



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鈴木, 宏尚
Description	配架番号 : 1699
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7081号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75794
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hironao_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 鈴 木 宏 尚

学 位 論 文 題 名

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)

【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- κ 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腔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 α 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- κ 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- κ 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- κ B 標的遺伝子プロモーターへの集積、並びに NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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。