

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23791107

研究課題名(和文) リウマチ関連タンパク質 PAD4 の骨髄造血細胞における役割

研究課題名(英文) Role of rheumatoid arthritis-related protein PAD4 in hematopoiesis

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)：

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4 (PAD4) は、ヒストン H3 をシトルリン化して転写を制御する転写制御因子である。PAD4 は骨髄等の造血系組織に高い発現がみられるがその生理機能はほとんど分かっていなかった。本研究により、骨髄中の造血多能性細胞において PAD4 が発現していることを明らかにした。PAD4 欠損マウスを用いた解析から、PAD4 欠損マウスでは野生型に比べ造血多能性細胞が増加していた。PAD4 欠損マウスの造血多能性細胞では *c-myc* 遺伝子の発現が亢進しており、PAD4 が *c-myc* の発現を抑制することが示唆された。クロマチン免疫沈降等の解析から、PAD4 は *c-myc* 遺伝子の upstream において転写因子 LEF1 とヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 と相互作用しその転写を制御することが示唆された。これらのことから、PAD4 は、*c-myc* 遺伝子の転写を制御することで造血多能性細胞の増殖を調節することが示された。

研究成果の概要(英文)：

Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) functions as a transcriptional co-regulator by catalyzing the conversion of histone H3 arginine residues to citrulline residues. Although the high level of PAD4 expression in bone marrow cells suggests its involvement in hematopoiesis, its precise contribution remains unclear. Here, we show that PAD4, which is highly expressed in lineage⁻ Sca1⁺ c-kit⁺ (LSK) cells of mouse bone marrow compared with other progenitor cells, controls *c-myc* expression by catalyzing the citrullination of histone H3 on its promoter. Furthermore, PAD4 is associated with lymphoid enhancer-binding factor 1 and histone deacetylase 1 at the upstream region of the *c-myc* gene. Supporting these findings, LSK cells, especially multi-potent progenitors (MPPs), in PAD4-deficient mice show increased proliferation in a cell-autonomous fashion compared with those in wild-type mice. Together, our results strongly suggest that PAD4 regulates the proliferation of MPPs in the bone marrow by controlling *c-myc* expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：シトルリン化、エピジェネティクス、造血

1. 研究開始当初の背景

1999年、関節リウマチ患者の血清中でみ

られる自己抗体が、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、オランダの Serra 博士らのグループより報告された。フィラグリンのシトルリン化は、Peptidylarginine deiminase (PAD) によってのみ生成されることから、PAD の自己免疫疾患への関与がこのときはじめて示唆された。この発見をもとに開発されたサイクリックシトルリンペプチド (CCP) は、関節リウマチの早期診断薬として有効であり、現在では広く使われるようになっている。さらに最近、PAD のファミリー遺伝子である PAD4/PADI4 に、リウマチ患者に優位にみられる 1 塩基多型がみつき、それがリウマチ発症と強く関連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。しかしながら、PAD4 によるリウマチ発症のメカニズムはほとんど分かっていない。

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。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)。

シトルリン化されたタンパク質は、正電荷を失い、構造や機能を大きく変化させることが分かっている。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おり、それぞれ異なる組織分布を示す。

その中のひとつである PAD4 は、ヒト白血病細胞の分化に伴い誘導される遺伝子として我々が最初に同定した (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、クロマチン構造変化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、転写や複製などのゲノム機能制御、ひいては生体や疾患発症に非常に重要であり、盛んに研究されている。

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 を介する転写を制御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分かっていなかった。

2. 研究の目的

Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) は、リウマチ関連遺伝子として注目され、基礎から臨床分野において盛んに研究されている。近年、PAD4 はクロマチンを修飾し、エストロゲン受容体や p53 による遺伝子の転写を抑制することが分かってきた。PAD4 は、造血器官や子宮において高い発現がみられ、細胞増殖や炎症過程に関わることが示唆されているが、その生理機能はほとんど分かっていない。

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・単球、脾臓そして子宮において特に高い発現がみられる。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。

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 ノックアウト (PAD4^{-/-}) マウスを用いた生理機能の解析を進めた。本研究の目的は、主にノックアウトマウスを用いて PAD4 の生理機能とその分子機構を解明し、関節リウマチ発症との関連性を明らかにすることである。この研究成果は、PAD4 によるリウマチ発症機構の解明、新規リウマチ治療薬の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

①FACS による骨髄造血細胞のプロファイル解析

PAD4 欠損 (PAD4^{-/-}) マウスにおける骨髄造血細胞のプロファイルを FACS により解析し、野生型 (WT) マウスと比較した。造血は、長期の自己増殖能を持つ造血幹細胞 (HSC) から、多能性前駆細胞 (MPP, LRP) を経て、骨髄球系前駆細胞 (CMP)、リンパ球系前駆細胞 (CLP) に分化する。CMP は、さらに顆粒球-マクロファージ前駆細胞 (GMP) と巨核球-赤血球前駆細胞 (MEP) を経て、最終的に、好中球や単球、巨核球、赤血球へと成熟する。一方、CLP は、B 細胞、T 細胞、NK 細胞などのリンパ球へと分化する (図 1)。これら前駆細胞や成熟細胞は、それぞれの表面抗原を用いた FACS 解析により、分離同定することが可能である。

②LSK 細胞の増殖性 (BrdU を用いて)

PAD4^{-/-} マウスにおいて LSK 細胞の増殖状態を知るために、プロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与し、24 時間後の LSK 細胞への BrdU の取り込みを解析した。

③骨髄移植

放射線照射した PAD4^{-/-} マウスと WT マウスに、B6/Ly5.1 マウスから採取した骨髄を移植し、LSK 細胞の数を調べた。また、逆に放射線照射した B6/Ly5.1 マウスに、PAD4^{-/-} マウスあるいは WT マウスから採取した骨髄を移植し LSK 細胞の数を調べた。

④PAD4 欠損により LSK 細胞において発現変動する遺伝子

PAD4 は、クロマチン修飾により遺伝子の発現を制御するタンパク質であるため、PAD4^{-/-}マウスと野生型マウスの LSK 細胞から RNA を抽出しマイクロアレイ解析で網羅的に遺伝子発現を解析した。また、リアルタイム PCR でも発現を確認した。

⑤クロマチン免疫沈降による PAD4 標的遺伝子の同定

マイクロアレイにより同定された遺伝子の中から、増殖に関連する遺伝子について調べる。これら遺伝子のプロモーター領域に、PAD4 やシトルリン化ヒストンが結合しているかどうかについて、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を用いて解析した。

⑥造血細胞における PAD4 の発現解析

FACS セルソーターにより骨髓造血前駆細胞をそれぞれのマーカーで分取し、リアルタイム PCR で PAD4 の発現を解析した。また、免疫細胞染色により細胞内での局在も明らかにした。

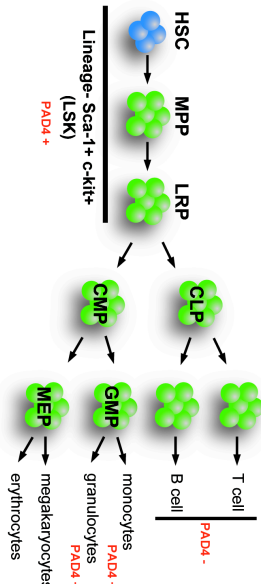


図 1、造血と PAD4 の発現

4. 研究成果

血液細胞は、骨髓においてひとつの造血幹細胞 (HSC) から様々な分化過程を経てつくり、末梢血液中を循環する (図 1)。PAD4 は骨髓、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、骨髓血液細胞における詳細な発現解析はない。そこで最初に、骨髓での発現を詳細に調べるために、マウス骨髓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、CMP, GMP, CLP における発現は低いもしくは、ほぼ検出されなかった。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 2)。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た。

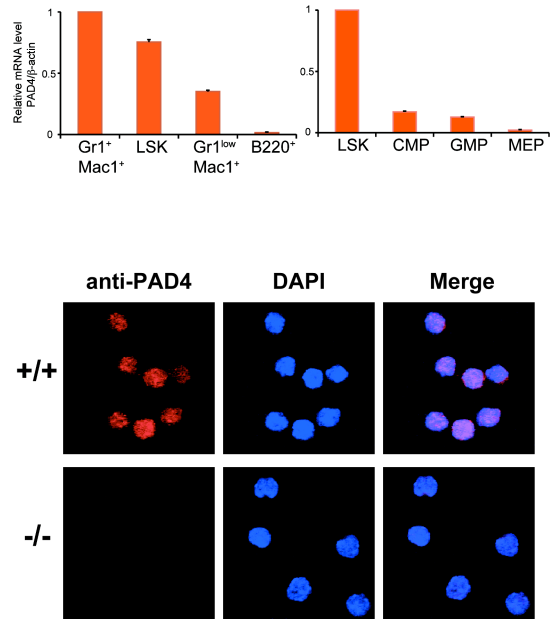


図 2 造血細胞における PAD4 の発現

次に、PAD4^{-/-}マウスと WT マウス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 3)。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。

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増加していた。そのなかでもがん遺伝子である c-myc 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、c-myc 遺伝子の約 1 kb 上流に 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。

