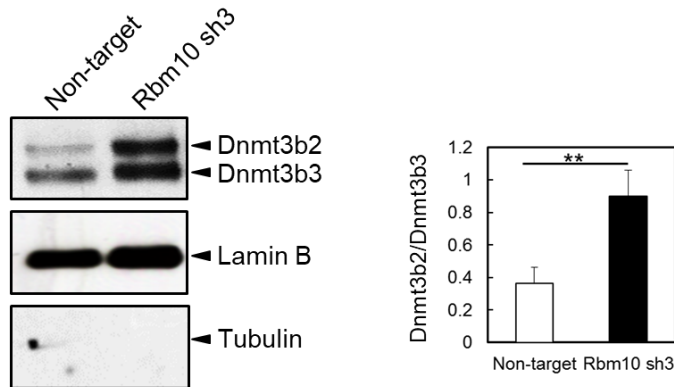
(a) Non-target 及び Rbm10 sh3 から cDNA を合成し、RT-PCR にて各 Dnmt3b アイソフォームを検出した。Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 と想定される位置に明確なバンドが認められたのに対して、Dnmt3b4 及び Dnmt3b5 ではサイズによる両者の分離は困難であった

ものの、予想される位置に明確なバンドは認められなかった。(b)MEF に Flag-Dnmt3b2、Flag-Dnmt3b3 又は Flag-Dnmt3b4 を安定発現させ、抗 Flag 抗体ビーズを用いて免疫沈降後、抗 Flag 抗体又は抗 p65 抗体を用いてウエスタブロットティングを行った。Flag-Dnmt3b2 又は Flag-Dnmt3b3 を安定発現させた MEF において、p65 の共沈が認められた。左図は免疫沈降後、右図は免疫沈降前の細胞溶解液をサンプルとしたウエスタブロットティングの結果を示す (上段 : 抗 p65 抗体、下段 : 抗 Flag 抗体)。また、各図の左側に記載の数字は分子量マーカーの位置とそのサイズを示す。(c)Flag-Dnmt3b2、Flag-Dnmt3b3 又は Flag-Dnmt3b4 を安定発現させた MEF をパラホルムアルデヒドで固定後、抗 p65 抗体及び抗 Flag 抗体を用いた PLA 法により p65 と各 Dnmt3b アイソフォームが近接して存在し得るか検討した。Flag-Dnmt3b2 又は Flag-Dnmt3b3 を安定発現させた MEF において、核内での蛍光 PLA シグナルの増加が認められた。図は共焦点顕微鏡画像において核ごとに計数した蛍光 PLA シグナル数を示す。

11. Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b3 に対する Dnmt3b2 の存在比が増加していた  
先行研究において Rbm10 は RNA スプライシングに関与すること (Bechara et al., 2013 ; Wang et al., 2013 ; Inoue et al., 2014)、及び Dnmt3b は Rbm10 の基質である可能性 (Sutherland et al., 2017) が報告されている。また、先の RT-PCR (図 13a) において、Rbm10 ノックダウン MEF では Non-target と比較して Dnmt3b2 のバンドが濃くなっているように思われた。これらのことから、Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b mRNA のスプライシング制御に変化が起きた可能性を考えた。これを確認するために、Non-target 及び Rbm10 sh3 から細胞溶解液を調製し、抗 Dnmt3b 抗体を用いたウエスタブロットティングにて Dnmt3b の発現を検討した。その結果、Non-target において Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 と考えられる 2 本のバンドが検出されたが、Rbm10 sh3 では Dnmt3b2 のバンドが明らかに濃く、Dnmt3b2 と Dnmt3b3 の存在比 (Dnmt3b2/Dnmt3b3) は Rbm10 ノックダウンにより増加した (図 14a)。また、この増加は Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで Non-target とほぼ同等にまで減少した (図 14b)。このことから、Rbm10 ノックダウン MEF で認められた Dnmt3b2/Dnmt3b3 比の増加は shRNA の導入に伴うアーティファクトではなく、Rbm10 の発現抑制に基づくものであることが確認された。



a



b

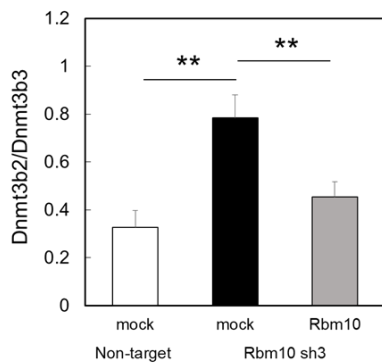


図14 Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b3 に対する Dnmt3b2 の存在比が増加した  
 (a) Non-target 及び Rbm10 sh3 から核タンパク抽出液を調製し、抗 Dnmt3b 抗体、抗 Lamin B 抗体及び抗 Tubulin 抗体を用いてウエスタブロットティングを行った。Non-target 及び Rbm10 sh3 でともに Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 と考えられる 2 本のバンドが検出されたが、Rbm10 sh3 では Dnmt3b2 のバンドが明らかに濃く、Dnmt3b2 と Dnmt3b3 の存在比 (Dnmt3b2/Dnmt3b3) は Rbm10 ノックダウンにより増加した。左図はウエスタブロットティングの結果、右図は ImageJ ソフトウェアにて算出した Dnmt3b2/Dnmt3b3 比を示す。(b) Non-target 及び Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させた Rbm10 sh3 から cDNA を合成し、図 13a と同様にして RT-PCR にて各 Dnmt3b アイソフォームを検出した。ImageJ ソフトウェアにて Dnmt3b2 或いは Dnmt3b3 と想定されるバンドの濃淡比 (Dnmt3b2/Dnmt3b3) を算出した。Rbm sh3 では Non-target と比較して Dnmt3b2/Dnmt3b3 比が増加したが、これは Rbm10 sh3 に Rbm10 shRNA に耐性の Rbm10 遺伝子を強制発現させることで有意に減少した。

