

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670139

研究課題名(和文) ヒストン結合ペプチダーゼによる炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory role of a histone-binding peptidase in inflammatory diseases

研究代表者

西 英一郎 (Nishi, Eiichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30362528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：当初の研究計画通り、初年度に野生型あるいは不活性型NRDcを再導入したMEF細胞の作製、クロマチン免疫沈降(ChIP)に使用可能な抗体を得ることに成功し、最終年度にはこれらを用いて、ChIP、RNAシーケンスを行い、NRDcの標的遺伝子を網羅的に同定することに成功した。また、いくつかの標的遺伝子の転写制御が、NRDcの酵素活性依存的に制御されていることが示唆された。一方個体レベルの炎症疾患モデルとして、1)炎症性腸疾患モデル、2)非アルコール性脂肪肝(NASH)モデル、3)関節リウマチモデルにおいて、NRDc欠損による炎症の顕著な軽減を認めた。

研究成果の概要(英文)：In the first year of the project, we have established MEF-/- cells (MEF cells derived from NRDC-deficient mice) stably re-introduced with wild-type or enzymatically inactive mutant of NRDC. We also established monoclonal antibody against NRDC, which functions well for chromatin immunoprecipitation (ChIP). In the second year, by using those materials, we performed ChIP sequence and RNA sequence to globally identify the target genes for NRDC. As a result, we identified some hundreds of target genes, some of which were differentially regulated by the enzymatic activity of NRDC. We have also confirmed that the level of inflammation in three mouse models of inflammatory diseases (inflammatory bowel disease, NASH and rheumatoid arthritis) is significantly lower in NRDC-deficient mice compared with control mice.

研究分野：分子生物学、内科学

キーワード：転写 ペプチダーゼ 炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

ナルディライジン (NRDc) は主に細胞質に存在する可溶性の酵素で、明らかなシグナルペプチドを有さないが、未知の経路で細胞外に分泌される。一方、典型的な核移行、核外移行シグナルも有さないが、核と細胞質をシャトリングする。もともと我々は、NRDc を増殖因子 HB-EGF の新規細胞表面受容体として同定し (Nishi 他 EMBO J, 2001)、NRDc が ADAM プロテアーゼの活性化を介して HB-EGF の細胞外ドメインシェディングを増強すること、NRDc のシェディング増強効果は HB-EGF に限定されず、TNF- α やアミロイド前駆体タンパク質 (APP) を含む広範な膜蛋白質に及ぶことを明らかにした (Nishi 他 JBC, 2006、Hiraoka 他 J. Neurochem, 2007 など)。さらに NRDc 遺伝子改変マウスの解析より、NRDc がニューレギュリンのシェディングを介して神経軸索・髄鞘形成を司ること (Ohno 他 Nat. Neurosci. 2009)、TNF- α のシェディングとその下流の IL-6 発現増強を介して胃がん進展に関わること (kanda 他 EMBO Mol Med 2012)、APP の切断調節を介してアミロイドプラーク産生を制御すること (Ohno 他 Neurobiol Aging 2013) を明らかにし、NRDc のシェディング調節因子として重要性を明らかにしてきた。一方、最近我々は NRDc の核内における機能、すなわち、1) NRDc が新規修飾特異的 H3 (H3K4me2) 結合タンパク質であること、2) NCoR/SMRT コリプレッサー複合体と結合し転写調節に関わること (Li 他 JBC 2012)、3) 転写コアクター PGK-1 と結合し、細胞・個体レベルにおける熱産生遺伝子転写調節に関わっていること、4) 同転写調節活性に NRDc の酵素活性が必要であること (Nat Comm in press) を明らかにした。NRDc はジメチル H3K4 特異的結合が示された初めてのタンパク質であり、chromo あるいは PHD ドメインなど既知のメチル化認識ドメインを持たない。さらに興味深いのは、少なくとも一部の転写調節活性が、NRDc のプロテアーゼ活性に依存していることである。NRDc 欠損マウスは、複数の炎症疾患モデル (メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、NASH など) で顕著な炎症抵抗性を呈しており、本研究では NRDc が転写調節因子として、いかに炎症制御に関わっているか、とりわけ NRDc の酵素活性が果たす役割を明らかにしたい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NRDc が転写調節因子として、いかに炎症制御に関わっているか、とりわけ NRDc の酵素活性が果たす役割を明らかにすることである。特に、NRDc の標的遺伝子を網羅的に同定し、その中で酵素活性依存性に転写調節に関わる遺伝子を同定する。また、炎症性疾患モデルマウスを用いて NRDc の疾患における役割をさらに明らかに

