

# 研究報告書

## 「炎症を負に制御する分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 田中 貴志

### 1. 研究のねらい

細菌やウイルスなどの病原微生物が生体に侵入すると、樹状細胞は Toll 様受容体(TLR)によってこれを感知し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化して、IL-6 や IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することにより炎症反応を惹起する。さらにこれらのサイトカインは、ヘルパーT 細胞において転写因子 STAT4, STAT6 および STAT3 を活性化し、それぞれ Th1, Th2, Th17 細胞という異なったエフェクターT 細胞への分化を誘導することにより、さまざまな病原微生物の排除を行う。ところが一方では、何らかの原因でこの炎症反応が過剰かつ無制限に活性化されると自己免疫疾患や慢性炎症性疾患を引き起こすことも示唆されている。生体は内因性の負の制御機構により、このような炎症反応を適当な時点で終息させることで病気の発症を未然に防いでいる。すなわち、この負の制御機構の破綻こそが炎症を慢性化させて上記の疾患を発症させる原因であると考えられる。しかしながら、このような免疫系の負の制御の分子機構の詳細は未だ解明されていない。私たちはこれまで、免疫系の複数のシグナル伝達を抑制することにより免疫系全体を負に調節するような因子を同定することを目標に研究を行ってきた。そして、このような因子の1つとして LIM 蛋白ファミリーに属するユビキチンリガーゼ PDLIM2 を同定した。PDLIM2 は、樹状細胞において転写因子 NF- $\kappa$ B をユビキチン化してプロテアソーム依存性に分解することにより炎症反応を負に制御するとともに、ヘルパーT 細胞においては STAT4 および STAT3 をユビキチン化・不活性化することにより Th1 および Th17 細胞分化を抑制する。そこで、本研究においては、この PDLIM2 による炎症反応制御機構を足がかりとして、炎症反応の制御を担う多くの分子群を同定し、炎症反応の負の制御機構の全容を分子レベルで明らかにすることを目指す。まずは、PDLIM2 以外の LIM 蛋白ファミリーに属する因子群の炎症反応を制御する分子機構を明らかにする。さらに、PDLIM2 と結合する分子を探索する方法、および、PDLIM2 欠損マウスの組織や細胞を用いたマイクロアレイ解析により、炎症反応の負の制御を担う新たな分子群、および、逆に炎症の慢性化に関与するような遺伝子群を同定する。最終的には、これらの分子の異常が、ヒトの自己免疫疾患の病因病態形成に関与するのかを解明する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究においては、まず LIM 蛋白ファミリーの炎症制御における役割を解析した。その結果、PDLIM4 が、PDLIM2 とは異なり、細胞質において LIM ドメインを介して蛋白脱リン酸化酵素 PTPBL をリクルートして STAT4, STAT6 および STAT3 を脱リン酸化することにより、Th1, Th2 および Th17 細胞分化を負に制御することを明らかにした。このことから、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。さら

に、ヒトの PDLIM4 の LIM ドメイン内のアミノ酸置換を伴う一塩基多型が、関節リウマチの疾患感受性に関与していることを明らかにした。また、この変異を導入した PDLIM4 では、PTPBL との結合が低下することにより、STAT3 を脱リン酸化・抑制する活性が傷害されていた。以上の結果より、炎症反応シグナルの負の制御因子の機能異常が、ヒトの自己免疫疾患の原因になりうる事が証明された。

LIM 蛋白はアダプター分子としてさまざまな分子と相互作用することにより機能を発揮している。そこで次に、PDLIM2 と会合する分子を網羅的に探索し、この中から、siRNA を用いた細胞レベルの解析により、NF- $\kappa$ B の活性を抑制する分子を同定した。これにより、HSP70、HSP90 などのシャペロン分子群や、Fbxo21 などのユビキチンリガーゼ複合体のコンポーネントなど、約20個の分子が新たな炎症反応の制御因子の候補として同定できた。さらにこの中で HSP70 について解析を進めたところ、HSP70 は、PDLIM2 および NF- $\kappa$ B と結合するとともに、プロテアソーム結合蛋白である BAG1 と会合して、PDLIM2-NF- $\kappa$ B 複合体のプロテアソームへの輸送を促進することにより NF- $\kappa$ B の分解不活性化に関与することが明らかになった。また、HSP70 欠損マウスでは、*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 投与による炎症性サイトカインの産生・肝臓の炎症性肉芽腫の形成が野生型マウスに比べて著明に亢進していたことから、個体レベルでも HSP70 は炎症反応を負に制御すると考えられた。今後はこれらの得られた分子群について、炎症を制御する分子機構およびヒトの慢性炎症性疾患の病因病態形成への関与について解析を進めていく予定である。

## (2) 詳細

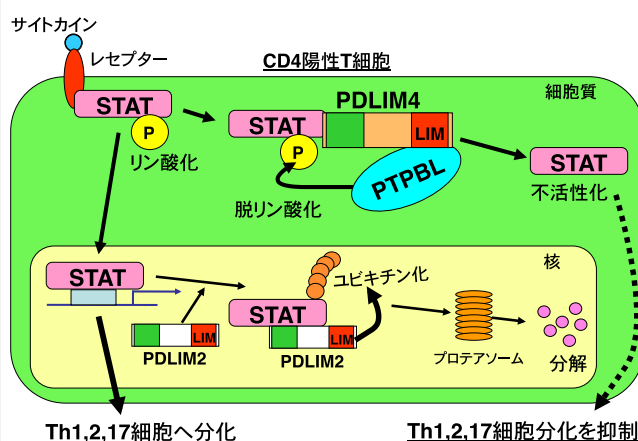
### 研究テーマ1: LIM 蛋白ファミリーによる炎症反応制御機構の解明

・PDLIM4 は STAT を脱リン酸化・不活性化することにより Th1, Th2, 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 STAT4、STAT6 および 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

STAT 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、STAT 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。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、Th1、Th2 および Th17 細胞分化が亢進しており、

図1 PDLIM2とPDLIM4によるTh細胞分化の負の制御の分子機構



STAT4、STAT6 および 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 Th1 および 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、野生型マウスと比べて、神経症状が有意に亢進していた。また、個体レベルでの Th2 反応を調べるために、PDLIM4 欠損マウスに腸管寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を感染させたところ、野生型マウスと比べて、腸間膜リンパ節における IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインの産生が亢進しており、それに伴って腸管からの寄生虫の排除も亢進していた。以上より、PDLIM4 は、STAT を脱リン酸化し不活性化することにより、Th1、Th2、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。

#### ・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関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関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。

#### ・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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。また、PDLIM1 は、PDZ ドメインを介してアクチン結合蛋白である  $\alpha$ -actinin と結合しており、PDZ ドメインを欠失させた PDLIM1 の変異体は、NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制する機能が著明に阻害されていた。以上の結果から、PDLIM1 はアクチン線維と相互作用して NF- $\kappa$ B を細胞質内に留めることにより、NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

## 研究テーマ2： 炎症反応の負の制御を担う新たな分子群の同定

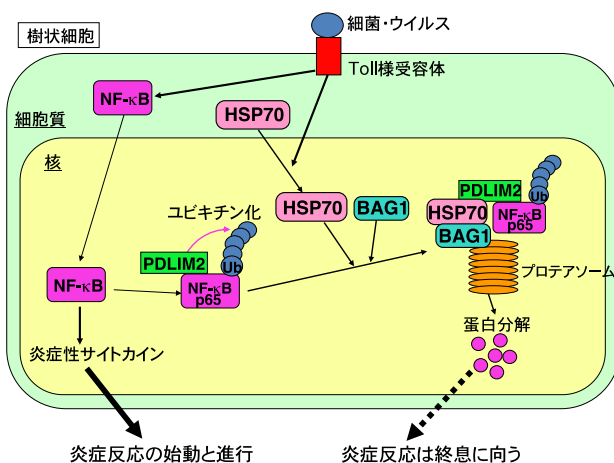
### ・共免疫沈降と質量分析法を用いた PDLIM2 結合タンパク質の同定

LIM ドメインおよび PDZ ドメインはいずれも蛋白蛋白相互作用に関与するドメインであることから、LIM 蛋白はアダプター分子としてさまざまな分子と相互作用することにより機能を発揮していると考えられている。そこで、PDLIM2 と会合し、且つ、炎症反応を負に制御する分子群を網羅的に探索した。具体的には、まず Flag タグを付加した PDLIM2 発現ベクターおよびコントロールベクターを 293T 細胞に強制発現させ、この細胞の全細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降し、ここから Flag ペプチドを用いて PDLIM2 と特異的に結合するタンパク質を溶出した。そしてこのサンプルに含まれるタンパク質を、質量分析法を用いて特定した。さらに得られた候補因子の中から、siRNA を用いて培養細胞でノックダウンしたときに NF- $\kappa$ B の活性を亢進させる分子を同定した。これにより、HSP70, HSP90, HSP40, HSP105, Apg-1 などのシャペロン分子群や、Fbxo21, Skp1 などのユビキチンリガーゼ複合体のコンポーネントなど、約20個の分子が新たな炎症反応を負に制御する因子として同定できた。HSP70をはじめとするシャペロン分子群は、タンパク質の細胞内品質管理機構においては、変成したタンパク質と結合してその凝集を防ぐことにより、協同して変成タンパク質の分解処理を促進する。よって、NF- $\kappa$ B の不活性化の過程においても、これらのシャペロン分子群が協同して NF- $\kappa$ B の分解・不活性化を促進している可能性が示唆された。また、PDLIM2 などのユビキチンリガーゼは実際には他のいくつかの分子と複合体を形成することにより機能を発揮する。今回同定された Fbxo21 は、F-box 蛋白ファミリーに属しており、F-box 蛋白は、このユビキチンリガーゼ複合体の中で、標的タンパク質との直接の結合を担っていることが知られている。私たちは、Fbxo21 が PDLIM2 と協同してユビキチン化の基質特異性を決定していることを明らかにした。

### ・HSP70 は PDLIM2 と協同して炎症反応を負に制御する(論文リスト1)

さらに、上記の PDLIM2 結合タンパク質の中から、HSP70 に焦点を絞って解析を進めた。HSP70 が細胞を刺激していない状態では細胞質にのみ存在し、細胞をTLRが認識する細菌成分であるLPSで刺激して3-5時間後に核の中へと移行すること、および、HSP70 をノックダウンした細胞においては、PDLIM2 が NF- $\kappa$ B p65 を分解する活性が著明に阻害されることから、PDLIM2 が、細胞を LPS で刺激して3-5時間経過して HSP70 が核に移行するのにともなってはじめて NF- $\kappa$ B の分解を誘導できることが示唆された。また HSP70 が、PDLIM2 および

図2 HSP70による炎症反応制御の分子機構



細菌成分であるLPSで刺激して3-5時間後に核の中へと移行すること、および、HSP70 をノックダウンした細胞においては、PDLIM2 が NF- $\kappa$ B p65 を分解する活性が著明に阻害されることから、PDLIM2 が、細胞を LPS で刺激して3-5時間経過して HSP70 が核に移行するのにともなってはじめて NF- $\kappa$ B の分解を誘導できることが示唆された。また HSP70 が、PDLIM2 および

NF- $\kappa$ B と結合するとともに、プロテアソーム結合蛋白である BAG1 と会合して、PDLIM2-NF- $\kappa$ B 複合体のプロテアソームへの輸送を促進することにより NF- $\kappa$ B の分解不活性化に関与することも明らかになった。さらに、ヒトの自己免疫疾患の1つであるサルコイドーシスの原因菌であることが示唆されている *P. acnes* を用いて HSP70 の個体レベルでの炎症反応制御における役割を調べた。その結果、*P. acnes* の加熱死菌を投与した HSP70 欠損マウスにおいては、樹状細胞からの IL-12 および IL-6 の産生が亢進することにより、個体レベルでの Th1 および Th17 細胞分化、および、肝臓での炎症性肉芽腫形成が野生型マウスと比べて亢進していることが明らかになった。これより、HSP70 は個体レベルでも炎症反応を負に制御することが明らかになった。以上の結果より、PDLIM2 と結合する活性を指標にして同定した因子が実際に個体レベルでも炎症反応を制御することが証明された。

### 3. 今後の展開

(1)本研究で同定された新たな炎症反応制御の候補因子に関して、細胞レベルだけでなく個体レベルでの炎症反応制御における役割を解析する。この際、CRISPRなどのゲノム編集機能を利用して、簡潔かつ迅速にノックアウトマウスの作成を行う。さらに、GAWS を用いてこれらの分子の異常が、ヒトの自己免疫疾患の病因病態形成に関与するのかを解明する。

(2)ヒトの自己免疫疾患は感染を契機として発症・増悪する場合が多い。そこで、自己免疫疾患の発症との関連がすでに示唆されている細菌、たとえば、*Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *Mycoplasma fermentans*, *Campylobacter jejuni* を PDLIM2、PDLIM4 および HSP70 欠損マウスに感染させ、内因性の免疫制御異常の宿主において、これらの細菌がどのような病態を引き起こすのかを解析する。

(3)上記の細菌などを感染させた PDLIM2、PDLIM4 および HSP70 欠損マウスの組織や細胞を用いたマイクロアレイ解析により、炎症の慢性化に関与するような遺伝子群、および、自己免疫疾患の病態形成に関連する分子群を同定する。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

独自に同定した炎症反応制御因子である PDLIM4 が関節リウマチの疾患感受性と関連することを示すデータが得られたことから、炎症反応シグナルの負の制御因子の異常が自己免疫疾患の病因病態形成に関与することを証明するという当初の目的の1つは達成できた。また、PDLIM2 と結合する因子群を同定するという手法により、LIM 蛋白以外の新たな炎症反応制御因子が同定できた。さらに、この中の1つである HSP70 が、分子レベル・細胞レベルだけでなく、個体レベルでも炎症反応の負の制御に重要であることを明らかにできたことにより、この手法の妥当性を証明できたと考えられる。しかしながら、当初予定していた、マイクロアレイ解析によって炎症の慢性化や自己免疫疾患の発症に関与する因子を同定する計画に関しては、候補遺伝子は得られたものの、それらの解析はまだ途上である。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

免疫系細胞に発現し炎症反応制御に働く分子としてLIMタンパク質ファミリーの解析を行い、PDLIM2は、LIMドメインを介してユビキチン化酵素E1/E2をリクルートし、樹状細胞においてはTLRなどのシグナルにより活性化して核内に移行してきたNF- $\kappa$ B(p65)を、T細胞においてはIL-6などのシグナルにより活性化して核内に移行してきた転写因子STAT3をユビキチン化してプロテアソーム分解することで過剰なTh1/17細胞の分化を負に制御することを明らかにした。また、PDLIM2-NF- $\kappa$ B複合体のプロテアソームへの輸送には、HSP70とプロテアソームに結合するBAG1と会合する必要があることを見出し、発表している。一方、独自に同定したPDLIM4はT細胞において標的タンパクをユビキチン化することなく細胞質内においてLIMドメインを介してタンパク質脱リン酸化酵素PTPBLをリクルートし、STAT4/3を脱リン酸化することにより、Th1/2/17細胞分化を負に制御することを明らかにした。さらに、PDLIM4のLIMドメイン内のSNPが関節リウマチやバセドウ病の疾患感受性と相関することなどを明らかにした。今後のマイクロアレイ解析などにより、新規の慢性炎症の機序解明に資する分子の同定が期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tanaka, T., Shibasaki, A., Ono, R., Kaisho, T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor  $\kappa$ B to inhibit inflammatory signaling. *Sci. Signal.*, in press, 2014.
2. 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

### (2) 特許出願

なし。

### (2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表および招待講演

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」第三回 明石町リウマチ連携セミナー(東京)2014年10月22日。
2. Tanaka, T, "Negative regulation for inflammatory responses and its association with autoimmune diseases." Monash Univ. & RIKEN IMS Workshop (RIKEN, Yokohama, Japan) August 5, 2014
3. 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.
4. 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。

5. Tanaka, T, “Negative regulation of inflammatory responses by LIM proteins.” The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (Tokyo, Japan) October 24, 2012.
6. Tanaka, T, “Clarifying the molecular mechanisms that regulate inflammatory responses.” RIKEN – Novo Nordisk A/S Scientific Forum (RIKEN, Yokohama, Japan) April 19, 2012.
7. 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。
8. 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
9. Tanaka, T, “HSP70 is essential for PDLIM2-mediated termination of NF- $\kappa$ B signaling” University of Michigan–RCMI Joint Workshop (RIKEN, Yokohama, Japan) December 1, 2011.
10. 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.

#### 著作物

1. 田中貴志「核内ユビキチンリガーゼ PDLIM2 による Th17 細胞分化と肉芽腫性炎症の負の制御機構」医薬の門社、感染・炎症・免疫、42, 288-295, 2012
2. 田中貴志「核内転写因子を標的とした自然免疫の負の制御機構」医歯薬出版、医学のあゆみ、243, 51-55, 2012

#### プレスリリース

「炎症反応誘導に必須な分子の活性化を抑制する仕組みの一端を解明」（平成26年12月17日）