

上皮での炎症性サイトカイン産生を担う新規分子群の役割とそれを制御する化合物の探索

熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座

押海 裕之

RIG-I-like receptors (RLRs) recognize viral RNAs as well as endogenous retroelement RNA, leading to the expression of pro-inflammatory cytokines. Since abnormal regulation of RLRs causes auto-immune-like disorders, their activation should be strictly regulated. We investigated the proteins and small chemicals that affect this regulation and found that the Riplet ubiquitin ligase fine-tunes RLRs-mediated pro-inflammatory cytokines via K63-linked polyubiquitination of the LGP2 protein. Moreover, we conducted a chemical screening and identified several chemicals that augment RLR-mediated pro-inflammatory cytokine expression. Interestingly, the identified molecules target a metabolite that attenuates inflammatory responses. We found that the addition of the metabolite reduces pro-inflammatory cytokine expression in epithelial cells. These findings are expected to be utilized to develop a new method and chemicals to attenuate inflammatory reactions in the skin.

1. 緒言

皮膚での炎症は腫れや赤みや痛みなどの原因となり、化粧品においても接触性皮膚炎や、いわゆる化粧品かぶれなどが問題となっている。本研究では、上皮における炎症を制御する分子メカニズムを解明すること、さらに、炎症を抑制する化合物を新たに同定することを目的とする。これらの目的を達成することで、化粧品によるかぶれや皮膚炎の問題を解決する基礎基盤を作ることが可能になると期待される。

我々はこれまで炎症について、上皮細胞での炎症性サイトカイン産生を誘導する Riplet E3 ユビキチンリガーゼを同定しその機能を解明したほか、上皮成長因子である EGF が細胞内のヘリケース分子を介して炎症を抑制するメカニズム、さらに、ZNF598 分子による炎症性サイトカインを抑制するメカニズムなどを解明した¹⁾。本研究では我々のこれまでの研究をさらに発展させ、炎症を誘導する Riplet E3 ユビキチンリガーゼの活性を抑制する新たな化合物をケミカルスクリーニングによって単離し、さらに、ZNF598 分子や Riplet 分子依存的な炎症のメカニズムを解明する。これらにより、化粧品かぶれのメカニズムを解明するとともに、かぶれを抑える新たな成分を同定できると期待される。

2. 方法

2.1. LGP2 のユビキチン化を介した炎症性サイトカイン産生の制御

Riplet 分子依存的な炎症性サイトカイン産生の新たな制御機構を解明するために、HeLa 細胞や HEK293 細胞、A549 細胞などの細胞を用い解析を行った。解析では、それぞれの分子を発現するベクターや、それぞれの分子に対する siRNA を用いることで、個々の分子が炎症性サイトカインの産生にどのような役割を果たすのかを調べた。遺伝子発現の網羅的な解析としてマイクロアレイ解析は東レの 3D-Gene を用いた。

ユビキチン化において、HA や Myc などのタグ付きのユビキチン発現ベクターを用いるとともに、ユビキチンに対する抗体などによりタンパク質のユビキチン修飾を調べた。また、LGP2 タンパク質のユビキチン修飾については、質量分析として LC-MS/MS を用いた解析を実施した。

2.2. 炎症を制御する新たな化合物の探索

ケミカルスクリーニングでは大阪大学のオリジナル化合物ライブラリーおよび東京大学創薬機構の既存薬ライブラリーから分与をえて使用した。ケミカルスクリーニングの実験系においては、Riplet 依存的なシグナルを検出するためにサイトカイン遺伝子のプロモーターの下流に mCherry 遺伝子を繋いだレポータープラスミドと同時に、恒常的に発現する遺伝子のプロモーターに GFP 遺伝子を繋いだレポータープラスミドを細胞に導入し、mCherry による赤色の蛍光と、内在性コントロールとなる GFP の緑色の蛍光のバランスが大きく変化する化合物を選択した。ケミカルスクリーニングでは合計でおよそ 3200 化合物についてスクリーニングを実施した。



Role of new molecules and chemicals regulating inflammatory responses in the skin

Hiroyuki Oshiumi

Department of Immunology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

3. 結果

3.1. 炎症性サイトカイン産生を制御する新たな分子メカニズムの解明

Ripletは炎症性サイトカインの産生を誘導するRIG-Iを活性化する分子である。RipletはRIG-Iをユビキチン化することで、RIG-I依存性の炎症性サイトカインの産生を誘導する²⁾。炎症性サイトカインは外来の微生物に対する免疫応答に重要である反面、その過剰な産生は自己炎症性疾患や自己免疫疾患、アレルギーなどの原因ともなることから、その抑制機構が重要である。我々は、RipletによるRIG-I依存性の炎症性サイトカイン産生を抑制するメカニズムとして、RIG-Iファミリー分子であるLGP2タンパク質に着目し研究を進めた。

まず、LGP2遺伝子をCRISPR-Cas9のシステムを用いてノックアウト (KO) した細胞を用い、Riplet経路を刺激するpoly I:Cで刺激後の炎症性サイトカインを野生型細胞と比較したところ、IFN- β 、IL-6、IP-10などの炎症性サイトカインのmRNAの発現がLGP2 KOにより亢進することが定量PCR法により示された。Ripletはユビキチンリガーゼ活性を有するため、LGP2のユビキチン化を調べるために、LGP2とRiplet分子をそれぞれ細胞に発現させると、Ripletを共発現した際にLGP2のポリユビキチン化が顕著に増加することがウェスタンブロット法により示された。このLGP2のポリユビキチン化を定量的に測定するために蛍光色素を用いた顕微鏡観察を実施したところ、予想通り、Ripletを共発現させることで、LGP2のユビキチン化を示すシグナルが統計的に有意に増加することが示された。さらに、RipletとLGP2分子が結合するかどうかを調べるために免疫沈降法により調べたところ、これらの二つの分子が結合することが示された。

RipletによるLGP2のユビキチン化が63番目のリジン

を介しているかを調べるため、63番目以外のリジンを全てアルギニンに置換した組換えユビキチン (K63 only Ub) を発現させ調べたところ、この組換えユビキチンがRipletの発現により効率的にLGP2分子に取り込まれることが明らかとなった。また、この組換えユビキチンのLGP2分子への結合はRiplet KO細胞では大きく減少することも示された。また逆にRipletをKOした細胞ではLGP2のユビキチン化を示すシグナルが大きく減弱した。これらのデータからRipletがLGP2をリジン63鎖を介したポリユビキチン修飾することが示唆された。

実際に、LGP2分子がポリユビキチン修飾を受ける残基を決定するために、質量分析を行ったところ、39番目、532番目、599番目、629番目のリジン残基がユビキチン化を受けることが示された。これらの4つのリジン残基のポリユビキチン修飾は、Ripletを共発現することで増加することが、LFQ法による解析により示唆された。これらのリジン残基のユビキチン化がLGP2分子の機能に関与するかどうかを調べるために、これらの4つのリジン残基をアルギニンに置換したLGP2分子として、LGP2-4KR分子を作成し細胞へ発現させると、Riplet依存性の炎症性サイトカインの産生や、IP10やCcl5などの炎症に関与するケモカインの発現が上昇することが示された (図1)。

これらの結果は、Ripletは、LGP2が存在すると、逆に、炎症性サイトカインの産生を抑制することを示唆する³⁾。

3.2. 炎症を抑制する新たな化合物の探索 (ケミカルスクリーニング)

Riplet分子はI型インターフェロンの他にIL-6などの炎症性サイトカイン産生の誘導で非常に重要な働きをする分子である。我々はRipletの活性化を評価する実験系を作製したことから、この実験系を用いてRipletの活性を制御する化合物についてケミカルスクリーニングを実施した。お

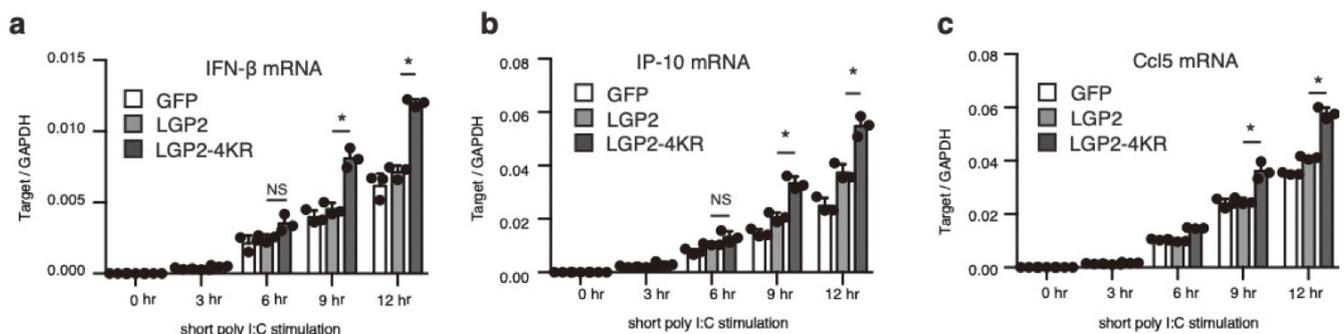


図1 LGP2のユビキチン修飾と炎症性サイトカイン

ユビキチン化を受けるリジンをアミノ酸置換し、ユビキチン化されないLGP2分子を発現させ、炎症に関与するサイトカインとしてIFN- β 、IP-10、Ccl5のmRNAの発現を調べたところ、ユビキチン化されない変異型LGP2タンパク質(LGP2-4KR)を発現する細胞では、それらのサイトカインの産生が亢進していた。これらの結果は、ユビキチン化されることで炎症性サイトカインの産生を抑制することを示唆する。

よそ 3200 個の化合物についてケミカルスクリーニングを実施したところ、興味深いことに複数の化合物を同定することができた。

これらの薬剤（化合物 X）を、HeLa 細胞などの、ヒト上皮細胞の培養上清に加え、細胞を刺激後に炎症性サイトカインの産生を調べたところ、この化合物 X が IFN- β や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を非常に強く増強することを発見した。

化合物 X が標的とする分子 Z に対する siRNA を用いたノックダウン実験を実施すると、化合物 X の添加と同様に上皮細胞から産生される炎症性サイトカインの産生が亢進した。さらに、化合物 X が代謝産物 Y の合成を阻害することから、逆に、この代謝産物 Y を培養上清に加えて細胞を刺激したところ、炎症性サイトカインの産生を有意に抑制することを発見した（図 2）。これらの結果は、細胞中の代謝物 Y の量が、細胞が産生する炎症性サイトカイン量と逆相関することを示唆する。

そのメカニズムについて調べたところ、この代謝産物を合成する合成酵素の転写を制御する転写因子が、実は炎症性サイトカインの産生誘導に関与する分子の発現も制御することを明らかとした。これらの結果は、化合物 X が標的とする代謝産物 Y が、炎症を抑制する働きを示唆する。

次に、マウス個体実験を実施するため、化合物 X をマウスへ投与し、Riplet 経路を刺激する薬剤を投与後の炎症性サイトカインの産生を調べたところ、化合物 X の投与によりマウス組織での炎症性サイトカインの産生量が増加する結果を得た。逆に、代謝物 Y の量が増えるマウス動物モデルを用いると炎症性サイトカイン量が低下することが示された。これらのことから、代謝物 Y は炎症を抑制する効果を持つことが示された。

4. 考 察

Riplet はユビキチンリガーゼ活性を有し、RIG-I 分子依存的な炎症性サイトカインの産生を亢進する働きを持つ。一方で、今回の研究から、LGP2 依存的な炎症性サイトカインの抑制にも関与することが示された。この一見相反する Riplet の作用は、Riplet が、RIG-I と LGP2 のタンパク質のバランスによって、その役割を変えることを示唆する。つまり、炎症性サイトカインの産生量は、ユビキチン化された RIG-I と、ユビキチン化された LGP2 分子のバランスによって制御されていることを示唆している。

RIG-I や LGP2 はウイルス感染時に主に機能すると考えられているが、ウイルス非存在下においても炎症性サイトカインの産生に関与することが明らかとなっている。特に、RIG-I 遺伝子の変異により自己炎症性疾患を誘導することが明らかとなっており、細胞内に元々存在するレトロトラ

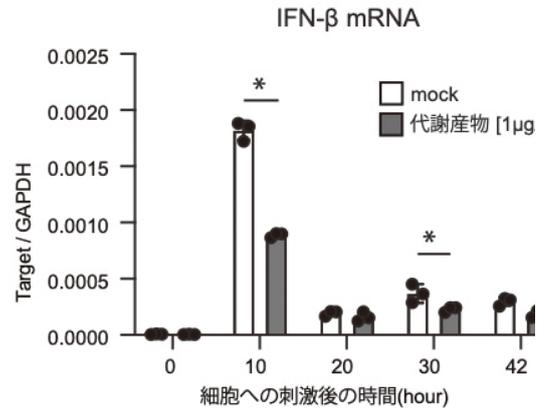


図 2 代謝産物による炎症性サイトカインの抑制
培養細胞を刺激し炎症性サイトカイン産生を誘導する実験において、培養液にあらかじめ代謝産物を添加することで、炎症性サイトカインの産生が有意に低下した。

ンスポゾンなどにより、内因性に炎症を誘導すると考えられる。このようなウイルス非存在下で RIG-I や LGP2 が関与する炎症性サイトカインの産生の誘導や抑制が、化粧品によるかぶれなどにどのように関与するのかはまだ明らかとなっていないが、紫外線などの照射により活性化した内在性のレトロ因子が RIG-I による炎症を誘導することが報告されており、本研究で明らかとした Riplet の新たな役割が、紫外線などによる炎症にどのように関与するのかは、今後のさらなる研究により解明されると期待される。

ケミカルスクリーニングにより同定された化合物 X と代謝物 Y について、これらが炎症性サイトカインの産生を制御することを示唆する結果は他のグループからも報告があるが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究で、代謝物 Y が炎症性サイトカインの産生を抑制する詳細なメカニズムを解明したことで、代謝物 Y の抗炎症作用を用いた化粧品の開発などにつながると期待される。

5. 総 括

本研究の結果、炎症の制御に関与する新たなメカニズムとして、Riplet 分子による LGP2 分子のポリユビキチン修飾と、代謝産物 Y による炎症抑制効果を新たに明らかとした。炎症性サイトカインは血管内皮細胞に作用し血管透過性を亢進することなどにより、局所での腫脹、発赤、疼痛の原因となる。一方で炎症反応の誘導としては、自然免疫応答と獲得免疫応答の二つの経路が存在する。獲得免疫においては抗原が炎症反応を誘導するが、自己免疫疾患以外では外来微生物やアレルゲンの存在により炎症が誘導される。一方で、自然免疫はパターン認識受容体のリガンドとなるものが炎症を誘導する。Riplet 分子は、ウイルス感染時の炎症性サイトカイン産生に必要な分子として同定され

たが、最近の研究から、このRipletが関与する経路が内在性のレトロ因子により誘導される炎症にも関与することが示唆されており、アレルゲンや抗原に非依存的な炎症誘導に関与すると考えられる。特に、内在性レトロ因子は紫外線などの刺激により活性化することが報告されていることから⁴⁾、本研究で明らかとなった炎症の制御機構は、紫外線などによる抗原非依存的な炎症を抑制する新たな方法の開発などにつながると期待される。特に、本研究で同定した代謝産物Yは従来の化粧品にも配合されることがあるため、今後、この代謝産物Yの割合を高めることで炎症を抑える機能的な化粧品として利用できると期待される(図3)。

(引用文献)

- 1) Wang G, Kouwaki T, Okamoto M, Oshiumi H. Attenuation of the innate immune response against viral infection due to ZNF598-promoted binding of FAT10 to RIG-I. *Cell Reports* 28: 1961-1970 (2019)
- 2) Naesens L, Haerynck F, Gack MU. The RNA polymerase III-RIG-I axis in antiviral innate immunity and inflammation *Trends Immunol.* 44: 435-449 (2023)
- 3) Kouwaki T, Nishimura T, Wang G, Nakagawa R, Oshiumi H. K63-linked polyubiquitination of LGP2 by Riplet regulates RIG-I-dependent innate immune

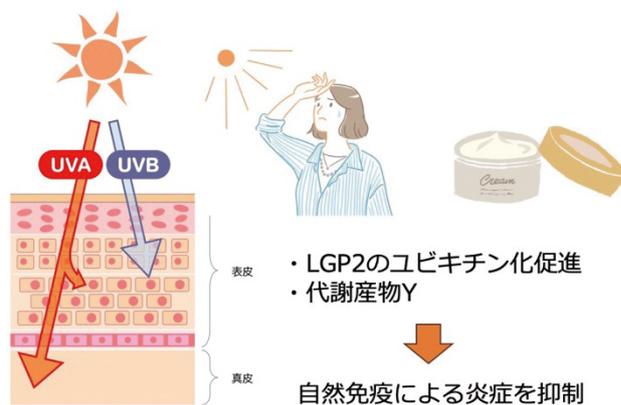


図3 炎症を制御する新たな成分
 本研究で解明した新たな分子メカニズムを標的とした物質(成分)を用いることで、今後、抗炎症性作用を示す化粧品などの開発につながると期待される。

response. *EMBO Reports* 24: e54844 (2022)

- 4) Mix X, Zheng M, Yu Y, Wu J, Kuang Q, Hu Z, Ouyang L, Lu S, Zhao M. Ultraviolet light induces HERV expression to activate RIG-I signaling pathway in keratinocytes. *Exp Dermatol* 31: 1165-1176 (2022)