

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17565

研究課題名（和文）p53誘導性ホスファターゼPPM1Dによる好中球分化と免疫応答制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of tumor suppressor protein p53-inducible phosphatase PPM1D on neutrophil differentiation

研究代表者

鎌田 瑠泉（Kamada, Rui）

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：40750881

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）：癌抑制タンパク質p53誘導性Ser/ThrホスファターゼPPM1Dは、免疫系細胞の分化や免疫応答において重要な機能を有していることが示唆されている。しかしながら、免疫細胞分化・免疫応答におけるPPM1Dの分子制御機構はいまだ明らかとなっておらず、その解明が強く求められている。本研究では、PPM1Dが好中球分化および分化後の機能制御に関与していることを明らかにした。さらに、PPM1Dの各スプライスバリエント過剰発現細胞株を作製し、PPM1DスプライスバリエントPPM1D605、PPM1D430の好中球分化および機能成熟における機能を初めて明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞への分化過程は遺伝子発現・制御因子の活性化により厳密に制御されており、分化の制御機構の破綻は、白血病や骨髄異形成症候群などの重篤な血液疾患を引き起こす。しかしながら、免疫細胞分化の分子制御機構はいまだ不明な点が多く、これら疾患の原因解明および新規治療法開発のために、免疫細胞分化および免疫応答の分子制御機構の解明が強く求められている。本研究は、好中球の分化および機能獲得を制御する遺伝子産物PPM1Dを同定し、その詳細な機能を明らかとした。本研究により、好中球分化および機能制御機構の破綻により引き起こされる様々な疾患の原因解明・新規治療法開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Tumor suppressor protein p53-inducible Ser/Thr phosphatase PPM1D has important role in DNA damage responses. Ppm1d knockout mice show multiple defects in immune responses and spermatogenesis. It is suggested that PPM1D plays an important role in immune cell differentiation and immune responses. In this study, we demonstrated that PPM1D inhibitor induced neutrophil differentiation of human promyelocytic leukemia cells. Furthermore, we showed that PPM1D regulates neutrophil immune function, such as phagocytosis. Using cell line which overexpressed PPM1D splice variants, PPM1D605 and PPM1D430, we clarified the role of PPM1D splice variants in neutrophil differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞分化 ホスファターゼ 阻害剤 好中球

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の免疫細胞は、造血幹細胞から血液前駆細胞を経て機能的な成熟細胞へと分化して機能している。血液細胞への分化過程は遺伝子発現・制御因子の活性化により厳密に制御されており、分化の制御機構の破綻は、白血病や骨髄異形成症候群などの重篤な血液疾患を引き起こす。しかしながら、免疫細胞分化の分子制御機構はまだまだ不明な点が多く、これら疾患の原因解明および新規治療法開発のために、免疫細胞分化および免疫応答の分子制御機構の解明が強く求められている。

癌抑制タンパク質 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D は、p53, ATM などの脱リン酸化・不活性化を介して細胞周期の恒常性を維持している。造血幹細胞において、PPM1D 遺伝子は極めて多くの変異が報告されている遺伝子である。また、白血病をはじめとする様々な悪性腫瘍において、PPM1D の過剰発現や遺伝子増幅が報告されている。Ppm1d 欠損マウスにおいて、造血器異常、特に好中球数増大および免疫不全の表現系が見られ、PPM1D が好中球をはじめとした免疫細胞分化や免疫応答において重要な機能を有していることが強く示唆されている。我々はこの研究室では、ヒト PPM1D において、以前より知られる PPM1D605 に加え、C 末端に 10 残基のユニークな配列を持つスプライスバリエント PPM1D430 を同定している (図 1) (J. Biochem. 145, 1-12, 2009)。また、PPM1D605 が全身の組織にユビキタスに発現しているのに対し、PPM1D430 は白血球系細胞および精巣特異的に発現することを明らかにしている。このため、PPM1D430 は免疫細胞において特異的な機能を有していることが強く示唆されるが、現在までにスプライスバリエントを区別して解析した例はなく、その機能は不明である。免疫細胞分化・免疫応答における PPM1D の分子制御機構はまだまだ明らかとなっておらず、その解明が強く求められている。

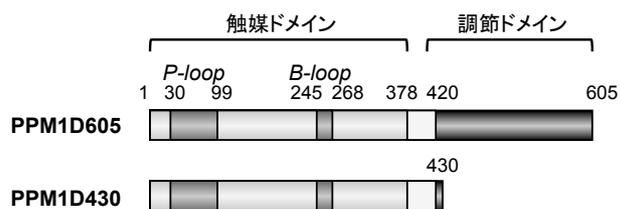


図 1 PPM1D605, 430 のドメイン構造

2. 研究の目的

免疫細胞の中でも好中球は、白血球において最も多い割合を占め、初期段階における生体防御の中心を担っている。骨髄において造血幹細胞から分化した好中球は、血管内を移動して生体内に侵入した病原菌を貪食・殺菌する。本研究では、PPM1D のスプライスバリエントを区別した解析および PPM1D 特異的阻害剤を用いた解析により、PPM1D による好中球分化・免疫応答の分子制御機構の解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 好中球分化における PPM1D バリエントの発現量および局在解析

血液細胞分化の研究に広く用いられている急性骨髄球性白血病由来細胞株 HL-60 細胞を好中球様細胞やマクロファージ様細胞に分化誘導し、バリエント特異的抗体を用いて PPM1D430 および PPM1D605 の発現レベルを定量し、分化マーカーである CD11b 発現レベルや細胞の表現型 (NBT 還元試験・接着性) との相関を解析した。また、各 PPM1D バリエントの分化前後における細胞内局在や mRNA 量を解析した。

(2) PPM1D 活性および発現量変化による好中球分化制御機構解明

PPM1D 特異的阻害剤 SL-176 (図 2) を HL-60 細胞に投与し、PPM1D 活性の阻害が分化誘導に及ぼす効果を解析した。好中球様細胞への分化誘導効率解析には、我々が開発した新規蛍光プローブ TAP-4PH を用いた細胞分化過程の迅速な可視化手法を用いた (PLOS ONE, 11, e0160625, 2016)。PPM1D 阻害剤による活性阻害は、阻害剤を加える時期を変えることで、細胞分化のどの時期に PPM1D が機能しているかについても検討した。

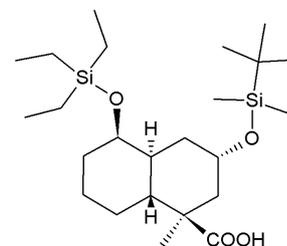


図 2 PPM1D 阻害剤 SL-176

(3) RNAseq によるトランスクリプトーム解析

好中球分化過程において PPM1D が制御するシグナル経路を同定するため、分化誘導剤 ATRA、PPM1D 阻害剤 SL-176、および ATRA と SL-176 を共投与した HL-60 細胞について、RNAseq のライブラリを調製し、次世代シーケンサーによりトランスクリプトーム解析を実施した。

(4) PPM1D スプライスバリエント PPM1D605, PPM1D430 の好中球分化における機能を解析するため、各スプライスバリエントを過剰発現させた HL-60 細胞株を作製した。

4. 研究成果

(1) HL-60 細胞に PPM1D 阻害剤 SL-176 を投与した結果、分化マーカーである CD11b の発現量が増加したことから、PPM1D 阻害により好中球様細胞に分化が誘導されることが明らかとなった。また、TAP-4PH を用いた細胞の核形態の観察により、PPM1D 阻害によって HL-60 細胞の核分葉が誘導されることが見出された。また、好中球分化にともない、PPM1D605 および PPM1D430 の発現量が増加することが明らかとなった。

さらに我々は、PPM1D 阻害により CD11b が増加することが示された一方、好中球の主要な機能である貪食能が低下することを見出した (図 3)。これらの結果より、PPM1D が好中球の分化のみならず、その分化後の好中球機能の制御にも関与していることが示唆された。

(2) 好中球分化過程において PPM1D が制御するシグナル経路を同定するため、HL-60 に PPM1D 阻害剤を投与した際の遺伝子発現パターンを RNAseq により解析した。PPM1D 阻害剤単独投与の条件および、分化誘導剤 ATRA と阻害剤の共投与の条件下において、刺激前の HL-60 と比較して多くの遺伝子の発現が変化していることが見出された。得られた発現変動遺伝子群の GO 解析を実施し、好中球の主要な機能である貪食能や、炎症応答経路に関わる遺伝子発現が PPM1D により制御されていることが明らかとなった。

(3) RNA-seq により同定された炎症応答における PPM1D の機能解析を実施し、ATRA と PPM1D 阻害剤 SL-176 を共投与した細胞では、ATRA 単独で分化誘導した HL-60 細胞と比較して LPS 刺激に応答した炎症性サイトカインの産生量が増加することが見出された。一方で、抗菌ペプチド産生量は SL-176 により大きく減少することが明らかとなった (図 3)。

(4) 作製した PPM1D スプライスバリエント PPM1D605, PPM1D430 を過剰発現させた細胞株を用い、好中球分化および機能解析を実施した。その結果、PPM1D605 および PPM1D430 の過剰発現によって、抗菌ペプチドの発現量が著しく増加することが示された。また、PPM1D605 は貪食促進的受容体 FCGR1 の mRNA の発現量を大幅に増加させ、貪食抑制的受容体 FCGR2B の mRNA の発現量もわずかに増加させた。一方で、PPM1D430 は FCGR1 および FCGR2B の mRNA の発現量を低下させた。転写レベルにおいて貪食能にバリエント間で異なる変化を引き起こしたが、PPM1D は貪食能を促進させることが示唆された。

本研究により、Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D が好中球の分化を制御していることが明らかとなった。さらに、PPM1D スプライスバリエント PPM1D605, PPM1D430 の好中球分化および機能成熟における機能が初めて明らかとなった。今後は、好中球分化および機能獲得における PPM1D の詳細な機能解明を進めていく。本研究により、好中球分化および機能制御機構の破綻により引き起こされる様々な疾患の原因解明・新規治療法開発への展開が期待される。

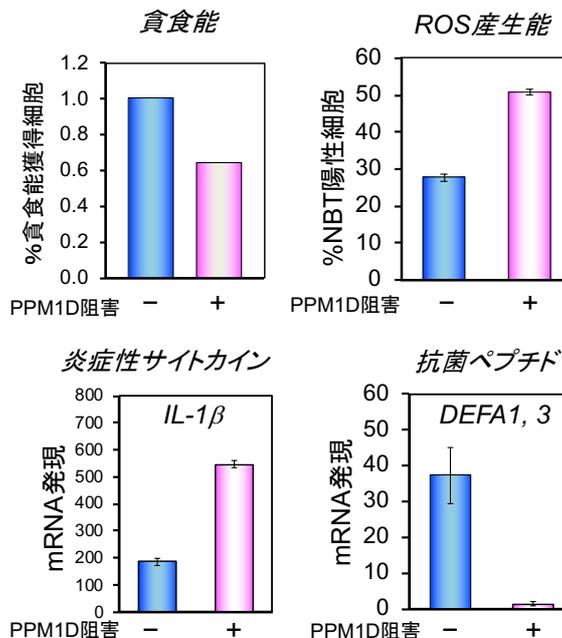


図 3 好中球における PPM1D 阻害の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamada Rui, Yang Wenjing, Zhang Yubo, Patel Mira C., Yang Yanqin, Ouda Ryota, Dey Anup, Wakabayashi Yoshiyuki, Sakaguchi Kazuyasu, Fujita Takashi, Tamura Tomohiko, Zhu Jun, Ozato Keiko	4. 巻 115
2. 論文標題 Interferon stimulation creates chromatin marks and establishes transcriptional memory	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E9162 ~ E9171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1720930115	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 該当する

1. 著者名 Ogasawara Sari, Chuman Yoshiro, Michiba Takahiro, Kamada Rui, Imagawa Toshiaki, Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of protein phosphatase PPM1D enhances retinoic acid-induced differentiation in human embryonic carcinoma cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy119	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 -

1. 著者名 Kamada Rui, Kimura Nozomi, Yoshimura Fumihiko, Tanino Keiji, Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of lipid droplet formation by Ser/Thr protein phosphatase PPM1D inhibitor, SL-176	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0212682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0212682	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 -

1. 著者名 Kamada Rui, Kudoh Fuki, Yoshimura Fumihiko, Tanino Keiji, Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 162
2. 論文標題 Inhibition of Ser/Thr phosphatase PPM1D induces neutrophil differentiation in HL-60 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 303-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx032	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 -

1. 著者名 Wolf Gernot, Rebollo Rita, Karimi Mohammad M., Ewing Adam D., Kamada Rui, Wu Warren, Wu Brenda, Bachu Mahesh, Ozato Keiko, Faulkner Geoffrey J., Mager Dixie L., Lorincz Matthew C., Macfarlan Todd S.	4. 巻 548
2. 論文標題 On the role of H3.3 in retroviral silencing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 E1 ~ E3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nature23277	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 該当する

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 工藤風樹、鎌田瑠泉、田代麻里亜、坂口和靖
2. 発表標題 プロテインホスファターゼPPM1Dの好中球分化における新規機能探索
3. 学会等名 日本生化学会第55回北海道支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷愛海、白幡祐貴子、塚原七星、川村慧、伊藤祥吾、鎌田瑠泉、坂口和靖
2. 発表標題 Ser/ThrホスファターゼPPM1ファミリーの特異的基質認識における立体化学の効果
3. 学会等名 日本生化学会第55回北海道支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuki Kudoh, Maria Tashiro, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Effect of p53-inducible phosphatase PPM1D inhibition on p53-null Acute Myeloid Leukemia cell
3. 学会等名 The 37th Sapporo International Cancer Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shogo Ito, Yuhei Kiyota, Junya Furuta, Rui Kamada and Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Effect of PPM1D phosphatase on abnormal nucleolar formation through Nucleophosmin phosphorylation
3. 学会等名 The 37th Sapporo International Cancer Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鎌田瑠泉、木村望、坂口和靖
2. 発表標題 脂肪細胞分化および脂肪滴形成におけるp53誘導性Ser/ThrホスファターゼPPM1Dの機能解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤風樹、鎌田瑠泉、田代麻里亜、坂口和靖
2. 発表標題 Ser/ThrホスファターゼPPM1Dの急性骨髄性白血病細胞分化・成熟における新規機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rui Kamada, Nozomi Kimura, Keiji Tanino, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Ser/Thr protein phosphatase PPM1D regulates adipocyte differentiation and formation of lipid droplets
3. 学会等名 "Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13)" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuki Kudoh, Kazuya Iikura, Maria Tashiro, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Protein Phosphatase PPM1D Controls Neutrophil Differentiation and Maturation.
3. 学会等名 "Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13)" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shogo Ito, Nanase Tsukahara, Yukiko Shirahata, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 "Metal-dependent Substrate Trapping" : The novel substrate identification method for wild-type PPM phosphatases
3. 学会等名 "Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13)" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shogo Ito, Yuhei Kiyota, Junya Furuta, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Effect of Nucleophosmin Phosphorylation and Oligomerization on Abnormal Nucleolar Formation in PPM1D-hyperactivated Tumors
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium/第55回ペプチド討論会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Kawamura, Yukiko Shirahata, Itsumi Tani, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Analysis of Substrate Recognition Mechanism of Metal-dependent Ser/Thr Phosphatases
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium/第55回ペプチド討論会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Itsumi Tani, Yukiko Shirahata, Nanase Tsukahara, Kei Kawamura, Shogo Ito, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Effect of Substrate Regioselectivity on Dephosphorylation of D-Amino Acids Containing Peptides for Metal-dependent Ser/Thr Phosphatase PPM1 Family
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium/第55回ペプチド討論会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鎌田瑠泉、Wenjing Yang, 應田 涼太, 坂口和靖、Jun Zhu, Keiko Ozato
2. 発表標題 自然免疫を担うインターフェロン経路に見られる転写記憶とその制御機構解明
3. 学会等名 第4回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuki Kudoh, Rui Kamada, Maria Tashiro, Kazuya Iikura, Shuji Shigenobu, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Regulatory Mechanism of PPM1D for Acquisition of Neutrophil Heterogeneity
3. 学会等名 第4回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shogo Ito, Yuhei Kiyota, Junya Furuta, Rui Kamada, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Regulation of Nucleophosmin oligomerization by Ser/Thr phosphatase PPM1D for nucleolar formation
3. 学会等名 第4回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田瑠泉、Wenjing Yang, 應田 涼太, 坂口和靖、Jun Zhu, Keiko Ozato
2. 発表標題 Chromatin Marks in Interferon Stimulated Genes Regulates Transcriptional Memory
3. 学会等名 ConBio2017 (第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 工藤風樹、鎌田瑠泉、田代麻里亜、谷野圭持、坂口和靖
2. 発表標題 プロテインホスファターゼPPM1D特異的阻害剤SL-176による好中球の分化促進
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤祥吾、鎌田瑠泉、古田純也、清田雄平、坂口和靖
2. 発表標題 癌抑制タンパク質p53誘導性ホスファターゼPPM1D阻害によるNucleophosminリン酸化を介した癌細胞核小体形成能の回復
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 愉彦権、清田雄平、鎌田瑠泉、今川敏明、坂口和靖
2. 発表標題 Ser/ThrホスファターゼPPM1D機能のC末端領域を介した制御機構解明
3. 学会等名 日本生化学会第54回北海道支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村望、鎌田瑠泉、坂口和靖
2. 発表標題 p53誘導性ホスファターゼPPM1Dによる脂肪滴形成制御
3. 学会等名 第5回がん代謝研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤祥吾、鎌田瑠泉、古田純也、清田雄平、坂口和靖
2. 発表標題 癌細胞の核小体形成異常における Nucleophosmin の多量体形成状態とリン酸化による制御
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2017年夏季研究発表会2017/07/222017/07/22
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 愉彦権、鎌田瑠泉、今川敏明、坂口和靖
2. 発表標題 Ser/Thr ホスファターゼPPM1D C末端領域を介した機能制御機構の解明
3. 学会等名 日本化学会秋季事業－第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sari Ogasawara, Yoshiro Chuman, Rui Kamada, Toshiaki Imagawa, Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Inhibition of PPM1D phosphatase promotes human NT2/D1 cells differentiation via activation of retinoic acid signaling
3. 学会等名 第3回日台プロテインホスファターゼ学術集会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shogo Ito, Rui Kamada, Junya Furuta, Yuhei Kiyota, and Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Regulation of Nucleolar Formation through Nucleophosmin Oligomerization by PPM1D Phosphatase
3. 学会等名 ConBio2017 (第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nozomi Kimura, Rui Kamada, Fumihiko Yoshimura, Keiji Tanino, and Kazuyasu Sakaguchi
2. 発表標題 Regulation of adipocyte differentiation and lipid droplet formation by Ser/Thr phosphatase PPM1D
3. 学会等名 ConBio2017 (第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

〔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