

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年5月31日現在

機関番号： 82401
研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2008～2010
課題番号： 20590499
研究課題名(和文)
核内ユビキチンリガーゼPDLIM2による炎症反応制御機構の解析
研究課題名(英文) Clarification of molecular mechanisms how PDLIM2, a nuclear ubiquitin E3 ligase, regulates inflammatory responses
研究代表者
田中 貴志 (TANAKA TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・炎症制御研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号： 00415225

研究成果の概要(和文)：

PDLIM2は、炎症反応に必須の転写因子NF- κ Bをユビキチン化・分解することにより炎症反応を負に制御している。本研究では、熱ショック蛋白であるHSP70が、PDLIM2によるNF- κ Bの分解に必須であることを明らかにした。また、個体レベルにおいてPDLIM2を欠損させたマウスでは炎症性病変および創傷治癒反応が亢進することから、PDLIM2は炎症反応から組織修復に至る一連の反応を負に制御することにより、慢性炎症性疾患の発症を防いでいると考えられる。

研究成果の概要(英文)：

PDLIM2 negatively regulates inflammatory responses by promoting polyubiquitination and degradation of NF- κ B, an essential transcription factor for the inflammation. In this study, we demonstrate that HSP70, a heat shock protein, is essential for PDLIM2-mediated degradation of NF- κ B. Moreover, PDLIM2 deficient mice reveal enhanced inflammation and wound healing, which suggests that PDLIM2 negatively regulates both inflammatory and tissue repair responses and prevent the development of chronic inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・免疫学

キーワード： 炎症反応、PDLIM2、NF- κ B、HSP70、創傷治癒、Smad2/3、炎症性肉芽腫、STAT3

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は、生体内に侵入してきた細菌やウイルスを、細胞表面の Toll 様受容体によって認識し、転写因子 NF- κ B を活性化する。活性化された NF- κ B は、細胞質から核内に移行し、IL-12 や IL-6 などのさまざまな免疫応答遺伝子の発現を誘導することにより、一連の炎症反応を惹起する。ところが一方では、過剰かつ無制限な NF- κ B の活性化が自己免疫疾患などの炎症性疾患を発症させることも示唆されている。よって、この NF- κ B の活性化の ON/OFF をうまく制御することが、適切な炎症反応の進行に重要であると考えられる。

最近、この NF- κ B が、ユビキチン化を受けてプロテアソーム依存性に分解されることにより不活性化されることが報告された。蛋白ユビキチン化は、細胞内シグナル伝達系を制御する新たな蛋白質翻訳後修飾として注目されているが、この反応の中心的役割を果たしているのがユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼは基質蛋白を選別・結合して、これにユビキチン鎖を付加する。NF- κ B に対するユビキチンリガーゼはこれまで不明であった。

PDLIM2(PDZ and LIM domain protein-2)は、T細胞において Th1 細胞分化の誘導に必須の転写因子である STAT4 に結合する因子として、申請者らが単離した核内ユビキチンリガーゼである (Tanaka T, et al, *Immunity*, 22, 729-736, 2005)。その後申請者は、PDLIM2 が、樹状細胞においては、核内の NF- κ B に対するユビキチンリガーゼとして炎症反応を負に制御するように機能していることを明らかにした (Tanaka T et al, *Nat. Immunol.*, 22, 729-736, 2007)。すなわち、PDLIM2 は C 末端部の LIM ドメインを介して NF- κ B をユビキチン化するとともに、N 末端部の PDZ ドメインを介して NF- κ B を PML nuclear body という核内の小分画に移動・隔離させる。PML nuclear body は、タンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームを多く含んでおり、ユビキチン化された NF- κ B は最終的にこの PML nuclear body においてプロテアソームによって分解されることにより不活性化される。

しかしながら、PDLIM2 自体の活性がどのように調節されているのか、および、個体レベルにおける PDLIM2 の異常が、慢性炎症性疾患の病態形成に關与するかどうかに関しては現時点では明らかになっていない。

2. 研究の目的

本申請研究においては、申請者が明らかにした PDLIM2 による NF- κ B の不活性化機構を

さらに詳細に解明することを目的として、次の 2 つの研究を行う。

(1) Toll 様受容体を介するシグナル伝達経路において、PDLIM2 の NF- κ B に対するユビキチンリガーゼ活性自体がどのように調節されているかを解析する。

