

課題番号 : 29指1013  
研究課題名 : 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  
主任研究者名 : 木村彰宏  
分担研究者名 : 河村由紀

キーワード : NQO1, 多発性硬化症, Th17 細胞, 活性酸素, 酸化ストレス  
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。

一方でわれわれはマクロファージにおけるNQO1の作用機序に関しても解析を進めた。NQO1欠損マクロファージではLPS誘導性IL-6産生がコントロール細胞に比べ著しく高くなることが判明していたが、今回そのメカニズムの詳細を明らかにした。LPS刺激により誘導されるTNF-aやIL-1産生はLPSシグナル下流ではたらくNF- $\kappa$ Bにより直接的に誘導される。一方で、IL-6やIL-12産生はNF- $\kappa$ Bにより誘導される核内転写因子I $\kappa$ B $\zeta$ を介して誘導されることが報告されており、LPS誘導性IL-6産生は2段階制御を受けている。今回われわれはNQO1がLPSにより誘導されるI $\kappa$ B $\zeta$ のユビキチン化を促進していることを発見した。NQO1自身はユビキチンリガーゼではないことから、I $\kappa$ B $\zeta$ のユビキチン化を誘導するユビキチンリガーゼを探索したところ、核内ユビキチンリガーゼであるPDLIM2が同定された。NQO1欠損マクロファージと同様に、PDLIM2欠損マクロファージにおいてもLPS誘導性IL-6産生が特異的に上昇していた。われわれはPDLIM2がI $\kappa$ B $\zeta$ と結合しユビキチン化を誘導する際に、NQO1が両者の結合の橋渡しとしての役割を担っていることを明らかにした。さらにPDLIM2がNQO1やI $\kappa$ B $\zeta$ と結合するにはPDLIM2内に存在するLIMドメインを介していることもdeletion mutantを使った実験により明らかにした。またin vivoにおけるLPS投与実験においてもNQO1欠損マウスおよびPDLIM2欠損マウスにおいてコントロールマウスよりもLPS感受性が高くなっており、血中IL-6量も高値を示した。以上の結果から、NQO1はPDLIM2によるI $\kappa$ B $\zeta$ ユビキチン化に必要な橋渡しタンパクとしてはたらくことにより、LPS誘導性IL-6産生を特異的に抑制していることを明らかにした。これらの結果は*J Exp Med* (in press)に発表した。

Subject No. : 29 指 1013

Title : Developing new treatments for multiple sclerosis using NQO1 inhibitor

Researchers : Akihiro Kimura, Yuki Kawamura

Key word : NQO1, multiple sclerosis, Th17, ROS, oxidative stress

Abstract :

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) was originally identified as a flavoenzyme that catalyzes the two-electron reduction of quinones to their hydroquinone forms, protecting cells from oxidative stress, redox cycling, and neoplastic lesions. Recently, we found that NQO1 deficiency decrease IL-17 production and increases IL-10 production in Th17 cells. We generated NQO1/IL-10 double KO mice to investigate whether increased IL-10 production decreases IL-17 production in NQO1-deficient T cells. In this study, we found that NQO1/IL-10 double deficiency canceled the increase of IL-17 in NQO1-deficient T cells. NQO1 deficiency inhibits the symptoms of experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), mouse model of multiple sclerosis. Furthermore, we found that NQO1/IL-10 double deficiency canceled the inhibition of EAE symptoms in NQO1 deficient mice. Since NQO1 protects cells from oxidative stress, we next investigated ROS production between WT and NQO1-deficient Th17 cells. As expected, NQO1 deficiency increased ROS production compared to that in WT cells. In addition, N-Acetyl-l-cysteine (NAC), thiol-containing antioxidant, treatment inhibits increased IL-10 production in NQO1-deficient Th17 cells, reaching levels similar to those in WT Th17 cells. These results indicated that increased IL-10 production in NQO1-deficient Th17 cells is caused by increased ROS production.

Furthermore, we demonstrated the function of NQO1 in macrophages. we found a novel role of NQO1 in suppressing Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses. NQO1-deficient macrophages selectively produced excessive amounts of IL-6, IL-12, and GM-CSF on LPS stimulation, and the deletion of NQO1 in macrophages exacerbated LPS-induced septic shock. NQO1 interacted with the nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ B- $\zeta$ , which is essential for the TLR-mediated induction of a subset of secondary response genes including IL-6, and promoted I $\kappa$ B- $\zeta$  degradation in a ubiquitin-dependent manner. We demonstrated that PDLIM2, known as the ubiquitin E3 ligase, participates in NQO1-dependent I $\kappa$ B- $\zeta$  degradation. NQO1 augmented the association between PDLIM2 and I $\kappa$ B- $\zeta$ , resulting in increased I $\kappa$ B- $\zeta$  degradation. Collectively, this study describes a mechanism of the NQO1–PDLIM2 complex as a novel and important regulator in the innate immune signaling and suggests the therapeutic potential of NQO1 in TLR-mediated inflammation and disorders.

