

炎症制御因子“脱ユビキチン化酵素”CYLDの新たな発現制御機構 およびCYLDを標的とした新規治療戦略

小松 賢生

1. はじめに

細菌やウイルス等による感染症から身を守るため、我々の体にはさまざまな免疫機構が備わっている。そのうちの一つである自然免疫（innate immunity）は無脊椎動物から脊椎動物まで広くにわたり保存された免疫機構であり、上皮細胞やマクロファージなどにおける炎症性サイトカインの産生や粘液産生などの感染初期に認められる生体反応に代表される防御機構である。一方、自然免疫の異常活性化により、中耳炎や慢性閉塞性呼吸器疾患（chronic obstructive pulmonary disease：COPD）等の慢性炎症性疾患が引き起こされる。したがって、自然免疫に関連する正や負の調節機構を解明することは、免疫制御または炎症性疾患の新規治療法や治療薬の開発を考慮する上できわめて重要である。本稿では、炎症応答やがん化に関連するシグナル伝達経路を制御する重要な分子である、脱ユビキチン化酵素CYLDに着目し、最近明らかになったCYLDの新たな発現調節機構およびCYLDを標的とした新規治療戦略について紹介する。

2. 炎症性疾患治療の現状と問題点

近年の研究により、樹状細胞やマクロファージ、上皮細胞など自然免疫を担う細胞で抗原認識分子Toll様受容体（Toll-like receptor：TLR）が同定され、TLRを介した自然免疫応答（炎症性サイトカインや抗菌ペプチド、粘液の産生誘導）がさまざまな感染症から身を守るために重要な防御機構であることが明らかとなった^{1,2)}。また、中耳炎やCOPDなどの起因菌である非莢膜保有型インフルエンザ菌（nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi）をはじめ、

細菌やウイルスなどの病原微生物はTLRによって認識され、NF- κ Bシグナル伝達経路や分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（mitogen-activated protein kinase：MAPK）など、炎症性サイトカインや粘液の発現制御に重要なシグナル伝達経路が活性化されることが明らかとなっている^{3,4)}。これまでの数多くの研究に基づき、異常産生された炎症性サイトカインや粘液の発現抑制を目標に、自然免疫に関連するシグナル伝達経路を標的とした抗炎症薬が開発・臨床応用されてきた。ステロイド剤を代表とする多くの抗炎症薬はI κ Bキナーゼ（I κ B kinase：IKK）/NF- κ Bシグナル伝達経路などの炎症応答を惹起するシグナル伝達経路を抑制することで、炎症反応を抑制することが明らかとなっている⁵⁾。しかしながら、慢性炎症性疾患の患者に対しては疾患の重症化に伴い、抗炎症薬の高濃度投与・長期投与を行う必要があるため、生体が備えている細菌やウイルスに対する防御応答も抑制され、重篤な副作用が生じることが報告されている^{5,6)}。生体に悪影響を及ぼさずに炎症性疾患を治療するには、免疫のバランス維持が重要であると考えられている。これまで、自然免疫を正に調節するシグナル伝達経路が盛んに研究されてきたが、負に調節するシグナル伝達経路を明らかにすることで、これを標的とした、副作用が少なく十分な抗炎症作用を有する新規抗炎症薬の開発が可能となる。

3. 脱ユビキチン化酵素CYLD

脱ユビキチン化酵素CYLD（*cylindromatosis*）は、家族性円柱腫症（familial cylindromatosis）の原因遺伝子であり、がん抑制遺伝子として同定された⁷⁾。これまでに、CYLD機能解明に関わる数多くの研究結果より、CYLDはタンパク質分解に関与するリシン48（lysine 48：K48）結合型のポリユビキチン鎖ではなく、標的分子のシグナル伝達に関与するリシン63（lysine 63：K63）を介したポリユビキチン鎖を除去することで、標的分子の活性を負に調節する重要な抑制因子であることが明らかとなった⁸⁾。これまでに、多くのCYLDの標的分子が明らかにされ、その中には炎症応答やがん化において重要な役割を果たしているNF- κ Bシグナル伝達の上流分子であるTRAF（tumor necrosis factor receptor associated factor）ファミリーやNEMO

