

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790091

研究課題名(和文)新規慢性炎症制御因子CYLD機能低下の肺線維化における意味論の展開

研究課題名(英文)Novel roles of chronic inflammatory factor CYLD in lung fibrosis

研究代表者

城野 博史 (Jono, Hirofumi)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40515483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肺の線維化は、肺組織が不可逆的に変化した慢性疾患の終末像であり、様々な肺疾患の病態に深く関与している。本研究では、慢性炎症の新たな制御因子として注目されている Cylindromatosis (CYLD) 遺伝子に着目した病態解析を行い、1. CYLDの発現低下が、肺線維化遺伝子の過剰な発現を惹起し肺の線維化を促進していること、2. CYLDの発現低下は、TGFシグナルのシグナル伝達分子(Smad3)の分解を抑制し肺線維化遺伝子の過剰な発現を誘発していること、を明らかにし、CYLDが肺線維化遺伝子の発現を制御し肺線維症の分子病態メカニズムにおいて重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Lung Fibrosis, a fatal progressive pathological condition caused by chronic inflammation, is deeply-involved in the pathogenesis of various kinds of pulmonary diseases. In this study, we focused on CYLD, a novel chronic inflammatory factor, and elucidated the molecular pathogenesis of lung fibrosis. We revealed that, 1. Loss of CYLD promoted lung fibrosis via overproduction of fibrotic response gene, 2. Loss of CYLD caused overproduction of fibrotic response gene via increasing Smad3 protein expression by suppressing Smad3 degradation. Those results suggest that CYLD regulates the fibrotic response gene expression and plays important roles in the molecular pathogenesis of lung fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：肺線維症 CYLD 慢性炎症 TGF 腫瘍抑制遺伝子 脱ユビキチン化酵素

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は、肺組織が不可逆的に変化した慢性疾患の終末像であり、様々な肺疾患の病態に深く関与している。肺の線維化は、肺胞上皮や気管支の損傷・脱落とそれに続く線維芽細胞の増殖を伴う傷害治癒過程、すなわち組織修復モデリングの結果起こると考えられ、本過程には、環境因子や複数の原因遺伝子群の影響による慢性炎症の病態が関与している可能性が考えられているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。

Cylindromatosis (CYLD) 遺伝子は、家族性円柱腫の原因遺伝子として同定された腫瘍抑制遺伝子であり、その遺伝子変異は腫瘍形成に重要な役割を果たす。その後の研究から、CYLD タンパク質は、脱コピキチン化酵素としての機能を有し、Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) シグナルの活性化を抑制するフィードバック機構の担い手として腫瘍抑制作用を示していることが明らかとなった。CYLD が制御する NF- κ B は特に炎症反応において中心的な役割を果たす転写因子であり、申請者はこれまでに、慢性炎症性疾患における CYLD の新規機能解明を目的とした研究を展開し、慢性炎症の新たな制御因子として CYLD 遺伝子の重要性を示してきた。

今回、申請者らは、慢性炎症の制御因子として注目されている CYLD 遺伝子に着目し、肺線維症の臨床検体を用いた検討から、重篤な線維化を起こしている肺間質組織において CYLD の発現が著明に減少していることを見出した。さらに、CYLD 欠損マウスに感染症を誘発すると、野生型と比較して肺間質組織に重篤な線維化が起こることも明らかにした。これらの研究成果は、CYLD の機能低下が肺の線維化反応を左右する重要な因子である可能性を示しているが、その詳細な病態発現メカニズムは未だ多くの謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究では、肺の線維化が病態発現に深く関与している「肺線維症」、「肺癌」に焦点を当て、CYLD に着目した病態解析を行い、

1. CYLD は肺の線維化過程においてどのような役割を果たしているのか？
2. 肺線維症患者の組織において何故 CYLD の発現が著明に低下しているのか？
3. CYLD の発現低下はどのようにして肺を線維化へと導くのか？

上記の3点について解明を試み、CYLD が制御する肺線維化メカニズムを解明することを目的とする。

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) 肺線維化における CYLD の役割の解明

肺線維症の臨床検体を用いた CYLD 発現解析と肺線維化レベルを解析し、その相関を検討した。また、申請者が CYLD 欠損マウスを用いて独自に開発した肺線維症モデルの肺組織を採取し、病理的变化をきたした組織を対象に網羅的な遺伝子発現解析を行い、CYLD が制御する遺伝子の同定を行った。さらに、肺由来の培養細胞株に対し、siRNA を用いた CYLD の遺伝子発現抑制を行い、細胞増殖、候補遺伝子の発現量変化などを評価し、細胞レベルで線維化過程における CYLD の役割を明らかにした。