する。不活性型 NRDc ノックインマウスを作製し、将来的に NRDc のペプチダーゼ活性が炎症制御において *in vivo* で果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

NRDc の酵素活性が転写制御において果たす役割、その炎症制御における意義の解明を目標とし、以下に沿って研究を遂行する。1) 野生型および不活性型 NRDc を null 細胞に再導入した細胞の作製、2) クロマチン免疫沈降法 (ChIP) に使用可能な抗 NRDc モノクローナル抗体の作製、3) 上記 1) の細胞、2) の抗体を用いて ChIP シーケンス、RNA シーケンスを施行し、NRDc の標的遺伝子を網羅的に同定する。さらに、炎症性サイトカインによる発現誘導が、ペプチダーゼ活性依存性にレスキューされる標的遺伝子群を抽出し、同転写調節領域における NRDc および主要転写制御因子、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化などを検討する。4) 炎症疾患モデルマウス (炎症性腸疾患、NASH、リウマチ) における NRDc の臓器特異的役割の検討、5) 不活性型 NRDc ノックインマウスの作製。

4. 研究成果

当初の研究計画通り、初年度に野生型あるいは不活性型 NRDc を再導入した MEF 細胞 (NRDc-/-*WT、NRDc-/-*E>A 細胞) の作製、クロマチン免疫沈降 (ChIP) に使用可能な抗体を得ることに成功し、最終年度にはこれらを用いて、ChIP、RNA シーケンスを行い、NRDc の標的遺伝子を網羅的に同定することに成功した。また、いくつかの標的遺伝子の転写制御が、NRDc の酵素活性依存的に制御されていることが示唆された。一方個体レベルの炎症疾患モデルとして、1) デキストラン硫酸ナトリウム経口投与による炎症性腸疾患モデル、2) 高脂肪食負荷によるメタボリックシンドロームモデル (null マウスで白色脂肪組織における炎症細胞浸潤の減少)、3) コリン欠乏食および高脂肪食負荷による非アルコール性脂肪肝 (NASH) モデル (null マウスで肝臓線維化の減少) において、NRDc 欠損による炎症の軽減を認め、さらに関節リウマチモデル (SKG マウスとの交配) において、NRDc 欠損マウスが顕著な関節炎の減弱を呈することを明らかにした。新たに腸管上皮、マクローファージ特異的 NRDc 欠損マウスを作製し、NRDc の炎症性疾患における臓器特異的役割を明らかにした。

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 6 件)

Ishizu-Higashi S, Seno H*, [Nishi E](#)*,
Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y,
Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K,
Komekado H, Chiba T (*Co-corresponding
author)
Deletion of nardilysin prevents the development
of steatohepatitis and liver fibrotic changes
PLOS ONE 9(5): e98017, 2014
doi:10.1371/journal.pone.0098017

Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A,
Hashimoto A, Sabe H, [Nishi E](#), Kamei K, Arai H,
Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N.
AMAP1 as a negative-feedback regulator of
nuclear factor- κ B under inflammatory
conditions.
Sci Rep. 4:5094. 2014.
doi: 10.1038/srep05094.