## 12. Dnmt3b2 の過剰発現は NF- $\kappa$ B シグナルの活性化を抑制した

Rbm10 ノックダウン MEF では活性型アイソフォームである Dnmt3b2 の存在比が増加したことから、Rbm10 を介した Dnmt3b2 の産生制御が NF- $\kappa$ B シグナル活性化に重要な役割を担っている可能性が考えられた。これを検討するために、MEF に Dnmt3b2 を過剰発現させたときの NF- $\kappa$ B 標的遺伝子発現への影響を評価した。その結果、Dnmt3b2 を過剰発現させた MEF では IL-6 及び IL-17 刺激による IL-6 産生が抑制され、炎症回路の活性化が阻害されたと考えられた (図 15a, b)。また、TNF $\alpha$  刺激による Cxcl mRNA の転写量も減少した (図 15c)。さらに、IL-6 遺伝子のプロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクター (IL-6 promoter-Luc) を導入した HEK293T を用いて、これに様々な比率で Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 発現ベクターを導入後に TNF $\alpha$  で刺激したときのルシフェラーゼ活性を評価した。その結果、Dnmt3b3 発現量に対する Dnmt3b2 発現量の比率を増加させるに従い、レポーター活性の低下が確認された (図 15d)。最後に、Rbm10 ノックダウン MEF における IL-6 遺伝子プロモーター領域への Dnmt3b の集積を、抗 Dnmt3b 抗体を用いた ChIP アッセイで検討した。その結果、Rbm10 sh3 では Non-target と比較して、サイトカイン刺激の有無に関わらず IL-6 遺伝子プロモーター上への Dnmt3b の集積が亢進していた (図 15e)。以上の結果から、MEF において Dnmt3b2 の発現量比は NF- $\kappa$ B シグナルの活性化に重要な役割を担っていることが確認された。

本研究での一連の解析から、Rbm10 は Dnmt3b のスプライシング制御を介して Dnmt3b アイソフォームの発現量比を変化させることで NF- $\kappa$ B シグナルの活性化に関与する、炎症回路を正に制御する因子であることが明らかとなった (図 16)。