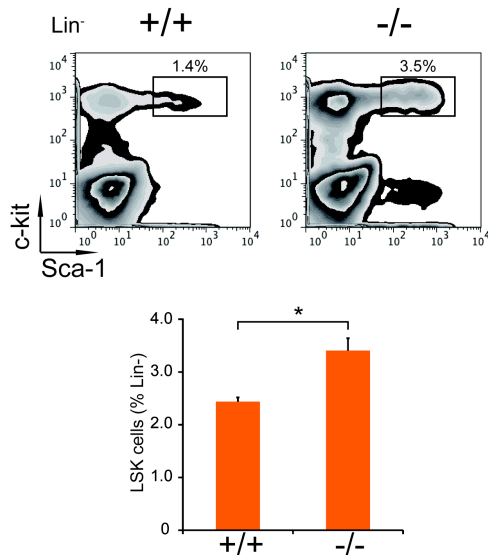


図3 PAD4欠損によるLSK細胞の増加

さらに、PAD4によるc-myc遺伝子発現制御の分子機構を明らかにするために、PAD4と相互作用する転写制御因子を探索した。その結果、PAD4結合部位において転写因子LEF1とヒストン脱アセチル化酵素HDAC1が相互作用することを、免疫沈降法やChIP法により明らかにした。

これらの結果から、PAD4は、c-mycの上流においてLEF1およびHDAC1と相互作用し、ヒストンをシトルリン化することでc-myc遺伝子の発現を制御する。また、これにより造血多能性細胞の増殖を調節していることが明らかとなった(図4)。このことは、PAD4ががん抑制因子として機能することを示唆しており、造血系疾患に関与する可能性が考えられる。このことから、PAD4を標的としたそれら疾患の治療や診断法の開発につながる可能性がある。

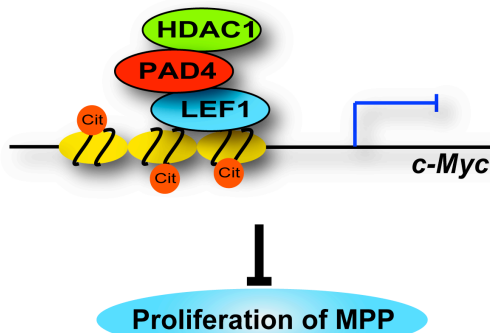


図4 PAD4による増殖制御の分子機構

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 Katsuhiko Nakashima*, Satoko Arai, Akari Suzuki, Yuko Nariai, Takeshi Urano, Manabu Nakayama, Osamu Ohara, Ken-ichi Yamamura, Kazuhiko Yamamoto, Toru Miyazaki. PAD4 regulates proliferation of hematopoietic multipotent cells by controlling c-Myc expression. Nat. Commun. 4, 1836 (2013) doi: 10.1038/ncomms2862 *corresponding author (査読有)

② Satoko Arai, Natsumi Maehara, Yoshihiro Iwamura, Shin-ichiro Honda, Katsuhiko Nakashima, Toshihiro Kai, Masato Ogishi, Kumiko Morita, Jun Kurokawa, Mayumi Mori, Yuji Motoi, Kensuke Miyake, Nobuyuki Matsushashi, Ken-ichi Yamamura, Osamu Ohara, Akira Shibuya, Edward K. Wakeland, Quan-Zhen Li, and Toru Miyazaki. Obesity-Associated Autoantibody Production Requires AIM to Retain the Immunoglobulin M Immune Complex on Follicular Dendritic Cells. Cell Rep. 3, 1-12 (2013) doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.006 (査読有)

③ Yoshihiro Iwamura, Mayumi Mori, Katsuhiko Nakashima, Toshiyuki Mikami, Satoko Arai, Toru Miyazaki. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 422, 476-481 (2012) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.018. (査読有)

④ 大場麻生、中島克彦、宮崎徹 「機能的なリコンビナント AIM タンパク質の作製」 生化学 第84巻 p.588-591 (2012) (査読無)

[学会発表] (計2件)

① 中島克彦、宮崎徹 「PAD4はc-mycの発現を制御することにより造血多能性細胞の増殖を制御する」第85回日本生化学会大会 2012年12月14日~2012年12月16日 福岡県(福岡国際会議場)

② Katsuhiko Nakashima, Satoko Arai, Toru Miyazaki PAD4 regulates proliferations of hematopoietic multipotent progenitors by directly controlling c-Myc expression. 99th Annual Meeting, American Association of Immunologists annual meeting, May 4-8, 2012 Hynes Convention Center, Boston,

Massachusetts, USA

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