

機関番号：17401

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2010

課題番号：20890167

研究課題名（和文）難治性疾患の病態に深く関与するCYLDの新たな病態制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Novel roles of CYLD in the molecular pathogenesis of intractable diseases

研究代表者

城野 博史（JONO HIROFUMI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：40515483

研究成果の概要（和文）：腫瘍抑制遺伝子である CYLD は、様々な難治性疾患の病態に関与する注目の分子である。本研究では、CYLD 関連疾患であることが報告された、1. 肺線維症、2. 慢性閉塞性肺疾患、3. 家族性アミロイドポリニューロパチーに焦点を当て、病態発現機構における CYLD の役割の解明を行った。本研究結果から、CYLD は、脱ユビキチン化酵素として、TGFβ シグナルや NF-κB シグナルなどの細胞内シグナル伝達経路を抑制し、様々な疾患関連遺伝子の発現を制御することで疾患の病態発現に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Tumor suppressor CYLD has been recently shown to play important roles in the pathogenesis of various intractable diseases. In the present study, we focused on the CYLD-related diseases (1. lung fibrosis, 2. chronic obstructive pulmonary disease, 3. familial amyloidotic polyneuropathy) and revealed that CYLD acted as a deubiquitinase and involved in various diseases by suppressing intracellular signaling, such as TGFβ signal and NF-κB signal to regulate the disease-related gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：病態情報解析学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：CYLD、肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、家族性アミロイドポリニューロパチー

## 1. 研究開始当初の背景

CYLD 遺伝子は、家族性円柱腫症 (familial cylindromatosis) の原因遺伝子として同定され、その遺伝子変異は腫瘍形成に重要な役割を果たす。近年、CYLD は脱ユビキチン化酵素として転写因子である NF-κB (Nuclear Factor-κB) の活性化を抑制し腫瘍抑制作用を示すことが明らかとなり、その機能の一端が明らかとなりつつあるが、我々はこれまでに CYLD 欠損マウスを作成し、CYLD が腫瘍のみ

ならず様々な難治性疾患の病態発現機構に重要な役割を示すことを見出してきた。

CYLD 欠損マウスは通常状態では著明な表現型を一切示さないが、外的刺激として細菌感染症を誘発すると、肺炎球菌感染に対し重篤な肺線維症、莢膜非保有インフルエンザ菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi) 感染に対し慢性閉塞性肺疾患 COPD の病態を示す。これらの研究成果は、CYLD が生体の病的変化を察知し、様々な疾患に関与す

る大変ユニークな分子である可能性を示しているが、そのメカニズムの詳細はいまだ多くの謎に包まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、病態発現機構における CYLD の新たな役割を解明することを目的とし、これまで我々が取り組んできた細菌感染により誘発される疾患 (1. 肺線維症、2. COPD) および遺伝性疾患 (3. FAP) について、それぞれの発症機構における CYLD の機能の解析を行う。

- (1) 肺炎球菌感染症における CYLD の機能解析
- (2) NTHi 感染症における CYLD の機能解析
- (3) FAP 発症機構における CYLD 機能解析

本研究は、想像以上の広がりを見せる CYLD 関連疾患の病態像の一端を明らかにし、これらの難治性疾患の病態発現機構の解明および治療法の開発に貢献することが期待される。

## 3. 研究の方法

本研究目的を達成するため、以下の研究を実施した。

### (1) 肺炎球菌感染症における CYLD の機能解析

- ① CYLD 欠損マウスの肺組織を用いた、肺線維症関連遺伝子を中心とした遺伝子発現の網羅的解析を行った。また、リアルタイム RT-PCR を用い mRNA の定量的解析を行った。
- ② 肺線維症組織のプロテオーム解析として、肺炎球菌により活性化される細胞内シグナル伝達の状態を解析するため、シグナル分子特異的なリン酸化抗体やユビキチン抗体を用いた Western Blotting 法および免疫組織染色法による検討を行った。

上記の結果より、CYLD 欠損により誘発される肺線維症の病態発現機構の解明を行った。

### (2) NTHi 感染症における CYLD の機能解析

- ① NTHi 感染を起こした CYLD 欠損マウスに対し、炎症性サイトカインの発現をリアルタイム RT-PCR にて経時的にモニターし、過剰発現および発現の持続性について野生型との比較を行った。また、野生型マウスにおいて、CYLD 遺伝子発現の挙動を確認し、炎症反応の終息との相関を解析した。
- ② CYLD 欠損細胞株を用い、サイトカイン過剰発現、発現持続性の確認を行った。また、NF- $\kappa$ B 活性化におけるシグナル分子への

