

令和元年6月8日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06994

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼFbw7の炎症反応調節機能

研究課題名(英文) Regulation of inflammatory response via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7

研究代表者

北川 恭子 (KITAGAWA, KYOKO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20299605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンリガーゼであるFbw7の結合部を失って分解抵抗性になったc-Mybノックインマウスを作成したところ、ホモ変異型では肺にB細胞を主としたリンパ球浸潤による臓器障害発生例が見られ、一部の浸潤細胞がc-Myb陽性を示した。炎症部にB細胞を走化させるCXCL13の遺伝子プロモーター上にはc-Myb応答配列が存在し、その転写活性化能がLuc assayで確認された。またFbw7の別の分解標的GATA3も相乗的に転写活性能を増強した。よってFbw7が炎症発生時にCXCL13の発現調節に関わる可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fbw7の欠損はc-MybおよびGATA3の分解阻害をもたらす、血球系細胞の分化増殖阻害を発生させる可能性があることは過去に報告したが、本研究によって炎症発生に伴って免疫細胞がCXCL13を産生する際に、Fbw7による量的調節を受けたc-MybとGATA3が相乗的な発現促進作用を持つ可能性が示唆された。両因子の相乗作用はIL-13発現においても過去の報告で認められており、複数の炎症性サイトカインの発現調節にFbw7がこれら転写因子の量的調節を介して関与していると考えられる。このことからFbw7活性調節が新規抗炎症薬での分子標的候補になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Both c-Myb and GATA3 are the targets of Fbw7-mediated ubiquitylation. A knock-in strategy to express Fbw7-mediated degradation resistant mutant of c-Myb in mice was performed. In lung of some homozygous knock-in mice, lymphocytic infiltration which was mainly comprised of B cells was observed, and some cells in the region were expressed c-Myb.

CXCL13 which expresses in accordance with an inflammation is a chemotactic factor for B cell to a damage site, c-Myb responsive sequences are included in its promoter region. The transcriptional activity of c-Myb on the CXCL13 promoter region was confirmed by luciferase assay, indeed, GATA3 which is also a target of Fbw7 produced synergistic effect with c-Myb. It is suggested that Fbw7 associates with the regulation of CXCL13 expression level by quantitative regulation of its targets.

研究分野：分子生物学

キーワード：Fbw7 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**炎症と T 細胞** : 抗原物質などによる刺激を受けた部位では生体防御のために免疫系が起動する。まずマクロファージが抗原を受け止め、自然免疫系の細胞が抗原を貪食排除すると共に獲得免疫系へも抗原情報を送るとヘルパー T 細胞 (Th0) の再分化が発生し、多種の免疫細胞から炎症性サイトカインが産生され、炎症が発生する。貪食を受けた組織細胞は死滅し、脱落した領域を補う為に周辺の細胞増殖は一過性に亢進する。急性炎症ではこの組織損傷と修復が繰り返されながらサイトカインの発現は抗炎症性サイトカインにシフトして治癒に向かうが、受けるダメージが強く修復不能な場合は慢性炎症に分類され、組織には不可逆性の線維化が誘導されて臓器障害の原因となる。最近の研究で、炎症は糖尿病などの生活習慣病、アルツハイマー病や癌など、多種の疾患に関わる生体反応であることがわかり、治療標的として注目されている。

Th0 の再分化で産生される Th1 と Th2 は互いの機能を抑制し、Th1/Th2 バランスと称される平衡状態を保ってそれぞれの産生するサイトカイン量が調節されている。アトピー性皮膚炎ではバランスが Th2 に偏っているのが特徴のひとつだが、GATA3 の高発現状態は Th2 優位の傾向を強める作用を持つ。

