

研 究 報 告 書

「慢性炎症性疾患における病理性二重鎖 RNA の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 2 月～平成 28 年 3 月

研究者: 中村 能久

1. 研究のねらい

近年、2型糖尿病やアルツハイマー病といった慢性疾患では、炎症・炎症性反応が誘導され、疾患の発症・進行に関わっていることが明らかになっている。このような慢性炎症性疾患では、肥満が危険因子であること、また、エネルギー代謝組織、脳においてインスリン抵抗性が誘導されることなど、共通の特徴が見いだされている。私たちはこれまでに、肥満・2型糖尿病における炎症性反応の生理的意義について研究し、内在性二重鎖 RNA と炎症性二重鎖 RNA 結合タンパク質の役割について新しい発見をしている。本研究では、炎症性反応とインスリンシグナルを手がかりに、内在性二重鎖 RNA の動的変化を追い、2型糖尿病などの慢性炎症性疾患の発症メカニズムを探る。慢性炎症性疾患での内在性二重鎖 RNA を起点とした炎症性反応の誘導機構解析を通し、慢性炎症性疾患に共通する分子基盤解明、および新しい治療戦略への応用を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

肥満は、糖尿病や動脈硬化などのメタボリック症候群・生活習慣病の危険因子である。肥満では、脂肪細胞や肝細胞といったインスリン標的細胞において慢性的な炎症性反応が誘導され、この炎症性反応がインスリンシグナル・糖代謝を阻害し、様々な生活習慣病発症の原因になりうるということが明らかになっている。私たちは、内在性の二重鎖 RNA 経路が肥満における炎症性反応の誘導やインスリン抵抗性の発症に関わっていることを明らかにしている。

炎症性反応を誘導するタンパク質には、RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) 様タンパク質群や PKR (Double-stranded RNA dependent protein kinase) のように、二重鎖 RNA (dsRNA) をリガンドとして認識するものが数多く存在している。以前は、細胞内には内在性の dsRNA がなかったために、これらの dsRNA 結合タンパク質 (dsRNA-binding proteins: dsRBPs) は、ウイルス由来などの外来性 dsRNA を特異的に認識し、炎症性反応を誘導するものと考えられていた。しかしながら、近年の microRNA (miRNA) の発見からも明らかのように、細胞内に多種多様な dsRNA が存在していることがわかっている。多くの dsRBPs が炎症性であることから、私達は、内在性の dsRNA と dsRBPs のネットワーク変化が細胞内で炎症性反応を誘導するのではと考えた。そして、肥満時にこのような dsRNA ネットワーク変化が誘導され、インスリン抵抗性発症の原因になるのではないかと仮説をたてた。実際、炎症性二重鎖 RNA 結合タンパク質である PKR が、肥満などの代謝性ストレス下で活性化して炎症・炎症性反応を誘導し、インスリン

抵抗性・2型糖尿病の発症に関わることを報告している(*Cell*, 2010)。また、この PKR の活性化に、PKR の二重鎖 RNA 結合能が必要であることを見出している。このことは、内在性二重鎖 RNA の動的变化が、慢性炎症性疾患の分子基盤になっている可能性を示唆する。

本さがけ研究では、PKR と二重鎖 RNA とのネットワークに注目し、PKR が認識する内在性病原性 RNA の同定、そして PKR が誘導する肥満性炎症機構の解析を行い、肥満における炎症性反応誘導機構の分子基盤の解明を試みた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「内在性病原性 dsRNA による PKR の活性化機構」

我々は、PKR が肥満の肝臓や脂肪組織において、発現および活性が上昇していること、更に、炎症作用のあるパルミチン酸を処理した線維芽細胞でも活性化することを見いだしている(図1)。これは、PKR が自然免疫反応のみならず、過栄養状態で誘導される代謝性炎症反応に関わっていることを示唆する。

それでは、PKR はどのようにしてパルミチン酸などの代謝性ストレスに反応しているのだろうか。PKR は、二重鎖結合ドメインを持ち、二重鎖 RNA を認識して活性化することから、肥満時には PKR の