# 多発性硬化症(MS)に対する新規治療薬の開発

抗酸化酵素(Nqo1) 活性酸素を排除することで酸化ストレスから生体を防御している

Nqo1がTh17細胞で高発現

Nqo1欠損Th17細胞  
IL-17産生が抑制  
IL-10産生が促進

Nqo1によるTh17分化制御機構

Nqo1阻害剤のスクリーニング  
Th17細胞のIL-17産生を抑制、  
IL-10産生を促進

Nqo1阻害剤の同定

Nqo1欠損マウスではMSが誘導されない

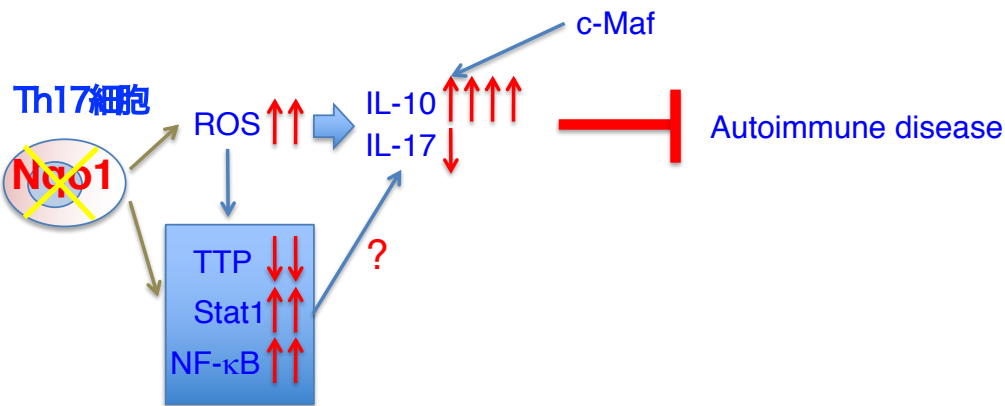
Nqo1阻害剤  
MSに対する治療効果の可能性

Nqo1とMSとの関連性

Nqo1阻害剤を用いたMS治療の開発

- ★ Nqo1を標的としたMSに対する新規治療薬の開発
- ★ Nqo1による酸化ストレス防御とMSとの関係性の解明

## NQO1によるTh17細胞の分化抑制機構の解明



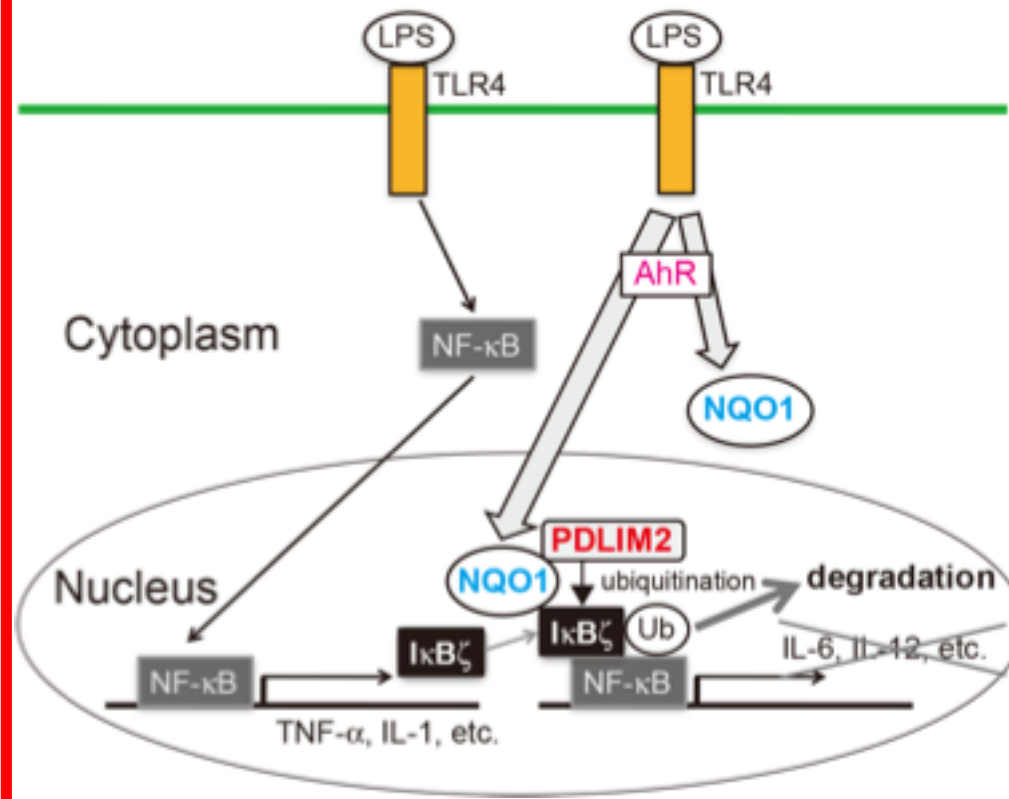
- ★ NQO1欠損T細胞ではROSの産生が高くなる結果、IL-10産生が上昇する一方で、IL-17産生は減少する
- ★ NQO1/IL-10二重欠損T細胞ではIL-17産生が増加する
- ★ NQO1欠損マウスでは自己免疫疾患のEAEが抑制されるが、NQO1/IL-10二重欠損マウスではEAEの症状が悪化する
- ★ 既存のNQO1阻害剤はT細胞によるIL-17産生だけでなく、IL-10産生も抑制した



T細胞においてNQO1が活性化すると抗炎症性サイトカインであるIL-10産生が著しく減少し、結果としてNQO1は炎症を促進させる方向に作用していることが判明した。

NQO1活性の阻害は自己免疫疾患を抑制することから、今後は他のNQO1阻害剤を用いてIL-10産生を促進し、IL-17産生を阻害するような物を探索する

## NQO1によるLPS誘導性IL-6産生の抑制機構の解明



- ★ LPS刺激によりAhR依存的にNQO1発現が誘導される
- ★ NQO1欠損マクロファージではLPS誘導性IL-6産生が特異的に増加する
- ★ NQO1欠損マウスではLPSに対する感受性が高くなる
- ★ NQO1欠損マクロファージではLPS刺激後、LPS誘導性IL-6産生に必要な転写因子IκBζの分解が抑制されずに安定化している
- ★ NQO1は核内ユビキチンリガーゼPDLIM2とIκBζとの結合を橋渡しすることでIκBζの分解を促進する

課題番号 : 29指1013  
研究課題名 : 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  
主任研究者名 : 木村彰宏  
分担研究者名 : 河村由紀

キーワード : NQO1, 多発性硬化症, Th17 細胞, 活性酸素, 酸化ストレス

研究成果 :

分担研究課題である「Th17 細胞を分化抑制する NQO1 阻害剤のスクリーニング」を遂行するために、まず既存の NQO1 活性阻害剤を用いて Th17 細胞の分化に対する影響を調べた。これまでの報告から NQO1 を特異的に阻害する低分子化合物として Dicoumarol や Diminutol などが知られている。ナイーブ T 細胞を単離し、Th17 細胞分化条件下で Dicoumarol あるいは Diminutol を添加し、IL-17 産生を測定した。その結果、Dicoumarol や Diminutol を加えると、IL-17 産生が抑制されていた。

これまでのわれわれの研究成果から、NQO1 欠損 T 細胞では IL-10 産生が増加することにより IL-17 産生が抑制されるということを明らかにしている。従って、Dicoumarol や Diminutol を添加した群でも、NQO1 活性が抑制されることで NQO1 欠損 T 細胞の時と同様に IL-10 産生が促進されることが予想された。そこで次に IL-10 産生を測定したところ、予想に反して Dicoumarol あるいは Diminutol の添加群では IL-10 産生も抑制されていた。これらの結果から、今回使用した NQO1 阻害剤 (Dicoumarol あるいは Diminutol) は IL-17 と IL-10 の両方を抑制しており、これらの結果は NQO1 欠損 T 細胞の結果とは少し乖離がみられる。NQO1 欠損 T 細胞で確認されたように抗炎症性サイトカインである IL-10 産生が促進され、IL-17 産生が抑制されることが自己免疫疾患に対する治療において理想型であることから、今後は他の NQO1 阻害剤を用いて NQO1 欠損 T 細胞でみられたような IL-10 産生を促進し、IL-17 産生を抑制するような低分子化合物を同定していく。また同時に、ケミカルライブラリーから新たな NQO1 阻害剤を発見し、新規 NQO1 阻害剤についても同様に検討していく。

## 研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1013

研究課題名：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

主任研究者名：木村彰宏

### 論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Nqo1 Regulates Irritant Contact Hypersensitivity against Croton Oil through Maintenance of Dendritic Epidermal T Cells	Kitajima M, Kimura A, Suzuki H	J Immunol.	200: 1555-1559	2018年
NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting IκB-ζ degradation	Akihiro Kimura, Masayuki Kitajima, Kyoko Nishida, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Satoshi Sakamoto, Takumi Ito, Hiroshi Handa, Takashi Tanaka, Akihiko Yoshimura, and Harumi Suzuki	J Exp Med.	in press	2018年

### 学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
The novel ubiquitin ligase complex, NQO1-PDLIM2 inhibits TLR-dependent production of selective cytokines by degrading IκB-z	Akihiro Kimura, Masayuki Kitajima and Harumi Suzuki	The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon	金沢	2017年11月
The novel ubiquitin ligase complex, NQO1-PDLIM2 inhibits TLR-dependent production of selective cytokines by degrading IκB-ζ	Akihiro Kimura, Masayuki Kitajima and Harumi Suzuki	The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology	仙台	2017年12月

### その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。