

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21689028

研究課題名(和文) 関節リウマチ関連遺伝子ペプチジルアルギニンデイミナーゼタイプ4に関する研究

研究課題名(英文) Study of Peptidylarginine deiminase type 4 (PADI4) as a susceptibility gene of rheumatoid arthritis (RA)

研究代表者

鈴木 亜香里 (SUZUKI AKARI)

独立行政法人理化学研究所・自己免疫疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号：00391996

研究成果の概要(和文)：

ケースコントロール関連解析法により RA 関連遺伝子として、PADI4 を同定し、PADI4 の機能として、RA の病態と深く関与していることが予測されたため、その遺伝子改変マウスである、mouse Padi4 ノックアウトマウスを作製した。その遺伝的背景を、C57BL6 と DBA1J に置換し、関節炎誘導実験を行ったところ、関節炎のスコアが低下し、自己抗体である、抗コラーゲン抗体の産生量も減少した。

研究成果の概要(英文)：

PADI4 gene was identified as one of susceptibility genes for RA using case-control association study. To investigate relationship between PADI4 and RA, we generate Padi4-knockout (KO) mice by the deleting exon 1 and 2. Significant decrement was found in the severity score of the arthritic mice between wild type and Padi4 KO mice in the development of CIA. However, no significant difference was detected in the incidence of the CIA. Padi4 KO mice showed significantly lower levels of anti-CII IgG than that wild type. These data suggested that the function of PADI4 gene is important for RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

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：ペプチジルアルギニンデイミナーゼ、シトルリン化、関節リウマチ、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

ケースコントロール関連解析法により関節リウマチ関連遺伝子として、同定した PADI4 遺伝子はタンパク質中のアルギニンをシトル

リンする酵素をコードする遺伝子として知られていたが、その活性が関節リウマチにおいてどのように関係しているかははっきりしていなかった。関節リウマチ患者で特異的

に、また高率で観察される自己抗体の一つに、抗シトルリン化ペプチド抗体（抗CCP抗体）があり、この抗原となるタンパクは、生体内ではPADI遺伝子産物である、ペプチジルアルギニンデアミナーゼという酵素からしか作られないことから、関節リウマチとPADI遺伝子は機能的にも強い関連があると考えられる。しかしながら抗CCP抗体の測定に用いられる抗原は、フィラグリンをもとにした環状化ペプチドを起源とした、合成ペプチドであり、実際の生体内では抗原は存在しないため、抗原としてもともと別のタンパクが存在し、それに対して抗体ができ、antigen spreadingを経て、CCPに反応する抗体ができると考えられる。PADI4酵素の基質となるタンパクについては様々なグループで様々なたんぱくが同定され、フィラグリン、ビメンチン、フィブリノーゲン、コラーゲン、エノラーゼなどがあるが、発症にかかわる抗原はいまだ不明であり、すべての患者が同一の抗原を原因としているかどうか不明である。抗原を作り出していると考えられているPADI4遺伝子はこれらの基質の多くをシトルリン化することは報告されているが、シトルリン化を介して、関節リウマチに対してどのように影響しているのか、その機序は全く不明である。PADI4遺伝子は、機能は明確だが、生体内の役割についても不明である。シトルリン化を介して、ヒストンの脱メチル化に関与している、ということが報告され、この脱メチル化が遺伝子発現の調節につながっていることが、示唆された。また様々ながんにおいて、PADI4遺伝子に関与しているという報告もあり、関節リウマチの発症とCCP抗体に対する抗原と、PADI4、また発がんもPADI4の観点からその機能解析を実施した。

2. 研究の目的

そこで、mouse Padi4 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、関節炎発症への影響を調べるために、関節炎モデルマウスである Collagen induced arthritis (CIA) mouse を実施する。CIA は関節炎発症に遺伝的背景の影響を強く受けるため、C57BL/6(B6)とDBA/1Jに遺伝的背景を変更して、CIA を実施した。PADI4 をノックアウトすることにより、発症率、重症度に影響があるかどうか、また関節炎で多く見られる抗体への影響、抗原への反応性を見るため、T細胞増殖アッセイの実施、サイトカイン濃度への影響も含めて調べる。また、同マウスを用いて、PADI4 遺伝子が生体内でどのような機能を持っているのかについても検討するため、関与が知られているがんにおける機能解析を行った。

3. 研究の方法

1) 関節リウマチにおける PADI4 遺伝子の関与

ヒト PADI4 のカウンターパートである、マウス Padi4 遺伝子をノックアウトして、B6 マウスと交配し、遺伝的背景の99.5%がES細胞由来である129S1からB6に変更されたところで、DBA/1Jと交配し、さらに99.5%がDBA/1Jの遺伝的背景に変わった時点で、バッククロス終了とし、関節炎誘導実験を開始した。

2) Padi4 遺伝子の生理的機能

PADI4 遺伝子が核内に発現し、ヒストンのメチル化を介して、遺伝子発現に影響を及ぼしていることはすでに報告されているが、どのような遺伝子に影響しているかは具体的にはよくわかっていない。

Padi4KOマウスではPadi4が存在しないため、その機能は働かない。そこで、Padi4が関与していると言われている、p53 パスウェイにおいて、どのような変化が見られるかを調べた。

4. 研究成果

1) 関節リウマチにおける PADI4 遺伝子の関与

ノックアウトマウスの表現型を調べるため、個体の成長を観察し、組織をとり、HE染色を実施したが、野生型マウスとの大きな違いは見られない。CIA を実施したところ、関節炎のスコアが平均で20~30%、最大で50%ほど下がる(図1)。しかしながら発症率には差がみられない(図2)。それに伴い、炎症性サイトカインの血中濃度低下やRNAレベルでの発現量低下も観察される。また、抗2型コラーゲン抗体価についても、IgMクラス、IgGクラス(図3)ともに有意に低下する。抗原のシトルリン化に伴い、HLA-DR4との抗原結合能が上昇することで、T細胞に対する抗原提示が起りやすくなり、その結果、自己抗体の形成が起りやすくなると考えられるため、T細胞活性化に関して今後研究を実施する。

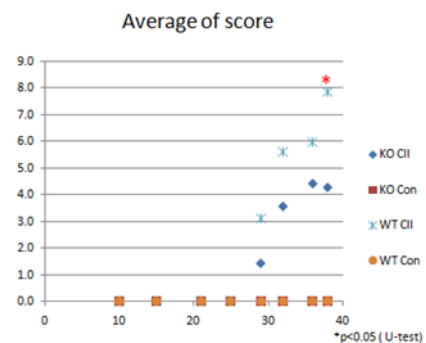


図1

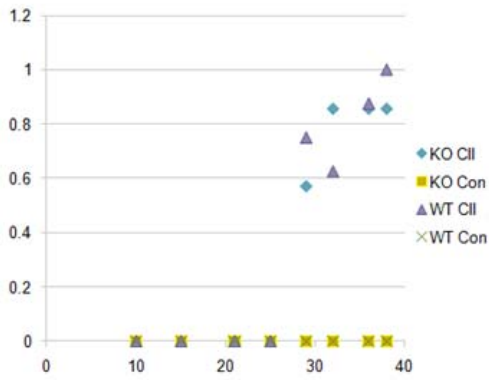


図 2 Incidence

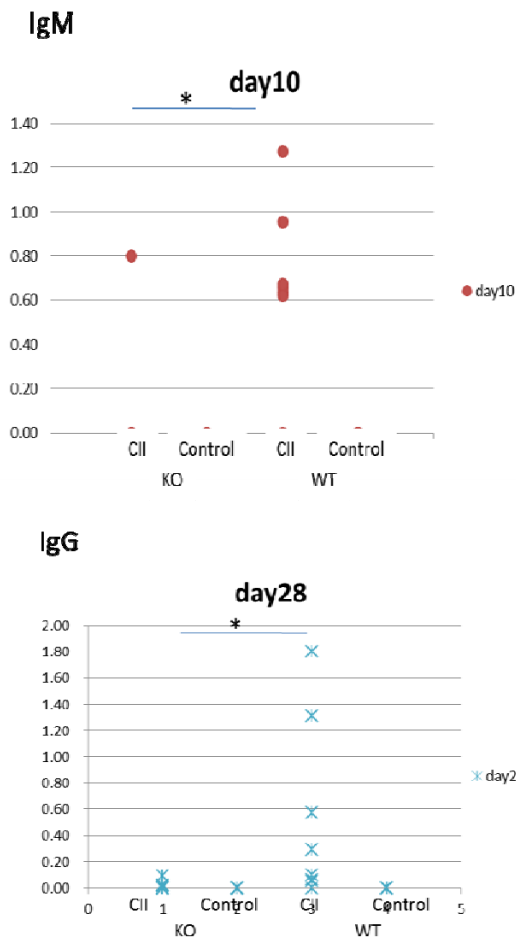


図 3

2) PADI4 の機能としてヒストンのシトルリン化を介した脱メチル化による発現量の調節があげられる。肺がん細胞において、シトルリン化されるヒストンの中でも、ヒストン H4 の 3 番目のアルギニン、アドリアマイシン投与やイラジエーションによって DNA ダメージを細胞に与えると、ヒストン H4R3 シトルリン化が誘導され、同時に p53 発現が抑制されてアポトーシスが誘導 (Tune1 陽性)

される (図 4)。Padi4KO マウスでは、シトルリン化ヒストン H4R3 細胞が減少し、アポトーシス誘導のマーカーとなる、Tune1 陽性細胞も、Caspase-3 陽性細胞もそれに伴って減少する (図 5)。また、Non small cell lung cancer では、citH4R3 陽性患者では細胞はより小さい (p=0.014) ことがわかった。

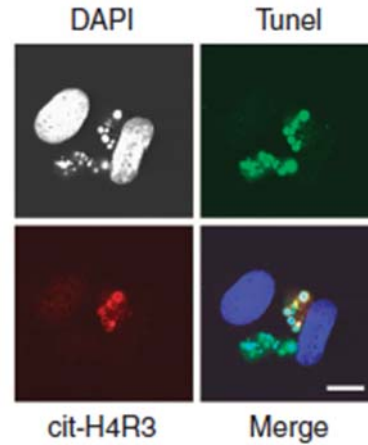
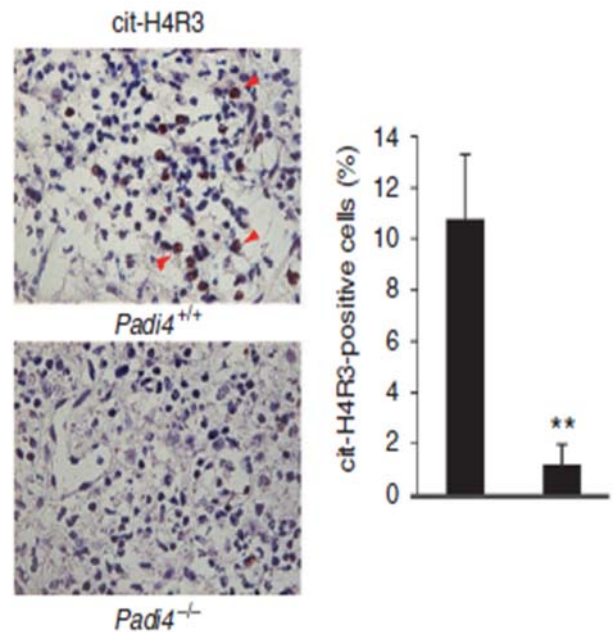


図 4



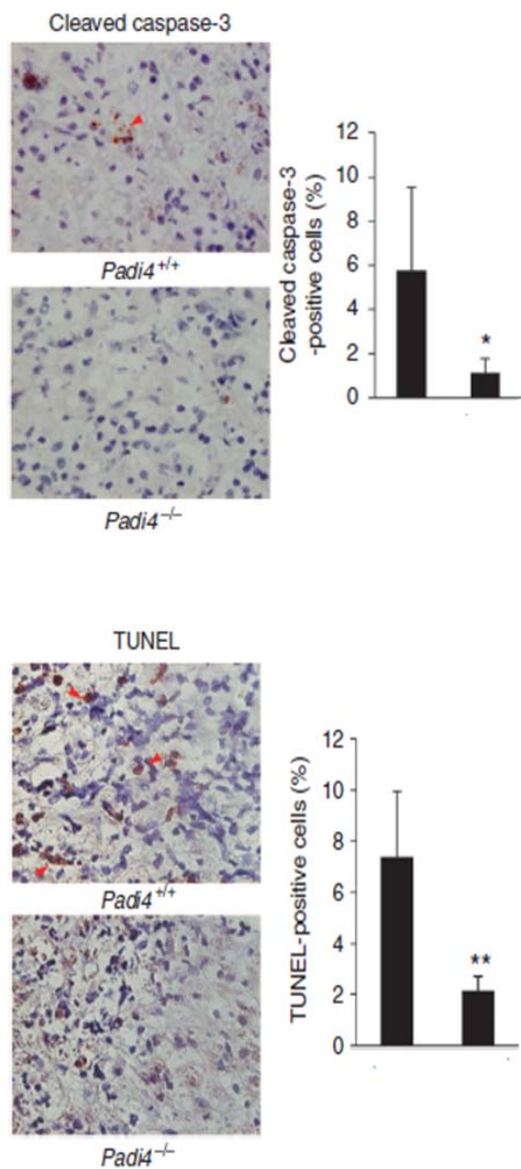


図 5

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 2 件)

Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway
Tanigawa C., Espinosa M., Suzuki A., Matsuda K., et al. Nature Communications in press.

Insight from Genome-Wide Association Studies in Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis,
Suzuki A., Kochi Y., Okada Y., and Yamamoto K. FEBS letters, ,585 (23) 3627-3632, 2011

〔学会発表〕 (計 2 件)

The role of PAD4 in hematopoietic stem cells and its molecular mechanisms. Katsuhiko Nakashima et al. 2010, 日本分子生物学会, 神戸 12/7-10

Functional study of Peptidylarginine deiminase type 4 as genetic risk factor for RA. A.Suzuki 2011, 61st American Society of Human Genetics, Montreal, Canada 10/11-15

〔図書〕 (計 1 件)

関節リウマチ滑膜における P AD-2, P AD-4 発現リウマチ科 40 巻 4 号 p422-426
鈴木亜香里、山田亮、山本一彦

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亜香里 (SUZUKI AKARI)

独立行政法人理化学研究所・自己免疫疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号：3 9 1 9 9 6