ジョージア州立大学生物医学研究所炎症・免疫・感染研究センター（〒30303-5035 アメリカ合衆国ジョージア州アトランタ市ピードモント通り100）

New insights into the regulation of anti-inflammatory regulator CYLD: Novel anti-inflammatory strategy by up-regulating CYLD
Kensei Komatsu (Center for Inflammation, Immunity & Infection, Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, 100 Piedmont Avenue SE, Atlanta, Georgia 30303, United States of America)
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870254

© 2015 公益社団法人日本生化学会

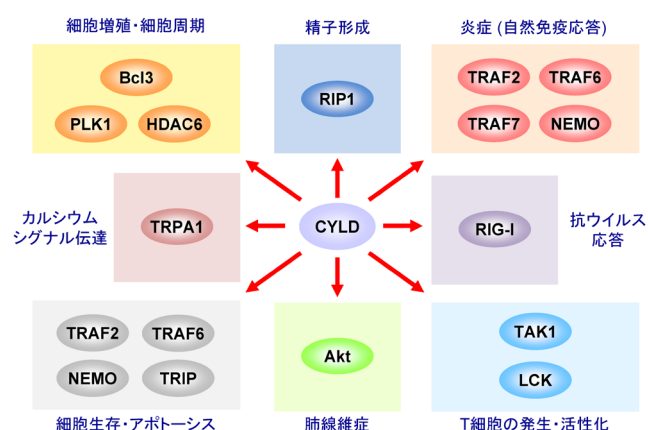


図1 脱ユビキチン化酵素CYLDの標的分子および関連する機能

(NF- κ B essential modulator) もある^{8,9)} (図1)。さらに、さまざまな腫瘍や慢性炎症組織でCYLDの発現が低下していること、CYLDノックアウトマウスを用いた細菌感染モデルやがんモデルにおいて、CYLDノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて炎症やがん化が悪化していることから、CYLDが炎症やがんを抑制する重要な分子であることが明らかとなってきた^{10,11)}。したがって、CYLDの発現制御機構を詳細に解明し、CYLD発現を上昇させる方法を確認することで、炎症性疾患やがんの治療に貢献できると示唆される。これまでに、CYLDはNF- κ Bをはじめとした様々なシグナル伝達経路の活性化によって発現が誘導され、正の発現調節機構が病原微生物や炎症の種類により異なることが知られている¹²⁾。また、がん遺伝子によるCYLD遺伝子の点変異、プロモーター領域のメチル化、ユビキチン・プロテアソーム系を介したCYLDタンパク質の分解促進など、がんにおけるCYLD発現抑制機構は明らかになっているが¹⁰⁾、感染症や慢性炎症疾患時においてCYLDの発現がどのようにして抑制されるか、すなわち負の調節機構についてはいまだ詳細に明らかにされていない部分が多い。そこで我々は近年、CYLDの発現誘導を応用した慢性炎症性疾患の新規治療法の確立を目標とし、CYLD発現抑制メカニズムを明らかにするために種々の検討を行った。

4. NTHi誘導性のCYLD発現に対するPDE4の関与

近年、選択的ホスホジエステラーゼ4 (phosphodiesterase 4: PDE4) 阻害薬であるroflumilastがCOPDに対して治療効果を示していることがいくつかの臨床試験で示唆されている¹³⁾。しかし、PDE4阻害薬が抗炎症作用を示すその詳細な分子機構、および炎症応答の抑制因子であるCYLDとPDE4の関与については不明であった。PDE4は細胞内セカンドメッセンジャーである環状アデノシン3',5'-一リン

酸 (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate: cAMP) を分解する分子であり、これまでに自然免疫 (炎症) 応答の惹起に重要な分子であることが明らかとなっている¹³⁾。我々は以前、NTHiがCYLD発現を誘導することを*in vitro*および*in vivo*で証明した^{11,12)}。細菌感染や薬物投与により炎症応答に関連している多くの分子の発現が増減すること、上皮細胞において通常状態でのCYLD発現量が低いことから、我々は、CYLD発現はPDE4阻害薬の投与により上昇するという仮説を立てた。そこで、まずNTHi誘導性のCYLD発現に対するPDE4阻害薬rolipramの効果について、定量PCR (Q-PCR) 法およびウエスタンブロッティング法を用いて検討を行った。その結果、興味深いことに、ヒト肺上皮細胞、ヒト中耳上皮細胞においてrolipramはNTHi誘導性のCYLD発現上昇をさらに増強した。さらに、*in vitro*の実験系で得られた結果が*in vivo*においてもみられるかマウスを用いて検討を行った。C57BL/6マウスにrolipramを腹腔内投与し、前処理2時間後にマウスの気管もしくは中耳にNTHiを処理し、組織回収後Q-PCR法を用いてCYLD mRNA発現量を、免疫蛍光染色法を用いてCYLDタンパク質発現量を測定した。その結果、マウス肺組織、中耳組織においても、rolipram処理によりNTHi誘導性のCYLD発現が顕著に上昇していた。さらに、COPD治療薬として臨床応用されているPDE4阻害薬roflumilastを用いても、*in vitro*・*in vivo*ともに同様の結果が得られることが確認された。以上のことから、PDE4阻害薬がNTHi誘導性のCYLD発現上昇をさらに増強することが*in vitro*・*in vivo*により証明された¹⁴⁾。

次に、PDE4阻害薬がNTHi誘導性のCYLD発現上昇をさらに増強する分子機構の解明を試みた。まず始めにNTHiがPDE4の発現を上昇するか検討を行った結果、*in vitro*・*in vivo*においてNTHi処理によりPDE4サブファミリーの一つであるPDE4B遺伝子・タンパク質発現のみが顕著に増加した。次に、PDE4阻害薬がNTHi誘導性のCYLD発現上昇をさらに増強するという現象にPDE4Bがどのように関与しているか、siRNA-PDE4Bによるノックダウン系を用いて検討を行った結果、PDE4阻害薬を用いた実験結果と同様に、siRNA-PDE4Bを導入することでNTHi誘導性のCYLD発現がさらに増強した。この結果から、PDE4阻害薬によるCYLD発現誘導効果にPDE4Bが関与していることが示唆された。さらに、PDE4BがCYLDの発現制御に関わるシグナル伝達経路について詳細な検討を行った結果、PDE4BがMAPKの一種であるc-Jun N末端キナーゼ2 (c-Jun N-terminal kinase 2: JNK2) を特異的に活性化し、その結果NTHi誘導性のCYLD発現を抑制することが明らかとなった。以上のことから、PDE4阻害薬はCYLD発現を負に調節するPDE4B-JNK2シグナル伝達経路を抑制し、その結果、NTHi誘導性CYLD発現上昇を増強

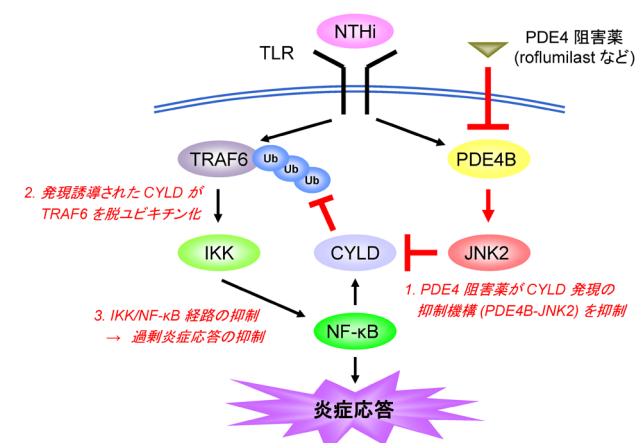


図2 PDE4阻害薬によるNTHi誘導性炎症応答の抑制機構

することが示唆された¹⁴⁾(図2)。

5. PDE4阻害薬によるNTHi誘導性炎症応答抑制に対するCYLDの役割

前節までに得られた結果より、PDE4阻害薬によるNTHi誘導性炎症応答抑制においてCYLDが重要な役割を担っていると予想された。PDE4阻害薬によるNTHi誘導性炎症応答抑制にCYLDが関与しているか明らかにするために、まずsiRNA-CYLDによるノックダウン系を用いて検証した。ヒト肺上皮細胞、ヒト中耳上皮細胞にsiRNA-CYLDを導入した後、PDE4阻害薬およびNTHiを処理し、RNA抽出後Q-PCR法を用いて炎症性サイトカインのmRNA発現量を測定した。その結果、興味深いことに両細胞においてPDE4阻害薬によるNTHi誘導性サイトカイン産生抑制効果が、siRNA-CYLDによるCYLDノックダウンにより消失した。さらに、この現象が*in vivo*においてもみられるか検証するため、CYLDノックアウトマウスを用いた。PDE4阻害薬およびNTHiを処理したマウスの肺組織や中耳組織を摘出し、Q-PCR法による炎症性サイトカインの発現量、ヘマトキシリン・エオジン染色法によるマウスの肺組織や中耳組織における炎症状態を確認した。その結果、野生型マウスの組織ではPDE4阻害薬によるNTHi誘導性炎症応答が抑制されたが、CYLDノックアウトマウスの組織ではその抑制効果がみられなかった。以上のことから、PDE4阻害薬によるNTHi誘導性炎症応答の抑制効果は、CYLD依存的であることが*in vitro*・*in vivo*で明らかとなった¹⁴⁾(図2)。

6. おわりに

最近の研究により、炎症制御因子CYLDの新たな発現制御機構、および慢性炎症性疾患の新規治療薬として注目を

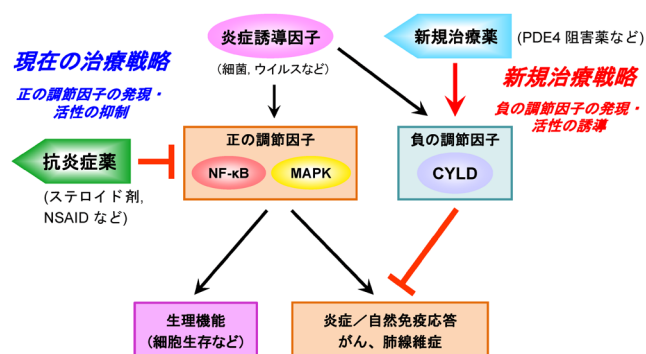


図3 炎症制御因子CYLDを標的とした新規治療戦略

浴びているPDE4阻害薬が持つ抗炎症作用の分子機構の一端が明らかとなってきた。中耳炎やCOPDの起因菌NTHiはPDE4B-JNK2経路を活性化し、CYLD発現を負に調節する。そして、PDE4阻害薬はPDE4B-JNK2シグナル伝達経路を抑制することで、CYLD発現抑制経路の抑制(脱抑制)という興味深い現象を起こし、その結果誘導されたCYLDがNTHiによる炎症反応を抑制することが示唆された¹⁴⁾(図2)。多くの抗炎症薬はNF-κBシグナル伝達経路を抑制することで抗炎症作用を発揮するが⁵⁾、疾患の重症化に伴う抗炎症薬の高濃度・長期投与により、生体が備えている細菌やウイルスに対する防御応答も抑制される^{5,6)}。また、CYLDの発現もNF-κBにより制御されるため、抗炎症薬の高濃度・長期投与によりCYLDの発現までもが抑えられ、自然免疫応答機能が最大限に発揮されないことが示唆される。これまで、抗炎症作用を目的としてステロイド剤などの単独投与が臨床で用いられており、またPDE4阻害薬roflumilastも臨床試験で用いられているが、ステロイド剤とPDE4阻害薬の低濃度併用処理によって過剰な炎症応答が抑制され、副作用が少なく、感染症に対する治療効果が最大限に発揮できるのではないかと考えられる(図3)。その際、炎症をはじめとする生体内での自然免疫応答ならびにCYLD発現や機能について詳細にモニタリングする必要があるだろう。また、過去の報告で数種類のがん、肺線維症においてCYLDの発現・機能が低下していることがあげられている^{9,10)}。したがって、CYLDの抑制シグナル伝達経路を抑制(脱抑制)してCYLD発現を上昇させる方法は、炎症性疾患のみならず、がんや肺線維症の新規治療法や治療薬の開発に応用できることが示唆される(図3)。

近年、生体に悪影響を及ぼさずに十分な抗炎症作用を発揮する新規抗炎症薬の開発において、自然免疫を負に調節するシグナル伝達経路を標的とする考えが広まりつつある¹⁵⁾。本研究により、CYLDが中耳炎やCOPDなどの慢性炎症性疾患において有益な新規創薬標的分子となりうることが示唆された。今後もCYLDのプロモーター解析やタン

パク質の翻訳後修飾の解析など、CYLD発現制御機構について詳細に検討することで、現在用いられている医薬品にとって代わる薬効・安全性が高い新規治療薬の開発が可能になるのではないかと考えられる。また、現在用いられている既存医薬品や薬効不足などで臨床応用まで至らなかった化合物が、CYLD発現を誘導する効果を有しているか、ドラッグ・リポジショニング（薬効再評価）研究を行っていくことも大変興味深い。今回の知見により、慢性炎症性疾患をはじめ、がんや肺線維症の新規治療法確立のための研究や開発が躍進できれば幸いである。

謝辞

本研究はジョージア州立大学（アメリカ合衆国）生物医学研究所 Jian-Dong Li 研究室で行われたものであり、Li 教授およびラボメンバー、さらに共同研究者のロチェスター大学医療センター（アメリカ合衆国）心循環器研究所の Chen Yan 准教授および熊本大学大学院医学薬学研究部の甲斐広文教授に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., & Choi, S. (2007) *Exp. Mol. Med.*, **39**, 421–438.
- 2) Medzhitov, R. (2008) *Nature*, **454**, 428–435.
- 3) Leichtle, A., Lai, Y., Wollenberg, B., Wasserman, S.I., & Ryan, A.F. (2011) *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **11**, 78–84.
- 4) Decramer, M., Janssens, W., & Miravittles, M. (2012) *Lancet*, **379**, 1341–1351.
- 5) Liu, F., Xia, Y., Parker, A.S., & Verma, I.M. (2012) *Immunol. Rev.*, **246**, 239–253.
- 6) Barnes, P.J. & Adcock, I.M. (2009) *Lancet*, **373**, 1905–1917.
- 7) Bignell, G.R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M., Rapley, E., Barfoot, R., Green, H., Brown, C., Biggs, P.J., Lakhani, S.R., Jones, C., Hansen, J., Blair, E., Hofmann, B., Siebert, R., Turner, G., Evans, D.G., Schrander-Stumpel, C., Beemer, F.A., van Den Ouweland, A., Halley, D., Delpech, B., Cleveland, M.G., Leigh, I., Leisti, J., & Rasmussen, S. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 160–165.
- 8) Sun, S.C. (2010) *Cell Death Differ.*, **17**, 25–34.
- 9) Lim, J.H., Jono, H., Komatsu, K., Woo, C.H., Lee, J., Miyata, M., Matsuno, T., Xu, X., Huang, Y., Zhang, W., Park, S.H., Kim, Y.I., Choi, Y.D., Shen, H., Heo, K.S., Xu, H., Bourne, P., Koga, T., Xu, H., Yan, C., Wang, B., Chen, L.F., Feng, X.H., & Li, J.D. (2012) *Nat. Commun.*, **3**, 771.
- 10) Massoumi, R. (2011) *Future Oncol.*, **7**, 285–297.
- 11) Lim, J.H., Jono, H., Koga, T., Woo, C.H., Ishinaga, H., Bourne, P., Xu, H., Ha, U.H., Xu, H., & Li, J.D. (2007) *PLoS ONE*, **2**, e1032.
- 12) Jono, H., Lim, J.H., Chen, L.F., Xu, H., Trompouki, E., Pan, Z.K., Mosialos, G., & Li, J.D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 36171–36174.
- 13) Michalski, J.M., Golden, G., Ikari, J., & Rennard, S.I. (2012) *Clin. Pharmacol. Ther.*, **91**, 134–142.
- 14) Komatsu, K., Lee, J.Y., Miyata, M., Lim, J.H., Jono, H., Koga, T., Xu, H., Yan, C., Kai, H., & Li, J.D. (2013) *Nat. Commun.*, **4**, 1684.
- 15) Kondo, T., Kawai, T., & Akira, S. (2012) *Trends Immunol.*, **33**, 449–458.

著者寸描

●小松 賢生（こまつ けんせい）



ジョージア州立大学生物医学研究所炎症・免疫・感染研究センター博士研究員。薬学博士（熊本大学）。

■略歴 1983年宮崎県に生る。2006年熊本大学薬学部卒業。08～10年同大学大学院薬学教育部在籍時、ロチェスター大学医療センター（アメリカ合衆国）に留学。11年3月熊本大学大学院薬学教育部修了。11年5月より現職。

■研究テーマと抱負 中耳炎や呼吸器疾患に関連する分子機構の解明および創薬応用研究。自然免疫応答に関連する正や負の調節機構を詳細に理解し、炎症性疾患の新規治療法および治療薬開発に貢献していきたい。

■ウェブサイト <http://biomedical.gsu.edu>

■趣味 ジャズ音楽鑑賞、名所巡り、料理。