**Fbw7** : ユビキチンプロテアソーム分解において基質を認識する E3 ligase のひとつで、多くの基質に対して、GSK3 によってリン酸化される Ser/Thr を含むコンセンサスアミノ酸配列 (CPD : Cdc4 phospho-degron) を認識して結合、分解を誘導することが知られている。血液癌を始めとする複数種の癌で高頻度に機能欠損に帰結する *Fbw7* 遺伝子変異が同定され、また既知の基質に癌遺伝子産物および造血系細胞の分化増殖に関わる因子を含む事から、*Fbw7* は癌抑制や細胞分化調節を司ると理解されている。*Fbw7* を T 細胞分化初期以降に欠失する Lck-Cre コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの T 細胞では、Myc, Notch, NF B2, GATA3 の蓄積が観察される。いずれも *Fbw7* の基質であると同時に、炎症反応の惹起、進展の様々な局面で重要な役割を担うことから、Lck-Cre cKO マウスでは炎症刺激に対して T 細胞応答不全の反応を起こすかもしれない。しかしながら *Fbw7* が炎症抑制に関与していることと実証した報告はない。

**c-Myb** : 我々は血球細胞の分化制御を担う転写因子として知られる c-Myb タンパク質が、CPD 内 T572 がリン酸化されることで *Fbw7* と結合し、ユビキチン依存的分解を受けることを発見した (Kitagawa *Oncogene* 2009, *Cell Div.* 2010)。cMyb の分解は臓器のどこで、どのように機能しているかを明らかにすることを目的として、T572 に変異を導入し *Fbw7* による分解に抵抗性を獲得した c-Myb ノックイン (cMyb<sup>T572A</sup> KI) マウスを作製した。このマウスでは通常環境下での飼育によって可逆性の接触性皮膚炎に似た可逆性の皮膚炎症を発症することが観察された。皮膚炎の発症に c-Myb が関与することを示す報告はなく、c-Myb は未知の下流転写制御分子を介して炎症惹起を回避する役割を持つ分子であると予想される。

**GATA3** : T 細胞の分化過程で不可欠の役目を果たしている GATA3 も CPD を持つタンパク質で、我々は *Fbw7* の基質であることを同定した (Kitagawa *MCB* 2014)。Lck-Cre cKO マウスでは GATA3 の蓄積によって胸腺内での T 細胞の最終分化に障害が発生していることが推測された。また、近年ユビキチン分解の抑制機構の一つとして deubiquitinase (DUB) の機能が注目されており、GATA3 の安定性にも DUB の関与があることがわかっている。GATA3 は半減期の短い転写因子だが、炎症発生時に活性が誘導される MAPK は GATA3 をリン酸化し、GATA3 のユビキチン化を抑制してタンパク安定化に導くことが報告されている。MS 解析で MAPK-p38 によるリン酸化部位を調べたところ、同定されたのは 1 箇所だけで、このリン酸化修飾は DUB の一種 (仮称 : USP-X) の結合と *Fbw7* による GATA3 のユビキチン化の抑制をもたらす可能性が見出された。

## 2. 研究の目的

ユビキチンプロテアソーム分解系の E3 リガーゼである *Fbw7* は、癌抑制や分化調節を司ると理解されてきた。一方で *Fbw7* の基質の炎症に関連した報告や、炎症に関する知見等を統合して考えると、*Fbw7* は炎症調節因子としての役割を担う分子でもあり、おそらく正常時では *Fbw7* は炎症の発生および重篤化を抑制しているが、その分解システムに障害が起こると、炎症の惹起も重篤化も起こりやすくなる傾向に向かうと推察された。本課題では炎

症反応過程に関わる Fbw7 の既知・新規基質の同定とその役割、また炎症シグナル下での Fbw7 を介した基質分解制御の役割を明らかにし、Fbw7 の炎症における機能を解明する。

### 3. 研究の方法

#### I. c-Myb<sup>T572A</sup> KI マウスで発生する炎症の病態解析と病態獲得に寄与する cMyb 下流遺伝子を同定する。

皮膚炎は発症原因や症状から多種に分類され、c-Myb<sup>T572A</sup> KI マウスで起こる自然炎症を正確に捉えるには、その特徴を明らかにし、発症原因を探る必要がある。そこで自然発生した炎症および薬剤による炎症モデルを c-Myb<sup>T572A</sup> KI マウスを対象に解析し、病態獲得に関わる cMyb 下流遺伝子を同定する。

#### II. Fbw7 を介した GATA3 分解の DUB による抑制制御機構を解明する。

Fbw7 の基質に対する DUB 結合の阻害は、炎症制御因子の量的調節を可能にする方法のひとつになると考えられる。炎症惹起シグナルに連動した GATA3 の安定性制御に関与する DUB を同定し、機能発現に関与する GATA3 のリン酸化機構を明らかにするとともに、炎症モデルマウスでの DUB と GATA3 のリン酸化制御の関与を検証する。

