

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07088

研究課題名(和文) 抗酸化酵素Nqo1を標的とした多発性硬化症に対する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of MS therapy targeting Nqo1

研究代表者

木村 彰宏 (Kimura, Akihiro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：20533318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NQO1がTh17細胞においてIL-10産生を抑制することで、IL-17産生を促進させていることが明らかになった。また、NQO1がIL-10産生に関与しているc-Mafの発現を抑制することでIL-10産生を抑制していた。NQO1は抗酸化酵素であることからROSの関与も調べた結果、NQO1はROS産生を抑制することでc-Mafの発現を抑制していた。NQO1欠損マウスではコントロールマウスに対してEAEが顕著に抑制されていたが、NQO1/IL-10二重欠損マウスではこの抑制がキャンセルされEAEの症状が悪化した。NQO1がTh17細胞におけるIL-10産生の制御因子であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではMSに関与しているTh17細胞においてNqo1が特異的に誘導されT細胞分化に関与していることを発見した。Nqo1を抑制する新たな低分子化合物の発見、開発を進めることでMSに対する画期的な治療法が創造される可能性がある。これら一連の研究プラットフォームは、Nqo1を基軸としたさまざまな生命現象の制御機構の研究に対して起爆剤となることが期待され、結果として我が国の医療や創薬の向上・活性化に対して大いに貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we demonstrated that Nqo1-deficient T cells exhibited reduced induction of T helper 17 cells (Th17) in vitro during Th17(23)- and Th17( )-skewing conditions. Nqo1-deficient mice showed ameliorated symptoms in a Th17-dependent autoimmune Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. Impaired Th17-differentiation was caused by overproduction of the immunosuppressive cytokine, IL-10. Increased IL-10 production in Nqo1-deficient Th17 cells was associated with elevated intracellular Reactive oxygen species (ROS) levels. Furthermore, overproduction of IL-10 in Th17 ( ) cells was responsible for the ROS-dependent increase of c-avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (c-maf) expression, despite the lack of dependency of c-maf in Th17(23) cells. Taken together, the results reveal a novel role of NQO1 in promoting Th17 development through the suppression of ROS mediated IL-10 production.

研究分野：免疫学

キーワード：NQO1 Th17 多発性硬化症 活性酸素 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

酸素を利用している生物の体内では、活性酸素種(ROS)が常に産生されており、ROSは細胞機能や生体のホメオスタシスに対して大きな影響を与えている。当然ながら、生体はROSに対する防御機構を有している。その防御機構が破綻すると酸化ストレスが生じ、さまざまな免疫応答の破綻、自己免疫疾患の誘導につながる事が報告されている。しかしながら炎症時に誘導されるROSと自己免疫疾患との詳細な関係性に関しては不明な点も多い。多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は代表的な中枢神経系自己免疫疾患である。わが国においてはその患者数はこの数十年で30倍近くまで増加しており、このことは環境要因が大きく関与していることが考えられる。環境要因として様々なストレス因子が知られているが、中でも酸化ストレスは多くの疾患に関与していることが報告されている。しかしながらMSと酸化ストレスに関する報告はほとんどなく、この問題が解決されれば、新たなMS発症メカニズムの解明につながる。

Nqo1は抗酸化酵素の一つとして知られており、酸化ストレスによる損傷から細胞を守るはたらきがある。近年、このNqo1が抗酸化作用だけでなく標的タンパクの安定化の制御にも関与していることが示され、Nqo1が多機能を有するタンパクであることが明らかになってきた。本申請者らはこれまでに、Nqo1がI $\kappa$ B $\zeta$ というタンパクに結合し安定化させることで、自然免疫応答を制御していることを明らかにしてきた (*J Exp Med* 215: 2197-2209, 2018)。