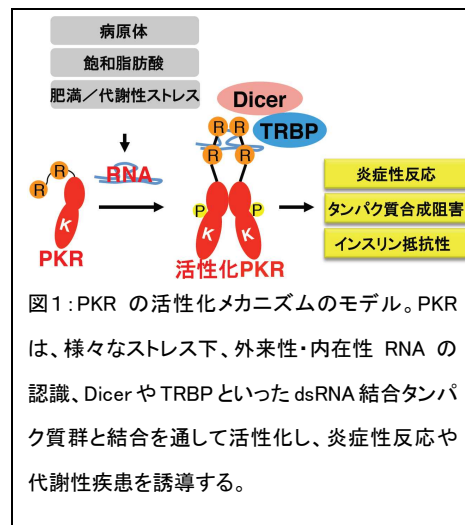


図1: PKR の活性化メカニズムのモデル。PKR は、様々なストレス下、外来性・内在性 RNA の認識、Dicer や TRBP といった dsRNA 結合タンパク質群と結合を通して活性化し、炎症性反応や代謝性疾患を誘導する。

内在性二重鎖 RNA リガンドが存在していることが考えられる。我々は、二重鎖 RNA と結合ができない PKR 変異体を作製し、パルミチン酸処理の影響を調べた。興味深いことに、この PKR 変異体は、パルミチン酸で処理をしても活性化しなくなることが観察された(図2A)。このことは、PKR が代謝性ストレス下で生じる内在性 RNA の変化を認識し、活性化する可能性を示唆している。実際、私達は、パルミチン酸処理下での細胞内において、PKR が、dsRNA 結合能依存的に特定の内在性 RNA と結合していることを見出した(図2B)。この中には、H/ACA box 型 snoRNA (small nucleolar RNA) など、二重鎖 RNA 様構造をとる RNA があり、これら内在性 RNA が PKR を活性化することが明らかになった。この結果は、パルミチン酸などの炎症作用のある脂肪酸は、脂質・タンパク質代謝の変化のみならず、RNA ネットワークに影響を及ぼし、PKR のようなセンサー分子がその変化(内在性病原性 dsRNA)を認識し、炎症性反応の誘導に関わっている可能性を示した。

研究テーマ B 「PKR 複合体因子 TRBP の炎症性反応、糖代謝における役割」

PKR が関わる炎症性反応やインスリン抵抗性の誘導機構を更に解析するために、我々は、質量分析法を用いたプロテオーム解析により肥満時の肝臓における PKR のタンパク質複合体を同定した。この複合体タンパク質情報をもとに遺伝子オントロジー解析を行うと、肥満の肝臓での PKR は、RNA の制御・代謝に関わる因子群と強く相関があることが明らかになった(図3A)。興味深いことに、肥満時において PKR は、dsRNA 結合タンパク質であり、RISC

(RNA-induced silencing complex)-loading complex (RLC)の構成タンパク質で、miRNA の生合成に中心的な役割を果たす Dicer や TRBP (TAR RNA-binding protein)と強固に結合することが明らかになった(図3A)。この結合には PKR の活性化が関わっており、パルミチン酸を処理した細胞でも結合が誘導される。更に、dsRNA 結合能欠損 PKR 変異体がこれらの因子と結合できないこと、また、TRBP 欠損細胞ではパルミチン酸処理による JNK の活性化が抑制されることから、これらの結合が dsRNA を起点とした炎症性反応の誘導に関わっていることを示唆している。

TRBP と肥満における糖代謝の関係を調べるために、アデノウイルスを用いて TRBP に対する shRNA (short hairpin RNA)を肥満マウスモデルの肝臓特異的に発現させ、TRBP 遺伝子発現抑制下の炎症性反応やインスリンシグナルの解析を行った。TRBP の発現抑制により、*ob/ob* マウス肝臓での PKR、JNK の活性低下や炎症性因子の発現減少、インスリンシグナルの亢進が確認され(図3B)、全身性の耐糖能の改善も見られた(図3C)。これらのことは、TRBP が肥満・2型糖尿病治療の標的になりうることを示すと同時に、内在性二重鎖 RNA を標的にし、TRBP-PKR 経路の活性を抑えるような新しい治療戦略への可能性を示唆するものである。

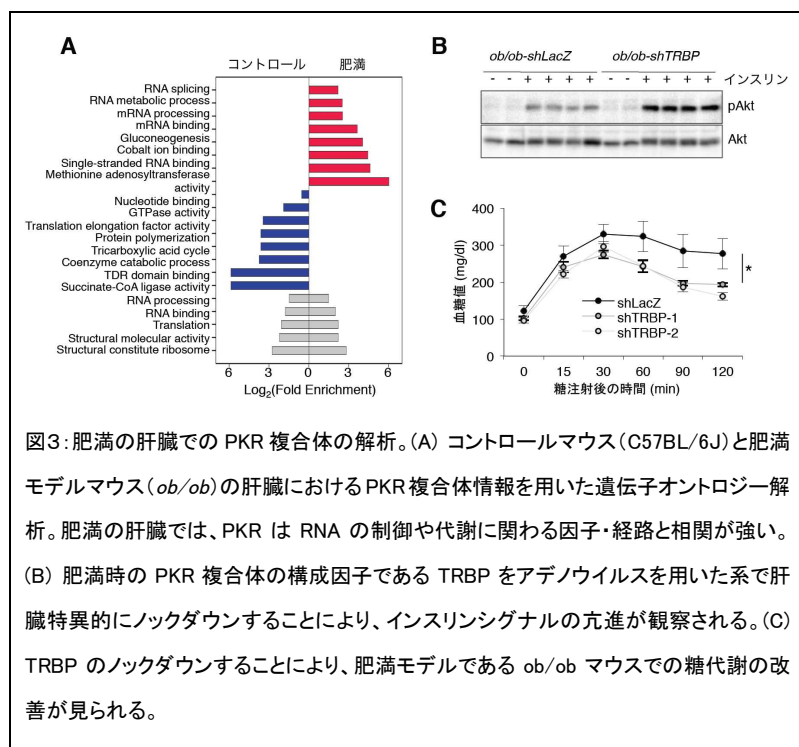


図3: 肥満の肝臓での PKR 複合体の解析。(A) コントロールマウス(C57BL/6J)と肥満モデルマウス(*ob/ob*)の肝臓における PKR 複合体情報を用いた遺伝子オントロジー解析。肥満の肝臓では、PKR は RNA の制御や代謝に関わる因子・経路と相関が強い。(B) 肥満時の PKR 複合体の構成因子である TRBP をアデノウイルスを用いた系で肝臓特異的にノックダウンすることにより、インスリンシグナルの亢進が観察される。(C) TRBP のノックダウンすることにより、肥満モデルである *ob/ob* マウスでの糖代謝の改善が見られる。

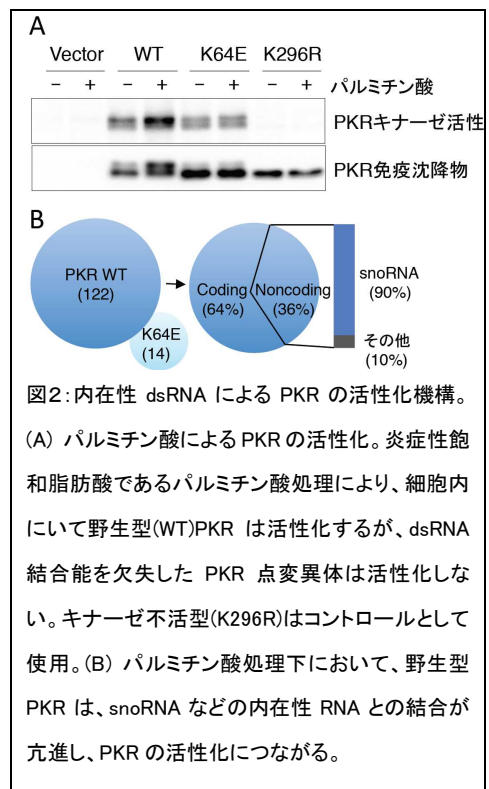


図2: 内在性 dsRNA による PKR の活性化機構。(A) パルミチン酸による PKR の活性化。炎症性飽和脂肪酸であるパルミチン酸処理により、細胞内において野生型(WT)PKR は活性化するが、dsRNA 結合能を欠失した PKR 点変異体は活性化しない。キナーゼ不活性(K296R)はコントロールとして使用。(B) パルミチン酸処理下において、野生型 PKR は、snoRNA などの内在性 RNA との結合が亢進し、PKR の活性化につながる。

3. 今後の展開

本さがけ研究により、肥満などの代謝性ストレス下において、内在性 RNA が炎症性 dsRNA 結合タンパク質により認識され、炎症性反応を誘導する機構の一端が明らかになった。今後の重要な課題として、これらの内在性 RNA が病原性になる分子機構の解明が急務である。RNA は、メチル化などの RNA 修飾、局在変化、または高次構造の変化などにより、特性が変化する。代謝性ストレス下において、これらの RNA の特性変化が誘導され、RNA を病原性に変化させる可能性を追求し、研究を展開したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

肥満は、メタボリックシンドロームのみならず、癌やアルツハイマー病などの様々な疾患の危険因子であるため、肥満における炎症性反応誘導の分子機構の解明は、非常に重要である。この「慢性炎症」分野の研究により、肥満における2型糖尿病発症における内在性 RNA の重要性・意義について、世界にさがけて発表できたことについては当初の目的を達成できた。その一方、他の肥満性疾患への応用については、期間および人員が足りず、目標の到達には至らなかった。

しかしながら、本研究が明らかにした、内在性 RNA が特定条件下において病原性に成り得るという知見は、肥満疾患のみならず、癌やアルツハイマー病などの、慢性炎症性疾患の発症機構に共通する可能性がある。その場合、この研究成果が、RNA 研究の加速度的発展を促し、また、それにとまなう科学技術の発展に貢献するものと期待される。

なお、さがけ採択後、シンシナティ小児病院に異動したが、さがけのサポートもあり良好な環境下で研究が遂行できた。また、本さがけ研究の成果により、アメリカ国内での講演会が増えるなど、更なる飛躍への足場が固まったと感じている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究者は、肥満などの代謝性ストレス下で、内在性の二重鎖 RNA(dsRNA)に結合して活性化する PKR (Double-stranded RNA dependent protein kinase)が、肥満における炎症反応を誘導してインスリン抵抗性 2 型糖尿病の発症に関わることを見いだしている。本研究においては、肥満時の代謝性ストレス下で PKR と結合する内在性 RNA を探索し、H/ACA box 型 snoRNA (small nucleolar RNA)などが PKR を活性化することを明らかにして発表した。さらに、PKR が関わる炎症性反応やインスリン抵抗性の誘導機構を詳細に解析し、肥満時の肝臓において PKR は Dicer や TRBP (TAR RNA-binding protein)などのタンパク質と結合しており、ob/ob マウス肝臓の TRBP の発現を抑制すると、肝臓での PKR や JNK の活性低下、炎症性因子の発現減少、インスリンシグナルが亢進して耐糖能が改善することを確認して発表した。今後、代謝性ストレス下で内在性 RNA が炎症性 dsRNA 結合タンパク質により認識されるようになる分子機構の解明に期待する。

以上のように、2 型糖尿病発症における内在性 RNA の重要性・意義について世界にさがけ

て発表し、その一連の病態に關与する治療標的になる可能性のある分子を明らかにしてきたことは高く評価できる。さきがけ採択直後にハーバード大学からシンシナティ小児病院に異動して研究開始がやや遅れたが、さきがけ研究の成果により研究所内で高い評価を得、アメリカ国内での活躍の場も広がり、研究者としてのさらなる飛躍への足場が固まった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Nakamura T**, Arduini A, Baccaro B, Furuhashi M, Hotamisligil GS. “Small molecule inhibitors of PKR improve glucose homeostasis in obese, diabetic mice.” *Diabetes*. 2014 Feb; 63 (2): 526–534
2. **Nakamura T***, Kunz RC, Zhang C, Kimura T, Yuan CL, Baccaro B, Namiki, Y, Gygi SP, Hotamisligil GS*. “A critical role of PKR complexes with TRBP in immunometabolic regulation and eIF2 α phosphorylation in obesity.” *Cell Reports*. 2015 Apr 14;11(2):295–307.
***Corresponding authors**
3. Youssef OA, Safran SA, **Nakamura T**, Nix DA, Hotamisligil GS, Bass BL. “A Potential Role for snoRNAs in PKR Activation during Metabolic Stress.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr; 112 (16): 5023–5028

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **Nakamura T**. “dsRNA in immunometabolism.” *Oncotarget*. 2015 Aug; 6 (24) 19940–19941
2. **Nakamura T**. “Molecular mechanism of double-stranded RNA pathway-mediated immunometabolic regulation.” *BIO Clinica: Lipid metabolism and signaling*. 2015 Aug; 30 (9) 838–842
3. **Nakamura T**. “Role of double-stranded RNA pathways in immune-metabolic regulation.” *BIO Clinica Special Edition: Chronic inflammation in endocrinology and metabolism*. 2015 Feb; 4 (1) 104–108
4. **Nakamura T**. “Molecular basis of chronic inflammatory responses and metabolic diseases in obesity.” *Experimental Medicine*. 2014 Feb; 32 (3) 380–385
5. Diabetes Action Research and Education Foundation Grant Award (2014)
6. Digestive Health Center Pilot and Feasibility Program Award (2015)
7. The 46th NIPS International Symposium, invited speaker (2015)