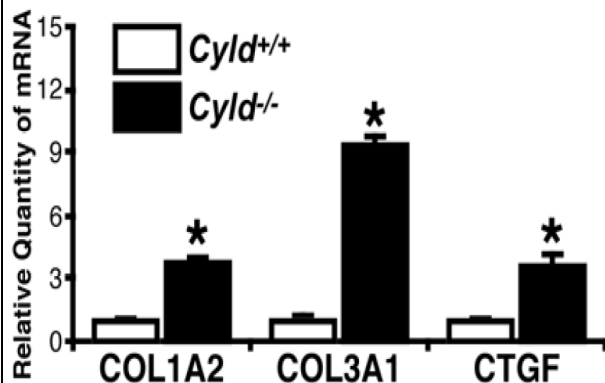
影響を確認し、CYLD がどのシグナル分子を標的として抑制効果を示すか確認した。

### (3) FAP 発症機構における CYLD 機能解析

- ① FAP 患者の検体を用い、アミロイド沈着臓器における CYLD の発現をリアルタイム RT-PCR、Western blotting、免疫組織染色にて確認する。
- ② 培養細胞を用い、アミロイド線維の誘導する細胞の変化をリアルタイム PCR により解析し、CYLD の FAP 発症機構に対する影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 肺線維症発症メカニズム解明

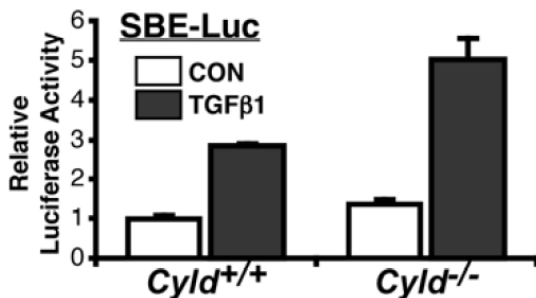


① CYLD 欠損マウスの肺線維症組織の遺伝子発現解析およびプロテオーム解析から、線維化した肺においてコラーゲンなどの細胞外基質の過剰蓄積が認められた (下図)。

リアルタイム RT-PCR を用い mRNA の定量的解析の結果、肺組織において CYLD の機能が喪失すると、コラーゲン (COL1A2、COL3A1) や結合組織成長因子 (CTGF) などの線維化反応に密接に関与する遺伝子の発現が著明に上昇しており、これらの遺伝子発現制御機構に CYLD が関与している可能性が示された。CYLD は、遺伝子発現を制御する様々な細胞内シグナル伝達経路において、シグナル分子と相互作用しその活性化を制御することが明らかとなりつつあり、CYLD の機能喪失により、肺組織において細胞内シグナル異常が誘発されている可能性が考えられる。

② 肺炎球菌により活性化される細胞内シグナル伝達の状態を解析した結果、CYLD 欠損マウスの肺線維症組織においてトランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) シグナルが過剰に活性化していることが明らかとなった。肺線維化過程における細胞外基質の過剰蓄積には、TGF $\beta$  シグナルの過剰活性化が関与していることが知られており、本結果は、CYLD が

TGFβシグナルを制御していることを示唆する初めての知見である。



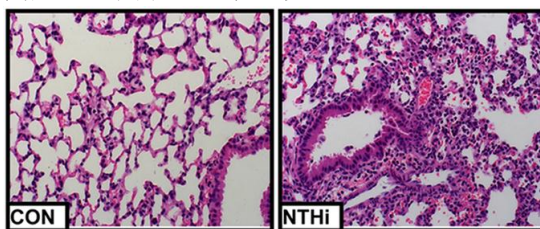
本知見を確認するため、細胞培養系を用いた CYLD の機能解析の結果、CYLD は脱ユビキチン化酵素として TGFβシグナル伝達経路を制御していることが明らかとなった (下図)。

TGFβシグナルの構成分子である Smad 応答性 (SBE: smad binding element) のルシフェラーゼプロモーターの活性は、CYLD 欠損細胞株において著明に上昇していた。また、脱ユビキチン化活性を持たない変異型 CYLD を用いた解析においても、TGFβシグナルの過剰な活性化が確認された。