### 2. 研究の目的

本研究ではMSに関与しているTh17細胞においてNqo1が特異的に誘導されT細胞分化に関与していることを発見した。非常に興味深いことにNqo1欠損(KO)マウスではMSのマウスモデルであるExperimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)がほとんど起こらないという実験結果も得られている。T細胞におけるNqo1による酸化ストレス防御機構とTh17細胞分化制御機構の解明およびMSとの関連を明らかにしていくことで、これまで報告のなかったTh17細胞分化における酸化ストレスの影響が明らかになり、Th17細胞に特化した抗酸化酵素による免疫応答制御機構の解明は斬新性が高く独創性が高い。また**Nqo1を抑制する新たな低分子化合物の発見、開発を進めることでMSに対する画期的な治療法が創造される可能性がある**。これら一連の研究プラットフォームは、Nqo1を基軸としたさまざまな生命現象の制御機構の研究に対して起爆剤となることが期待され、結果として我が国の医療や創薬の向上・活性化に対して大いに貢献することができる。

### 3. 研究の方法

本研究において以下に示す解決すべき課題を明らかにしていく。

- 1) **Nqo1によるTh17細胞の分化制御機構**
- 2) **T細胞由来Nqo1を基軸とした酸化ストレスとMSの関連性**
- 3) **Nqo1阻害剤によるMS治療**

具体的な研究計画及び達成目標は以下の通りである。

#### 1) **Nqo1によるTh17細胞の分化制御機構**

本申請者はこれまでにNqo1欠損T細胞ではTh17細胞の分化が抑制されることを見

いただいている。Th17 細胞の分化においてマスター転写因子としてはたらいっているのが ROR $\gamma$ t であることが報告されていることから(*Nature* 441 : 235-238, 2006)、まず Nqo1 欠損 T 細胞において Th17 細胞分化条件下で ROR $\gamma$ t の発現量を確認する。また、ROR $\gamma$ t の誘導に参与している Stat3 の活性化(リン酸化やパルミトイル化)についても、野生型および Nqo1 欠損 Th17 細胞においてウェスタンブロッティング法にて比較検討する。

近年、Th17 細胞には炎症性 Th17 細胞と抑制性 Th17 細胞が存在することが明らかにされてきた。抑制性 Th17 細胞は IL-10 を産生することで、炎症反応を抑制することが知られている。本申請者らは Th17 細胞分化条件下において Nqo1 欠損 T 細胞ではこの IL-10 産生がコントロール細胞に比べて顕著に高くなっていることを発見した。Nqo1 は酸化ストレス時に抗酸化因子として作用することから、Nqo1 欠損 Th17 細胞における IL-17 産生の抑制や IL-10 産生の促進が酸化ストレスに依存しているかを検証する。具体的には、WT および Nqo1 欠損ナイーブ T 細胞を Th17 細胞に分化させる際に、抗酸化剤である N-アセチルシステインで処理し酸化ストレスを除去することで Nqo1 欠損細胞における酸化ストレスと Th17 細胞分化の影響を明らかにする。IL-17 や IL-10 の産生を ELISA で比較することにより、Nqo1 や活性酸素が炎症性 Th17(IL-17 のみ産生)と抑制性 Th17(IL-17 および IL-10 を産生)の分化バランスをどのように制御しているのかを解明していく。

さらに、Nqo1 欠損 Th17 細胞では IL-10 が過剰に産生されていることから、この IL-10 の過剰産生により IL-17 産生が抑制しているのかについても検証する。Nqo1 欠損 Th17 細胞において IL-10 中和抗体で処理し、IL-17 産生を ELISA やフローサイトメーターで検出することで IL-10 の過剰産生の影響を調べる。

一方で Th17 細胞における ROS の産生においてもフローサイトメーター(FACS)によって確認する。しかしながら、T 細胞における ROS 産生は FACS による検出が困難な可能性もあるため、群馬大学の岩脇隆夫講師との共同研究において酸化ストレスを検知できるマウスを用いる。岩脇講師らは酸化ストレスに曝された細胞や組織が発光するトランスジェニックマウス (OKD48)の作製に成功している。この OKD48 マウスと Nqo1 KO マウスを交配し、Nqo1 KO マウスで酸化ストレスを検知できるようにする。Nqo1 KO-OKD48 マウスからナイーブ T 細胞を分離し、Th17 細胞に分化誘導させ、T 細胞分化時の酸化ストレスを検出する。以上の研究計画を遂行することで、Nqo1 による酸化ストレス防御機構と炎症性、抑制性 Th17 細胞分化との関連性を明らかにしていく。

## 2) T 細胞由来 Nqo1 を基軸とした酸化ストレスと MS の関連性

T 細胞における Nqo1 の役割と MS との関連を明らかにするために、T 細胞、B 細胞、NK-T 細胞を欠損する RAG-2 KO マウスに Nqo1 欠損 T 細胞を移入し、WT の T 細胞を移入したマウス群とともに EAE を誘導し、クリニカルスコアや抹消 Th17 細胞の割合、血中 IL-17 濃度を比較することで、T 細胞固有の Nqo1 と EAE 誘導との関連を明らかにする。Rag2 KO マウスに WT、Nqo1 欠損 T 細胞を移入して EAE を誘導した際に、NAC をさらに投与することで EAE に対する酸化ストレスの影響を調べる。さらに、T 細胞特異的に Nqo1 を欠損させた cKO マウスや Nqo1/IL-10 ダブル cKO マウスを用いて EAE を誘導しコントロール群と比較することで、T 細胞由来 Nqo1 とそれにより制御されている IL-10 が EAE にどのように関与しているのかを明らかにする。

また同時に前述した OKD48 マウスと Rag2 KO マウスを交配し、同様に WT または

Nqo1 欠損 T 細胞を移入し EAE を誘導することで、EAE 誘導時において酸化ストレスを受けている組織や細胞を時間軸、空間軸の両面から解析していく。これらの実験を通して MS において T 細胞由来 Nqo1 がどのようにして酸化ストレスを制御し MS の発症や増悪に関与しているのかを解明していく。さらに MS 患者の血清を使って、血清中の Nqo1 活性を健常人と比較することで、ヒトにおいても Nqo1 が MS に関与していることを明らかにしていく。

### 3) Nqo1 阻害剤による MS 治療

Th17 細胞分化を抑制する低分子化合物は自己免疫疾患の治療に有効な手段の一つであると考えられる。Nqo1 欠損 Th17 細胞において IL-17 産生が抑制され、IL-10 産生が促進することを発見していることから、T 細胞において Nqo1 活性を抑制できる Nqo1 阻害剤は MS の新規治療薬として有望な候補となり得る。

Nqo1 酵素活性を抑制できる Nqo1 阻害剤は複数存在している。これら Nqo1 阻害剤の中から以下の 2 点に着目し、MS に対して治療効果を示す Nqo1 阻害剤の候補を選定する。「Th17 細胞において IL-17 産生を抑制する」「Th17 細胞において IL-10 産生を促進する」この 2 点のうちどれか一つまたは両方の条件を満たすような Nqo1 阻害剤を同定する。同定された候補に関しては EAE を誘導したマウスに投与することでその治療効果を確認する。また既存の Nqo1 阻害剤だけでなく、ケミカルライブラリーの中から T 細胞において Nqo1 活性を抑制できる未知の Nqo1 阻害剤を同定する。既存の Nqo1 阻害剤以外の新たな Nqo1 阻害剤を同定する理由として、これまでの市販の Nqo1 阻害剤は Nqo1 以外にも Nqo2 を阻害してしまうものもあるため、本研究では Nqo1 特異的な新規阻害化合物の発見を目指す。酸化ストレスを除去する Nqo1 活性の測定系は確立されていることから、ケミカルライブラリーの各化合物をそのアッセイ系に加えることで Nqo1 依存的に酸化ストレスを除去できる低分子化合物をスクリーニングしていく。同定された未知の Nqo1 阻害剤に関しては上述した研究計画に沿って自己免疫疾患に対する治療効果を確認していく。

### 4. 研究成果

本申請者らはこれまでに抗酸化酵素 NAD(P)H quinone dehydrogenase 1(NQO1)が Th17 細胞において特異的に誘導されていることを発見していた。NQO1 欠損 Th17 細胞では IL-17 産生が低下し、逆に IL-10 産生が更新していたことから、NQO1 欠損 Th17 細胞における IL-17 産生の減弱が IL-10 の高産生によるものなのかを調べるために NQO1/IL-10 二重欠損マウスを作成した。NQO1/IL-10 二重欠損 Th17 細胞では NQO1 欠損 Th17 細胞で見られた IL-17 産生の減弱がキャンセルされていた。このことから NQO1 は Th17 細胞において IL-10 の産生を抑制することで、IL-17 産生を促進させていることが判明した。さらに、NQO1 欠損マウスではコントロールマウスに対して Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) が顕著に抑制されていたが、NQO1/IL-10 二重欠損マウスではこの抑制がキャンセルされ EAE の症状が悪化した。さらに EAE を誘導した際、NQO1 欠損マウスでは血中 IL-17 量は低値を示したが、NQO1/IL-10 二重欠損マウスでは血中 IL-17 量は高くなっていた。この結果から in vivo においても NQO1 欠損における IL-10 産生の亢進が IL-17 産生を抑制し、EAE を抑制していることが示唆された。NQO1 は抗酸化酵素であることから、NQO1 欠損 T 細胞における活性酸素(ROS)の産生量を調べた結果、

コントロール細胞に比べてNQO1欠損Th17細胞ではROS産生量が増加していた。このことからNQO1欠損Th17細胞におけるIL-10産生は活性酸素により促進されていることが予想された。そこでNQO1欠損Th17細胞に活性酸素除去試薬(NAC)を添加するとIL-10産生がコントロールTh17細胞と同程度まで抑制された。これらの結果から、NQO1欠損Th17細胞におけるIL-10産生の亢進はROSに依存していることが明らかになった。

Type 1 regulatory T cell (Tr1)細胞におけるIL-10産生には転写因子の一つであるc-mafが関与していることが報告されている。本申請者らはTh17細胞においてc-mafが発現していることを確認した。一方で、他のMaf familyであるmaf Kなどの発現は確認されなかった。これらの結果から、Tr1細胞と同様にTh17細胞においてもIL-10産生にはc-mafが関与していることが考えられるため、c-maf欠損マウスを用いて解析を進めた。その結果、コントロールに比べNQO1欠損Th17細胞においてc-Mafの発現が高くなっていることが明らかになった。また、NQO1/c-Maf二重欠損Th17細胞ではNQO1欠損Th17細胞にみられたIL-10産生の亢進がキャンセルされたことから、c-MafがNQO1欠損Th17におけるIL-10産生を促進させていることが明らかとなった。c-Mafは大Maf転写因子群の一つであるが、Th17細胞における小Maf転写因子群の関与も調べた結果、小Maf転写因子群はTh17細胞におけるIL-17およびIL-10産生には関与していないことが判明した。

関節リウマチにおける aaRS の作用機序に関する研究を最近論文に発表した。多くの aaRS が関節リウマチ患者血清で高い値を示しており、aaRS がアラミンとして自然免疫応答を活性化することで、サイトカイン誘導や PAD4 放出を促進していることを明らかにした。さらにわれわれが開発したアラミンとしての aaRS の機能を阻害する阻害ペプチドが、関節リウマチのマウスモデルにおいて高い治療効果を示すことも判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishida-Tamehiro Kyoko, Kimura Akihiro, Tsubata Takeshi, Takahashi Satoru, Suzuki Harumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Antioxidative enzyme NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) modulates the differentiation of Th17 cells by regulating ROS levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0272090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0272090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Akihiro, Takagi Takeshi, Thamamongood Thiprampai, Sakamoto Satoshi, Ito Takumi, Seki Iwao, Okamoto Masahiro, Aono Hiroyuki, Serada Satoshi, Naka Tetsuji, et al.	4. 巻 82
2. 論文標題 Extracellular aaRSs drive autoimmune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis via the release of cytokines and PAD4	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1153-1161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/ard-2023-224055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------