

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790943

研究課題名 (和文) 関節リウマチ関連タンパク質PAD4の生理機能とその分子機構の解析

研究課題名 (英文) Physiological function of PAD4, a rheumatoid arthritis-related protein, and its molecular mechanisms.

研究代表者

中島 克彦 (NAKASHIMA KATSUHIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90528035

研究成果の概要 (和文)：

PAD4 が骨髄中の造血系幹細胞、多能性前駆細胞に発現することを始めて明らかにした。野生型マウスと比較して PAD4 ノックアウトマウスでは骨髄造血幹細胞の割合が高いことが分かった。また、骨髄移植を用いた実験から、幹細胞の増加は骨髄環境の影響ではなく細胞内因性によるものであった。さらに幹細胞の増殖亢進がみられたが、マイクロアレイなどの結果から、この原因は、増殖に関わる遺伝子の転写が PAD4 欠損により活性化したことによると考えられた。本研究成果は、血球分化・増殖における新しい制御のひとつを提唱した。

研究成果の概要 (英文)：

PAD4 was predominantly expressed in HSC while less in the progenitor cells. Moreover, frequency of HSC in PAD4-deficient mice is higher than that in wild-type mice. Furthermore, the expression levels of some genes related to the cell proliferation were changed in PAD4-deficient HSC compared to wild-type HSC. These results suggested that PAD4 might maintain HSC proliferation in bone marrow by regulation of the gene expression mediated by histone citrullination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学、エピジェネティクス、シトルリン化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾は、リン酸化、ユビキチン化、アセチル化など他にも様々なものが知られており、タンパク質合成後にアミノ酸残基を修飾しその構造や機能を巧みに制御している。Peptidylarginine Deiminase (PAD) は翻訳後修飾酵素のひとつであり、カルシウムイオン存在下でタンパク質のア

ルギニン残基をシトルリン残基に変換する(シトルリン化)(図1参照)。PADは、ほ乳類で5種類(PAD1, 2, 3, 4, 6)存在し、生体内に広く分布している。1999年に、自己免疫疾患のひとつである関節リウマチ患者で検出される自己抗体が、通常のフィラグリンには反応せずシトルリン化フィラグリンを特異的に認識することがヨーロッパのグル

ープから報告され、PAD の自己免疫疾患への関与がはじめて示唆された。また、この発見をもとに開発された抗サイクリックシトルリンペプチド (CCP) 抗体は、関節リウマチの早期診断薬として非常に有効である。さらに最近、リウマチ患者に優位にみられる 1 塩基多型が PAD4 をコードする *PADI4* 遺伝子中にみつき、それがリウマチ発症と強く相関することが報告された。これらのことから、PAD4 はリウマチ関連タンパク質として注目され、近年、特に臨床分野での研究が国内外で盛んに行われている。

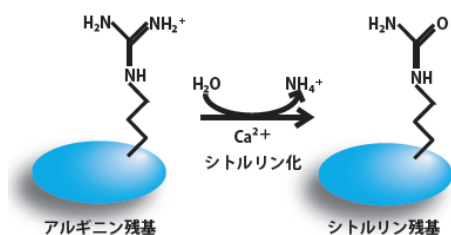


図1 PADによるシトルリン化

PAD4 は、ヒト白血球細胞の分化に伴い誘導されるタンパク質として申請者が最初に同定した (Nakashima *et al.*, J. Biol. Chem. 1999)。その後 PAD4 は、PAD ファミリーの中で唯一核移行シグナルを保持しており好中球において核に局在することを明らかにした (Nakashima *et al.*, J. Biol. Chem. 2002)。また、細胞内でクロマチン中のコアヒストンを標的としてシトルリン化することを見いだした (Hagiwara *et al.*, BBRC 2002)。近年、ゲノム上の遺伝子情報を変化させず、クロマチン構造を変化させることによるエピジェネティックなゲノム制御が注目されている。特にヒストンのメチル化やアセチル化などのクロマチン修飾は、ヒストンコード仮説とよばれよく研究されている。これらのクロマチン修飾は、転写や複製などのクロマチン機能制御、ひいては生体や疾患発症に非常に重要であり、世界中で盛んに研究されている。そのひとつであるヒストン H3 アルギニン残基のメチル化は転写を活性化するが、その反応は不可逆的であると考えられていた。しかし、我々の発見をもとにした研究成果から、逆の反応を PAD4 が担うことが示唆された (Cuthbert *et al.*, Cell 2004)。ごく最近、PAD4 によるクロマチンのシトルリン化は、エストロゲンレセプターや p53 を介する転写を抑制することが報告され、その重要性が明らかになりつつある。しかしながら、PAD4 によるクロマチン修飾の生理学的意義はまだよくわかっていない。

2. 研究の目的

PAD4 は、骨髄球分化に伴い発現が誘導され、

生体内では骨髄、末梢血好中球、脾臓で特に強い発現がみられる。このことから、PAD4 は血球、特に骨髄球分化あるいは好中球の機能に関わると推察されるが、その生理機能はまだよくわかっていない。そこで本研究では、東京大学医学部リウマチ内科の山本一彦教授研究室との共同研究により、PAD4 のノックアウトマウスを用いた生物学的機能の解析を進める。特に血球分化あるいは細菌感染防御などの白血球特有の機能に着目し、PAD4 の生理機能の解明を目指す。さらに、クロマチン免疫沈降とマイクロアレイを組み合わせた ChIP on chip 解析により、PAD4 が制御する標的遺伝子を網羅的に解析することでその分子メカニズムを解明する。また PAD4 は、ヒストンアセチル化酵素などと同様に転写因子と複合体を形成し標的遺伝子の転写を制御すると考えられている。そこで、様々な手法を用いて結合タンパク質の探索を行い、PAD4 複合体を同定し詳細な分子機構の解明を目指す。

マウス個体を用いた PAD4 の生理機能の解析や ChIP on chip などによる標的遺伝子の網羅的解析はこれまでに報告がなく、PAD が関わる関節リウマチ発症機構の解明に必須である。また、PAD4 によるクロマチン修飾に関する研究はまだ報告が少ないため、エピジェネティックなゲノム遺伝子の制御に新しい研究分野を開拓できると考えている。これらの研究成果は、PAD4 が関わるリウマチ発症機構の解明、PAD4 あるいはその標的遺伝子に対するリウマチ治療薬の開発に大きく貢献すると期待される。

3. 研究の方法

ノックアウトマウスは東大医学部アレルギーリウマチ内科山本一彦教授より提供していただいた。マウス PAD4 モノクローナル抗体は、大腸菌で発現させ精製した組み換えタンパク質を免疫して作製した。FACS により骨髄中の血球を分離、解析した。PAD4 の発現は、リアルタイム PCR、FACS、ウエスタンブロット法により解析した。マイクロアレイにより PAD4 ノックアウトにより発現が変動する遺伝子を同定した。また、クロマチン免疫沈降法により PAD4 及びヒストンシトルリン化により制御される遺伝子を解析した。

4. 研究成果

血液細胞は、骨髄でひとつの造血幹細胞 (HSC) から様々な分化過程を経てつくられ、末梢血液中を循環する (図 2)。PAD4 は骨髄、脾臓、末梢血好中球、単球で発現することが分かっているが、骨髄血液細胞における詳細な発現解析はない。そこで最初に、骨髄での発現を詳細に調べるために、マウス骨髄から血球を採取し表面マーカー抗体による FACS

を用い、様々な血球前駆細胞を分離した。各細胞での PAD4 の発現を RT-qPCR で解析したところ、Lineage⁻, Sca-1⁺, c-kit⁺ (LSK) 細胞において、好中球同様の高い発現を示した。一方、骨髓球やリンパ球系の前駆細胞における発現は低いもしくは、ほぼ検出されなかった (図 2)。さらに、免疫細胞染色法により、LSK 細胞の核に PAD4 が局在していることを明らかにした (図 3)。このことから、LSK 細胞は最も未成熟な血球、造血幹細胞と多能性前駆細胞であり、これらの細胞において PAD4 がなんらかの役割を担うと推察される。

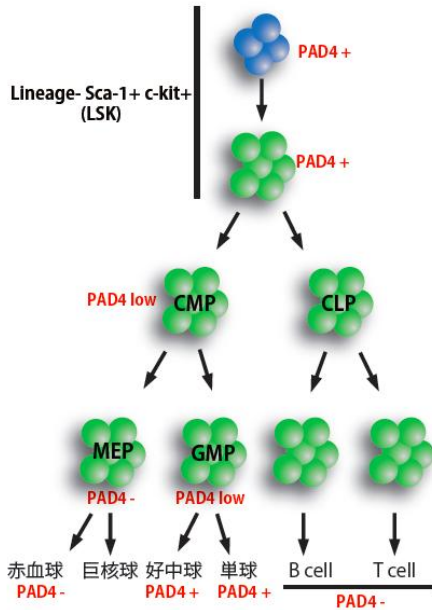


図 2 血球分化と PAD4 の発現

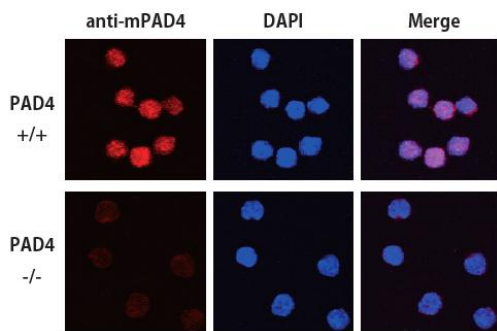


図 3 LSK 細胞の抗 PAD4 抗体による染色

次に、PAD4 ノックアウトマウス (PAD4^{-/-}) と野生型マウス (WT) の骨髓における血球組成を FACS で解析した結果、WT と比較して PAD4^{-/-} 骨髓 LSK 細胞の割合が高いことが分かった (図 4)。また、骨髓移植を用いた実験から、LSK 細胞の増加は骨髓環境の影響ではなく細胞内因性によるものであった。さらに BrdU を用いた細胞増殖解析からも、LSK 細胞の増殖亢進がみられた。

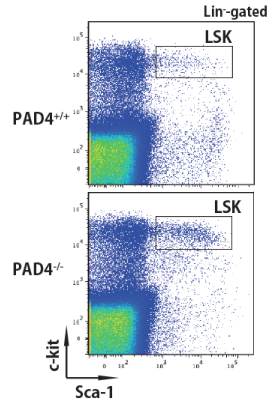


図 4 PAD4 欠損による LSK 細胞の増加

PAD4 による LSK 細胞増殖制御の分子機構を解明するために、マイクロアレイを用いて PAD4 欠損により発現変動する遺伝子を同定した。この結果、細胞増殖に関連するいくつかの遺伝子が変動していた。そのなかでも遺伝子 X は重要な増殖制御遺伝子であるため、その上流に PAD4 が結合しヒストンをシトルリン化するかどうか調べた。細胞は LSK 細胞を用い、クロマチン免疫沈降を行った。その結果、遺伝子 X の約 1 kbp 上流 (Region A) に PAD4 が結合しており、その領域のヒストン H3 がシトルリン化していることが分かった (図 5) 本研究成果は、血球分化・増殖における新しい制御のひとつを提唱した。

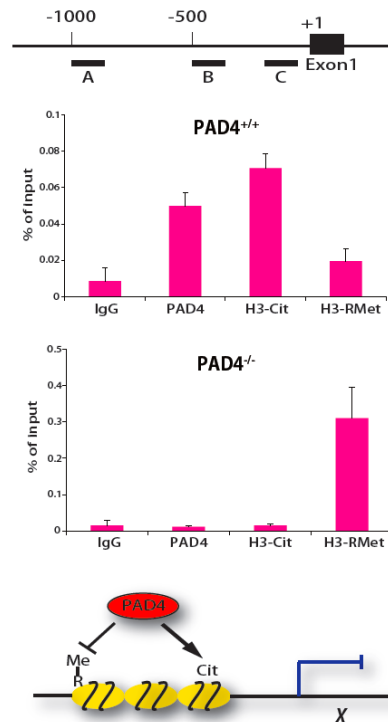


図 PAD4 は GeneX の上流でヒストンシトルリン化しその発現を制御すると考えられる

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4件)

- ① Zhonghan Li, Chao-shun Yang, Katsuhiko Nakashima, Tariq M Rana. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. **EMBO J.**, 30, 823-834 (2011) 査読有
- ② Jun Kurokawa, Satoko Arai, Katsuhiko Nakashima, Hiromichi Nagano, Akemi Nishijima, Keishi Miyata, Rui Ose, Mayumi Mori, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Yuichi Oike, Hisashi Koga, Maria Febbraio, Toshihiko Iwanaga, Toru Miyazaki. Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. **Cell Metabolism** 11, 479-492 (2010) 査読有
- ③ Nobuya Kurabe, Mayumi Mori, Jun Kurokawa, Kaori Taniguchi, Hisatoshi Aoyama, Kazuhiro Atsuda, Akemi Nishijima, Nariaki Odawara, Saori Harada, Katsuhiko Nakashima, Satoko Arai and Toru Miyazaki. The death effector domain-containing DEDD forms a complex with Akt and Hsp90, and supports their stability. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391, 1708-1713 (2010) 査読有
- ④ Ikuko Hojo-Nakashima, Ryo Sato, Katsuhiko Nakashima (corresponding author), Teruki Hagiwara, and Michiyuki Yamada. Dynamic expression of peptidylarginine deiminase 2 in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. **J. Biochem.** 146, 471-479 (2009) 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 長野広通, 黒川淳, 中島克彦, 新井郷子, 宮崎徹, AIMの翻訳後分子修飾の脂肪細胞における生理活性に対する意義。第33回に本分子生物学会年会・第83回日本生化学会年会合同大会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド (兵庫)

- ② Katsuhiko Nakashima, Akari Suzuki, Takeshi Urano, Osamu Ohara, Kazuhiko Yamamoto and Toru Miyazaki. The role of PAD4 in hematopoietic stem cells and its molecular mechanisms. 第33回に本分子生物学会年会・第83回日本生化学会年会合同大会, 2010年12月9日, 神戸ポートアイランド (兵庫)
- ③ 黒川淳, 新井郷子, 中島克彦, 宮崎徹, A new role of AIM, an apoptosis inhibitor expressed by macrophage, on adipocytes. 第32回に本分子生物学会年会 2009年12月11日 パシフィコ横浜 (神奈川)
- ④ 谷口香織, 中島克彦, 新井郷子, 宮崎徹, To identify the pathogenic T lymphocytes for metabolic syndrome. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月11日 パシフィコ横浜 (神奈川)
- ⑤ 中島克彦, 鈴木亜香里, 山本一彦, 宮崎徹, リウマチ関連タンパク質 PAD4 の血球分化、機能への関与。第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸ポートアイランド (兵庫)
- ⑥ 黒川淳, 新井郷子, 中島克彦, 門脇孝, 岩永敏彦, 宮崎徹, 肥満におけるアポトーシス抑制因子 AIM/CD5L の役割。第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸ポートアイランド (兵庫)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 克彦 (NAKASHIMA KATSUHIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90528035

(2) 分担研究者

なし

(3) 連携研究者

なし

