

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590577

研究課題名(和文) Th17細胞分化を負に制御するLIM蛋白ファミリーの役割の解明

研究課題名(英文) Clarification of the roles of LIM proteins in the negative regulation of Th17 cell differentiation

研究代表者

田中 貴志 (TAKASHI, TANAKA)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00415225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究において、われわれは、LIM蛋白ファミリーに属するPDLIM4が、Th17細胞分化に必須の転写因子であるSTAT3に結合するとともに、LIMドメインを介して蛋白脱リン酸化酵素であるPTPBLをリクルートしてSTAT3を脱リン酸化することによりTh17細胞分化を負に制御することを明らかにした。さらに、ヒトのPDLIM4のLIMドメイン内の一塩基多型が、関節リウマチの疾患感受性に関与することも明らかにした。以上より、PDLIM4はTh17細胞分化を負に制御することにより自己免疫疾患の発症を防いでおり、PDLIM4の機能異常が自己免疫疾患の原因になりうるということが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The differentiation of Th17 cells is tightly regulated, otherwise exaggerated Th17 responses causes autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis. We have demonstrated that PDLIM4 bound to STAT3, a key transcription factor for Th17 cell development, and negatively regulated Th17 cell differentiation. PDLIM4 also associated with and recruited to PTPBL, a protein tyrosine phosphatase, through LIM domain, and facilitated dephosphorylation of tyrosine residue of STAT3, thereby suppressing STAT3 signaling. We further found that a single nucleotide polymorphism (SNP) of PDLIM4 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. Interestingly, PDLIM4 mutant containing this amino acid substitution in the LIM domain revealed reduced binding to PTPBL, and therefore partially impaired to dephosphorylate STAT3 and suppress STAT3 signaling. These data delineate an essential role of PDLIM4 to prevent the onset of human autoimmune diseases by negatively Th17 cell differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：免疫学 Th17細胞 LIM蛋白 STAT3 SNP

1. 研究開始当初の背景

Th17 細胞は、最近新しく発見されたヘルパー T 細胞の亜集団であるが、この Th17 細胞の過剰な活性化が自己免疫疾患の発症および増悪化に関与することが示唆されている。よって、Th17 の活性化は厳密に制御される必要がある。しかしながら、Th17 の活性化を自ら調節する分子メカニズムはこれまでのところほとんど解明されていない。PDLIM2 (PDZ and LIM domain-containing protein-2) は、申請者が、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単離した核内蛋白である (Tanaka et al, Immunity, 22, 729-736, 2005)。PDLIM2 は、N 末端部に PDZ ドメインを、C 末端部に LIM ドメインを有しており、LIM 蛋白ファミリーに属する。LIM ドメインは、構造的に RING フィンガードドメインと類似しており、申請者は、世界に先駆けて、LIM ドメインがユビキチンリガーゼ活性を有する新たなモチーフであることを報告し、実際、PDLIM2 が、CD4⁺T 細胞において、STAT4 をユビキチン化して分解することにより、Th1 細胞分化を自ら調節することを明らかにした。さらに申請者は、この PDLIM2 が、STAT3 に対してもユビキチンリガーゼとしてはたらくこと、すなわち、STAT3 をユビキチン化・分解・不活性化することにより、Th17 細胞分化に対しても自らの調節因子として作用することを明らかにした (Sci. Signal. 4(202), ra85, 2011)。さらに最近の研究により、PDLIM2 と類似する LIM 蛋白である PDLIM4 が、STAT3 の活性化を抑制するようにはたらくことが明らかになった。興味深いことに、PDLIM4 の LIM ドメインはユビキチンリガーゼ活性を有しておらず、実際、PDLIM4 は STAT3 をユビキチン化しなかった。ところが、PDLIM4 は、STAT3 の活性化に重要なチロシン残基のリン酸化を強力に抑制した。PDLIM4 が核ではなく細胞質にのみ存在することから、PDLIM4 は、細胞質内において STAT3 のリン酸化を抑制することにより、STAT3 活性化を自ら制御することが明らかになった。以上のことから、LIM 蛋白ファミリーに属する因子群はそれぞれ異なった分子機構で Th17 細胞を自ら制御する可能性が示唆された