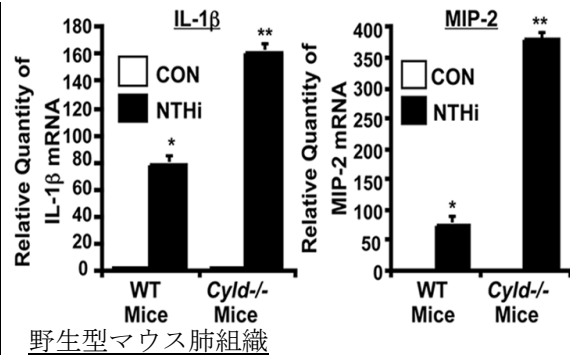
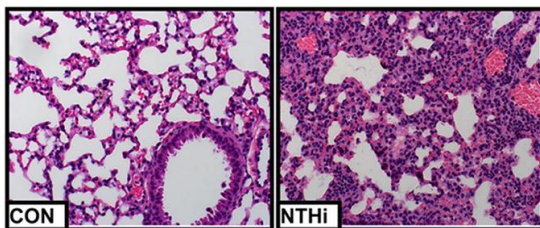
以上の結果から、CYLD は、脱ユビキチン化酵素として TGFβシグナル伝達経路を制御する機能を有し、その機能が喪失した結果、肺の線維化の原因となるコラーゲンなどの細胞外基質の過剰な蓄積が起こっている可能性が示された。今後は、CYLD が標的とする TGFβシグナル分子の同定およびその詳細なメカニズムの解析が必要である。

## (2) 慢性炎症化メカニズムに関する CYLD の機能解析

① NTHi 感染を起こした CYLD 欠損マウスで確認される過剰な肺組織の傷害は、CYLD 機能喪失に起因する過剰な炎症性サイトカイン



の発現亢進が原因である可能性が示された (下図)。

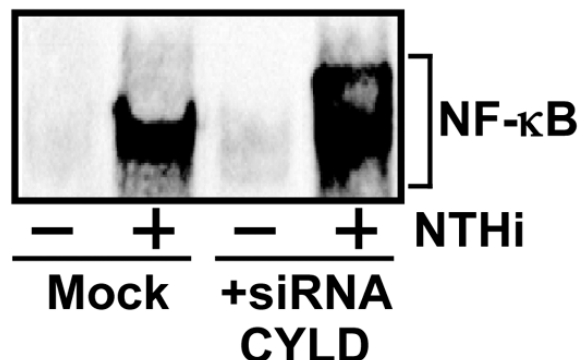


野生型マウス肺組織

CYLD 欠損マウス肺組織

また、炎症性サイトカイン (TNF-α, IL-1β, MIP-2) の発現をリアルタイム RT-PCR にて経時的にモニターし、発現の持続性について野生型との比較を行った結果、各種サイトカインが定常レベルに戻るまでの期間の延長が見られたことから、これらのサイトカインの過剰発現は、CYLD 機能喪失によるフィードバック機構の破たんに関与していると考えられる。

②細胞培養系を用い、NTHi 感染により活性化される細胞内シグナル伝達の状態を解析し



た結果、CYLD は脱ユビキチン化酵素として、NTHi 感染時の NF-κB シグナル活性化を抑制していることが明らかとなった (下図)。

転写因子である NF-κB の結合部位を用いた EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) の結果においては、siRNA により CYLD の発現をノックダウンした細胞において NTHi 感染による NF-κB の過剰な活性化が見られ、脱ユビキチン化活性を持たない変異型 CYLD を用いた解析においても、NF-κB の過剰な活性化が確認された。また、CYLD は、NTHi 感染時に活性化される Toll-like receptor (TLR) の下流に位置する TRAF 分子の脱ユビキチン化を行い、NF-κB シグナル活性化の抑制を行うことも明らかとなった。

以上の結果より、CYLD は、NTHi 感染時の炎症反応を制御し、炎症の慢性化を左右する重要な因子である可能性が示唆された。

(3) FAP 発症機構における CYLD の役割の解明

FAP の原因タンパク質であるトランスサイレチンのアミロイド線維を培養細胞に添加すると、細胞内の CYLD 発現が低下した。また、アミロイド線維沈着の足場となることが知られているコラーゲンの発現上昇も同時に確認された。上述の肺線維症の病態解析においても、CYLD の機能が失われるとコラーゲンの発現が上昇することが確認されており、今後は TGFβシグナルの関与などの詳細なメカニズム解析ならびに臨床的意義の解明が必要である。また、FAP 患者の検体を用い、様々なアミロイド沈着臓器における CYLD の発現をリアルタイム PCR により確認し、NF-κB の活性化やユビキチン化と相関しているか現在継続して検討中である。

今後は、上記の CYLD が病態発現に関与する 3 疾患を対象に CYLD の機能解析を継続して行い、臨床的意義ならびに治療標的としての可能性を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Jono H, Anno T, Motoyama K, Misumi Y, Tasaki T, Oshima T, Mori Y, Mizuguchi M, Ueda M, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y. Cyclodextrin, a novel therapeutic tool for suppressing amyloidogenic transthyretin misfolding in transthyretin-related amyloidosis. *Biochem J*, 査読有, 2011, in press.
- ② Kugimiya T, \*Jono H, Saito S, Maruyama M, Kadowaki D, Misumi Y, Hoshii Y, Tasaki T, Su Y, Ueda M, Obayashi K, Shono M, Otagiri M, Ando Y. Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Lab Invest*, 査読有, 2011, in press (\* 貢献同等)
- ③ Sueyoshi T, Ueda M, Jono H, Irie H, Sei A, Ide J, Ando Y, Mizuta H. Wild-type transthyretin-derived amyloidosis in various ligaments and tendons. *Hum Pathol*, 査読有, 2011, in press
- ④ Obayashi K, Yamashita T, Tasaki M, Ueda M, Shono M, Jono H, Ohshima T, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ando Y. Amyloid neuropathy in a younger domino liver transplanted recipient. *Muscle Nerve*, 査読有, 43, 2011, 449-50
- ⑤ Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Horlad H, Jono H, Ueda M, Phd SS, Ando Y, Baba H. Hepatic Stellate Cells Accelerate the Malignant Behavior of Cholangiocarcinoma Cells. *Ann Surg Oncol*, 査読有, 18, 2011, 1175-1184
- ⑥ Jeon KI, Jono H, Miller CL, Cai Y, Lim S, Liu X, Gao P, Abe J, Li JD, Yan C. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulate PDE1 regulate the beta-catenin/TCF signaling through PP2A B56 gamma subunit in proliferating vascular smooth muscle cells. *FEBS J*, 査読有, 277, 2010, 5026-39
- ⑦ Tasaki M, Ueda M, Ochiai S, Tanabe Y, Murata S, Su Y, Shinriki S, Jono H, Shono M, Obayashi K, Nakamura T, Yamada M, Ando Y. Trans Soluble amyloidogenic enhancing factor Circulating via exosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 400, 2010, 559-62
- ⑧ Jeon KI, Xu X, Aizawa T, Lim JH, Jono H, Kwon DS, Abe J, Berk BC, Li JD, Yan C. Vinpocetine inhibits NF-kappaB dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 107, 2010, 9795-800
- ⑨ Arima H, Yamashita S, Mori Y, Hayashi Y, Motoyama K, Hattori K, Takeuchi T, Jono H, Ando Y, Hirayama F, Uekama K. In Vitro and In Vivo Gene Delivery Mediated by Lactosylated Dendrimer/α-Cyclodextrin Conjugates (G2) into Hepatocytes. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 2010, 146, 106-17
- ⑩ Lim JH, Kim HJ, Komatsu K, Ha U, Huang Y, Jono H, Kweon SM, Lee J, Xu X, Zhang GS, Shen H, Kai H, Zhang W, Xu H, Li JD. Differential regulation of Streptococcus pneumoniae-induced human MUC5AC mucin expression through distinct MAPK pathways. *Am J Transl Res*, 査読有, 8, 2009, 300-11
- ⑪ Misumi Y, Ando Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Uchino M. Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol*, 査読有, 219, 2009, 481-90
- ⑫ Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y. Humanized

anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 査読有, 15, 2009, 5426-34.

- ⑬ Ueda M, Misumi Y, Mizuguchi M, Nakamura M, Yamashita T, Sekijima Y, Ota K, Shinriki S, Jono H, Ikeda S, Suhr OB, Ando Y. SELDI-TOF mass spectrometry evaluation of variant transthyretins for diagnosis and pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy. Clin Chem. 査読有, 55, 2009, 1223-7
- ⑭ Komatsu K, \*Jono H, Lim JH, Imasato A, Xu H, Kai H, Yan C, Li JD. Glucocorticoids inhibit nontypeable Haemophilus influenza induced MUC5AC mucin expression via MAPK phosphatase-1 dependent inhibition of p38 MAPK. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 19, 2008, 763-8 (\*貢献同等)
- ⑮ Ishinaga H, \*Jono H, Lim JH, Komatsu K, Xu X, Lee J, Woo CH, Xu H, Feng XH, Chen LF, Yan C, Li JD. Synergistic induction of nuclear factor-kappaB by transforming growth factor-beta and tumour necrosis factor-alpha is mediated by protein kinase A-dependent RelA acetylation. Biochem J. 査読有, 417, 2009, 583-91 (\*貢献同等)
- ⑯ Koga T, Lim JH, Jono H, Ha UH, Xu H, Ishinaga H, Morino S, Xu X, Yan C, Kai H, Li JD. Tumor suppressor cylindromatosis acts as a negative regulator for Streptococcus pneumoniae-induced NFAT signaling. J Biol Chem, 査読有, 283, 2008, 12546-54
- ⑰ Ota K, Fujimori H, Ueda M, Shinriki S, Kudo M, Jono H, Fukuyoshi Y, Yamamoto Y, Sugiuchi H, Iwase H, Shinohara M, Ando Y. Midkine as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer, 査読有, 99, 2008, 655-62
- ⑱ Shen H, Yoshida H, Yan F, Li W, Xu F, Huang H, Jono H, Li JD. Synergistic induction of MUC5AC mucin by nontypeable Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 365, 2008, 795-800

[学会発表] (計7件)

- ① 城野博史、竹崎達也、神力悟、工藤真励奈、矢野茂敏、中村英夫、牧野敬史、秀拓一郎、牟田大助、植田光晴、倉津純一、安東由喜

雄：ヒト化抗 IL-6 受容体抗体を用いたグリオーマに対する抗腫瘍効果の検討 第50回臨床化学学会年会、2010年9月23日、山梨県立県民文化ホール、山梨

- ② Jono H, Anno T, Misumi Y, Mori Y, Motoyama K, Ueda M, Horibata Y, Shono M, Obayashi K, Arima H, Ando Y. Effect of cyclodextrins on transthyretin amyloid formation. XII International symposium on amyloidosis. April 18-21, 2010, Crown Plaza Rome, Rome, Italy.
- ③ 城野博史、工藤真励奈、神力悟、矢野茂敏、中村英夫、牧野敬史、秀拓一郎、牟田大助、植田光晴、安東由喜雄、倉津純一：グリオーマの病態解析およびヒト化抗 IL-6 受容体抗体の抗腫瘍効果の検討。第49回日本臨床化学学会年会、2009年9月19日、長崎大学医学部、長崎
- ④ 城野博史、安野貴幸、三隅洋平、本山敬一、植田光晴、大林光念、堀端洋子、有馬英俊、安東由喜雄：シクロデキストリン誘導体を用いた TTR 型アミロイドーシスのアミロイド線維形成抑制メカニズムの解析。第56回日本臨床検査医学会学術集会、2009年8月28日、札幌コンベンションセンター、札幌
- ⑤ 城野博史、安野貴幸、三隅洋平、大林光念、植田光晴、堀端洋子、有馬英俊、安東由喜雄：シクロデキストリン誘導体を用いた家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の新規治療法の開発、第27回日本神経治療学会総会、2009年6月11日、熊本市市民会館、熊本
- ⑥ 城野博史、安野貴幸、本山敬一、三隅洋平、堀端洋子、植田光晴、有馬英俊、安東由喜雄：分岐β-シクロデキストリンを用いたトランスサイレチンのアミロイド線維形成機構の解析。第55回日本臨床検査医学会総会、2008年11月30日、名古屋国際会議場、名古屋
- ⑦ Jono H, Saito S, Kugimiya T, Maruyama T, Misumi Y, Hoshii Y, Horibata Y, Ueda M, Otagiri M and Ando Y. Effect of Albumin on Transthyretin Amyloid Formation. VIIth International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy, September 3, 2008, King's college London, London, UK.

[図書] (計4件)

- ① 城野博史、大林光念、安東由喜雄：脳機能を反映する血中バイオマーカーの現状と展望。医療と検査機器・試薬、ラボ・サービス、33：284-288, 2010.

- ② Ando Y, Nakamura M, Ueda M, and Jono H.  
New Therapeutic Approaches for Familial  
Amyloidotic Polyneuropathy (FAP)  
Recent Advances in Transthyretin  
Evolution, Structure and Biological  
Functions, Springer, Chapter 14,  
215-238, 2009
- ③ 城野博史、安東由喜雄： $\beta 2$ -ミクログロ  
ブリンの分子修飾. 季刊腎と骨代謝、臨床  
医学出版、22：13-20, 2009.
- ④ 安東由喜雄、城野博史：トランスサイレチ  
ン型アミロイドーシスの病態解析と治療.  
臨床病理、克誠堂出版、56：114-200, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/diagnostic/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城野 博史 (JONO HIROFUMI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：40515483

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし