

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461494

研究課題名(和文) PAD4を標的とした好中球細胞外トラップの阻害と炎症性疾患の病態への影響

研究課題名(英文) Role of PAD4 for inflammatory diseases and neutrophil extracellular traps

研究代表者

中島 克彦 (Nakashima, Katsuhiko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90528035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチジルアルギンデイミナーゼ4 (PAD4) は、核内タンパク質シトルリン化酵素であり、ヒストンH3をシトルリン化して転写を制御する。PAD4は、好中球において高い発現があり、好中球細胞外トラップにおいてヒストンシトルリン化は必須であることが報告されている。本研究では、PAD4欠損マウスを用いて急性肺障害におけるPAD4欠損の影響を調べた。その結果、PAD4欠損により急性肺障害における炎症性サイトカインの発現が顕著に抑制されることが分かった。また、PAD4は炎症性細胞への分化を促進することが示唆された。これらの結果から、PAD4は生体の炎症応答に重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) is a nuclear-localized citrullination enzyme and transcription regulator through citrullination of histone H3. It has been reported that PAD4 is essential for neutrophil extracellular traps (NETs) which is a event on bacterial infection and inflammation. In this study, we examined the role of PAD4 on acute lung injury (ALI) using PAD4-deficient mouse. The results showed expression of inflammatory cytokines, IL-6, TNF-alpha, MCP-1, and IL-1beta, were suppressed by PAD4-deficiency. Next, we assessed the role of PAD4 on macrophage differentiation of M1 cells, mouse myelocytic leukemia cells. Ectopic expression of PAD4 but not mutant PAD4 in M1 cells induced apoptosis during IL-6 treatment of M1 cells. In addition, c-myc expression on IL-6 treatment is suppressed by ectopic expression of PAD4 but not mutant PAD4. These results suggested that PAD4 plays important roles on inflammatory response, especially ALI.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：シトルリン化

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) NETs

自然免疫は、様々な炎症性疾患において中心的な役割を担っている。好中球は、自然免疫において最も初期に働く細胞であり、体内に侵入した細菌などの微生物を殺すために、様々な酵素を細胞内の顆粒に保持している。近年、好中球は、自らのクロマチン DNA 複合体を細胞内顆粒とともに細胞外に放出し、細菌などをトラップすることで感染防御を担うことが明らかとなってきた。この現象は、好中球細胞外トラップ (NETs) とよばれ、PAD4 によるヒストン修飾が重要な制御因子であることが報告されている。

### (2) PAD4

PAD4 は、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タンパク質修飾酵素であり、関節リウマチ関連タンパク質としてよく知られている。4 種存在する PAD ファミリーのうち、PAD4 は唯一核内に存在しヒストンやヌクレオフォスミン等を修飾する (Nakashima *et al.*, 2002)。最近では、p53 や Elk-1 などの転写因子も修飾することが報告され、発癌への関与が示唆されている。また、PAD4 は、骨髄などの血球系組織で強い発現がみとめられるものの、その造血系への関与は不明であった。最近我々は、PAD4 欠損マウスを用いた解析から、PAD4 が造血多能性幹細胞に発現しており、c-myc を制御することでその細胞の増殖を抑制することを明らかにした。一方で、PAD4 は好中球に豊富に存在するタンパク質であり、NETs においてヒストンをシトルリン化することでクロマチンの放出に関与することが示唆されている。PAD4 欠損により NETs が阻害されることから、PAD4 によるヒストンシトルリン化は NETs において重要な制御因子であることが分かっている。

### (3) 急性肺障害と NETs

組織において重度の炎症が起こると、好中球の顆粒中のプロテアーゼ等により組織に多大な損傷が引き起こされる。これにより、様々な炎症性疾患において、その影響が重篤な症状を引き起こす。例えば、関節リウマチ患者の関節滑膜においては、重度の慢性的な炎症により関節痛を引き起こし、患者の QOL は著しく低下する。またごく最近、NETs が自己抗体による刺激で誘導されることが報告されており、自己免疫疾患への関与も示唆されている。急性肺障害 (ALI) では、肺胞中にエラスターゼなどのタンパク質分解酵素が放出され肺組織が損傷し短時間で死に至る。しかしながらエラスターゼ阻害剤は ALI に対する効果が低いことが分かっている。このように、慢性、急性によらず、炎症性疾患では重度の組織障害がその症状を悪化させる。好中球より放出されるプロテアーゼはエラスターゼだけでなく、カテプシン G など、他にも様々な酵素が存在する。また、NETs が ALI

など様々な炎症性疾患に関与することが近年明らかとなってきた。したがって、NETs を阻害し好中球からの顆粒の放出を抑制することで、組織の損傷を防ぐことができると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PAD4 ノックアウトマウスを用いて ALI モデルを作製し、ALI における PAD4 の役割を明らかにすることである。また、PAD4 の阻害による NETs の抑制が、ALI における組織損傷を防ぐかどうか検討し、関節リウマチ等の自己免疫疾患や他の炎症性疾患も含め、PAD4 を標的とした治療応用への可能性を明らかにする。さらに、PAD4 が炎症細胞、特にマクロファージへの分化に関与する可能性がみだされており、その検証とメカニズムについて解析する。

## 3. 研究の方法

(1) PAD4 欠損マウスの肺にリポポリサッカライド (LPS) を経気管投与し、肺組織における炎症性サイトカインの発現を RT-qPCR 法により定量した。

(2) PAD4 欠損マウスの肺に LPS を投与し、肺胞洗浄液を採取し、エステラーゼ活性を測定することで肺における炎症を定量化した。

(3) マウス白血病 M1 細胞にマウス PAD4 をレンチウイルスにより強制発現させ、細胞分化や細胞死に与える影響について FACS を用いて調べた。

(4) PAD4 をレンチウイルスにより発現させた M1 細胞の分化における c-myc の発現を RT-qPCR で解析した。

(5) PAD4 を発現させた M1 細胞を IL-6 処理し、FACS にて細胞分化とアポトーシスについて解析した。

## 4. 研究成果

(1) PAD4 欠損マウスにおける急性肺障害と炎症性サイトカインの発現

急性肺障害における NETs の役割を明らかにするために、野生型マウスと PAD4 欠損マウスに LPS を経気管投与し、肺組織における炎症性サイトカインの発現量を解析した。TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP1 について mRNA レベルを RT-qPCR で解析したところ、WT マウスでは LPS 投与により顕著に発現が上昇した。一方、PAD4 欠損マウスにおいてはこれらサイトカインの発現上昇は比較的弱かった (図 1)。また、この結果は、ブレオマイシン投与によっても同様であった。これらのことから、PAD4 による NETs の制御は、急性肺障害における炎症性サイトカインの発現誘導に重要な役割を担っていると考えられた。

(2) PAD4 安定発現 M1 細胞株の樹立  
マウス白血病 M1 細胞は、IL-6 処理するとマ

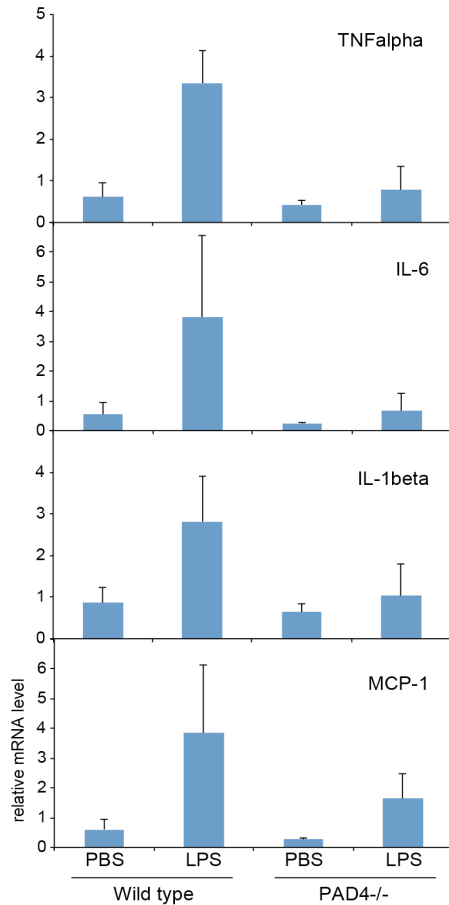


図1 PAD4欠損マウスにおけるALIに伴う炎症性サイトカインの発現

クロファージ分化とともに細胞死が誘導される。マクロファージ分化や細胞死におけるPAD4の役割について解析した。そのために、レンチウイルスによりM1細胞にPAD4 cDNAを導入し、安定発現株を樹立した。PAD4 cDNAは、点突然変異を挿入しPAD活性を失活させた変異体(PAD4mut)も作製した。PAD4を発現させた細胞ではカルシウム存在下でヒストンがシトルリン化されるが、PAD4mutを発現させた細胞ではシトルリン化が認められなかった(図2)。これらのことから、PAD4mutは酵素活性が失活していることが確認された。

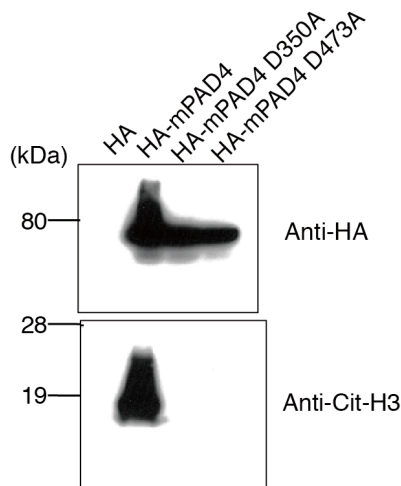


図2 PAD4安定発現M1細胞株の樹立

### (3) PAD4のM1細胞分化及び細胞死における役割

これら(2)で樹立した細胞を用いて、IL-6によるマクロファージ分化におけるPAD4の役割について解析した。M1細胞をIL-6で処理し、FACSを用いて細胞死の割合をAnnexinV染色により解析した。その結果、PAD4発現細胞では、親株やPAD4mut発現細胞と比較して細胞死誘導の割合が高かった。PAD4はc-mycの発現を抑制的に制御することから、IL-6処理におけるc-mycの発現変動について調べた。その結果、未処理の状態ではPAD4発現によりc-mycの発現は変動しなかった。IL-6処理後PAD4mut細胞ではc-mycの発現はほとんど変動しないが、PAD4発現細胞ではc-mycの発現が顕著に抑制された。これらの結果から、PAD4はM1細胞における分化時にc-mycを抑制し細胞死誘導を上昇させることが示唆された。

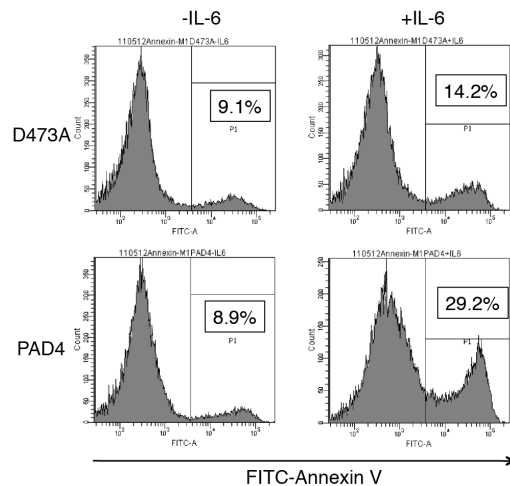


図3 M1細胞のIL-6誘導細胞死におけるPAD4発現の影響

### 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 中島 克彦 「造血多能性細胞におけるタンパク質シトルリン化の役割」医学のあゆみ 255, 877-882 (2015) 査読無
- ② Ueno H, Tomiyama A, Yamaguchi H, Uekita T, Shirakihara T, Nakashima K, Otani N, Wada K, Sakai R, Arai H, Mori K. Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal

kinase-paxillin axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 240-247 (2015). 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc

- ③ Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R, Narisawa-Saito M, Nakashima K, Tsuta K, Tsuda H, Kiyono T, Yokota J, Sakai R. Oncogenic Ras/ERK signaling activates CDCP1 to promote tumor invasion and metastasis. *Mol. Cancer Res.* 12, 1449-1459 (2014). 査読有 doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0587
- ④ Hamada M, Nakamura M, Tran MT, Moriguchi T, Hong C, Ohsumi T, Dinh TT, Kusakabe M, Hattori M, Katsumata T, Arai S, Nakashima K, Kudo T, Kuroda E, Wu CH, Kao PH, Sakai M, Shimano H, Miyazaki T, Tontonoz P, Takahashi S. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nat. Commun.* 5, 3147 (2014). 査読有 doi: 10.1038/ncomms4147

〔学会発表〕(計 4件)

- ① 中島克彦、堺隆一「膵臓がん細胞における Side-Population 細胞の特性とその分子基盤」第 74 回 日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8-10 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ② Nakashima K, Sakai R, Molecular Characterization of Side-population Cells in Pancreatic Cancer Cells. The 10<sup>th</sup> Symposium Mechanisms and Models of Cancer 2015 年 8 月 5-8 日 サンディエゴ (アメリカ合衆国)
- ③ 中島克彦、堺隆一「膵臓がん細胞における Side-Population 細胞の特性」第 24 回 がん転移学会学術総会 2015 年 7 月 23-24 日 シティプラザ大阪 (大阪府大阪市)
- ④ 中島克彦、黒澤仁、堺隆一「転移関連膜タンパク質 CDCP1 の切断による分泌とその機能」第 73 回 日本癌学会学術総

会 2014 年 9 月 25-27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 克彦 (NAKASHIMA, Katsuhiko)  
国立がん研究センター・研究所・研究員  
研究者番号：90528035