Goto K, Sugiyama T, Matsumura R, Zhang
XM, Kimura R, Taira A, Arita E, Iwase K,
Kobayashi E, Iwadate Y, Saeki N, Mori M,
Uzawa A, Muto M, Kuwabara S, Takemoto M,
Kobayashi K, Kawamura H, Ishibashi R, Sakurai
K, Fujimoto M, Yokote K, Nakayama T, Harada J,
Kobayashi Y, Ohno M, Chin H, [Nishi E](#), Machida
T, Iwata Y, Mine S, Kamitsukasa I, Wada T,
Aotsuka A, Katayama K, Kikkawa Y, Sunami K,
Takizawa H, Nakamura R, Tomiyoshi G,
Shinmen N, Kuroda H and Hiwasa T
Identification of Cerebral Infarction-Specific
Antibody Markers from Autoantibodies Detected
in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.
J Mol Biomark Diagn 6: 219. 2015.
doi: 10.4172/2155-9929.1000219

Hiwasa T, Zhang XM, Kimura R, Machida T,
Kitamura K, Yamazoe R, Kunimatsu M, Mine S,
Kobayashi E, Iwadate Y, Saeki N, Takemoto M,
Kobayashi K, Kawamura H, Ishibashi R, Sakurai

KI, Fujimoto M, Yokote K, Iwata Y, Nakayama T,
Harada JY, Kobayashi Y, Ohno M, Chen PM,
[Nishi E](#), Yokota M, Kamitsukasa I, Wada T,
Aotsuka A, Mori M, Uzawa A, Muto M,
Sugimoto K, Kuwabara S, Goto K, Matsumura R,
Takizawa H, Shimada H, Ito M, Wang H, Taira A,
Arita E, Iwase K, Kudo T, Doi H, Nakamura R,
Tomiyoshi G, Shinmen N, Kuroda H
Association of Serum Antibody Levels against
TUBB2C with Diabetes and Cerebral Infarction
J Mol Biomark Diagn 6: 219. 2015.
doi: 10.18314/gjbs.v1i2.27

Hiwasa T, Machida T, Zhang XM, Kimura R,
Wang H, Iwase K, Ashino H, Taira A, Arita E,
Mine S, Ohno M, Chen PM, [Nishi E](#), Kitamura K,
Yamazoe R, Takizawa H, Kashiwado K,
Kamitsukasa I, Wada T, Aotsuka A, Kobayashi E,
Matsutani T, Iwadate Y, Saeki N, Mori M,
Uzawa A, Muto M, Sugimoto K, Kuwabara S,
Iwata Y, Nakayama T, Harada JY, Kobayashi Y,
Takemoto M, Kobayashi K, Kawamura H,
Ishibashi R, Sakurai KI, Fujimoto M, Yokote K,
Goto K, Matsumura R, Sugiyama T, Hayashi H,
Hasegawa R, Shimada H, Ito M, Kudo T, Doi H,
Nakamura R, Tomiyoshi G, Shinmen N, Kuroda
H.
Elevated Levels of Autoantibodies against
ATP2B4 and BMP-1 in Sera of Patients with
Atherosclerosis-related Diseases.
Immunome Res 11: 097, 2015.
doi:10.4172/17457580.1000097

Hiwasa T, Zhang XM, Kimura R, Ohno M,
Chen PM, [Nishi E](#), Ono K, Kimura T,
Kamitsukasa I, Wada T, Aotsuka A, Mine S,
Takizawa H, Kashiwado K, Takemoto M,
Kobayashi K, Kawamura H, Ishibashi R, Yokote
K, Nakamura R, Tomiyoshi G, Shinmen N,
Kuroda H.

Elevated Adiponectin Antibody Levels in Sera of Patients with Atherosclerosis-related Coronary Artery Disease, Cerebral Infarction and Diabetes Mellitus

J Circ Biomark, 5:8, 2016

doi: 10.5772/63218

〔学会発表〕(計 30 件)

鳥口 寛、波多野 悦朗、竹本 研二、田邊 和孝、瀬尾智、田浦 康二郎、上本 伸二、西 英一郎

肝細胞癌の発症進展における Nardilysin (NRDc)の意義の検討

第 114 回日本外科学会定期学術集会 (2014 年 4 月 3 - 5 日、京都)

Ohno M, Hiraoka Y, Matsuura H, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E.

NRDc regulates circulatory dynamics through modulating cardiac sympathetic innervation

The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014, Apr.14-17, 2014, Kyoto, Japan.

西清人, 佐藤 雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 稲垣 暢也, 西英一郎.

ナルディライジンは膵β細胞においてインスリン分泌を制御する

第 61 回日本生化学会近畿支部例会 (2014 年 5 月 17 日)

優秀発表賞受賞

西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野美紀子, 西清人, 西英一郎

ナルディライジンはPGC-1αを制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する

第 61 回 日本生化学会近畿支部例会 (2014/5/30 京都)

西清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 北徹, 稲垣暢也, 木村剛,

西英一郎.

ナルディライジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する

第 46 回日本動脈硬化学会学術集会 (2014 年 7 月 10-11 日)

西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野 美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西清人, 坂本 二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎

ナルディライジンはPGC-1αを制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する

第 46 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2014/7/10-11 東京)

大野美紀子, 平岡義範, 松浦博, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛,

西英一郎

多機能プロテアーゼによる心拍数制御機構

第 35 回日本循環制御医学会総会 2014 年 7 月 4 日~5 日、福岡

会長賞最優秀賞受賞

坂本二郎, 大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 陳博敏, 木村剛, 西英一郎

ナルディライジンの心肥大、心不全における役割

第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2014 年 8 月 8-9 日、大阪)

大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 北徹, 木村剛, 西英一郎

多機能プロテアーゼによる交感神経系を介した循環動態制御機構

Molecular Cardiovascular Conference II 2014 年 9 月 5 日、神戸

西城さやか, 平岡義範, 大野美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西清人, 坂本二郎, 陳博敏, 森田雄介, 北徹, 木村剛, 西英一郎

褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す

第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日、横浜)

大野美紀子, 松浦博, 平岡義範, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎

多機能プロテアーゼによる洞房結節自動能制御機構

第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日、横浜)

坂本二郎, 大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 陳博敏, 森田雄介, 北徹, 木村剛, 西英一郎

ナルディライジンの心肥大、心不全における役割

第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日、横浜)

西清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 森田雄介, 松岡龍彦, 北徹, 稲垣暢也, 木村剛, 西英一郎

ナルディライジンによるインスリン分泌制御の解析

第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日、横浜)

西 英一郎：『セクレターゼ活性化因子
ルディライジンのアルツハイマー病におけ
る意義』
シンポジウム A 産生制御によるアルツハイ
マー病根本治療戦略の進歩
第 33 回認知症学会学術集会（2014 年 11 月
30 日、横浜）

Nishi E, Hiwasa T, Ohno M, Chen PM,
Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y,
Kimura T
Searching for Biomarkers Useful for Acute
Coronary Syndrome Prediction by the
Screening of Auto-antibodies
シンポジウム 動脈硬化の予防戦略：バイオ
マーカー、機能検査および画像の情報をどう
活かすか
第 79 回日本循環器学会学術集会（2015 年 4
月 26 日、大阪）

Saijo S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M,
Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y,
Kita T, Kimura T, Nishi E
Nardilysin in brown adipose tissue
regulates adaptive thermogenesis and body
temperature homeostasis.
第 79 回日本循環器学会学術集会（2015 年 4
月 24-26 日、大阪）

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Saijyo S,
Sakamoto J, Chen P, Morita Y, Matsuoka T,
Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin is a Critical Regulator of
Pancreatic β -Cell Function
第 79 回日本循環器学会学術集会（2015 年 4
月 24-26 日、大阪）

Chen PM, Ohno M, Nishi K, Saijo S,
Sakamoto J, Morita Y, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin, a Potent Biomarker for Acute
Coronary Syndrome, Regulates
Postmyocardial Infarction Remodeling
第 79 回日本循環器学会学術集会（2015 年 4
月 24-26 日、大阪）