2. 研究の目的

本申請研究では、LIM 蛋白ファミリーに属する因子群の中で、Th17 細胞の分化に必須の転写因子 STAT3 を介するシグナルを抑制することにより Th17 細胞の分化を自ら制御するものを同定し、その分子メカニズムを解明することを目指す。まず、LIM 蛋白ファミリーに属する因子群が、STAT3 を介するシグナル伝達を抑制することができるかどうか、およびその抑制作用の

分子メカニズムを解析する。さらに、これらの LIM 蛋白が Th17 細胞の分化・活性化を自ら制御することができるかどうかを明らかにすることを旨とする。具体的には次の 3 つのことを研究期間内に明らかにする。

- (1) PDLIM4 が STAT3 を不活性化する分子メカニズムを解明する。
- (2) PDLIM4 が細胞レベル・個体レベルで Th17 分化を自ら制御するかどうかを解明する。
- (3) LIM 蛋白ファミリーの他の因子が STAT3 の活性化および Th17 分化を自ら制御するかどうかを解明する。

3. 研究の方法

(1) PDLIM4 が STAT3 を不活性化する分子メカニズムを解明する。

JAK-STAT シグナル伝達経路においては、受容体にサイトカインが結合すると JAK ファミリーに属するチロシンキナーゼが活性化し、自己および受容体をリン酸化する。次に、転写因子である STAT がリクルートされて、受容体のリン酸化チロシンに結合する。さらに JAK が STAT のチロシン残基をリン酸化する。リン酸化された STAT は核に移行して標的の DNA 配列に結合することにより遺伝子の発現を誘導する。上述のように、PDLIM4 は STAT3 のチロシンリン酸化を抑制する。PDLIM4 は脱リン酸化活性をもつ構造を有していないことから、PDLIM4 が何らかの蛋白脱リン酸化酵素をリクルートして STAT3 の脱リン酸化を促進すると予想される。これまでに多くの蛋白脱リン酸化酵素が報告されてきた。まず、RT-PCR 法を用いて、この中で CD4 陽性 T 細胞に発現しているものを検索する。そして、得られた候補の siRNA を作製し、ルシフェラーゼアッセイにおいて PDLIM4 が STAT3 の転写活性を抑制する作用を阻害するものをスクリーニングする。これでポジティブな結果が得られた蛋白脱リン酸化酵素に関して、実際に STAT3 のリン酸化を抑制するかどうか、および、PDLIM4 や STAT3 と結合するかどうかを確かめる。さらには、ロックアウトマウスを入手または作製し、候補の蛋白脱リン酸化酵素が個体レベルでも STAT3 のリン酸化を自ら制御するかどうかを調べる。

(2) PDLIM4 が細胞レベル・個体レベルで Th17 分化を自ら制御するかどうかを解明する。

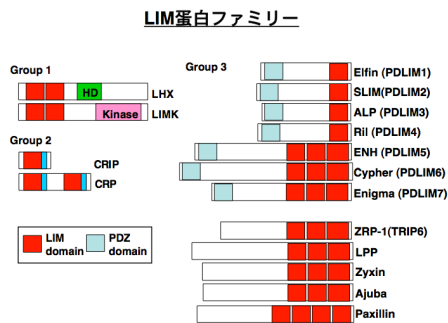
申請者は、すでに PDLIM4 欠損マウスを作製済みである。そこで、野生型および PDLIM4 欠損マウスの脾臓またはリンパ節より CD62L 陽性 CD4 陽性のナイーブ T 細胞を採取し、抗 CD3 抗体および IL-6+TGFβ

存在下で4日間培養することにより Th17 細胞分化を誘導する。この細胞における IL-17, IL-21, IL-22 などのサイトカインの発現を real time PCR で調べることにより、PDLIM4 欠損マウスにおいて Th17 細胞分化が亢進しているかどうかを解析する。

さて、生体においては、細菌・真菌感染の際に Th17 細胞の分化が強力に誘導され、これらの病原微生物の排除に Th17 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、細胞内寄生細菌感染の際の肉芽腫の形成に Th17 細胞が必須であることも報告されている。そこで、細胞内寄生細菌である Propionibacterium acnes (P.acnes) の加熱死菌を野生型および PDLIM4 欠損マウスに投与して、個体レベルで Th17 細胞分化を誘導する。そして、7日後の脾臓 CD4 陽性 T 細胞からの IL-17 などのサイトカインの産生、および、肝臓における肉芽腫の形成が PDLIM4 欠損マウスにおいて亢進しているかどうかを調べることにより、PDLIM4 が個体レベルにおいても Th17 分化を負に制御しているかどうかを解析する。