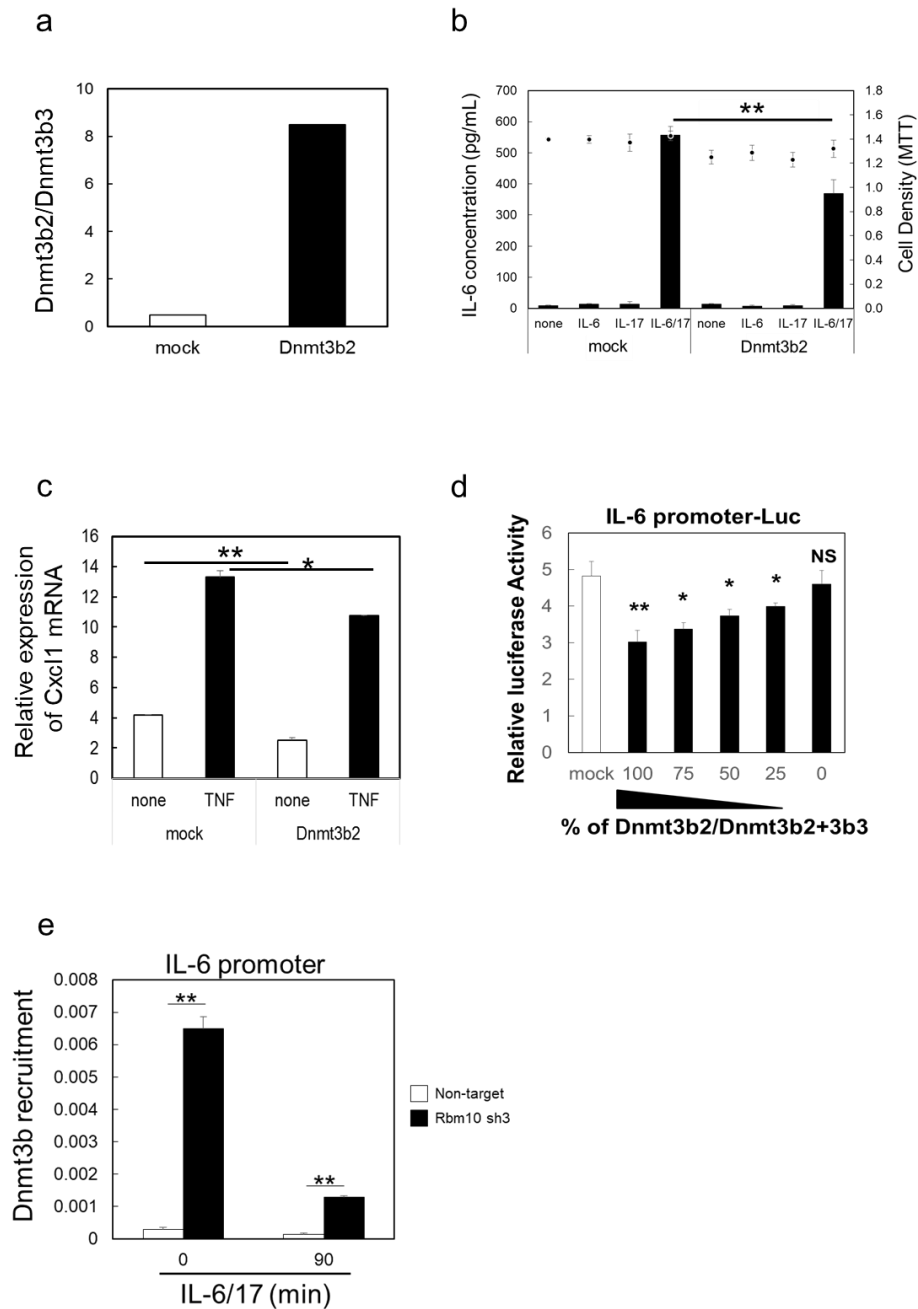


図 15 Dnmt3b2 の過剰発現はNF- $\kappa$ B シグナルの活性化を抑制した

(a) MEF に Flag-Dnmt3b2 又は mock の発現ベクターを過剰発現させ、その発現量を qRT-PCR で確認した。図は ImageJ ソフトウェアにて Dnmt3b2 或いは Dnmt3b3 と想定されるバンドの濃淡比 (Dnmt3b2/Dnmt3b3) を算出した結果を示した。(b) MEF に Flag-Dnmt3b2 又は mock の発現ベクターを過剰発現させ、IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で 24 時間培養したときの培養上清中 IL-6 濃度を ELISA 法で測定した。また、培養上清

回収時の細胞生存率を MTT 法で評価した。Dnmt3b2 を過剰発現させた MEF では生細胞率に影響することなく、IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で刺激したときの IL-6 産生量が有意に抑制された。図中の棒グラフは IL-6 濃度（左側縦軸）を、点は生細胞数の測定値（右側縦軸）を示す。(c) MEF に Flag-Dnmt3b2 又は mock の発現ベクターを過剰発現させ、TNF  $\alpha$  で刺激後の Cxcl1 遺伝子発現量を qRT-PCR で解析した。Dnmt3b2 を過剰発現させた MEF では TNF  $\alpha$  刺激後及び非刺激状態のどちらの条件でも Cxcl1 遺伝子発現量が有意に低下した。(d) IL-6 promoter-Luc (IL-6 プロモーター配列を組み込んだ pGL4.20 [Luc2/Puro] ベクター) を導入した HEK293T に様々な比率で Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 発現ベクターを導入し、TNF  $\alpha$  で刺激したときのルシフェラーゼ活性を評価した。Dnmt3b3 発現量に対する Dnmt3b2 発現量の比率を増加させるに従いレポーター活性の低下が確認された。(e) Non-target 及び Rbm10 sh3 を IL-6、sIL-6R 及び IL-17 で刺激後、パラホルムアルデヒドで固定し、クロマチン DNA を調製した。抗 Dnmt3b 抗体で免疫沈降後、IL-6 遺伝子のプロモーター特異的なプライマーを用いて qPCR を行った。Non-target と比較して、Rbm10 sh3 ではサイトカイン刺激有無にかかわらず、IL-6 遺伝子プロモーター領域への Dnmt3b の集積が亢進していた。

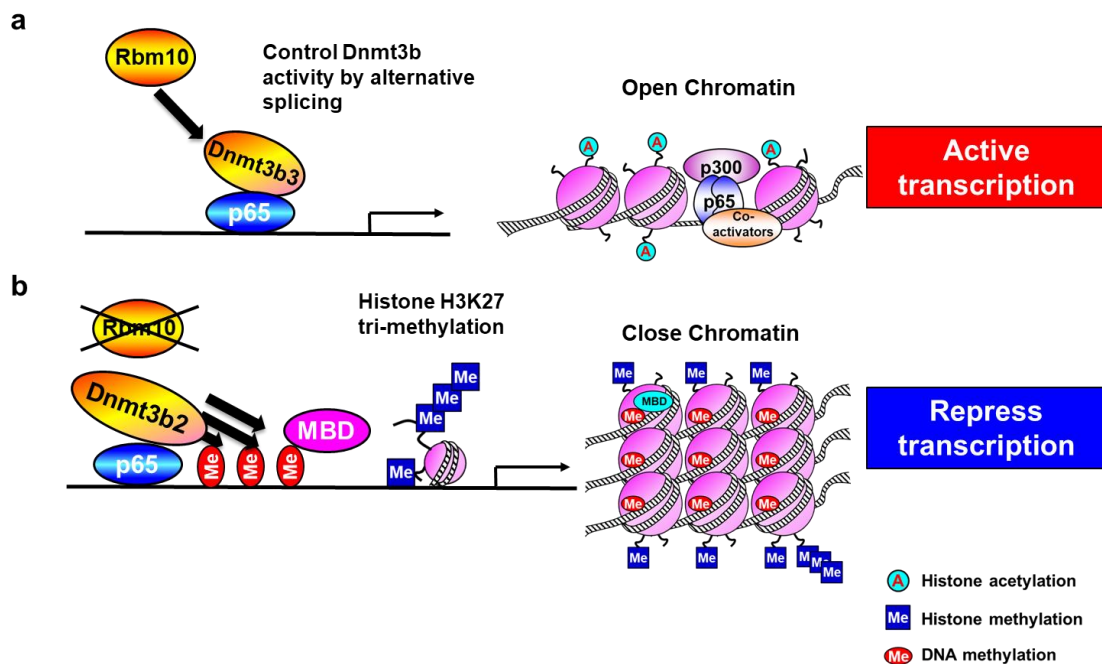


図 16 Rbm10 による NF- $\kappa$ B シグナル抑制の模式図

(a) MEF では Dnmt3b アイソフォームのうち Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 が主に発現しており、Rbm10 存在下では、Rbm10 による RNA スプライシングにより Dnmt3b3 が量的優位に存在している。Dnmt3b2 と Dnmt3b3 はともに p65 と相互作用するが、おそらくは量的な差により、主に Dnmt3b3 が p65 と会合している。Dnmt3b3 は DNA メチルトランスフェラーゼ活性を持たないため、p65 が集積する NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター近傍において DNA メチル化は亢進しない。(b) Rbm10 ノックダウン MEF では、Rbm10 による Dnmt3b 遺伝子の選択的スプライシング制御が変化し、Dnmt3b2 の産生が亢進して Dnmt3b2/Dnmt3b3 存在比が増加する。この状態では Dnmt3b2 が p65 と主に会合し、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター近傍に Dnmt3b2 が集積する。Dnmt3b2 は DNA メチルトランスフェラーゼ活性を有するため、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター近傍の CpG 領域でメチル化が亢進し、これにより MBD2 が CpG 領域に集積、ヒストン H3 Lys27 残基のトリメチル化が誘導される。ヒストントリメチル化によりクロマチンは転写抑制性状態に傾き、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写は抑制される。

## 考察

臓器特異的な自己免疫疾患の発症には免疫系細胞と非免疫系細胞の相互作用が重要な役割を担っており、炎症回路の活性化は特異的抗原なしに MHC クラス II に関連した臓器特異的自己免疫疾患を誘導し得ることから (Murakami et al., 2011a ; Murakami et al., 2011b)、炎症回路の制御機構を解明することはこれら疾患の病態解明及び新たな治療法の開発に重要である。我々は既に先行研究において、マウス細胞を用いたゲノムワイドスクリーニングにより炎症回路の活性化を正に制御する 1000 以上の候補遺伝子を見出しており (Murakami et al., 2013)、かつ、リバースディレクション法と命名したユニークな解析方法により、これら候補遺伝子群がヒトで自己免疫疾患だけではなく、アレルギー性疾患や内臓脂肪症候群、神経変性疾患など様々な疾患の他、がんの発生にも関与する可能性があることを示している (Atsumi et al., 2014; Sabharwal et al., 2014)。さらにこれらの成果を踏まえ、epiregulin-ErbB 経路がマウス及びヒトの双方で炎症回路を正に制御する因子であり、かつ炎症回路の活性化により発現誘導される遺伝子でもあること、及び血中 epiregulin 濃度が関節リウマチや多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症患者で上昇していることを明らかにしている (Harada et al., 2015)。また、肺の同種移植における移植拒絶にも炎症回路の活性化が関与することを、マウス及びヒトの双方で確認している (Lee et al., 2012 ; Lee et al., 2013)。これらの知見は、炎症回路の概念を基にした自己免疫疾患治療の臨床応用への可能性を期待させるものであり、したがって、炎症回路はヒトにおいて炎症反応が関与する様々な疾患の発症或いは増悪に関与することが強く示唆され、炎症回路の活性化を制御する因子はこれら多様な疾患に対する有望な治療標的となる可能性が期待される。

以上の知見を踏まえ、本研究ではゲノムワイドスクリーニングで同定した候補遺伝子群の中から新たに Rbm10 に着目し、本遺伝子による炎症回路活性化制御機構を詳細に解析した。ゲノムワイドスクリーニングでは I 型コラーゲン陽性線維芽細胞のモデル細胞として BC-1 細胞を用いたが、MEF においても、Rbm10 ノックダウンにより炎症回路の活性化抑制が認められ (図 4)、I 型コラーゲン陽性の非免疫系細胞に共通する現象であることが確認された。また、Rbm10 ノックダウン MEF では TNF $\alpha$  刺激下でのサイトカイン及びケモカイン遺伝子発現増加が抑制されたのに対して、IL-6 刺激下での SOCS3 遺伝子発現には影響がなかった (図 5)。炎症回路の活性化には NF- $\kappa$ B 経路と STAT3 経路の同時活性化が必要であるが、本結果から、Rbm10 は炎症回路の制御において NF- $\kappa$ B 経路に特異的に関与していると推察された。さらに、Rbm10 ノックダウンは、F759 マウスにおいて関節内に IL-17 と IL-6 を直接注射することで誘発する関節炎を

抑制した (図 7)。F759 マウスが発症する関節炎は炎症回路の活性化を介しており、NF- $\kappa$ B シグナル依存的であることをこれまでに示している (Atsumi et al., 2002 ; Murakami et al., 2011a ; Murakami et al., 2013 ; Harada et al., 2015 ; Meng et al., 2016)。以上の結果から、Rbm10 は I 型コラーゲン陽性の非免疫系細胞において NF- $\kappa$ B シグナル経路の活性化に関与し、Rbm10 の発現抑制は *in vitro* 及び *in vivo* の双方で炎症回路の活性化を抑制することが確認された。

NF- $\kappa$ B シグナルに注目して Rbm10 の機能解析を実施した結果、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B シグナル伝達因子 p65 のリン酸化及び核内移行には影響がなかった (図 8) 一方で、p65 や転写コアクチベーター p300 の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーターへの集積が抑制されていることが明らかとなった (図 9)。またこのとき、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター領域での H3K9 アセチル化が抑制されていた (図 9)。MeDIP-Seq 解析の結果、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的にプロモーター領域の CpG メチル化が亢進しており (図 10)、さらなる解析により、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域では H3K27 のトリメチル化及びメチル化 DNA 結合性の転写抑制因子である MBD2 の集積が亢進していることが分かった (図 11)。この結果から、Rbm10 ノックダウン MEF では NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター特異的にクロマチン構造が転写抑制性の状態に傾いていると推察された。また、上記の一連の解析において、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的な転写抑制はサイトカイン刺激に依らず定常状態から起こっていると推察された。そして DNA メチル化酵素に着目した解析により、MEF では Dnmt3b アイソフォームのうち Dnmt3b2 と Dnmt3b3 が主に発現しており Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b3 に対する Dnmt3b2 の発現量比が増加すること (図 13、14)、また、Dnmt3b2 と Dnmt3b3 はともに p65 と相互作用する (図 12、13) ことが確認された。さらに、Dnmt3b2 の過剰発現は NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写活性化を抑制した (図 15)。以上、本研究で得られた結果をまとめると、MEF において Rbm10 は Dnmt3b の選択的スプライシングを介して Dnmt3b2 アイソフォームの発現を負に制御しており、Rbm10 ノックアウト MEF では p65 との相互作用を介した Dnmt3b2 の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター領域への集積量が増加し同領域でのメチル化が亢進することで、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的にヘテロクロマチン様の転写抑制状態が誘導され、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路が阻害されたと推察された (図 16)。したがって、MEF において Rbm10 は NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のメチル化を負に制御しており、Rbm10-Dnmt3b 軸の異常は炎症回路の異常活性化或いは機能不全を誘導し得ると考えられた。

Rbm10 と Dnmt3b はともに広範囲の組織で発現していると報告されていることから (Coleman et al., 1996 ; Xie et al., 1999 ; Ozuemba et al., 2016)、Rbm10 による Dnmt3b の発現制御は多くの細胞種で普遍的に NF- $\kappa$ B シグナルの制御に関与している

可能性がある。一方で、ヒトにおいて Rbm10 の機能欠損が TARP 症候群の発症原因であると報告されているが (Gorlin et al., 1970 ; Johnston et al., 2010 ; Gripp et al., 2011 ; Johnston et al., 2014)、本症は多くが胎生致死又は生後早期に死に至る X 連鎖劣性遺伝性疾患であり、炎症回路の活性化に対する制御機構がどのような表現型として現れ得るかの知見は得られていない。ヒトにおける Rbm10 の機能欠損が免疫系に与える影響については今後の研究課題である。また、Rbm10 ノックダウン MEF における Dnmt3b2 を介した遺伝子プロモーター領域での DNA メチル化の亢進はハウスキーピング遺伝子では見られず、Rbm10-Dnmt3b 軸を介した DNA メチル化経路は NF- $\kappa$ B 標的遺伝子のプロモーター配列に特異的であった (図 10)。これに関して、本研究では Dnmt3b2 及び Dnmt3b3 が p65 と相互作用し得ることに加えて、Rbm10 ノックダウン MEF ではサイトカイン刺激の有無に依らず、Dnmt3b の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター上への集積が増加していることを確認した (図 15e)。Rbm10 ノックダウン MEF では Dnmt3b2 の発現量比が増加したことから、おそらくは Dnmt3b2 が主に集積しているものと推察され、これにより、Rbm10 ノックダウン MEF では定常状態から NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的にクロマチンが転写抑制性の状態に偏ったと考えられた。一方で、他のグループの報告によると、T 細胞リンパ腫において STAT3 は Dnmt1 及び histone deacetylase 1 と複合体を形成し SHP1 遺伝子発現を制御していることが報告されている (Zhang et al., 2005)。また、c-Myc は Dnmt3a 及び DNA 結合因子 Miz1 と複合体を形成して p21Cip1 遺伝子発現を制御することも報告されている (Brenner et al., 2005)。これらの報告を考え合わせると、Rbm10 ノックダウン MEF の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター上でも様々な構成因子が Dnmt3b2 と p65 の相互作用増強に関与し、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子特異的な Dnmt3b2 の集積に寄与している可能性がある。加えて、Dnmt3b アイソフォームのうち Dnmt3b2 と Dnmt3b3 は p65 と相互作用したが、Dnmt3b4 は相互作用しなかった (図 13)。Dnmt3b2 と Dnmt3b3 はエキソン 23 にコードされる触媒領域を有しているのに対して Dnmt3b4 では欠損していることから、この触媒領域が p65 との相互作用に必須だと推察される。これは、ヒトの先天性免疫不全症候群 (immunodeficiency, centromeric instability, facial anomaly : ICF) で認められている Dnmt3b 遺伝子のエキソン 23 における点変異 (A766P 及び R840Q : マウスでは A772P 及び R846Q) が、Dnmt3L との相互作用を消失させるとの報告 (Xie et al., 2006) と矛盾しない。なお、Dnmt3L は生殖系列及び体細胞の双方で発現し、これ自体は DNA メチルトランスフェラーゼ活性を有さないものの、Dnmt3b や Dnmt3a と相互作用しこれらの酵素活性を高める活性制御因子であることが知られている (Chen et al., 2005 ; Van et al., 2011)。今回、Dnmt3b2 又は Dnmt3b3 と p65 の相互作用には p65 の Rel homology domain が重要である可能性を示したが (図 12)、他のグループからは、Dnmt3L は p65 との相互作用



用を介して Dnmt3b と p65 の複合体形成を仲介し、TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) 遺伝子プロモーターのメチル化を誘導することが報告されており (Pacaud et al., 2014)、本研究で明らかとした MEF における Dnmt3b2 と p65 の相互作用にも Dnmt3L が介在している可能性はある。Dnmt3b2/p65 複合体形成に関与する他因子の同定も今後の課題である。

以上、本研究ではゲノムワイドスクリーニングにより見出した炎症回路を正に制御する 1177 の候補遺伝子のうち Rbm10 について詳細な解析を行い、Rbm10 が Dnmt3b の選択的スプライシングを介して炎症反応を制御するという新たな機能を明らかとした。本研究で得られた成果は炎症回路が関与する様々な疾患に対する新たな治療法の開発につながる有用な知見であり、Rbm10/Dnmt3b 軸は有望な治療標的の 1 つになり得ると考えている。

## 結論

- マウスの全ゲノムをカバーする shRNA レンチウイルスライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングにより見出した候補遺伝子群から、Rbm10 に着目して炎症回路を正に制御する機構を解析した。
- Rbm10 は MEF において NF- $\kappa$ B シグナル経路の活性化に関与し、Rbm10 ノックダウン MEF では炎症回路の活性化が抑制されることを *in vitro* 及び *in vivo* の双方で示した。
- Rbm10 が Dnmt3b の選択的スプライシングを介して NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の転写活性化を特異的に制御するという新たな機能を明らかとした。

本研究では、炎症回路の活性化を正に制御し得る 1000 以上の候補遺伝子のうち Rbm10 に着目して炎症回路活性化における役割を解析し、Rbm10 が Dnmt3b の選択的スプライシングを介して炎症反応を制御するという新たな機能を明らかにした。炎症回路の活性化は、ゲノムワイドスクリーニング及びリバーシディレクション法による解析から、様々なヒト疾患に関与する可能性が示されている。本研究成果により、炎症回路の活性化が関与するヒト疾患に対し、Rbm10/Dnmt3b 軸が有望な治療標的になり得ることを示すことができた。

Dnmt3b 自体は様々な細胞機能に関与するため、Rbm10/Dnmt3b 軸を標的とした炎症回路の活性化抑制薬を開発するためには、Dnmt3b2 が NF- $\kappa$ B 標的遺伝子プロモーター上に特異的に集積する機構をさらに詳細に解明する必要がある、そのためには Dnmt3b/p65 相互作用に関与する複合体因子の同定が不可欠である。また、Rbm10 の Dnmt3b に対する選択的スプライシング機構や、Rbm10 自体の発現或いは活性化制御機構の解明も重要である。ヒトでの Rbm10 の機能異常は TARP 症候群の原因となるが、炎症にどのように影響しているかは不明であり今後の研究課題である。また、炎症回路の関与が示唆されるヒト疾患群において Rbm10 の発現或いは機能に変動があるか否かを検討し、Rbm10/Dnmt3b 軸の治療標的としての可能性が期待できる疾患を特定することが重要である。Rbm10/Dnmt3b 軸の今後のさらなる解析が炎症回路の活性化制御機構の解明を通じて様々な疾患に対する新たな治療法の提供へとつながることを期待している。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、旧大阪大学医学部免疫発生学教室にて研究生として在籍させていただいて以来多大な御指導、御鞭撻を賜り、研究の進め方や物事の本質を見極める研究姿勢等様々なことを学ばせて頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野 村上正晃教授に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行や学会発表、本論文の作成等、多岐に渡り御指導、御協力を賜りました上村大輔講師、熱海徹先生、蔣菁菁先生を始め北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野並びに旧大阪大学医学部免疫発生学教室にてお世話になりました先生方、スタッフの皆様に厚く御礼と感謝を申し上げます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費並びに公益財団法人武田科学振興財団、公益財団法人発酵研究所、公益財団法人三菱財団、中外製薬株式会社、公益財団法人秋山記念生命科学振興財団、公益財団法人持田記念医学薬学振興財団、公益財団法人鈴木謙三記念医科学応用研究財団、公益財団法人国際科学技術財団、公益財団法人小野医学研究財団、公益財団法人神澤医学研究振興財団、公益財団法人千里ライフサイエンス振興財団、公益信託永尾武難病研究基金、特定非営利活動法人日本多発性硬化症協会、公益財団法人かなえ医薬振興財団、公益財団法人東京生化学研究会、公益財団法人上原記念生命科学財団、公益財団法人日本脳神経財団、公益財団法人花王芸術・科学財団、公益財団法人上原記念生命科学財団、公益財団法人安田記念医学財団及びノバルティスファーマ株式会社の各種研究助成を受けて実施しました。

最後に、本研究の遂行にあたり研究生として研究留学の機会を与えて頂きました科研製薬株式会社の関係者各位にこの場を借りて深く感謝いたします。

## 利益相反

本研究の内容に関連し、開示すべき利益相反状態はありません。

なお本研究は、科研製薬株式会社に所属しながら旧大阪大学医学部免疫発生学教室及び北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野の研究生として実施しました。本研究の実施にあたり、所属企業からの設備、助成等の提供はありません。

## 引用文献

Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J.H., Kawano, F., Yull, F.E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U.A.K., Márquez, G., Blackwell, T.S., Ohira, Y., Hirano, T., and Murakami, M. (2012). Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 148, 447-457.

Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K., Morimoto, Y., Wieghofer, P., Okada, Y., Mori, Y., Sakoda, S., Saika, S., Yoshioka, Y., Komuro, I., Yamashita, T., Hirano, T., Prinz, M., and Murakami, M. (2015). A pain-mediated neural signal induces relapse in multiple sclerosis models. *eLife*. 4, e08733.

Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., Kawamoto, T., Stofkova, A., Sakashita, Y., Morimoto, Y., Kuwatani, M., Iwanaga, T., Yoshioka, Y., Sakamoto, N., Yoshimura, A., Takiguchi, M., Sakoda, S., Prinz, M., Kamimura, D., and Murakami, M. (2017). Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *eLife*. 6, e25517.

Ashapkin, V.V., Kutueva, L.I., and Vanyushin, B.F. (2016). Dnmt2 is the Most Evolutionary Conserved and Enigmatic Cytosine DNA Methyltransferase in Eukaryotes. *Genetika*. 52, 269-282.

Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S.J., Saeki, Y., Kitamura, Y., and Hirano, T. (2002). A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 196, 979-990.

Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., Yamada, M., Harada, M., Jiang, J.J., Kamimura, D., Ogura, H., Hirano, T., and Murakami, M. (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Res.* 74, 8-14.

Bechara, E.G., Sebestyén, E., Bernardis, I., Eyra, E., and Valcárcel, J. (2013). RBM5, 6, and 10 differentially regulate NUMB alternative splicing to control cancer cell proliferation. *Mol. Cell.* 52, 720–733.

Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Viré, E., De, Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P.G., Amati, B., Kouzarides, T., de, Launoit, Y., Di, Croce, L., and Fuks, F. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 24, 336–346.

Chen, T., Ueda, Y., Xie, S., and Li, E. (2002). A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J. Biol. Chem.* 277, 38746–38754.

Chen, Z.X., Mann, J.R., Hsieh, C.L., Riggs, A.D., and Chédin, F. (2005). Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J. Cell. Biochem.* 95, 902–917.

Coleman, M.P., Ambrose, H.J., Carrel, L., Németh, A.H., Willard, H.F., and Davies, K.E. (1996). A novel gene, DXS8237E, lies within 20 kb upstream of UBE1 in Xp11.23 and has a different X inactivation status. *Genomics.* 31, 135–138.

Gorlin, R.J., Cervenka, J., Anderson, R.C., Sauk, J.J., and Bevis, W.D. (1970). Robin's syndrome. A probably X-linked recessive subvariety exhibiting persistence of left superior vena cava and atrial septal defect. *Am. J. Dis. Child.* 119, 176–178.

Gripp, K.W., Hopkins, E., Johnston, J.J., Krause, C., Dobyns, W.B., and Biesecker, L.G. (2011). Long-term survival in TARP syndrome and confirmation of RBM10 as the disease-causing gene. *Am. J. Med. Genet. A.* 155A, 2516–2520.

Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., Sabharwal, L., Jiang, J.J., Kumai, N., Miyasaka, N., Sakoda, S., Yamauchi-Takahara, K., Ogura, H., Hirano, T., and

Murakami, M. (2015). Temporal expression of growth factors triggered by ephreclin regulates inflammation development. *J. Immunol.* 194, 1039-1046.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara Y., Taniguchi, T., and Kishimoto, T. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 324, 73-76.

Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimi, M., Maid, R., Feldmann, M., and Kishimoto, T. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 11, 1797-801.

Inoue, A., Takahashi, K.P., Kimura, M., Watanabe, T., and Morisawa S. (1996). Molecular cloning of a RNA binding protein, S1-1. *Nucleic Acids Res.* 24, 2990-2997.

Inoue, A., Yamamoto, N., Kimura, M., Nishio, K., Yamane, H., and Nakajima, K. (2014). RBM10 regulates alternative splicing. *FEBS. Lett.* 588, 942-947.

Ishida, C., Ura, K., Hirao, A., Sasaki, H., Toyoda, A., Sakaki, Y., Niwa, H., Li, E., and Kaneda, Y. (2003). Genomic organization and promoter analysis of the Dnmt3b gene. *Gene.* 310, 151-159.

Johnston, J.J., Teer, J.K., Cherukuri, P.F., Hansen, N.F., Loftus, S.K., NIH Intramural Sequencing Center (NISC), Chong, K., Mullikin, J.C., and Biesecker, L.G. (2010). Massively parallel sequencing of exons on the X chromosome identifies RBM10 as the gene that causes a syndromic form of cleft palate. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 743-748.

Johnston, J.J., Sapp, J.C., Curry, C., Horton, M., Leon, E., Cusmano-Ozog, K., Dobyns, W.B., Hudgins, L., Zackai, E., and Biesecker, L.G. (2014). Expansion of the TARP syndrome phenotype associated with de novo mutations and mosaicism. *Am.*

J. Med. Genet. A. 164A, 120–128.

Lander, E.S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 470, 187–197.

Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S., Okumura, M., Hirano, T., and Murakami, M. (2012). IL-6 amplifier, NF- $\kappa$ B-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J. Immunol.* 189, 1928–1936.

Lee, J., Nakagiri, T., Kamimura, D., Harada, M., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, Y., Inoue, M., Miyoshi, S., Morii, E., Hirano, T., Murakami, M., and Okumura, M. (2013). IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int. Immunol.* 25, 319–332.

Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M.J., Clement, K., Tsankov, A.M., Akopian, V., Gifford, C.A., Donaghey, J., Galonska, C., Pop, R., Reyon, D., Tsai, S.Q., Mallard, W., Joung, J.K., Rinn, J.L., Gnirke, A., and Meissner, A. (2015). Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 47, 469–478.

Loiselle, J.J., and Sutherland, L.C. (2018) . RBM10: Harmful or helpful—many factors to consider. *J. Cell. Biochem.* 119, 3809–3818.

Meng, J., Jiang, J.J., Atsumi, T., Bando, H., Okuyama, Y., Sabharwal, L., Nakagawa, I., Higuchi, H., Ota, M., Okawara, M., Ishitani, R., Nureki, O., Higo, D., Arima, Y., Ogura, H., Kamimura, D., and Murakami, M. (2016). Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *J. Immunol.* 197, 3111–3119.

Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y., Takatsu, K., Kamimura, D., and Hirano, T. (2011a). Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J. Exp. Med.*



208: 103–114.

Murakami, M., and Hirano, T. (2011b). A four-step model for the IL-6 amplifier, a regulator of chronic inflammations in tissue-specific MHC class II-associated autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 2, 22.

Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J.J., Atsumi, T., Shiraya, S., Nakatsuji, Y., Kinoshita, M., Kohsaka, H., Nishida, M., Sakoda, S., Miyasaka, N., Yamauchi-Takahara, K., and Hirano, T. (2013). Disease-Association Analysis of an Inflammation-Related Feedback Loop. *Cell Rep.* 3, 946–959.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008). Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity.* 29, 628–36.

Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19, 219–220.

Ozuemba, B., Masilamani, T.J., Loisel, J.J., Koenderink, B., Vanderbeck, K.A., Knee, J., Larivière, C., and Sutherland, L.C. (2016). Co- and post-transcriptional regulation of Rbm5 and Rbm10 in mouse cells as evidenced by tissue-specific, developmental and disease-associated variation of splice variant and protein expression levels. *Gene.* 580, 26–36.

Pacaud, R., Sery, Q., Oliver, L., Vallette, F.M., Tost, J., and Cartron, P.F. (2014). DNMT3L interacts with transcription factors to target DNMT3L/DNMT3B to specific DNA sequences: role of the DNMT3L/DNMT3B/p65-NF  $\kappa$ B complex in the (de-)methylation of TRAF1. *Biochimie.* 104, 36–49.

Sabharwal, L., Kamimura, D., Meng, J., Bando, H., Ogura, H., Nakayama, C., Jiang, J.J., Kumai, N., Suzuki, H., Atsumi, T., Arima, Y., and Murakami, M. (2014). The Gateway Reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs

pathogenic immune cells into the CNS. *J. Biochem.* 156, 299–304.

Sawa, S., Kamimura, D., Jin, G.H., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Ishihara, K., Murakami, M., and Hirano, T. (2006). Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 12, 1459–1470.

Singh, R., Atsumi, T., Bando, H., Harada, M., Nakamura, A., Yamada, M., Jiang, J.J., Suzuki, H., Katsunuma, K., Nodomi, T., Kamimura, D., Ogura, H., and Murakami, M. (2013). Reverse direction method: A possible tool to link animal models with corresponding human diseases and disorders. *Int. J. Genomic Med.* 1, 106.

Sutherland, L.C., Rintala-Maki, N.D., White, R.D., and Morin, C.D. (2005). RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators? *J. Cell. Biochem.* 94, 5–24.

Sutherland, L.C., Thibault, P., Durand, M., Lapointe, E., Knee, J.M., Beauvais, A., Kalatskaya, I., Hunt, S.C., Loiselle, J.J., Roy, J.G., Tessier, S.J., Ybazeta, G., Stein, L., Kothary, R., Klinck, R., and Chabot, B. (2017). Splicing arrays reveal novel RBM10 targets, including SMN2 pre-mRNA. *BMC Mol. Biol.* 18, 19.

Van, Emburgh, B.O., and Robertson, K.D. (2011). Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Res.* 39, 4984–5002.

Wang, Y., Gogol-Döring, A., Hu, H., Fröhler, S., Ma, Y., Jens, M., Maaskola, J., Murakawa, Y., Quedenau, C., Landthaler, M., Kalscheuer, V., Wieczorek, D., Wang, Y., Hu, Y., and Chen, W. (2013). Integrative analysis revealed the molecular mechanism underlying RBM10-mediated splicing regulation. *EMBO Mol. Med.* 5, 1431–1442.

Xiao, S.J., Wang, L.Y., Kimura, M., Kojima, H., Kunimoto, H., Nishiumi, F., Yamamoto, N., Nishio, K., Fujimoto, S., Kato, T. et al. (2013). S1-1/RBM10:

multiplicity and cooperativity of nuclear localisation domains. *Biol. Cell.* 105, 162-174.

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., and Okumura, K, Li E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene.* 236, 87-95.

Xie, Z.H., Huang, Y.N., Chen, Z.X., Riggs, A.D., Ding, J.P., Gowher, H., Jeltsch, A., Sasaki, H., Hata, K., and Xu, G.L. (2006). Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1375-1385.

Zhang, Q., Wang, H.Y., Marzec, M., Raghunath, P.N., Nagasawa, T., and Wasik, M. A. (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 6948-6953.

Zhang, Y., Fujita, N., Ohhara, T., Morinaga, Y., Nakagawa, T., Yamada, M., and Tsuruo, T. (1998). Production of interleukin-11 in bone-derived endothelial cells and its role in the formation of osteolytic bone metastasis. *Oncogene.* 16, 693-703.