Sakamoto J, Ohno M, Nishi K, Saijo S,
Chen PM, Morita Y, Kita T, Kimura T,
Nishi E.
The Role of Nardilysin in Cardiac
Hypertrophy and Heart Failure
第 79 回日本循環器学会学術集会（2015 年 4
月 24-26 日、大阪）

Ohno M, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J,
Chen PM, Kita T, Morita Y, Hiroshi
Matsuura, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin Controls Heart Rate through
the Regulation of Sinus Node Automaticity
第 79 回日本循環器学会学術集会（2015 年 4
月 24-26 日、大阪）

②大野美紀子、平岡義範、松浦博、西清人、
西城さやか、坂本二郎、陳博敏、森田雄介、
北徹、木村剛、西英一郎：ナルディライジン
による交感神経系を介した循環動態の制御
第 16 回日本循環制御医学会 2015 年 6 月
5-6 日、名古屋

②藤井貴之、伊藤宣、吉富啓之、森田侑吾、
小豆澤勝幸、布留守敏、西英一郎、松田秀一
ナルディライジンノックアウトマウスは自
己免疫性関節炎の発症が抑制される
第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会
（2015 年 10 月 22-23 日、富山）

③西英一郎、大野美紀子、陳博敏、西清人、
西城さやか、坂本二郎、森田雄介、日和佐隆
樹、木村剛
多機能ペプチダーゼ NRDc の急性冠症候群
予知マーカーとしての有用性
ワークショップ「生活習慣病のバイオマーカー
研究—原因究明から治療標的の同定まで」
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本
生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、
神戸）

④大野美紀子、平岡義範、西清人、西城さや
か、坂本二郎、陳博敏、森田雄介、松田真太
郎、北徹、木村剛、西英一郎
ナルディライジンによる交感神経分布様式
と循環動態制御機構（口頭・ポスター）
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本
生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、
神戸）

⑤西清人、佐藤雄一、大野美紀子、平岡義範、
西城さやか、坂本二郎、陳博敏、森田雄介、
松田真太郎、北徹、稲垣暢也、木村剛、西英
一郎
ナルディライジンは臍 細胞機能、分化の維
持に必須である（口頭・ポスター）

⑥平岡義範、吉種光、布川莉奈、大野美紀子、
西清人、森田雄介、久米典昭、北徹、木村剛、
深田吉孝、西英一郎
ナルディライジンによる概日リズム制御機
構（ポスター）
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本
生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、
神戸）

⑦坂本二郎、大野美紀子、西清人、西城さや
か、陳博敏、森田雄介、松田真太郎、北徹、
木村剛、妹尾浩、西英一郎
ナルディライジンは p53 活性調節を介して大
腸がん細胞 HCT116 の化学療法感受性を制
御する（ポスター）
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本
生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、
神戸）

⑳西城さやか、平岡義範、大野美紀子、西清人、坂本二郎、陳博敏、森田雄介、松田真太郎、北徹、木村剛、西英一郎
褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す（ポスター）
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、神戸）

㉑森田雄介、大野美紀子、西清人、西城さやか、陳博敏、坂本二郎、松田真太郎、木村剛、西英一郎
ナルディライジンのゲノム上結合領域および転写制御既往の解明（ポスター）
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、神戸）

㉒陳博敏、大野美紀子、西清人、西城さやか、坂本二郎、森田雄介、松田真太郎、木村剛、西英一郎
ナルディライジンは急性冠症候群に対する有用なバイオマーカーであり、心筋梗塞後リモデリングを制御する（ポスター）
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会（2015 年 12 月 1-4 日、神戸）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：ナルディライジンの高感度免疫測定法
発明者：西 英一郎、平岡 義範、松本 恭一、國近 誠
権利者：京都大学（50%）、三洋化成工業株式会社（50%）
種類：特許
番号：特許第 5610256 号
取得年月日：2014 年 9 月 12 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西 英一郎 (NISHI, Eiichiro)
京都大学医学部附属病院・特定准教授
研究者番号：30362528

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者