(3) PDLIM2 以外の LIM 蛋白ファミリー因子が STAT3 の活性化および Th17 分化を負に制御するかどうかを解明する。

LIM 蛋白ファミリーに属する因子は大きく3つに分類される。PDLIM2 はその中の Group3 に属する(下図参照)。



このグループの蛋白は LIM ドメインと PDZ ドメイン以外には明らかな機能的な構造はもたず、その本来の機能はほとんど明らかになっていない。Group3 に属する LIM 蛋白は約 10 種類知られているが、まず real-time PCR 法を用いて、この中で CD4 陽性 T 細胞に発現しているものを検索する。ポジティブな結果が得られたものに関しては、それらの LIM 蛋白の細胞内局在をウェスタンブロット法または免疫細胞染色法を用いて調べる。また、その発現ベクターを作製し以下の実験を行う。PDLIM2 および PDLIM4 と特に homology の高い Elfin(PDLIM1) と ALP(PDLIM3)についてはすでに発現ベクターを作製済みである。

(a)、ルシフェラーゼアッセイを用いて LIM

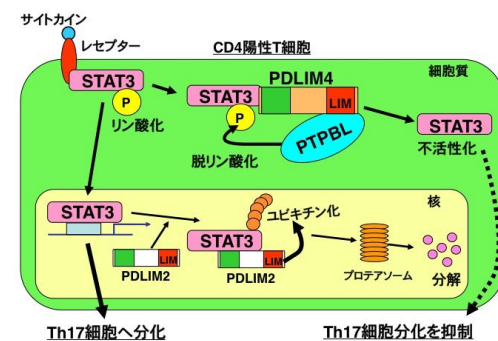
- 蛋白が STAT3 を介するシグナル伝達経路を抑制できるかどうか調べる。
- (b)、LIM 蛋白が STAT3 と会合しているかどうかを免疫沈降の手法を用いて調べる。
- (c)、LIM 蛋白と STAT3 を 293T 細胞に強制発現したときに、STAT3 蛋白がユビキチン化・分解されるか、および STAT3 のチロシンリン酸化や核移行が抑制されるかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) PDLIM4 は STAT を脱リン酸化・不活性化することにより Th17 細胞分化を負に制御する

これまでに30種類以上の LIM 蛋白が報告されているが、本研究では、PDLIM2 と同様に PDZ ドメインと LIM ドメインの両方を有する LIM 蛋白(PDLIM1-7)に焦点を当てて解析を行った。まずは、その中でも PDLIM2 と構造的に最も相同性が高い PDLIM4 に関して解析を行ったところ、PDLIM4 が STAT3 を介するシグナル伝達を負に制御することを見出した。ところが、PDLIM4 はユビキチンリガーゼ活性を有しておらず、実際 PDLIM4 は STAT3 をユビキチン化しなかった。さらに、PDLIM4 は核内ではなく細胞質に存在しており、蛋白脱リン酸化酵素である PTP-BL をリクルートして、STAT3 の活性化に必須のチロシン残基を脱リン酸化することにより STAT を不活性化した(図1)。

図1 PDLIM2とPDLIM4によるTh17細胞分化の負の制御の分子機構



また、PDLIM4 欠損マウス由来の T 細胞においては、野生型マウス由来 T 細胞と比べて、Th17 細胞分化が亢進しており STAT3 のチロシンリン酸化も増強していた。さらに、個体レベルでの Th17 反応を調べるために、PDLIM4 欠損マウスを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の実験を行ったところ、Th17 の産生が亢進しており、それに伴って野生型マウスと比べて、神経症状が有意に亢進していた。以上より、PDLIM4 は、STAT3 を脱リン酸化し不活性化することにより、Th17 細胞分化を負に制御していることが明らかになった。以上の結果から、LIM 蛋白は、

LIM ドメインを介してそれぞれ異なった細胞内因子と結合しこれをリクルートすることにより、それぞれ異なったメカニズムで標的蛋白を不活性化するアダプター分子として機能していると考えられた。

(2) ヒトの PDLIM4 遺伝子の一塩基多型は関節リウマチの疾患感受性と関連する

さらに PDLIM4 の異常がヒトの自己免疫疾患の病因病態に關与するかどうかを解明するために、ゲノムワイド関連解析(GWAS)を行った。その結果、PDLIM4 の LIM ドメイン内のアミノ酸置換を伴う一塩基多型(SNP)が、関節リウマチの疾患感受性に關与することが明らかになった(オッズ比:1.13, P 値:0.0041)。この SNP は、LIM ドメインの N 末端付近にある 259 番目のグリシン残基がシステインに置換されたもので、日本人の約 30% が有する。このアミノ酸置換により、本来は 8 つの保存されたシステイン/ヒスチジン残基を持つ LIM ドメインに、さらにもう 1 つシステインが付加されることになる。このアミノ酸置換を有する PDLIM4 は、野生型の PDLIM4 と比べて PTPBL への結合が低下しており、このため STAT3 を脱リン酸化・不活性化する活性が有意に傷害されていた。このことから、この PDLIM4 の SNP を有する場合、PDLIM4 が STAT3 を不活性化して Th17 細胞分化を負に調節する機能が低下するために上記のような疾患を発症しやすくなると考えられた。以上の結果より、炎症反応を誘導するシグナル伝達を負に制御する因子の機能異常が、ヒトの自己免疫疾患の発症と関連していることが明らかになった。

(3) その他の LIM 蛋白ファミリーの解析

その他の LIM 蛋白に関しては、現在 PDLIM1 と PDLIM7 に関して解析を進めている。PDLIM1 に関しては、細胞に PDLIM1 を強制発現させると NF- κ B の核移行を阻害すること、および、PDLIM1 をノックアウトした樹状細胞においては、逆に NF- κ B の核移行が促進されることにより炎症性サイトカインの発現が亢進することが明らかになった。以上の結果から、PDLIM1 は NF- κ B を細胞質内に留めることにより、NF- κ B シグナルおよび炎症反応を負に制御していることが示唆された。

一方、PDLIM7 は NF- κ B の p65 サブユニットをユビキチン化・分解したことから、PDLIM2 と同様ユビキチンリガーゼであると考えられた。さらに、PDLIM7 が PDLIM2 とヘテロダイマーを形成していること、および、PDLIM7 をノックダウンした細胞においては、PDLIM2 が NF- κ B p65 を分解する活性が著明に阻害されることから、PDLIM7 は PDLIM2 と協調して NF- κ B p65 をユビキチ

ン化・分化・不活性化することにより炎症反応を負に制御していることが示唆された。以上の結果より、LIM 蛋白はそれぞれ異なったメカニズムで炎症反応を負に制御する新たなファミリーであると考えられた。

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4件)

- 1, Tanaka, T., Shibasaki, A., Ono, R., Kaisho, T. HSP70 is required for PDLIM2-mediated degradation of the p65 subunit of NF- κ B to negatively regulate NF- κ B signaling. **Sci. Signal.** 7(356):ra119, 2014. doi: 10.1126/scisignal.2005533 査読有
- 2, Yamazaki, C., Sugiyama, M., Ohta, T., Hemmi, H., Hamada, E., Sasaki, I., Fukuda, Y., Yano, T., Nobuoka, M., Hirashima, T., Iizuka, A., Sato, K., Tanaka, T., Hoshino, K., Kaisho, T. Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. **J. Immunol.**, 190, 6071-6082, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1202798 査読有
- 3, Sasaki, I., Hoshino, K., Sugiyama, T., Yamazaki, C., Yano, T., Iizuka, A., Hemmi, H., Tanaka, T., Saito M., Sugiyama, M., Fukuda, Y., Ohta, T., Sato, K., Ainai, A., Suzuki, T., Hasegawa, H., Toyama-Sorimachi, N., Kohara, H., Nagasawa, T., Kaisho, T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. **Blood** 120, 4733-4743, 2012. doi: 10.1182/blood-2012-06-436527 査読有
- 4, Tanaka, T., Yamamoto, Y., Muromoto, R., Ikeda, O., Sekine, Y., Grusby, M., J., Kaisho, T., Matsuda, T. PDLIM2 inhibits T Helper 17 cell development and granulomatous inflammation through degradation of STAT3. **Sci. Signal.** 4(202), ra85, 2011. doi: 10.1126/scisignal.2001637 査読有

[学会発表](計18件)

1. 田中貴志 「分子から病気へ/炎症反応を負に制御する分子機構の解明と GWAS を用いた自己免疫疾患との関連解析」 第 6 回リウマチ膠原病ウインターセミナー@聖路加、聖路加国際病院(東京) 2014 年 2 月 14 日。

2. 田中貴志 「分子から病気へ/炎症反応を負に制御する分子機構の解明とGWASを用いた自己免疫疾患との関連解析」 第三回 明石町リウマチ連携セミナー (東京) 2014年10月22日。
3. Tanaka, T, "Negative regulation for inflammatory responses and its association with autoimmune diseases." Monash Univ. & RIKEN IMS Workshop (RIKEN, Yokohama, Japan) August 5, 2014.
4. Sibazaki A, Tanaka T. "PDLIM7 is a ubiquitin E3 ligase that heterodimerizes with PDLIM2 and negatively regulates NF- κ B signaling." 第42回日本免疫学会学術集会、(千葉) 2013年12月12日。
5. Tanaka, T, "Regulation of inflammatory responses by LIM proteins." The 5th LJI-RCAI Workshop "New Horizon in Immune Regulation towards Disease Intervention" (RIKEN, Yokohama, Japan) October 31, 2013.
6. 田中貴志 「炎症反応を負に制御する分子機構の解明」大阪南医療センター/Talk with the expert セミナー (大阪) 2013年10月11日。
7. Tanaka, T, "PDLIM4 negatively regulates Th17 cell differentiation by dephosphorylation of STAT3 transcription factor." JST-CREST International Symposium, Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease (Tokyo, Japan) February 13, 2013.
8. 小野 瑠美子、田中貴志 "PDLIM1 negatively regulates NF- κ B signaling by sequestering p65 subunit of NF- κ B in the cytoplasm." 第41回日本免疫学会学術集会、(神戸) 2012年12月7日。
9. 田中貴志、高地雄太、山本一彦、改正恒康 "A non-synonymous SNP of PDLIM4 is associated with susceptibility of rheumatoid arthritis and Graves' diseases." 第41回日本免疫学会学術集会、(神戸) 2012年12月5日。
10. Tanaka, T, "Negative regulation of inflammatory responses by LIM proteins." The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (Tokyo, Japan) October 24, 2012.
11. Tanaka, T, "Clarifying the molecular mechanisms that regulate inflammatory responses." RIKEN - Novo Nordisk A/S Scientific Forum (RIKEN, Yokohama, Japan) April 19, 2012.
12. 田中貴志 「LIM 蛋白ファミリーによる Th 細胞分化の負の制御機構」第132回日

- 本薬学会 (札幌) 2012年3月30日。
13. Tanaka T, Hirashima T, Kaisho T. PDLIM4 negatively regulates the differentiation of multiple lineages of T-helper cells by dephosphorylation of STAT transcription factors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, "Th17 Cells in Health and Disease" (Keystone, Colorado, USA) February 8, 2012
 14. Tanaka, T, "HSP70 is essential for PDLIM2-mediated termination of NF- κ B signaling" University of Michigan-RCAI Joint Workshop (RIKEN, Yokohama, Japan) December 1, 2011.
 15. Tanaka, T, Yamamoto Y, Muromoto R, Ikeda O, Sekine Y, Grusby MJ, Kaisho T, Matsuda T. "PDLIM2 inhibits T helper 17 cell development and granulomatous inflammation through degradation of STAT3" 2011 Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology/Symposium #3, Effector T cells (Chiba, Japan) November 28, 2011.
 16. Hirashima, T, Kaisho, T, Tanaka, T. "PDLIM4 negatively regulates STAT signaling by recruiting protein tyrosine phosphatases." 第40回日本免疫学会学術集会、(千葉) 2011年11月28日。
 17. Tanaka, T, Kaisho, T, "HSP70 is essential for PDLIM2-mediated termination of NF- κ B signaling." 第40回日本免疫学会学術集会、(千葉) 2011年11月27日。
 18. 田中貴志 「Heat Shock Protein 70 (HSP70) による NF- κ B シグナルの不活性化機構」第20回内毒素・LPS 研究会 (東京) 2011年6月23日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0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0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/ims/inflamm_reg/

<http://www.ims.riken.jp/labo/36/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・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00415225

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし