

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300335

研究課題名（和文） p53 シトルリン化修飾の臨床的意義の検討

研究課題名（英文） Role of p53-citrullination in human carcinogenesis

研究代表者

松田浩一（Matsuda Koichi）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：90401257

研究成果の概要（和文）：我々の解析の結果、新規 p53-PADI4 経路の基質として、histoneH4R3 及び LaminCR197,R198 を同定した。また Padi4 欠損マウスで放射線抵抗性を示すこと、PADI4 が癌組織、癌細胞株で高頻度に機能喪失型の変異を認めることから、PADI4 ががん抑制遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have identified in vivo and in vitro citrullination of the arginine 3 residue of histone H4 (cit-H4R3) in response to DNA damage through the p53-PADI4 pathway. We also show DNA damage-induced citrullination of Lamin C. Padi4(-/-) mice exhibit resistance to radiation-induced apoptosis in the thymus. We also found frequent loss of function mutations in cancer tissues and cell lines. Our findings reveal the possible role of PADI4 as a tumor suppressor gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

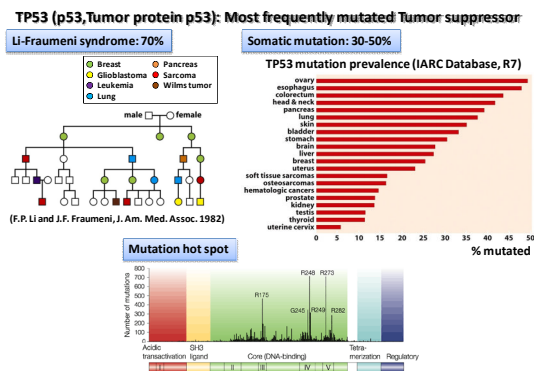
キーワード：バイオマーカー、p53

### 1. 研究開始当初の背景

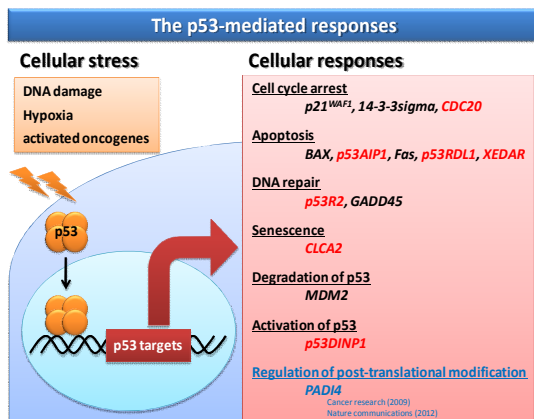
p53 の変異がみられる約半数の癌組織では、安定化によって p53 タンパク質の異常な蓄積が認められている。その結果、p53 に対する自己抗体が癌患者血清中に高頻度に認められ、腫瘍マーカーとして現在臨床応用されて

いる。また p53 の特定のエピトープをターゲットとしたワクチンも開発が進められており、phase2 臨床試験に入っている。この様に癌患者において p53 が抗原性を有する事が知られているが、抗体の認識部位に p53 の変異は殆ど認めないため、どのようにして p53 が

抗原性を獲得するかについては明らかになっていなかった。

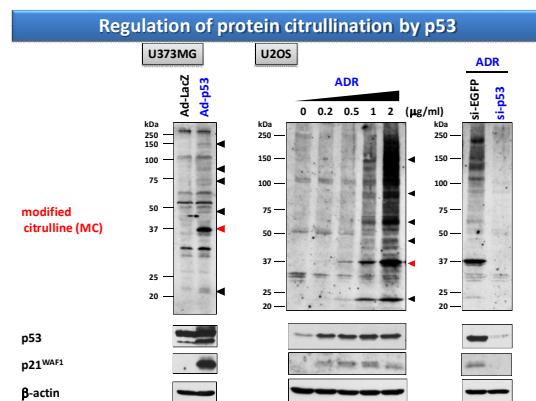


我々はこれまで継続して p53 の下流遺伝子の単離・機能解析を行っており、p53 による癌抑制機序を明らかとしてきた。最近我々は p53 がシトルリン化修飾酵素である PADI4 を誘導し、DNA ダメージ依存的に様々なタンパク質のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する事を報告した。シトルリン化修飾は側鎖の荷電状態を変化させタンパク質の構造や機能に大きな影響を与える事、また修飾を受けたペプチドが非自己として認識され抗原性をもつ事が知られている。我々の解析により p53 は、これまで言われていた転写調節による量的な制御に加え、タンパク質の質的な制御にも関与している事が示唆された。



現在これらの研究成果を元に、ノックアウトマウスも用いて p53-PADI4 経路によるシトルリン化の基質を探索しているが、その過程で p53 自身が PADI4 によってシトルリン化修

飾を受けることを発見した。さらに興味深い事に、シトルリン化修飾を受けるアルギニン残基の一つが、HLA クラス II 分子である HLA-DPB1\*0501 による抗原提示部位に含まれていた。以上の知見を元に、PADI4 によってシトルリン化されることで p53 は抗原性を獲得し、自己抗体産生が促進されるのではないかという着想に至り、本研究計画を立案するに至った。



## 2. 研究の目的

p53 は代表的な癌抑制遺伝子であり、癌の約半数で遺伝子変異が認められている。一方癌患者において p53 に対する自己抗体が出現する事が報告されているが、自己抗体は p53 の変異が少ない N 末・C 末領域を認識することから、なぜ p53 が抗原性を示すのかその機序は不明であった。我々は DNA ダメージによって複数のタンパク質が、タンパク質修飾酵素である PADI4 依存的にシトルリン化される事を最近報告した。しかしながらこれらの基質はほとんど未同定であり、PADI4 によるシトルリン化修飾の癌化における意義は明らかになっていない。本研究の目的は、PADI4 の新規基質を同定し、発癌における p53-PADI4 経路の意義を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

具体的に本研究で検討した項目は以下の通りである。

1) in vitro/in vivoにおいてp53がPADI4に

よりシトルリン化される部位の同定とシトルリン化p53に対する自己抗体の認識部位の検証。

2) PADI4によるシトルリン化がp53の活性及び自己抗体産生における意義の解明。

3) 候補分子解析による新規基質の探索

4) ヒストンシトルリン化の機能解析

5) シトルリン化ラミンCの修飾部位の同定と抗体作成

6) LC-MS/MSによる網羅的基質解析

7) 上記によって同定された基質の修飾部位同定と機能解析

8) PADI4の癌抑制遺伝子としての解析

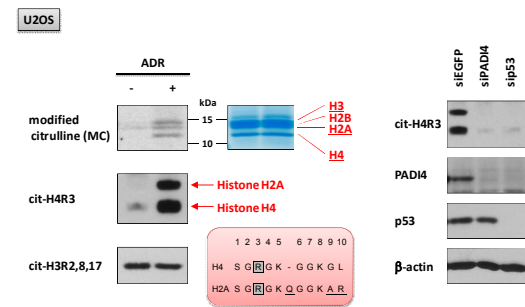
。

#### 4. 研究成果

p53のシトルリン化部位についての解析については、MS解析や変異型p53を用いた解析によって、複数のシトルリン化修飾候補部位を同定した。そこでこれらの領域に対して、抗シトルリン化p53抗体の作成を試みた。残念ながらこれらの抗体でDNAダメージ下では内在性のシトルリン化p53を検出することは困難であり、p53シトルリン化は生理的には検出感度以下で有るという結論となった。またアルギニンをシトルリンに変換したペプチド特異的に反応する抗p53自己抗体は、がん患者の血中において存在が確認できなかった。これらの結果より、PADI4の基質としてのp53の解析は終了した。

これらの結果を元に、p53以外の生理的な条件でのシトルリン化の基質の探索を行った。これまでシトルリン化が報告されているヒストンH3, H4について抗体を用いて検討した結果、H4R3がDNAダメージによってシトルリン化を受けることが明らかとなった。

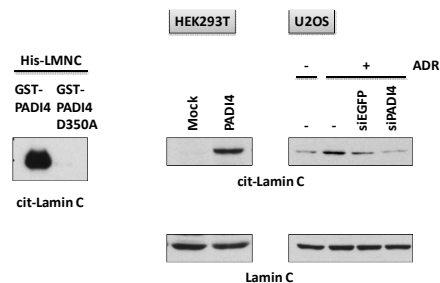
### Citrullination of Histone H4 and Histone H2A in response to DNA damage



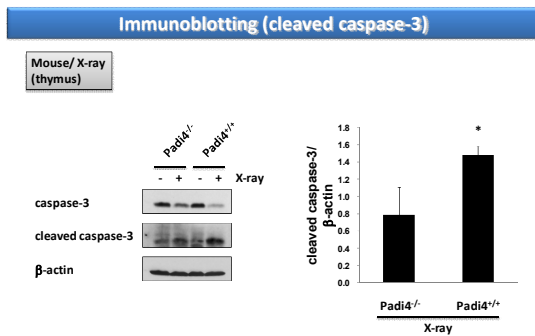
また抗シトルリン化抗体にてPADI4を遺伝子導入した細胞株を染色すると、核膜が強く染色された。核膜の構成蛋白質である、Laminファミリーについて、シトルリン化の有無を検討した結果、LaminCのC末がシトルリン化を受けることが示された。

またPADI4を過剰発現させた細胞から抽出した核を用いた解析によって、ヒストン、LaminCのシトルリン化によってクロマチン構造が弛緩し、DNaseによる核の切断が起きやすくなる事を示した。

### In vivo citrullination of Lamin C

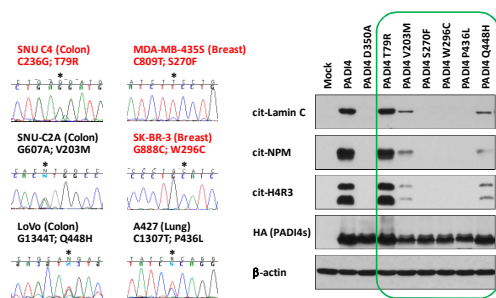


またPADI4ノックアウトマウスの検討によって、胸腺組織においてもγ線照射後ヒストンH4R3のシトルリン化がPADI4依存的に認められた。またノックアウトマウスはTUNEL陽性細胞、活性型caspase3陽性細胞が有意に減少しており、アポトーシス抵抗性を示した。



次いで癌細胞株にて PADI4 の遺伝子変異を探索した所、70 細胞株中 6 細胞株でアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が認められ、さらに内 5 つの遺伝子変異では顕著に酵素活性の低下が認められた。また癌組織における PADI4 の遺伝子変異を探索した所、ICGC 等のデータベースに 8 箇所の変異が登録されていた。これらの変異について酵素活性に与える影響を検討した所、全てで酵素活性の低下が認められた。これらの結果より、PADI4 が癌抑制遺伝子として機能し、さらに細胞周期や RNA splicing などに重要な役割を担うことが示された。

**The role of citrullination in human cancer**



肺癌の Tissue array を用いた検討では、シトルリン化ヒストン陽性細胞では、腫瘍サイズが小さく、また p53 の染色像と逆相関を示すことが明らかとなった。これらの結果より、PADI4 が癌抑制遺伝子として機能し、DNA ダメージ依存的なアポトーシス制御のメディエーターとして働くことが示された。一方、ノックアウトマウスでは、発癌に関して顕著

な phenotype が認められなかった。マウス Padi4 はヒト PADI4 に比べ酵素活性が弱く、この違いが弱い表現型として現れていと考えられた。

**Cit-H4 correlated with low T factor and negative p53 protein**

Association between citrullinated HistoneH4-positivity in NSCLC and patients' characteristics (n=309)

	Total n=309	citHistoneH4 positive n=159	citHistoneH4 negative n=150	P value positive vs. negative
<b>Gender</b>				
Male	214	100	114	
Female	95	59	36	0.0138**
<b>Age(years)</b>				
<65	135	67	68	
≥65	174	92	82	NS(0.6463)
<b>Histological type</b>				
ADC	192	110	82	
SCC	82	35	47	
Others	35	14	21	0.0099**
<b>Smoking status</b>				
Never	90	60	30	
Smoker	219	99	120	0.0007**
<b>pT factor</b>				
T1	132	80	52	0.0136**
T2+T3	177	79	98	
<b>pN factor</b>				
N0	204	104	100	
N1+N2	105	55	50	NS(0.9044)
<b>p53</b>				
positive	130	55	75	0.0079**
negative	179	104	75	

ADC, adenocarcinoma, SCC, squamous-cell carcinoma  
others, large-cell carcinoma(LCC) plus adenosquamous-cell carcinoma(ASC)  
\*\*P < 0.05(Fisher's exact test)  
NS, no significance

また新規の PADI4 の基質の探索を進めていった。候補分子を用いた解析では、cyclinA2 及び p27 がシトルリン化修飾を受ける事を明らかとした。さらにこれらの分子のシトルリン化部位を同定し、特異的抗体の作成を行った。またマウス骨髄組織においては、cyclinA2 の mRNA 量は変化がないものの、タンパク量がノックアウトマウスにおいて野生型に比べて顕著に減少していた。以上の結果より、シトルリン化修飾がタンパク質の安定化に関わる可能性が示唆された。

また Proteome 解析によって、網羅的な基質の探索を行った結果、hnRNP ファミリーが顕著にシトルリン化を受けることが明らかとなった。現在シトルリン化部位の同定、抗体作成を進めている。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 7 件)

- ① C. Tanikawa, M. Espinosa, A. Suzuki, K. Masuda, K. Yamamoto, E. Tsuchiya, K. Ueda, Y. Daigo, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nature communications* 3 (2012) 676.
- ② C. Tanikawa, H. Nakagawa, Y. Furukawa, Y. Nakamura, K. Matsuda, CLCA2 as a p53-inducible senescence

mediator. *Neoplasia* 14 (2012) 141-149.

③ C. Tanikawa, C. Ri, V. Kumar, Y. Nakamura, K. Matsuda, Crosstalk of EDA-A2/XEDAR in the p53 signaling pathway. *Molecular Cancer Research* 8 (2010) 855-863.

〔学会発表〕 (計 14 件)

① Koichi Matsuda, Chizu Tanikawa, Yataro Daigo, Yusuke Nakamura " Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway " 第 71 会 日本癌学会 2012.9.21 札幌

② 松田浩一 "ゲノムワイド関連解析による癌感受性遺伝子の探索" 平成 23 年度 文科省がん支援活動・厚労省対がん 10 カ年研究合同公開シンポジウム 2012.1.31 東京

③ Chizu Tanikawa, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda" Regulation of histone modification and chromatin structure by p53-PADI4 pathway" AACR 2012.4.4 Chicago

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/nakamura/matsuda/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 浩一 (Matsuda Koichi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：90401257

### (3) 連携研究者

谷川千津 (Tanikawa Chizu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30422421