

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08795

研究課題名(和文)新規NF- κ B抑制因子による炎症性腸疾患における慢性炎症の制御機構

研究課題名(英文) USP10 in LPS-stimulated macrophages acts on Regnase-1 to suppress inflammatory cytokines.

研究代表者

川村 宏樹 (KAWAMURA, Hiroki)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：20333495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マクロファージにおけるUSP10の炎症性サイトカイン産生への影響を検討した。TLR4リガンドであるLPSでUSP10-KD J774細胞を刺激するとRen J774細胞に比べ増殖能は低下するが、TNF α 、IL-6およびIL-1 β は有意に産生が増加した。これら炎症性サイトカイン産生能の増加はTLR2リガンド刺激では異なったため、TLR4刺激に特異的であることが明らかになった。この炎症反応は、これまで報告されているUSP10がNF- κ B活性を抑制する経路と異なり、USP10がRegnase-1によるmRNA量の調節機構に関与することで、炎症性サイトカイン産生に影響を与えることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、USP10は細胞の種類だけでなく刺激の種類によってIKK β /NEMOに作用してNF- κ B活性を抑制する機能やRegnase-1に作用して炎症性サイトカインの産生を調整する機能など多様な面を持っていることが明らかになった。本研究は当初の仮説と異なる結果となったが、マクロファージにおいてUSP10がRegnase-1のmRNA量の調節機構に関与することで、炎症性サイトカイン産生に影響を与えることを示唆することができた。これは炎症反応の新しい知見で、各刺激でのUSP10の機能を整理すれば将来的には炎症性腸疾患の治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study examined the effect of USP10 on inflammatory cytokine production in macrophages. Stimulation of USP10-KD J774 cells with the TLR4 ligand LPS resulted in decreased proliferative capacity compared to Ren J774 cells, while TNF α , IL-6 and MIP-2 (CXCL2) were significantly increased, and additional stimulation with Nigericin significantly increased IL-1 β . These increases in proinflammatory cytokine production capacity were different with TLR2 ligand stimulation and were specific to TLR4 stimulation. This inflammatory response differs from previously reported pathways in which USP10 suppresses NF- κ B activity, suggesting that USP10 affects inflammatory cytokine production through its involvement in the regulation of mRNA levels by Regnase-1. This is a new observation of the inflammatory response, but the pathway of involvement of USP10 in Regnase-1 needs to be clarified. We will further continue this study to contribute to the treatment of inflammatory bowel disease in the future.

研究分野：感染免疫学、自己免疫学、輸血検査学

キーワード：マクロファージ USP10 炎症性サイトカイン LPS IL-6 IL-1 TNF

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患 (IBD) は消化管の慢性炎症を特徴とする指定難病である。IBD における慢性炎症は、T 細胞とマクロファージによる炎症性サイトカイン (IL-6, TNF α など) の異常産生が関与している。この炎症性サイトカインの異常産生に転写因子 NF- κ B の過度な活性化が関与していることが報告されている¹。これらにより、IBD 治療薬のターゲットとして NF- κ B が注目されているが、マクロファージの NF- κ B の制御機構については不明な点が多い。申請者らは、HTLV-1 がコードする病原蛋白 Tax の新規結合因子として脱ユビキチン化酵素 USP10 を同定し、その機能解析から、USP10 は酸化ストレスによる活性酸素 (ROS) 産生と ROS に依存した細胞死を抑制する²、USP10 ノックアウトマウスは造血幹細胞が著減して骨髄造血不全を発症し早期に死亡する³ことを明らかにした。加えて他研究室から、USP10 は IKK γ /NEMO に結合して NF- κ B 活性を抑制する報告⁴がなされた。

以上の背景から、“マクロファージの NF- κ B 活性化の制御に USP10 が関与して、IBD における NF- κ B の異常活性化にも USP10 が重要な役割を果たす”と仮説を立て検討をおこなった。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく 2 つに分けられる。1 つ目は、マクロファージにおいて USP10 が NF- κ B を制御することで IL-1、IL-6、TNF α の炎症性サイトカインの産生に関与するか否かを明らかにする。2 つ目は IBD における慢性炎症の分子機構に 1 つ目の経路が関与しているか否かを明らかにすることである。

3. 研究の方法

- (1) 細胞株 マウスマクロファージ系細胞株の J774 細胞と RAW264.7 細胞、ヒト T 細胞系細胞株の Jurkat 細胞と 293T 細胞を使用した。
- (2) 試薬 LPS 大腸菌 055:B5 由来、ATP および Zymosan は Sigma 社を、Nigericin は InvivoGen 社を用いた。
- (3) USP10KD 細胞の作製 pLKO.1-puro (Sigma) に USP10-shRNA 配列を組み込み FuGENE HD (Roche) を用いて 293T 細胞に導入し、72 時間後に培養上清を回収した。培養上清中のレンチウイルスは Amicon Ultra-15 units (Millipore) を用いて濃縮した。8 μ g/ μ L polybrene 存在下でレンチウイルス液を RAW264.7 細胞、Jurkat 細胞の培養上清に添加し、48 時間後に細胞を puromycin で選択培養した。
- (4) USP10-KD J774 細胞の作製 SGEF に USP10-shRNA 配列を組み込み FuGENE HD を用いて 293T 細胞に導入し、細胞に培養上清を添加して感染させた。(Fig.1)。
- (5) USP10-KD J774 細胞と USP10-KO J774 細胞に USP10 を再導入した細胞の作製 レンチウイルスベクター-CS-CMV-IRES-Bsd に WT, USP10 を組み込み、FuGENE HD を用いて 293T 細胞に導入し、培養上清を添加して J774-USP10KD 細胞と J774-USP10KO 細胞に感染させ Blasticidin で選択した。
- (6) 各種 mitogen と細胞培養 TNF α 、IL-6 および MIP-2 (CXCL2) の測定の LPS 刺激と Zymosan 刺激の場合は、細胞株 1x10⁵ 個を 24well plate で LPS 加えた培養液を用いて培養して上清を回収した。IL-1 β の測定の LPS と ATP の共刺激の場合、細胞株 1x10⁵ 個を 24well plate で LPS 加えた培養液で 4 時間培養して、その後に ATP は加えて 2 時間培養して上清を回収した。LPS と Nigericin の共刺激の場合、細胞株 1x10⁵ 個を 24well plate で LPS 加えた培養液で 4.5 時間培養して、その後に 20 μ M Nigericin を加えて 1 時間培養して上清を回収した。

4. 研究成果

- (1) USP10-KD J774 細胞の LPS 刺激におけるサイトカイン産生能の検討。

Ren (control) J774 細胞と J774-USP10KD 細胞 (Fig. 1AB) に各濃度の LPS を加え 24 時間培養して、細胞数と上清中のサイトカインの濃度を測定した。なお細胞は Usp10-3 を使用した。その結果、細胞数は Ren に比べ USP10-KD は有意に減少した (Fig. 2A)。一方、TNF α 、IL-6 の炎症性サイトカインおよびケモカインの MIP-2 (CXCL2) は、Ren と USP10KD の間に有意な差は認められなかった (Fig. 2B)。そこで、J774 細胞 Ren と USP10-KD J774 細胞に

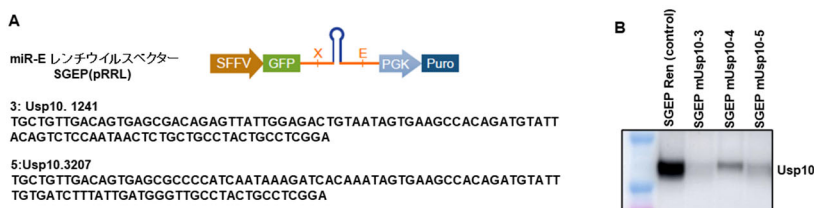


Fig. 1 USP10-KD J774細胞の作製

各濃度の LPS を加え 6 時間培養して、細胞増殖能と上清中のサイトカインの濃度を測定した。その結果、細胞増殖能は培養開始 1 時間および 2 時間後の両方共に、Ren に比べ USP10-KD は増殖スピードが約半分に減少した (Fig. 2C)。TNF α 、IL-6 および MIP-2 は、いずれも Ren と USP10-KD の間に有意な増加が認められた (Fig. 2B)。また炎症性サイトカインの IL-1 β を測定したところ、他のサイト

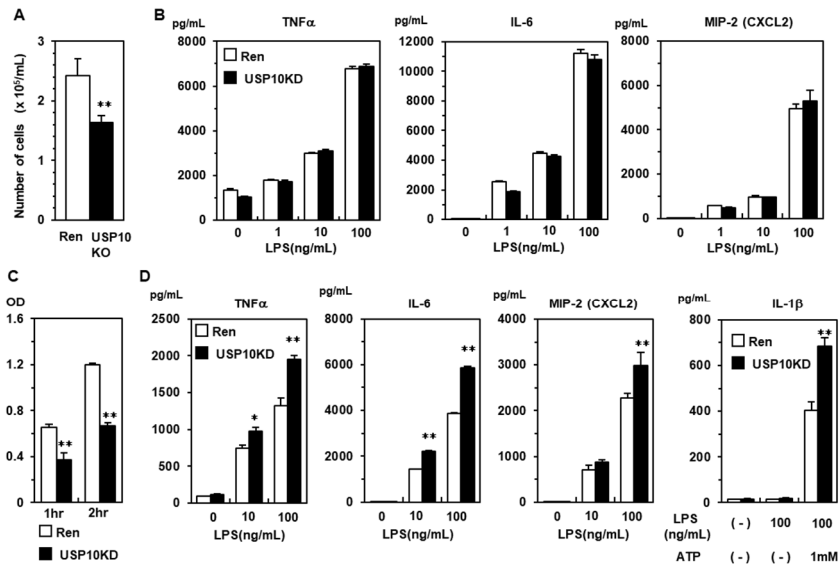


Fig. 2 USP10-KD J774細胞のLPS刺激における培養上清中のサイトカイン産生

カインと同様に有意な増加が認められた (Fig. 2B)。次に、Fig. 2 で増加が認められたサイトカイン量が細胞当たりのサイトカインの mRNA も増加しているか否かを検討した。その結果、TNF α において Ren に比べ USP10-KD は培養開始 1 時間で約 3 倍量となり 2 時間後に約 1.5 倍量であった (Fig. 3A)。一方 IL-6 において Ren に比べ USP10-KD は培養開始 1 時間で約 2 倍量となったが、2 時間後には著明な差は認められなかった (Fig. 3B)。

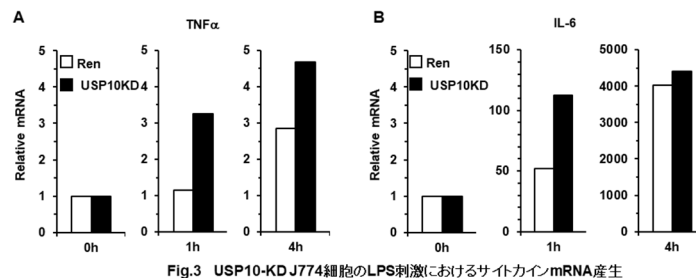


Fig.3 USP10-KD J774細胞のLPS刺激におけるサイトカインmRNA産生

(2) USP10-KD Raw264.7 細胞の LPS 刺激におけるサイトカイン産生能の検討。

Fig.2 においてマクロファージ細胞株の J774 細胞は、Ren に比べ USP10-KD は増殖能が増加して、サイトカイン産生能が増加した。この結果が他のマクロファージ細胞株でも同様か、Raw264.7 細胞の USP10-KD 細胞を作製 (Fig. 4A) して検討した。その結果、LPS を加え 6 時間培養した上清中のサイトカインは、TNF α 、IL-6 および MIP-2 は、いずれも Ren と USP10-KD の間に有意な増加が認められた (Fig. 4B)。