PDLIM2 の発現および細胞内局在は、Toll 様受容体を介する刺激によっては変化しない。そこで、PDLIM2 に結合して、PDLIM2 の活性を調節するような分子の同定、解析を行う。申請者は、これまでの研究において、シャペロン分子である HSP90 (heat shock protein-90) および HSP70 が PDLIM2 と会合することを見出した。本申請研究においては、これらのシャペロン分子が PDLIM2 に対してどのように作用するのかを解明する。

(2) 核内ユビキチンリガーゼの異常が炎症性疾患の病態形成に關与する可能性について検討する。

PDLIM2 欠損マウスは、樹状細胞における NF- κ B の蛋白量が増加することにより炎症性サイトカインの産生が亢進しているものの、現時点では自己免疫疾患の自然発症は認めていない。そこで、細菌や薬剤によって自己免疫疾患を誘発するような系を用いて PDLIM2 欠損マウスに炎症症状を誘発する。これにより PDLIM2 が個体レベルの炎症反応や自己免疫疾患の病態形成にどのような役割をはたしているのかを解析する。また、PDLIM2 のトランスジェニックマウスや PDLIM2 を活性化するような薬剤が、個体レベルでの炎症反応を抑えることができるかどうかを調べる。これにより、PDLIM2 を用いた炎症性疾患の治療法の開発の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) PDLIM2 のユビキチンリガーゼ活性を制御する機構の解析

前述のように、申請者は、これまでの研究において、PDLIM2 と会合する分子としてシャペロン分子である HSP90 および HSP70 を同定している。一般的には、HSP90 自体は蛋白を安定化する方向に、HSP70 は逆に蛋白を分解する方向にはたらくことが報告されている。

そこで、本申請研究においては、シャペロン分子群が PDLIM2 に直接作用して NF- κ B のユビキチン化および蛋白分解を制御している可能性を検討する。まずは、Geldanamycin 処理が、PDLIM2 自体のユビキチン化 (PDLIM2 のユビキチンリガーゼ活性の指標)、および PDLIM2 による NF- κ B のユビキチン化・蛋白分解を促進するかどうか調べる。これにより HSP90 が PDLIM2 自体の活性に対しても抑制的にはたらくかどうかを検討する。さらには、HSP90 の強制発現ベクターおよび HSP90 に対する siRNA を用いて同様の実験を行い、Geldanamycin の作用が HSP90 に特異的なものであ

ることを確認する。

次に、HSP70のPDLIM2に対する作用を解析する。HSP70の強制発現ベクターおよびHSP70のsiRNAを用いて、培養細胞においてHSP70の活性を促進または抑制した場合に、PDLIM2によるNF-κBのユビキチン化および蛋白分解がどのように変化するかについて、ウェスタンブロット法および蛍光細胞染色法を用いて検討する。さらに、HSP70ノックアウトマウスの樹状細胞の解析を行う

(HSP70ノックアウトマウスは米国のバンクより入手手続中)。実際には、樹状細胞をLPSで刺激したときのNF-κBのユビキチン化および蛋白量を調べるとともに、炎症性サイトカインの産生量を測定する。これにより、HSP70が個体レベルにおいてもNF-κBを負に制御しているかどうかを明らかにする。

(2) 核内ユビキチンリガーゼの異常が炎症性疾患の病因病態形成に關与するかどうかの検討

PDLIM2欠損マウスは、炎症性サイトカインの産生が亢進しているものの、現時点では自己免疫疾患の自然発症は認めていない。しかしながら、実際には、PDLIM2欠損マウスにおける核内NF-κBの蛋白量の増加やユビキチン化の傷害は、細胞をLPSで活性化したときのみ顕著に認められる。このことから、PDLIM2欠損マウスの個体レベルでの解析には、以下のような、細菌や薬剤によって炎症性疾患・自己免疫疾患を誘発するような系を用いることが必要かつ有効であると考えられる。

- (a) 真菌誘発性血管炎モデル (Candida albicansの可溶性菌体外多糖を用いる)
- (b) 細菌誘発性肝炎モデル (Propionibacterium acnesとLPSを用いる)
- (c) II型コラーゲン誘発性関節炎モデル
- (d) OVAやAspergillus抗原による慢性気管支喘息モデル

これらの誘発性炎症疾患モデルの実験系において、PDLIM2欠損マウスに炎症所見の増悪が認められるかどうかを検索する。これにより、核内ユビキチンリガーゼの異常が炎症性疾患の病因病態形成に關与するかどうかを明らかにする。

また、培養細胞にNF-κBをPDLIM2と共に発現させると、核内のNF-κBはユビキチン化され、nuclear bodyへ運ばれて分解される。これに対し、LIMドメインを欠損させたPDLIM2(delta-LIM)をNF-κBと共に発現させた場合には、nuclear bodyへのNF-κBの移動は正常におこるが、NF-κBのユビキチン化・分解が著明に阻害されるため、NF-κBがnuclear body内に蓄積する(Tanaka et al, Nat Immunol., 8, 584-591, 2007)。そこで、PDLIM2欠損マウスにdelta-LIMのみを発現させることができ

れば、核内のnuclear bodyでNF-κBが過剰に蓄積する状況を、マウス個体において再現できると考えられる。具体的には、delta LIMトランスジェニックマウスを作製し、これをPDLIM2欠損マウスと交配する。また、別の手法として、ES細胞における相同組換えの方法を用いて、C末端部分のLIMドメインの直前に終止コドンを導入し、LIMドメインのみを欠損したマウス(LIMドメイン欠損マウス)の作製も行う。これらのマウスにおいても、上記の誘発性の炎症性疾患モデルの実験を行う。神経変性疾患の中には、神経細胞におけるユビキチンリガーゼの機能異常によって核内に蓄積した異常蛋白が原因となって、神経細胞の変性を引き起こすものが報告されている。

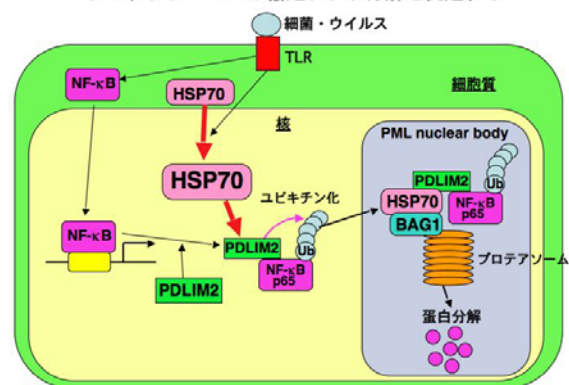
delta-LIMトランスジェニックマウスおよびLIMドメイン欠損マウスにおいても、同様に血管内皮細胞などにおいて不溶性蛋白質が核内に蓄積するような状況が生じれば、血管壁の変性病変などをさらに増悪させることが予想される。

4. 研究成果

(1) HSP70によるPDLIM2依存性のNF-κB不活性化の制御の分子機構

細胞内においてPDLIM2自体の活性がどのように制御されているのかを解明するために、PDLIM2と結合してPDLIM2の活性を調節する因子を同定することを試みた。この過程で、申請者は、シャペロン分子として知られているHSP70(Haet Shock Protein-70)がPDLIM2と結合していることを見出した。また、HSP70は無刺激の細胞においては細胞質内のみ存在しているが、TLR刺激により核内に移行することも明らかになった。HSP70をPDLIM2とともに細胞に強制発現させると、HSP70はPDLIM2によるNF-κBの分解を促進し、一方、siRNAを用いてHSP70を細胞レベルでノックダウンすると、PDLIM2によるNF-κBの分解が傷害された。このことから、PDLIM2がNF-κBを分解するためには、HSP70の発現が必須であることが明らかになった。HSP70は、さらにプロテアソーム結合蛋白であるBAG1と会合することに

HSP70はPDLIM2と結合し、BAG1と協調してNF-κBのプロテアソームへの輸送および分解を促進する



より、PDLIM2-NF- κ B 複合体のプロテアソームへの輸送および NF- κ B の分解を促進していることが明らかになった（前ページ図参照）。実際、HSP70 欠損樹状細胞および BAG1 をノックダウンした樹状細胞においては、いずれも炎症性サイトカインの産生が亢進していた。

以上より、HSP70 は、樹状細胞においては、BAG1 と共同して PDLIM2 による NF- κ B の分解を促進することで炎症反応を負に制御していると考えられる。HSP70 は、本来は、シャペロン分子として、蛋白合成過程における正確なフォールディングを補助するか、あるいはミスフォールドしてしまったタンパク質を分解するかの選択を行う品質管理を担っている。本研究により、転写因子を積極的に分解することでシグナル伝達を負に制御するという HSP70 の新たな機能が明らかになった（論文投稿準備中）。

(2) PDLIM2 による創傷治癒反応の制御

生体は、感染や外傷などに際して、まず免疫細胞を動員し炎症反応を惹起して異物の排除を行い、その後に傷害を受けた組織を修復する。ところが、何らかの原因でこれらの炎症反応および組織修復が過剰に起こると、慢性炎症性疾患や組織の線維化を引き起こすことが示唆されている。そこで、組織の修復反応における PDLIM2 の役割を解明するために、皮膚創傷治癒モデルの実験を行った。PDLIM2 欠損マウスにおいては、皮膚創傷治癒反応が野生型マウスにくらべて促進しており、特に炎症性肉芽組織が形成された後の創部の収縮反応が著明に亢進していることが明らかになった（下図参照）。

**PDLIM2欠損マウスでは、
皮膚創傷治癒反応における創収縮が促進される**

野生型マウス

PDLIM2欠損マウス



マウスの背部皮膚を直径 6 mm を切除した。その 7 日後の創傷治癒の様子を示す。

この創収縮には、創部局所において TGF β の作用によって分化してきた筋線維芽細胞が重要な役割を果たしている。興味深いことに、PDLIM2 欠損マウス由来の線維芽細胞においては、TGF β 刺激による筋線維芽細胞への分化が、野生型マウス由来細胞と比べて著明に亢進していた。TGF β のシグナルは、細胞内において、転写因子 Smad2、Smad3 および

Smad4 によって核まで伝達され、標的遺伝子の発現を誘導する。さらに申請者は、PDLIM2 が、Smad2 と Smad3 の核内ユビキチンリガーゼとして、これらの転写因子をユビキチン化・分解・不活性化することにより創傷治癒反応を適切な時点で終息させるようにはたらくことを明らかにした（投稿準備中）。

以上のことから、PDLIM2 は、NF- κ B や STAT を不活性化することにより炎症反応に対して抑制的にはたらくだけでなく、その後の修復期においては、TGF β -Smad のシグナルを不活性化して、筋線維芽細胞の分化を抑制することにより、組織の修復が過剰にならないように制御していると考えられた。

(3) PDLIM2 による Th17 細胞分化の制御

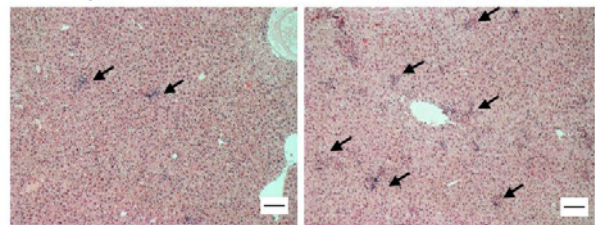
Th17 細胞は最近新しく発見された T 細胞のサブセットであり、病原微生物に対する生体防御に重要な役割を果たしている。しかしながら、この Th17 細胞が過剰に活性化されると、炎症性疾患や自己免疫疾患を発症することも指摘されている。よって、適切な免疫反応のためには、Th17 の活性化を正および負に制御することが重要であると考えられる。これまでに、Th17 細胞の分化および活性化には、炎症性サイトカインである IL-6 による転写因子 STAT3 の活性化が必須であることが明らかになっている。しかしながら、Th17 の活性化を負に調節する分子メカニズムはこれまでのところ解明されていない。

マウスに細胞内寄生細菌である *Pacnes* (*Propionibacterium acnes*) の加熱死菌を投与すると、Th17 細胞分化を誘導するとともに、肝臓において炎症性肉芽腫の形成を促進する。PDLIM2 欠損マウスにおいては、*Pacnes* による Th17 細胞分化および肉芽腫の形成が野生型マウスにくらべて著明に亢進していた（下図参照）。

**PDLIM2欠損マウスにおいては*P.acnes*による
肝臓の炎症肉芽腫形成が亢進する**

野生型マウス

PDLIM2欠損マウス



P.acnes の加熱死菌投与後 7 日目の肝臓の組織像を示す。
(肉芽腫を矢印で示した)。

Pacnes はまず樹状細胞に作用して NF- κ B 依存性に IL-6 の産生を誘導する。さらにこの IL-6 が TGF β と共同してナイーブ T 細胞から Th17 細胞の分化を誘導する。PDLIM2 欠損マウスの樹状細胞においては、*Pacnes* による IL-6 の産生が亢進していたが、これに加えて、PDLIM2 欠損マウスの T 細胞においては、TGF β と IL-6 による Th17 細胞分

化が促進していた。また、PDLIM2 欠損マウス由来の細胞においては、STAT3 のタンパクレベルおよび転写活性が亢進していることも明らかになった。さらに申請者らは、PDLIM2 が STAT3 をユビキチン化・分解・不活性化することを見出した。以上のことから、PDLIM2 は、STAT3 に対する核内ユビキチンリガーゼとして STAT3 の活性を抑制することにより、Th17 細胞の分化および炎症性肉眼腫の形成を負に制御することが明らかになった（論文投稿済み、審査中）。

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4件）

- ① Yamazaki, C., Miyamoto, R., Hoshino, K., Fukuda, Y., Sasaki, I., Saito, M., Ishiguchi, H. Yano, T., Sugiyama, T., Hemmi, H., Tanaka, T., Hamada, E., Hirashima, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., Nomura, S., Ito, T., Kaisho, T. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 756-761, 2010. 査読有。
- ② Matsuda T, Kido Y, Asahara S, Kaisho T, Tanaka T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Takeda A, Inoue T, Shibutani Y, Koyanagi M, Hosooka T, Matsumoto M, Inoue H, Uchida T, Koike M, Uchiyama Y, Akira S, Kasuga M: Ablation of C/EBP β alleviates ER stress and pancreatic b cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 115-126, 2010. 査読有。
- ③ Yan, P., Fu, J., Qu, Z., Li, S., Tanaka, T., Grusby, M. J., Xiao, G. PDLIM2 suppresses HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood*, 113, 4370-4380, 2009. 査読有。
- ④ Kaisho, T., Tanaka, T. : Turning NF- κ B and IRFs on and off in DCs. : *Trends Immunol.*, 29, 329-336, 2008. 査読有。

〔学会発表〕（計8件）

- ① 田中貴志。HSP70 terminates NF- κ B activation by facilitating degradation of the p65 subunit.。新学術領域研究「自然炎症」第1回若手ワークショップ。2011年1月26日。蔵王、山形。

- ② Tanaka, T.: PDLIM2, a nuclear ubiquitin E3 ligase, negatively regulates inflammatory responses. INSERM/Pasteur-RIKEN Joint Workshop "Frontier in Immunology - From basic to clinics". 2010年8月31日。横浜。
- ③ Tanaka, T.: PDLIM2 regulates Th17-mediated responses through degradation of STAT3 transcription factor. The 14th International Congress of Immunology. 2010年8月23日。神戸。
- ④ 田中貴志、改正恒康。PDLIM2 はTh17 細胞分化を負に制御する。日本免疫学会。2009年12月2日。大阪。
- ⑤ Tanaka, T. : PDLIM2, a nuclear ubiquitin E3 ligase negatively regulates inflammatory responses. The 2009 fall conference of the Korean association of immunologists. 2009年11月10日。Seoul, Korea.
- ⑥ Tanaka, T., Kaisho, T. : Enhanced skin wound healing in PDLIM2-deficient mice. The 9th World Congress on Inflammation. 2009年7月7日。東京。
- ⑦ 田中貴志、改正恒康。PDLIM2 欠損マウスにおける皮膚創傷治癒反応の亢進。日本免疫学会。2008年12月2日。大阪。
- ⑧ Tanaka, T., Kaisho, T. : PDLIM2 and HSP70 cooperatively terminate Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation. The 10th International Symposium on Dendritic Cells. 2008年10月1日-5日。神戸。

○出願状況（計2件）

- ① 名称:創傷治癒剤及びそのスクリーニング方法
発明者: 田中貴志、改正恒康
権利者: 独立行政法人理化学研究所
種類: 特願
番号: 2009-254379
出願年月日: 平成 21 年 11 月 5 日
国内外の別: 国内
- ② 名称:創傷治癒剤及びそのスクリーニング方法
発明者: 田中貴志、改正恒康
権利者: 独立行政法人理化学研究所
種類:
番号: 12/613134
出願年月日: 平成 21 年 11 月 5 日
国内外の別: アメリカ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rcai.riken.jp/group/inflammatory/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 貴志 (TANAKA TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・炎症制御研究ユニット・ユニットリーダー
00415225

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし