

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860933

研究課題名(和文) 転写抑制因子として機能するセリン/スレオニンキナーゼの肉芽腫形成への影響

研究課題名(英文) Influence on granuloma formation of serine/threonine kinase functioning as a transcription repressor

研究代表者

中野 倫代 (Nakano, Michiyo)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ブラウ症候群患者の末梢血でNOD2を発現するCD14陽性細胞より単離したmRNAに発現する遺伝子網羅解析の結果、転写抑制因子として機能するセリン/スレオニンキナーゼHIPK2(homeodomain-interacting protein kinase 2)の発現亢進を認めた。変異NOD2遺伝子をTHP1細胞に導入したが、HIPK2の発現は野生型と比べ差異がなかった。HEK293細胞にHIPK2とNOD2遺伝子を同時に遺伝子導入したところ、NOD2の発現亢進とNF- κ Bの転写活性亢進を認め、HIPK2遺伝子はNOD2遺伝子の発現を亢進させることで、肉芽腫形成を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed gene profiling of peripheral CD14+ cells that expressed NOD2 by microarray, and found high expression of serine/threonine kinase HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2) in EOS patients. As a result, we studied the relationship of HIPK2 and mutated NOD2 in granuloma formation. We transfected mutants of NOD2 into HEK293 cells and THP1 cells, but there was no difference in HIPK2 mRNA and protein expression between WT and mutants. Therefore, we hypothesized that HIPK2 acts in upstream of NOD2, and its overexpression will up- or down-regulates NOD2. We constructed HIPK2 high expression vector, but we could not transfect the vector into THP1 cells. Therefore, we co-transfected mutants of NOD2 and HIPK2 high expression vector into HEK293 cells, and obtained high expression of NOD2 protein and NF- κ B activity, suggesting that HIPK2 upregulates NOD2 and might accelerate granuloma formation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：肉芽腫 ブラウ症候群 若年発症サルコイドーシス NOD2 NF- κ B HIPK2

1. 研究開始当初の背景

肉芽腫は、貪食能をもつ単球由来の組織球が増殖して形成され、結核や真菌などによる感染防御反応、環状肉芽腫や脂肪類壊死症のように変性した自己組織に対する反応、シリカなどへの異物反応、サルコイドーシスなどで認められる。しかし、いずれの病態でも肉芽腫形成の分子メカニズムは明らかになっていない。

我々の研究室ではこれまでに、病原微生物、変成した蛋白質や結晶構造、生体自らが発する危険信号を細胞内で認識して炎症を惹起し、自然免疫において重要な役割を担うと注目される NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-leucine rich repeats containings)の機能解析と、NLR 遺伝子の自己活性型変異によって特徴的な臨床症状を呈する自己炎症症候群の研究に従事してきた (Kambe, *et al. J Dermatol Sci* 2005 review, Kambe, *et al. Allergol Int* 2010 review)。

NLR の1つである NOD2 は、当初、その機能消失性変異が消化管に肉芽腫を来すクローン病の発症に関連すると注目された分子である。一方、家族性に皮膚、関節、眼にサルコイドーシス類似の肉芽腫を来す疾患がブラウ症候群として報告され (Blau. *J Pediat* 1985), その後、ブラウ症候群において NOD2 の機能獲得性変異が認められることが報告された (Miceli-Richard, *et al. Nat Genet* 2001)。小児期発症のサルコイドーシスの中で、肺病変を欠き関節症状を来す一群はブラウ症候群に病態が近いと考えられ、この若年発症サルコイドーシス (early-onset sarcoidosis, EOS) の病態にも NOD2 の機能獲得性変異が関わることが同定された (Kanazawa, *et al. Blood* 2005)。

その後、我々はブラウ症候群/ EOS と診断される症例の集積を今日まで続けており、現在では国内で 30 例ほどの症例の存在が明らかになった (Okafuji, *et al. Arthritis Rheum* 2009) が、なぜ NOD2 の活性化が肉芽腫の形成に関わるかは、依然として不明である。

我々は NOD2 の活性が肉芽腫を来すメカニズムを明らかにする目的で、NOD2 変異が確認された EOS 患者、およびコントロールとしての健常者から、インフォームドコンセントを得て末梢血を採取し、NOD2 を発現する単球を分離した後、mRNA を単離し、発現する遺伝子の網羅解析をかずさ DNA 研究所 (千葉県木更津市) との共同研究として行った。その結果、HIPK2 (homeo-domain-interacting protein kinase 2) の発現が EOS 患者群においてコントロール群に比べて

優位に高いことを見いだした (表 1)。

表 1 EOS 患者の末梢血 CD14 陽性細胞の遺伝子網羅解析

Gene Symbol	FC	FC	SAM (log)	群平均シグナル値 (参考)			アレイ解析数値データ (75%ile log2)												
				disease	control	control	disease					control							
				mean	mean	median	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	C1	C2	C3	C4	C5	
	2.475	down	1	-3.7	-2.4	-3.7	-2.4	-3.17	-4.24	-3.94	-3.98	-3.59	-3.27	-3.67	-1.96	-2.41	-2.51	-2.16	-2.87
	2.459	down	2	-3.8	-2.5	-4.0	-2.5	-4.36	-3.97	-4.4	-3.49	-4.01	-3.28	-3.3	-2.92	-2.86	-2.32	-2.06	-2.51
	3.356	down	3	-0.9	0.8	-0.9	0.9	0.081	-0.92	-1.22	-2.02	-0.42	-0.72	-1.09	1.55	1.152	0.856	0.63	0.034
	17.5	up	4	0.4	-3.7	0.3	-4.2	1.623	-0.64	2.519	-1.21	-0.69	0.339	0.921	-2.21	-6.11	4.24	-4.72	-1.31
	5.02	up	5	1.0	-1.4	1.2	-1.9	1.024	1.188	1.204	-0.32	0.646	1.308	1.619	-2.26	-1.98	-1.33	-1.92	0.606
	1.882	up	6	2.7	1.8	2.6	1.8	2.525	2.726	3.369	2.942	2.578	2.539	2.309	1.824	2.064	1.532	1.63	1.954
HIPK2	2.194	up	7	2.3	1.2	2.4	1.3	2.675	2.887	2.633	2.44	1.761	1.819	2.165	1.002	0.721	1.3	1.672	1.336
	4.376	down	8	-2.7	-0.6	-2.3	-0.6	-1.62	-3	-4.28	-3.87	-1.91	-1.96	-2.33	-0.05	-0.31	0.62	-0.66	-1.27
	2.5	down	9	-1.9	-0.6	-2.1	-0.6	-1.41	-2.24	-2.34	-2.41	-1.49	-1.4	-2.08	0.262	-1.22	0.94	-0.41	-0.63
	2.394	down	10	-3.7	-2.5	-3.5	-2.6	-3.16	-4.02	-4.24	-4.67	-3.52	-3.12	-3.49	-2.68	-2.14	-2.56	-2.77	-2.29
	1.639	up	11	2.2	1.4	2.1	1.4	1.933	2.372	2.435	2.42	1.754	2.123	2.048	1.732	1.022	1.225	1.321	1.411
	3.383	down	12	-4.5	-2.8	-4.2	-2.8	-3.95	-4.21	-4.28	-3.84	-4.01	-5.23	-6.14	-3.19	-2.38	-3.18	-2.8	-2.27
HIPK2	2.165	up	13	2.4	1.3	2.5	1.3	2.688	2.9	2.65	2.541	1.784	1.824	2.208	0.998	0.71	1.336	1.797	1.439
	3.12	up	14	-3.1	-4.7	-3.2	-4.8	-3.89	-3.58	-2.06	-2.79	-3.95	-3.21	-2.19	-5.46	-4.82	-4.5	-4.89	-4.01
	1.744	up	15	-1.6	-2.4	-1.5	-2.2	-1.72	-0.96	-1.42	-1.54	-2.1	-1.66	-1.49	-2.62	-2.54	-2.18	-2.24	-2.21
	2.958	down	16	-0.6	1.0	-0.5	0.7	0.117	-1.17	-1.53	-0.46	-0.55	-0.35	-0.21	1.446	2.059	0.377	0.691	0.275
	1.858	down	17	0.3	1.2	0.3	1.1	0.6	0.254	-0.48	0.014	0.806	0.236	0.433	0.99	1.12	1.111	1.458	1.122
	1.952	up	18	1.0	0.0	1.1	0.1	1.227	1.278	0.852	1.149	1.346	0.468	0.388	-0.24	0.113	0.455	0.077	-0.44

HIPK2 は当初、転写抑制因子として機能するセリン / スレオニンキナーゼとして p53 の 46 番目のセリンをリン酸化し、細胞をアポトーシスに導き、癌の抑制に働くことで注目された分子である (D'Orazi G, *et al. Nat. Cell Biol* 2002)。最近では、HIV-associated nephropathy (HIVAN) において HIPK2 の発現が亢進し、NF- B の転写を亢進させることで炎症が起こり、腎線維化に関連すると報告されている (Jin Y, *et al. Nat Med* 2012)。我々が解析対象としているブラウ症候群/EOS においても、NOD2 の恒常活性型変異体により NF- B の転写が亢進し、肉芽腫が形成されるというメカニズムが推定されていることから、Jin らの報告は、NF- B の転写亢進に関わるという類似点をもって興味深い。

2. 研究の目的

NOD2 遺伝子の変異を基盤とし明らかな外来因子の存在なしに肉芽腫を来すブラウ症候群/若年発症サルコイドーシス (EOS) をモデルに、肉芽腫形成の分子機序を明らかにする。

EOS 患者の末梢血で NOD2 を発現する CD14 陽性細胞では、転写抑制因子として機能するセリン / スレオニンキナーゼ HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2) の発現亢進が認められることから、この分子の肉芽腫形成への関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞に NOD2 の疾患関連変異体の導入を行い、HIPK2 の発現とそれによって影響を受ける分子の検討を行う。

(2) 細胞に HIPK2 の導入を行い、NOD2 の発

現とそれによって影響を受ける分子の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 代表的な変異 NOD2 遺伝子をウイルスベクターを用いて HEK293 細胞に遺伝子導入し、HIPK2 の mRNA およびタンパクの発現を検討した予備実験では、いずれも HIPK2 の発現は認められるものの、野生型と比べ変異 NOD2 の導入により HIPK2 の発現亢進を認めなかった (図 1)。

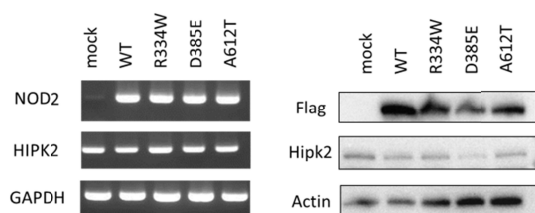


図 1 左：HEK293 細胞に変異 NOD2 遺伝子を導入し、PCR で測定した NOD2 と HIPK2 の mRNA 発現量。野生型と変異 NOD2 で差なし。R334W, D382E は EOS, A612T はクローン病で認められる代表的な変異 NOD2 遺伝子。右：ウェスタンブロットティングで測定したタンパクの発現量。野生型と変異 NOD2 で差なし。Nod2 は Flag で標識。

そのため、より EOS 患者の状態に近く、内因性の NOD2 を発現する単球系の THP1 細胞に変異 NOD2 遺伝子を Amaxa 法を用いて遺伝子導入し、HIPK2 の mRNA とタンパクの発現を検討したが、HEK293 細胞と同様に野生型と比べ、変異 NOD2 遺伝子導入による差異は認められなかった (図 2)。以上より、HIPK2 の発現は NOD2 によっては影響を受けないと考えられた。

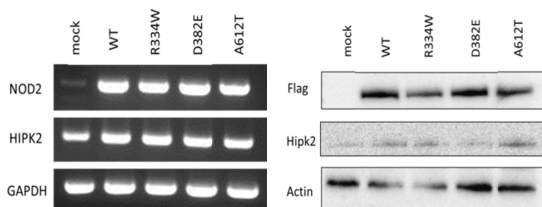


図 2 左：THP1 細胞に変異 NOD2 遺伝子を導入し、PCR で測定した NOD2 と HIPK2 の mRNA 発現量 (2 段目)。野生型と変異 NOD2 で差なし。右：ウェスタンブロットティングで測定した Hipk2 タンパクの発現量 (2 段目)。同様に野生型と変異 NOD2 で差なし。Nod2 は Flag で標識。

(2) 次に、HIPK2 が NOD2 の上流で働き、HIPK2 の過剰発現が NOD2 の発現やその下流の NF- κ B の転写活性に影響を与える可能性を評価するため、我々は THP1 細胞より HIPK2 の DNA を抽出し、mCherry で標識した HIPK2 を過剰発現するウイルスベクターを作成した。HIPK2 の過剰発現を確認するため、HEK293 細胞に遺伝子導入し、HIPK2 の mRNA とタンパクの発現を PCR とウェスタンブロットティングで検討した (図 3)。

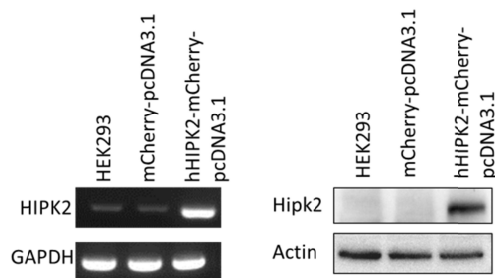


図 3 左：HIPK2 を過剰発現するウイルスベクターを HEK293 細胞に遺伝子導入し、HIPK2 の mRNA が発現することを確認した。左から、HEK293 細胞のみ、ベクターのみ、HIPK2 の順。右：同様にウェスタンブロットティングで Hipk2 タンパクの発現が認められることを確認した。

HIPK2 を過剰発現するウイルスベクターを内因性に NOD2 を発現する THP1 細胞に遺伝子導入し、HIPK2 の NOD2 発現に及ぼす影響を検討した。しかし、浮遊系の細胞である THP1 細胞への HIPK2 の遺伝子導入は、リポフェクション法や Amaxa 法など複数の方法を用いて導入を試みたが非常に困難であり、検討を行うことができなかった。

付着系の細胞である HEK293 細胞には遺伝子導入が可能であったため、次に、HEK293 細胞に HIPK2 と NOD2 遺伝子を同時に遺伝子導入し、NF- κ B の転写活性をルシフェラーゼアッセイで検討したところ、HIPK2 は NOD2 と同時に遺伝子導入することにより、NOD2 単独の場合と比較し、NF- κ B の転写活性を亢進させ (図 4)、同時に確認したウェスタンブロットティングの結果、NOD2 タンパクの発現も HIPK2 と同時に遺伝子導入することにより亢進していた (図 5)。

以上の結果より、HIPK2 は NOD2 の発現を亢進させることで、肉芽腫形成を促進させる可能性が示唆された。

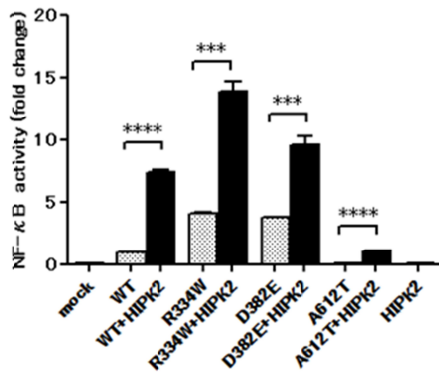


図4 HEK293 細胞に HIPK2 と NOD2 遺伝子を同時に遺伝子導入し，NF- B の転写活性を測定した。HIPK2 と NOD2 を同時に遺伝子導入した群では，NOD2 単独に比べ NF- B の転写活性が優位に上昇した。($n=3$, **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$)

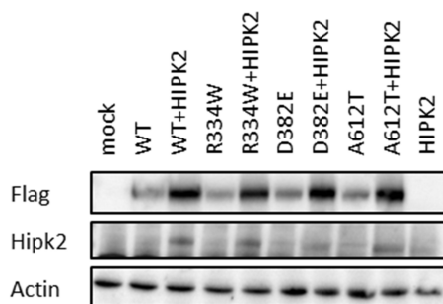


図5 HEK293 細胞に HIPK2 と NOD2 遺伝子を同時に導入し，ウェスタンブロッティングで測定した Nod2 タンパクの発現量。HIPK2 と NOD2 を同時に遺伝子導入した群では，Nod2 タンパクの発現が亢進している。Nod2 は Flag で標識。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 倫代 (NAKANO, Michiyo)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645634

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)

[学会発表] (計 1 件)

BCG vaccination as a trigger of skin eruption in Blau syndrome/early-onset sarcoidosis

Nakano M, Kambe N, Matsue H.

(11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology 2014, June 11-14, Heidelberg, Germany)