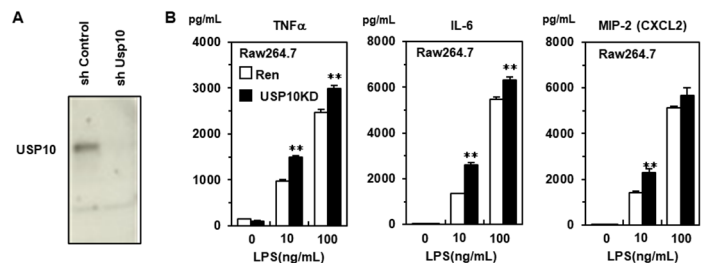


Fig.4 Raw264.7細胞USP-10 KDのLPS刺激におけるサイトカイン産生

(3) USP10-KD J774 細胞の Zymosan 刺激におけるサイトカイン産生能の検討。

Fig. 1 と Fig. 2 において TLR4 のリガンドである LPS 刺激で、TNF α 、IL-6 および MIP-2 は、いずれも Ren と USP10-KD の間に有意な増加が認められた。これは TLR4 特有なのかを TLR2 のリガンドである Zymosan を用いて検討した。その結果、Zymosan を加え 6 時間培養した上清中のサイトカインは、TNF α では Ren と USP10-KD の間で有意な減少が認められた。IL-6 では Ren と USP10-KD の間に Zymosan の濃度によって異なるが、著明な差は認められなかった (Fig. 5A)。

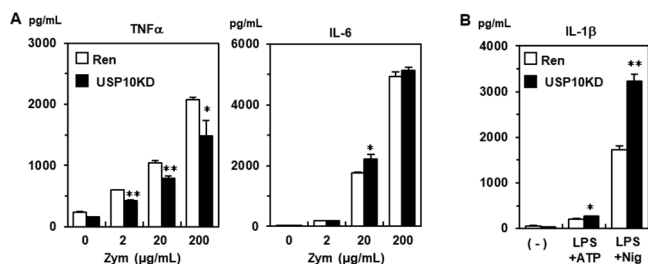


Fig. 5 USP10-KD J774細胞のZymosan刺激とNigericin刺激におけるサイトカイン産生能

(4) USP10-KD J774 細胞の LPS と Nigericin の共刺激におけるサイトカイン産生能の検討。

マクロファージの IL-1 β は LPS 刺激 (1 次刺激) のみだと pro-IL-1 β の前駆体で mRNA のま

まで、ATP による 2 次刺激で IL-1 β の変換酵素である caspase-1 が誘導され転写されさせて細胞外に産生される。ATP 同様に caspase-1 の誘導能をもつ Nigericin で 2 次刺激をおこなった場合の Ren と USP10-KD の間の産生量について検討した。その結果、ATP 刺激に比べ Nigericin は Ren において著明な IL-1 β の産生が認められ、USP10-KD は Ren に比べて有意な増加が認められた (Fig. 5B)。

(5) USP10-KD J774 細胞に USP10 を再導入した細胞のサイトカイン産生能の検討。

Figs. 1-3 の結果から、J774-USP10-KD は Ren に比べ、細胞増殖能が低く、炎症性サイトカインの産生能が高いことが明らかになった。これらが USP10 をノックダウンしたことに起因することを更に証明するために、J774-USP10 KD に USP10 を再導入した細胞を作製 (Fig. 6A) して、細胞増殖能とサイトカイン産生能が戻るか検討した。作製した P1 (control) と U10B を刺激なしの状態、p100 と p52 蛋白の差が無かったことから NF κ B の非古典経路の活性が起こっていないことを確認した (Fig. 6A)。Fig. 6B に示すように、U10B を再導入すると増殖能は回復した。次に