(2) CYLD 発現低下メカニズムの解明

線維化肺組織や肺癌組織の臨床検体や培養細胞を用いて mRNA およびタンパク質レベルでの CYLD 発現解析を行い、病的ストレス環境下での CYLD 発現抑制がどのレベルで起きているか検証し、その要因の解明を行った。

(3) CYLD の肺線維化誘導メカニズムの解明

CYLD の機能喪失が肺の線維化病態ならびに癌化にどのように影響するか、肺線維芽細胞およびヒト II 型肺胞上皮細胞 A549 などを対象に、siRNA を用いた CYLD の遺伝子発現抑制、コピキチン化活性をもたない変異 CYLD (CYLD-C/S, CYLD-H/N) の導入を実施し、細胞の線維化、増殖、浸潤、遊走、アポトーシスなどの評価を行い、肺線維化過程で CYLD が標的とする新たな細胞シグナルの同定を行った。

4. 研究成果

(1) 肺線維化における CYLD の役割の解明

肺線維症の臨床検体を用いた CYLD 発現解析および肺線維化レベルの定量化を行い、マッソン・トリクローム染色により重篤な線維化が確認された肺間質組織において CYLD の発現が著明に減少していることが明らかとなり、CYLD 発現低下と肺線維症の進行が相関している事実を見出した。また、CYLD 欠損マウスに肺炎球菌感染症を起こすことにより誘発される肺線維化組織において、野生型マウスと比較して、肺線維症関連遺伝子 (COL1A2, COL3A1, CTGF, PAI-1 など) 発現の著明な上昇が認められた。上記の現象を細胞培養系にて確認するため、siRNA を用いた CYLD の遺伝子発現を抑制したところ、上記の肺線維症関連遺伝子 (COL1A2, COL3A1, CTGF, PAI-1 など) が著明に上昇していた。

以上の結果から、CYLD は、肺の線維化に密接に関与しており、通常状態では肺線維症関連遺伝子を制御（抑制）しているが、何らかの病的刺激により肺組織においてその発現が低下し機能不全になると、肺線維症関連遺伝子の過剰な発現が誘発され、結果として肺の線維化を加速する可能性が示された。

(2) CYLD 発現低下メカニズムの解明

肺線維症の臨床検体を用いた検討から、CYLD の発現がタンパク質レベルで著明に低下していることが明らかとなった。次に、肺由来の細胞株を用い、肺線維化過程における CYLD 発現抑制の要因・メカニズムの解明を行ったところ、IL-6 などの一部の炎症性サイトカイン処理または低酸素状態により CYLD の発現が、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで著しく低下することが明らかとなった。

前述のように、肺の線維化は、肺胞上皮や気管支の損傷・脱落とそれに続く線維芽細胞の増殖を伴う傷害治癒過程、すなわち組織修復モデリングの結果起こると考えられ、本過程には、環境因子や複数の原因遺伝子群の影響による慢性炎症の病態に関与している可能性が考えられている。上記の結果から、IL-6 をはじめとした炎症に関与する遺伝子群や、肺の組織損傷に伴う環境因子の変化が起こり、これらの病的ストレスにより CYLD の mRNA レベルの発現が抑制され、結果的に肺組織における CYLD のタンパク質発現の低下が誘発されている可能性が示された。

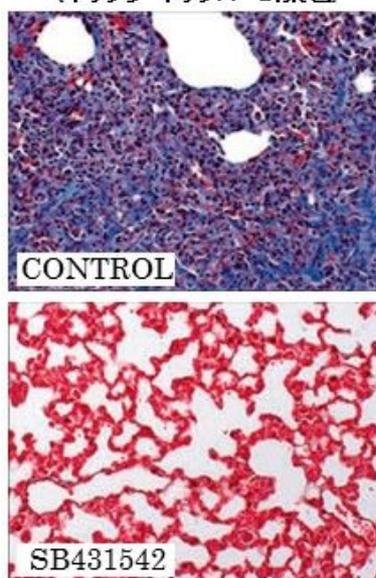
(3) CYLD の肺線維化誘導メカニズムの解明

肺由来の培養細胞株を対象に、siRNA を用いた CYLD の遺伝子発現抑制を行い、細胞内シグナリングの変動、候補遺伝子の発現量変化などを評価した結果、これまで知られていた NF- κ B シグナル伝達経路の過剰な活性化に加え、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナル、c-Jun N-terminal kinase (JNK)シグナル、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) シグナルなどの過剰な活性化が確認された。中でも、線維化との密接な関与が知られている TGF- β シグナルの CYLD の欠損による過剰な活性化は、上述の肺線維症関連遺伝子 (COL1A2, COL3A1, CTGF, PAI-1 など) の著明な発現上昇に寄与していることが示され、以後、TGF- β シグナルに着目した検討を継続して行った。

CYLD が TGF- β シグナルを制御するメカニズムを解明することを目的に、TGF- β シグナルに関与するシグナル伝達分子に対する CYLD の影響を確認したところ、siRNA を用いた CYLD の遺伝子発現抑制により、細胞質内で TGF- β シグナルを核内に伝達する Smad3 タンパク質の著明な上昇が確認され

た。更なる検討の結果、この Smad3 タンパク質の上昇は、CYLD の脱ユビキチン化活性の欠如による Akt 分子の過剰活性化とそれに伴う Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) の抑制により、Smad3 タンパク質の分解が著しく抑制された結果誘発されていたことが明らかとなった。したがって、CYLD の発現低下は、TGF- β シグナルで重要な役割を果たすシグナル伝達分子 (Smad3) を上昇させることで、肺線維症関連遺伝子の過剰な発現を惹起していることが明らかとなった。さらに、本仮説を実証するために、CYLD 欠損マウスを用いた肺線維化モデルに対して、TGF- β シグナルの阻害剤 (SB431542: TGF β RI 阻害剤) を処理すると、肺の線維化が著しく抑制された (下図)。

CYLD 欠損マウス (マッソン・トリクローム染色)



以上 (1)~(3)の結果より、肺の線維化過程における CYLD の発現低下とそれに伴う機能不全により誘発される肺線維症の分子病態メカニズムの一端が明らかとなった。CYLD の発現低下は、TGF- β シグナルにおいて重要な役割を果たすシグナル伝達分子 (Smad3) を上昇させることで、肺線維症関連遺伝子の過剰な発現を惹起し、結果として肺の線維化に大きく寄与している可能性が示された。

今後は、病的ストレス下での詳細な CYLD 発現制御メカニズムの解明、CYLD と TGF- β シグナルを標的とした治療の有用性の評価、他臓器 (肝臓、腎臓など) の線維化における CYLD の役割の解明、などを継続して行い、肺線維症および肺癌をはじめとした様々な線維化関連疾患 (肝硬変、腎線維症、強皮症など) の分子病態を解明し、これらの疾患の新たな治療法を開発するうえで重要な知見を積み重ねていく予定である。

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 12 件)

Hayashi M, Jono H, Shinriki S, Nakamura T, Guo J, Sueta A, Tomiguchi M, Fujiwara S, Yamamoto-Ibusuki M, Murakami K, Yamashita S, Yamamoto Y, Li J-D, Iwase H, Ando Y. Clinical Significance of CYLD Downregulation in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 査読有, 2014, in press.

Shinriki S, Jono H, Ueda M, Obayashi K, Nakamura T, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Guo J, Hayashi M, Hiraki A, Nakayama H, Yamashita S, Shinohara M, Ando Y. Stromal Expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Correlates with Poor Differentiation and Adverse Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Histopathology*, 査読有, 2014, 64: 356-64

Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Yokoyama N, Ishiko T, Shinriki S, Jono H, Ando Y, Baba H. CYLD down-regulation is correlated with tumor development in patients with hepatocellular carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology*, 査読有, 2013, 309-314

Komatsu K, Lee J, Miyata M, Lim JH, Jono H, Koga T, Xu H, Yan C, Kai H, Li JD. Suppression of inflammation via PDE4B-JNK2-dependent upregulation of deubiquitinase CYLD. *Nature Commun.*, 査読有, 2013, 4: 1684

Lee J, Komatsu K, Lee BC, Lim JH, Jono H, Xu H, Kai H, Zhang ZJ, Yan C, Li JD. PDE4B mediates ERK dependent up-regulation of mucin MUC5AC by *S. pneumoniae* by inhibiting cAMP-PKA dependent MKP-1 pathway. *J Biol Chem*, 査読有, 2012, 287: 22799-811,

Lim JH, Jono H*, Komatsu K, Dr. Woo CH, Lee J, Miyata M, Matsuno T, Xu X, Huang Y, Zhang W, Park SH, Kim YI, Choi YD, Shen H, Heo KS, Xu H, Bourne P, Koga T, Xu H, Yan C, Wang B, Chen LF, Feng XH, Li JD. CYLD Negatively Regulates Transforming Growth Factor-B Signaling via Deubiquitinating Akt. *Nature Commun.*, 査読有, 2012, 3: 771 (*貢献同等)

Okabe H, Beppu T, Ueda M, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Horlad H, Mima K, Miyake K, Iwatsuki M, Baba Y, Takamori H, Jono H, Shinriki S, Ando Y, Baba H. Identification of CXCL5/ENA-78 as a factor involved in the interaction

between cholangiocarcinoma cells and cancer-associated fibroblasts. *Int J Cancer*, 査読有, 2012, 131: 2234-41

Ota T, Jono H, Ota K, Shinriki S, Ueda M, Sueyoshi T, Nakatani K, Fujita S, Obayashi K, Shinohara M, Ando Y. Downregulation of midkine induces cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 査読有, 2012, 27: 1674-80

Jono H, Lim JH, Xu H, Li JD. PKC synergizes with TLR-dependent TRAF6 signaling pathway to upregulate MUC5AC mucin via CARMA1. *PLoS ONE*, 査読有, 2012, 7: e31049

Sueyoshi T, Jono H, Shinriki S, Ota K, Ota T, Tasaki M, Atsuyama E, Yakushiji T, Ueda M, Obayashi K, Mizuta H, Ando Y. Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma. *Cancer Lett*, 査読有, 2012, 316: 23-30

Otsu K, Ishinaga H, Suzuki S, Sugawara A, Sunazuka T, Omura S, Jono H, Takeuchi K. Effects of a Novel Nonantibiotic Macrolide, EM900, on Cytokine and Mucin Gene Expression in a Human Airway Epithelial Cell Line. *Pharmacology*, 査読有, 2011, 88: 327-332

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, 2011, 18: 1175-1184

[学会発表](計 10 件)

Jono H: Signal transduction mechanisms and their tight regulation in nontypeable *Haemophilus influenzae* infection 2013 International Meeting of the Microbiological Society of Korea, 2013.5.1、Jeonju city, Korea

Jono H: Uncovering host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens World-Class University & 5th microbial pathogenesis & immunity symposium, 2013.4.30、Su-Won, Korea

Shinriki S, Jono H, Li J-D, Nakamura T, Hayashi M, Guo J, Shinohara M, Ando Y: Loss of CYLD promotes cell migration through stabilized ALK5 in human oral squamous cell carcinoma AACR Annual meeting, 2013.4.6, Washington, USA

城野博史、末吉貴直、神力悟、厚山恵里、柳澤哲大、薬師寺俊剛、田崎雅義、大林光念、水田博志、安東由喜雄：骨肉腫におけ

るがん抑制遺伝子 CYLD の生物学的活性の解明 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜、横浜
城野博史、神力悟、大林光念、安東由喜雄：
Loss of tumor suppressor CYLD triggers cell invasion of human oral squamous cell carcinoma cells 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日、福岡国際会議場、福岡
城野博史、神力悟、大林光念、田崎雅義、安東由喜雄：頭頸部扁平上皮癌におけるがん抑制遺伝子 CYLD 発現低下の臨床的意義の解 第 65 回日本薬理学会西南部会、熊本大学薬学部 2012 年 11 月 23 日、熊本
城野博史、末吉貴直、神力悟、厚山恵里、柳澤哲大、薬師寺俊剛、田崎雅義、大林光念、水田博志、安東由喜雄：骨肉腫進展における CYLD の関与と生物学的意義の解明 第 52 回臨床化学学会年会、2012 年 9 月 6 日、いわて県民情報交流センター アイーナ、盛岡
郭建エイ、神力悟、城野博史、厚山恵理、太田和俊、太田智子、中村拓哉、大林光念、安東由喜雄：低酸素環境における腫瘍抑制遺伝子 cylincromatosis (CYLD) の発現異常 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場、愛知
津田幸元、神力悟、村上慶高、城野博史、安東由喜雄：低酸素環境における腫瘍抑制遺伝子 cylincromatosis (CYLD) の発現異常 第 51 回臨床化学学会年会、2011 年 8 月 28 日、札幌医科大学、札幌
村上慶高、神力悟、津田幸元、城野博史、安東由喜雄：Cylincromatosis (CYLD) 発現低下は口腔扁平上皮癌の血管新生を誘導する 第 51 回臨床化学学会年会、2011 年 8 月 28 日、札幌医科大学、札幌

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/pharmacy/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城野 博史 (JONO hirofumi)
熊本大学医学部附属病院・薬剤部
・准教授
研究者番号：40515483