### 4. 研究成果

I. c-Myb<sup>T572A</sup> KI マウスで自然発生した炎症としては、皮膚炎に加えて肺、肝臓、腎臓での異所性リンパ球浸潤、胸腺および脾臓の構造崩壊が観察された。さらに、これらの障害部にある細胞の一部がc-Mybを発現していることが組織免疫染色によって確認された。しかしながらこれらの異常はマウスの継代を重ねることで減弱化したため、発生原因はc-Mybの蓄積単独によるものではないと考えるのが妥当と判断された。

一方でダニ粉吸引による喘息発症モデルを作成、解析したところ、c-Myb<sup>T572A</sup> KI マウスで肺に自然発症した炎症像と近似していることがわかり、野生型マウスで作成した喘息発症モデルのリンパ球浸潤部であってもB細胞以外の一部の細胞がc-Mybを発現していることが確認された。炎症発生に伴ってB細胞が炎症部に遊走する際、障害部の樹状細胞やTfh細胞が走化因子であるCXCL13を発現することが知られている。遺伝子配列の検索より、CXCL13遺伝子プロモーター上にc-Myb応答配列が存在することがわかったため、c-Mybが転写活性化の可能性を考えた。そこでPromoter assayの系で検討した結果、c-MybはCXCL13転写の活性化能を持つ事がわかった。さらにc-MybはFbw7の別の分解標的であるGATA3と相乗的に、CXCL13の転写活性能を増強した。c-MybとGATA3の転写活性化における相乗作用はIL-13発現に対しても認められることが過去に報告されており、IL-13の発現調節にもFbw7が二種類の転写因子の量的調節を介して間接的に寄与している可能性がある。

T細胞特異的なFbw7ノックアウトマウスを対象にした検証より、Fbw7の欠損はT細胞の分化増殖阻害を発生させ、その一因としてGATA3の分解阻害による蓄積が考えられることはすでに報告したが、今回得られた知見より、分化後の免疫細胞においても、Fbw7が複数の転写因子の量的調節を介して複数のサイトカインの産生を制御し、組織での炎症に対する適正な生体反応に寄与している可能性が示唆された。

#### II.

詳細なユビキチンアッセイの結果、GATA3に同定されたMAPK-p38によるリン酸化部位は、その修飾状態によってFbw7によるGATA3のユビキチン化に影響を及ぼす知見は得られなかった。しかしながらGATA3は炎症発生時に機能が求められる転写因子としての性質を持つため、急性期の炎症反応の一つとして活性化するMAPK-p38がそのリン酸化を及ぼすことの意義については、今後解明されるべき課題と考える。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Mikamo, M., Kitagawa, K., Sakai, S., Uchida, C., Ohhata, T., Nishimoto, K., Niida, H., Suzuki, S., Nakayama, KI., Inui, N., Suda, T. and Kitagawa, M. (MM and KK are equally contributed): Inhibiting Skp2 E3 Ligase Suppresses Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(2): E474, 2018.

2. Murakami, T., Kikuchi, H., Ishimatsu, H., Iino, I., Hirotsu, A., Matsumoto, T., Ozaki, Y., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Fukushima, M., Baba, S., Kitagawa, K., Kitagawa, M. and Konno H.: Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis. *Br. J. Cancer Res.* **117(9)**: 1360-70, 2017.
3. Harada, M., Sakai, S., Ohhata, T., Kitagawa, K., Mikamo, M., Nishimoto, K., Uchida, C., Niida, H., Kotake, Y., Sugimura, H., Suda, T. and Kitagawa, M.: Homeobox Transcription Factor NKX2-1 Promotes Cyclin D1 Transcription in Lung Adenocarcinomas: *Mol. Cancer Res.* **15(10)**: 1388-97, 2017.
4. Niida, H., Matsunuma, R., Horiguchi, R., Uchida, C., Nakazawa, Y., Motegi, A., Nishimoto, K., Sakai, S., Ohhata, T., Kitagawa, K., Moriwaki, S., Nishitani, H., Ui, A., Ogi, T. and Kitagawa, M.: Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair. *Nat. Commun.* **8**:16102, 2017.
5. Matsumoto, A., Thompson, DC., Chen, Y., Kitagawa, K. and Vasiliou, V.: Roles of defective ALDH2 polymorphism on liver protection and cancer development. *Environ. Health Prev. Med.* **21(6)**: 395-402, 2016.
6. Kotake, Y., Naemura, M., Kitagawa, K., Niida, H., Tsunoda, T., Shirasawa, S. and Kitagawa, M.: Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology* **68(4)**: 1591-1596, 2016.
7. Kotake, Y., Kitagawa, K., Ohhata, T., Sakai, S., Uchida, C., Niida, H., Naemura, M. and Kitagawa, M.: Long non-coding RNA, PANDA, contributes to the stabilization of p53 tumor suppressor protein. *Anticancer Res.* **36(4)**: 1605-11, 2016.
8. Johmura, Y., Sun, J., Kitagawa, K., Nakanishi, K., Kuno, T., Naiki-Ito, A., Sawada, Y., Miyamoto, T., Okabe, A., Aburatani, H., Li, S., Miyoshi, I., Takahashi, S., Kitagawa, M. and Nakanishi, M.: SCF<sup>Fbxo22</sup>-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence. *Nat. Commun.* **7**: 10574, 2016.
9. Kitagawa, K. and Kitagawa, M.: The SCF-type E3 ubiquitin ligases as cancer targets. *Curr. Cancer Drug Targets.* **16(2)**: 119-29, 2016.
10. Matsunuma, R., Niida, H., Ohhata, T., Kitagawa, K., Sakai, S., Uchida, C., Shiotani, B., Matsumoto, M., Nakayama, KI., Ogura, H., Shiiya, N. and Kitagawa, M.: UV damage-induced phosphorylation of HBO1 triggers CRL4<sup>DDB2</sup>-mediated degradation to regulate cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **36(3)**: 394-406, 2015.
11. Ohhata, T., Matsumoto, M., Leeb, M., Shibata, S., Sakai, S., Kitagawa, K., Niida, H., Kitagawa M. and Wutz, A.: Histone H3 lysine 36 tri-methylation is established over the Xist promoter by antisense Tsix transcription and contributes to repressing Xist expression. *Mol. Cell. Biol.* **35(22)**: 2909-20, 2015.
12. Nakajima, T., Kitagawa, K., Ohhata, T., Sakai, S., Uchida, C., Shibata, K., Minegishi, N., Yumimoto, K., Nakayama, KI., Matsumoto, K., Katou, F., Niida, H. and Kitagawa M. (NT and KK are equally contributed): Regulation of GATA-binding Protein 2 Levels via Ubiquitin-dependent Degradation by Fbw7: involvement of cyclin b-cyclin-dependent kinase I-mediated phosphorylation of Thr176 in GATA-binding protein 2. *J. Biol. Chem.* **290(16)**: 10368-81, 2015.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 北川恭子 美甘真史 北川雅敏「ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスにおいてユビキチン E3 リガーゼ Skp2 の阻害は症状を軽減する」第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
2. Hosoi, T., Kohei Mori, Kyoko Kitagawa, Koichiro Ozawa : Behavioral analysis of ALDH2 deficient mice. **the 18<sup>th</sup> International Symposium of Society for Aldh2 Knockout Mouse Research** (Kitakyushu) 2016 Nov.
3. Kyoko Kitagawa, Masatoshi Kitagawa: SCF-type E3 ligase Fbw7 plays pivotal roles in the maintenance of the development and commitment in hematopoietic cells. **The 5<sup>th</sup> JCA-AACR Special Joint Conference** (2016) Urayasu, Japan.
4. 北川恭子 中嶋友美 北川雅敏 「 CDK1 によるリン酸化に依存した GATA2 の Fbw7 による分解」第 38 回日本分子生物学会年会 (2015)
5. 北川恭子 中嶋友美 北川雅敏「Fbw7 による GATA2 のユビキチン化分解機構」第 74 回日本癌学会学術総会 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/mol-biol/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)連携研究者

研究協力者氏名：北川雅敏

ローマ字氏名： Kitagawa Masatoshi