LPS 刺激でサイトカインの産生能を検討したところ、予想に反して TNF α と IL-6 の産生はいずれも P1 に比べ U10B の方が有意な増加が認められた (Fig. 6C)。

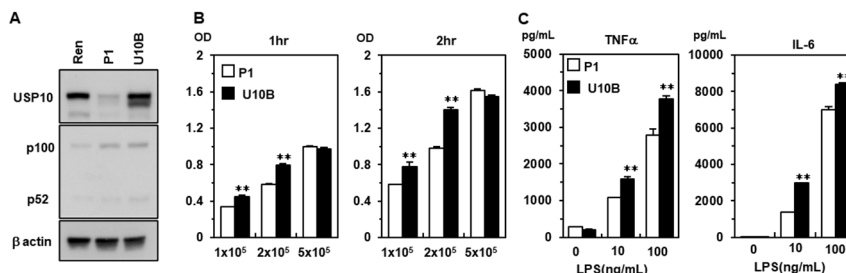


Fig. 6 USP10-KD J774細胞にUSP10を再導入した細胞のサイトカイン産生能の検討

(6) USP10-KD J774 細胞の LPS 刺激における NF κ B 活性の検討。

Fig. 6 の結果より、Niu ら⁴の報告から仮定した「マクロファージにおいて USP10 は NF κ B を抑制して炎症性サイトカインの産生を制御している」と異なる可能性がある。そこで、LPS 刺激後の Ren と USP10-KD の NF κ B 活性を I κ B α で古典経路の活性を、p100/p52 で非古典経路の活性が活発になるか検討した。その結果、I κ B α は Ren と USP10-KD の間で大きな差は認められなかった (Fig. 7A)。次に p100/p52 を検討したところ、は Ren と USP10-KD の間で大きな差は認められなかった (Fig. 7B)。これらから USP10 はマクロファージの炎症性サイトカインの産生において、USP10 は NF κ B から上流には関与せず、NF κ B より下流に影響を与える可能性が示唆された。Regnase-1 は IL-6 と IL-1 β といった炎症性サイトカインの mRNA を分

解することにより、その過剰な産生を抑制することが報告されている⁵。そこで USP10 の Regnase-1 への影響を検討した。その結果、USP10-KD は Ren に比べて Regnase-1 は著明に減少していた (Fig. 7C)。

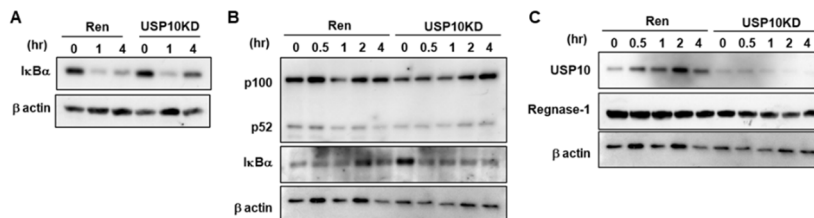


Fig. 7 J774-USP10KDのLPS刺激におけるNF- κ B活性の検討

(8) T 細胞株の USP10-KD におけるサイトカイン産性能と NF κ B 活性の検討。

Fig. 7 の結果から、マクロファージの USP10 は炎症性サイトカインの産生に影響を与えるが、NF κ B 活性に関与しないことが示唆された。このことがマクロファージ特有なのか、T 細胞株を用いて検討した。TPA/Ionomycins 刺激において USP10-KD Jurkat 細胞は NT (control) Jurkat 細胞に比べて IL-2 の産生が有意に低い、

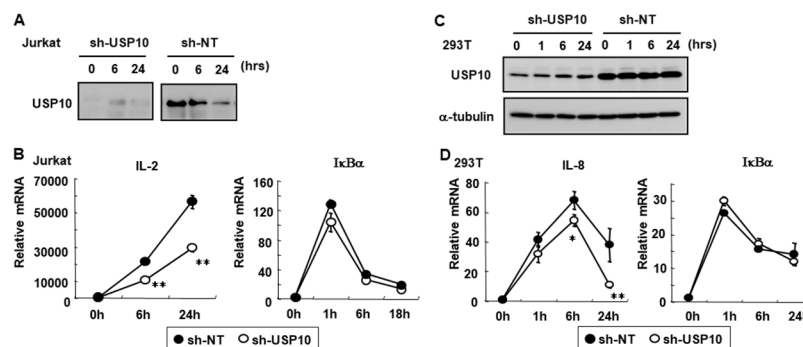


Fig. 8 T細胞株のUSP10-KDにおけるサイトカイン産性能とNF- κ B活性の検討

I κ B α の活性はほとんど変わらなかった (Fig. 8A)。更に他のT細胞株の 293T 細胞でもおこなったところ、TNF α 刺激において USP10-KD293T 細胞は NT-293T 細胞に比べて IL-8 の産生が有意に低い、I κ B α の活性はほとんど変わらなかった (Fig. 8B)。

5. まとめ

炎症性腸疾患における慢性炎症は、T 細胞とマクロファージが異常産生する炎症性サイトカイン (IL-6, TNF α など) に起因し、転写因子 NF- κ B の過度な活性化が関与していることが報告されている¹。Niu らは、USP10 が IKK γ /NEMO に作用して NF- κ B 活性を抑制することを報告⁴した。そこで本研究は“マクロファージの NF- κ B 活性化の制御に USP10 が関与して、IBF における NF- κ B の異常活性化にも USP10 が重要な役割を果たす”と考え検討をおこなった。

TLR4 のリガンドである LPS で USP10-KD J774 細胞を刺激すると Ren J774 細胞に比べ増殖能は低下するが、TNF α と IL-6 の炎症性サイトカインとケモカインである MIP-2 (CXCL2) は有意に産生が増加した (Figs. 1-3)。加えて LPS 刺激後にインフラマソームの ATP または Nigericin で追加刺激すると IL-1 β は USP10-KD J774 細胞で有意に産生が増加した (Figs. 1, 2 and 5)。この USP10-KD による TNF α 、IL-6 および MIP-2 の産生増加は、Raw264.7 細胞でも同様に認められた (Figs. 4 and 5)。これらからマクロファージにおいて USP10-KD すること細胞株特異的ではなく、炎症性サイトカイン産生能が増加することが明らかになった。

次に USP10-KD による炎症性サイトカイン産生能の増加が TLR4 刺激に特異的でないことを確認するために、TLR2 のリガンドである Zymosan 刺激を用いて検討した結果、LPS 刺激と違い炎症性サイトカインの産生増加は認められなかった (Fig. 5A)。このことから刺激の経路によって USP10-KD の作用が異なる可能性が示唆された。

Niu ら⁴は、USP10 は NEMO に作用して DNA damage による NF- κ B 活性を抑制することを報告した。この報告と Fig. 5A の結果から、USP10 は刺激の経路によって NF- κ B 活性を抑制する場合と抑制しない場合がある可能性が考えられた。そこで USP10-KD J774 細胞の LPS 刺激における NF κ B 活性を検討した結果、TLR4 が属する古典経路の I κ B α は Ren と USP10-KO の間で大きな差は認められなかった (Fig. 7A)。加えて Niu らが使用したと同じ 293T 細胞で USP10-KD して TNF α で刺激した結果、I κ B α の活性は大きく変わらなかった (Fig. 8B)。これらのことから USP10 は刺激の経路によって NF- κ B 活性への関与が異なり、TLR4 の刺激で USP10 はマクロファージ NF κ B から上流には関与せずに、NF- κ B より下流に影響を与える可能性が示唆された。Akira らは、Regnase-1 は IL-6 と IL-1 β といった炎症性サイトカインの mRNA を分解することで過剰な産生を抑制することが報告している。そこで USP10 の Regnase-1 への影響を検討した結果、USP10KD は Ren に比べて Regnase-1 は著明に減少していた (Fig. 7C)。このことから TLR4 の刺激で USP10 は NF- κ B の下流で Regnase-1 に作用することで、炎症性サイトカインの産生を調整することが示唆された。

USP10 は細胞の種類だけでなく刺激の種類によって、IKK γ /NEMO に作用して NF- κ B 活性を抑制する機能や Regnase-1 に作用して炎症性サイトカインの産生を調整する機能など多様な面を持っている。本研究は当初の仮説と異なる結果となったが、マクロファージにおいて USP10 が Regnase-1 の mRNA の量の調節機構に関与することで、炎症性サイトカイン産生に影響を与えることを示唆した。これは炎症反応の新しい知見であるが、USP10 の Regnase-1 への関与経路を明らかにする必要がある。将来的には炎症性腸疾患の治療に貢献できるように、更に本研究を継続しておこなう。

<引用文献>

- ① Vong LB, Tomita T, Yoshitomi T, Matsui H, Nagasaki Y., An orally administered redox nanoparticle that accumulates in the colonic mucosa and reduces colitis in mice., *Gastroenterology*. 2012 Oct;143(4):1027-36.
- ② Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M., Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production., *Mol Cell Biol*. 2013 Feb;33(4):815-29.
- ③ Higuchi M, Kawamura H, Matsuki H, Hara T, Takahashi M, Saito S, Saito K, Jiang S, Naito M, Kiyonari H, Fujii M., USP10 Is an Essential Deubiquitinase for Hematopoiesis and Inhibits Apoptosis of Long-Term Hematopoietic Stem Cells., *Stem Cell Reports*. 2016 Dec 13;7(6):1116-1129.
- ④ Niu J, Shi Y, Xue J, Miao R, Huang S, Wang T, Wu J, Fu M, Wu ZH., USP10 inhibits genotoxic NF- κ B activation by MCP1-facilitated deubiquitination of NEMO., *EMBO J*. 2013 Dec 11;32(24):3206-19.
- ⑤ Uehata T, Akira S., mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCPIP-1., *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun-Jul;1829(6-7):708-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村宏樹
2. 発表標題 成人T細胞白血病のがん関連蛋白USP10によるT 細胞の機能制御.
3. 学会等名 第17回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 姫田敏樹、大桑孝子、宇谷公一、樋口雅也
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP10のカルジオウイルス増殖抑制作用の解析
3. 学会等名 第55回 日本細菌学会 中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姫田 敏樹、大桑 孝子、宇谷 公一、樋口 雅也
2. 発表標題 Saffoldウイルス感染応答の制御における脱ユビキチン化酵素 USP10の役割
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇谷公一、逆井良、岩渕邦芳、樋口雅也
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP10によるDNA損傷応答制御
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋雅彦、北浦弘樹、柿田明美、垣花太一、葛城美徳、岩倉百合子、那波宏之、樋口雅也、小松雅明、藤井雅寛
2. 発表標題 USP10は -シヌクレイン凝集およびレビー小体を誘導するアグリソームの形成に重要な因子である
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋雅彦、北浦弘樹、柿田明美、垣花太一、葛城美徳、小山哲秀、小野寺理、岩倉百合子、那波宏之、小松雅明、藤井雅寛
2. 発表標題 G3BP1およびUSP10はTDP-43との相互作用により異常な細胞質のTDP-43凝集を防ぐ
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会、2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村宏樹
2. 発表標題 新規NF- B活性制御因子USP10のマクロファージにおける炎症性サイトカインの制御機構の検討
3. 学会等名 第21回新潟医療福祉学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	樋口 雅也 (HIGUCHI Masaya) (50334678)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高橋 雅彦 (TAKAHASHI Masahiko) (80377192)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関