

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 鈴木 和男

分担研究者

- | | |
|---------------------------------|-------------|
| (1) 国立感染症研究所 生物活性物質部 | 山越 智 |
| (2) 東京大学医科学研究所
ヒト疾患モデル研究センター | 岩倉 洋一郎 |
| (3) 昭和大学医学部第2病理 | 内田 俊和 |
| (4) 東邦大学 理学部 | 大富 美智子 |
| (5) 京都大学 医療技術短期大学部 | 笹田 昌孝 |
| (6) 医学生物学研究所(株) | 小島 和夫、大矢 和彦 |
| (7) 持田製薬株式会社 総合研究所 | 森下 英昭、山川 徹 |
| (8) ゼリア新薬工業(株) 中央研究所 | 瀬川 美秀 |

要旨

マウス肝障害モデルにおける肝中 LECT2 の発現低下調節機構には、T 細胞およびクッパー細胞の活性化が関与し、LECT2 ノックアウトマウスを用いることにより LECT2 が肝炎症反応の過度な進展を抑制している可能性が明らかとなった。薬剤投与から肝細胞のアポトーシス誘導前までの経路にこれまで知られていない LECT2 が関わる制御メカニズムが存在することが示唆された。また、肝疾患患者の臨床検体を用いてヒト血漿中の LECT2 の測定意義を検討した。

1. 研究目的

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は、ヒト好中球走化性因子として発見、クローニングされた肝臓で特異的に産生され、血中に放出される分子量約 16kDa のサイトカインである。これまでに LECT2 は、細胞レベルでは好中球走化性活性、骨芽細胞および軟骨細胞の増殖促進活性、生体レベルではその遺伝多型が慢性関節リウマチの病態の進行に影響を与えることが判明している。LECT2 は、現在までに魚からヒトまで種を越えて広く保存されていることが分かっている。C. elegans にも構造的ホモロジーの蛋白質が見つかり、生体機能に重要な働きをしている可能性が示唆されている。

本年度は昨年度に引き続き、肝炎における LECT2 の機能解析、骨代謝における LECT2 の機能解析、好中球と血管内皮細胞の相互作用に対する LECT2 の作用機作の解析の基礎的な研究を行い、さらにヒト肝疾患、肝移植血漿中の LECT2 濃度を測定し病態との因果関係を調べることを目的とした。以上の目的を達成することにより、将来的には LECT2 が関与すると考えられる炎症性疾患および肝臓病等に対する新しい治療方法等の開発が期待される。具体的に以下の解析を行うことを目的とした。

- 1) これまで急性肝障害動物モデル (D-galactosamine および concanavalin A (Con A) 誘発肝障害マウス) を用いて、LECT2 が、肝臓の障害ならびに治癒機転に応じて経時的な発現変化を示すことを明らかにした。ConA 肝炎モデルの発症は T 細胞に依存していること、ヒト肝炎と同じく IFN- γ や TNF- α 、IL-1、IL-6 などの産生亢進が認められることから、ヒトのウイルス性肝炎とよく似ているものと考えられる。そこでこの急性肝障害によって低下が認められる肝中 LECT2 mRNA の調節機構を解明するために、①T 細胞機能欠損 nude マウスを用いた検討、②LECT2 mRNA 発現を調節する薬剤のスクリーニング、ならびに③肝中 LECT2 mRNA 発現に及ぼすリコンビナントサイトカイン投与の影響をそれぞれ検討する。
- 2) LECT2 の生理機能、および肝炎や関節炎における病理的な役割を明らかにする目的で、ノックアウトマウスを作製した。LECT2 ノックアウトマウスは外見上、あるいは血液学的・病理学的評価においても顕著な異常を認められなかった。しかし、昨年度の報告で ConA 誘導性肝障害モデル実験において野生型マウスに比べて血清 GPT 活性が高値を示すという結果を報告した。LECT2 ノックアウトマウスを用い Con A 肝障害モデルにおける分子生物学的、病理学的解析の詳細について検討する。

- 3) nonA-G 肝炎の病原体候補の1つとして考えられる TT ウイルス(TTV)は、3.9kb の1本鎖環状 DNA を持ち circoviridae に分類されるが、これまでこのウイルスの病原性についてはほとんどわかっていない。このウイルスは健康人でも高い割合で感染していることが知られている。そこでこの病原性について検討するために、TTV 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、その病原性を検討する。
- 4) 昨年度ヒトの遺伝子多型が慢性関節リウマチの進行度と相関があることを報告し、破骨細胞の骨吸収活性を抑制することを見つけた。他のグループでは、chondromodulinII として軟骨細胞、骨芽細胞の増殖促進因子として報告している。そこで、さらに破骨細胞の骨吸収活性を抑制するメカニズムを解析する。
- 5) LECT2 は好中球に対する遊走因子活性を持つことが明らかにされている。好中球が生体防御に機能するために極めて重要である好中球と血管内皮細胞の相互作用に注目し、好中球を介した LECT2 の作用を明らかにする。
- 6) LECT2 の関与する炎症反応、免疫反応を特定するためにレセプターの構造と遺伝子解析、発現様式、発現細胞、シグナル伝達機構の解析が必要となるが、そのために LECT2 レセプター(LECT2R) cDNA のクローニングを行う。
- 7) ヒト肝疾患、肝移植血漿中の LECT2 濃度を測定し病態との因果関係を調べて、臨床検査に結びつけるために、肝疾患患者検体、肝移植検体を測定し臨床的価値があるかどうかを検討する。
- 8) ヒト肝炎や骨疾患に似た様々な各種炎症モデルマウスを用いてその発症機構を解明するために、血中マウス LECT2 測定系の構築を試みる。

2. 研究方法

- 1) BALB/c マウス (雌性, 7 週齢) および BALB/c nude マウス (雌性, 7 週齢) に Con A (13 mg/kg) を尾静脈内投与して肝障害を誘発した。肝障害惹起 8 時間後、血清 GPT 活性の測定、ならびに、摘出した肝臓、脾臓より total RNA を抽出し、Northern blotting 法あるいは RT-PCR 法により LECT2、各種サイトカインの mRNA 発現の検出を行った。
- 2) サイクロスポリン A (CsA ; 50 mg/kg, 静脈内投与)、FK506 (30 mg/kg, 経口投与)、デキサメタゾン (DEX ; 3 mg/kg, 腹腔内投与)、ロリプラム (30 mg/kg, 腹腔内投与) およびインドメタシン (IM ; 10 mg/kg, 経口投与) は、それぞれ Con A 投与 1 時間前に、塩化ガドリニウム (GdCl₃ ; 30 mg/kg, 静脈内投与) は、24 および 48 時間前に 2 回投与した。
- 3) BALB/c マウス (雌性, 7 週齢) にリコンビナント TNF- α (50 ng/kg および 10 μ g/kg)、IFN- γ (3 および 30 μ g/kg) あるいは IL-2 (3 および 30 μ g/kg) を静脈内投与し、8 時間後の肝中 LECT2 mRNA 発現を上記同様に検出した。
- 4) ノックアウトマウスにおける ConA 肝炎モデル
BALB/c マウス (雌性, 7 週齢) および BALB/c LECT2 ノックアウトマウス (雌性, 7 週齢) に量を変え Con A を尾静脈内投与して肝障害を誘発した。投与後、血清 GPT 活性の測定、ならびに、摘出した肝臓、脾臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により LECT2 及び他のサイトカインの mRNA を検出した。
- 5) Gene delivery system によるマウス血中での LECT2 の産生
PANVERA 社 Gene delivery system のキットに基づき SR-alpha のプロモーター制御下のヒト LECT2 遺伝子を持つベクターを尾静脈から導入した。
- 6) LECT2 トランスジェニックマウスの作成
1 つは肝臓での誘導性を持たせるためにヒトメタロチオネインのプロモーターを、もう 1 つは恒常的発現のために鶏の β -actin のプロモーターを用い発現ベクターを C3H/JeJ に導入した。
- 7) TTV 遺伝子は genotype 1a に属する pTV-TRM-1-1 を自治医大の岡本より入手した。CMV enhancer- β -actin promoter 下流に ORF1,2-4, 2-5, 3, 6 をそれぞれ結合した後、トランスジェニックマウスを作製した。
- 8) rhLECT2 蛋白質のヨード標識 rhLECT2 蛋白質のヨード標識は外部委託し、得られた [¹²⁵I] rhLECT2 については SDS-PAGE およびオートラジオグラフィーにより蛋白質の分解等がないことを確認した。
- 9) COS-1 細胞へのトランスフェクションとスクリーニング COS-1 細胞を Lab-Tek. II Chamber Slide の各ウェルに播種し、cDNA ライブラリーより調製したプラスミド DNA のトランスフェクションを行った。3 日間の培養後に [¹²⁵I] rhLECT2 とのバインディングアッセイを行い、チャンバースライド上に細胞を固定した後、フィルム乳剤の塗布・現像および顕微鏡下での解析を行った。トランスフェクションおよびスクリー

ーニングでのポジティブコントロールとして IL-8 レセプター (IL-8R) 発現プラスミドを COS-1 細胞にトランスフェクションし、 $[^{125}\text{I}]$ IL-8 をリガンドとして rhLECT2 と同様の条件下でバインディングアッセイを行った。

- 10) ウサギ骨細胞の調製 新生仔ウサギの長骨をハサミにて細切し、骨片上の破骨細胞を遊離させた後に骨片を取り除くことにより、未分画骨細胞を調製した。
- 11) ウサギ破骨細胞の調製 未分画骨細胞をコラーゲンゲルでコートしたシャーレに播種した後、プロナーゼおよびコラゲナーゼによる温和な処理にて破骨細胞以外の細胞を除去した。ゲル上に残された破骨細胞はゲルごと回収することにより、後のアッセイ等に用いた。
- 12) ピットフォーメーションアッセイ 厚さ $30\mu\text{m}$ の象牙片上に、調製した未分画骨細胞もしくは精製破骨細胞を播種し、 37°C にて一晚培養した。翌朝、象牙片上の細胞をきれいに除去した後、破骨細胞により形成された骨吸収窩 (ピット) をヘマトキシリンで染色し、ピットの数を計測した。
- 13) ヒト好中球は正常人末梢血より分離した。血管内皮細胞はヒト臍帯より型通りに分離し (HUVEC)、これをトランスウェル表面に一層となるように準備した。好中球の HUVEC を介した遊走能 (TEM) は、HUVEC をコートしたトランスウェルの上層に好中球を加えて、下層へと移行する好中球数をカウントすることにより評価した。
- 14) cDNA ライブラリー ヒトマクロファージ様細胞を材料として、平均鎖長 1.3 kbp 以上の cDNA が正方向に挿入された cDNA 発現ライブラリーを構築した。
- 15) ヒト LECT2 の検出は、すでに確立している測定系を使用して実施した。そして、肝疾患患者検体、肝移植検体を分担研究者関連施設より入手した血漿検体を使用した。
- 16) マウス LECT2 検出系の確立のためにモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を作製し ELISA 系で使用可能であるかどうかを検討した。

3. 研究成果

- 1) T 細胞機能欠損 nude マウスを用いた検討
BALB/c マウスに Con A 投与 8 時間後、血清 GPT 活性の顕著な上昇とともに、正常肝で認められていた LECT2 mRNA の発現低下が見られた。また、nude マウスにおいても正常肝同様肝中 LECT2 mRNA の発現は認められたが、Con A 投与による肝中 LECT2 mRNA の発現低下は見られず、血清 GPT 活性の上昇も示さなかった。
- 2) 肝中 LECT2 mRNA 発現を調節する薬剤のスクリーニング
免疫抑制剤の CsA および FK506、ならびにマクロファージおよびクッパー細胞の活性化抑制剤 GdCl_3 は、Con A 投与による肝中 LECT2 mRNA の発現低下および血清 GPT 活性の上昇を著明に抑制した (Fig.1)。また、合成副腎皮質ステロイド DEX およびホスホジエステラーゼ阻害剤ロリプラムは、血清 GPT 活性の上昇を著明に抑制したが、肝中 LECT2 mRNA の発現低下には何ら影響を及ぼさなかった。一方、シクロオキシゲナーゼ阻害剤 IM は、血清 GPT 活性の上昇および肝中 LECT2 mRNA の発現低下のいずれに対しても、何ら影響を及ぼさなかった。
- 3) リコンビナントのサイトカイン投与後の肝中 LECT2 mRNA 発現に及ぼす影響
リコンビナント TNF- α 、IFN- γ および IL-2 のそれぞれ静脈内単独投与では、肝中 LECT2 mRNA 発現に何ら影響を及ぼさなかった。
- 4) LECT2 ノックアウトマウスを用いた ConA 肝炎モデルでの解析
BALB/c の野生型、LECT2 ノックアウトマウスに Con A の量を尾静脈内投与した。その結果、LECT2 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて少ない用量の Con A で致死に至ることがわかった (表 1)。次に Con A の用量を 10 mg/kg に固定し経時的に血清を採取し、同時に肝臓、脾臓を摘出した。いくつかの炎症性サイトカインのレベルについて経時変化を調べた。血清中のレベルを ELISA 法で、肝臓における遺伝子発現を RT-PCR 法により検討した。その結果、肝炎発症に関わる IFN- γ 、TNF- α に関しては野生型マウスと血清中の発現パターンはほとんど同じであった。しかし、IL-6 については若干 LECT2 ノックアウトマウスの方で発現量が高い傾向が見られた。また、Con A 投与 8 時間後の血清 GPT 活性は LECT2 ノックアウトマウスの方が野生型の約 2.5 倍の高値を示した (図 1)。
- 5) LECT2 ノックアウトマウスを用いた抗 Fas 抗体による肝細胞のアポトーシスへの影響
肝細胞のアポトーシスを誘導する抗 Fas 抗体を用いた肝障害誘導の実験を行った。しかし、抗 Fas 抗体の用量に依存した致死率の増加は LECT2 ノックアウトマウスと野生型マウスで差が無かった。

表 1 ConA 肝炎モデルにおける LECT2(+/+), LECT2(-/-)における致死率

Con A (mg/kg)	genotype		
	+/+	+/-	-/-
15	0/3	0/7	2/6
20	0/5	-	1/6

(dead/total)

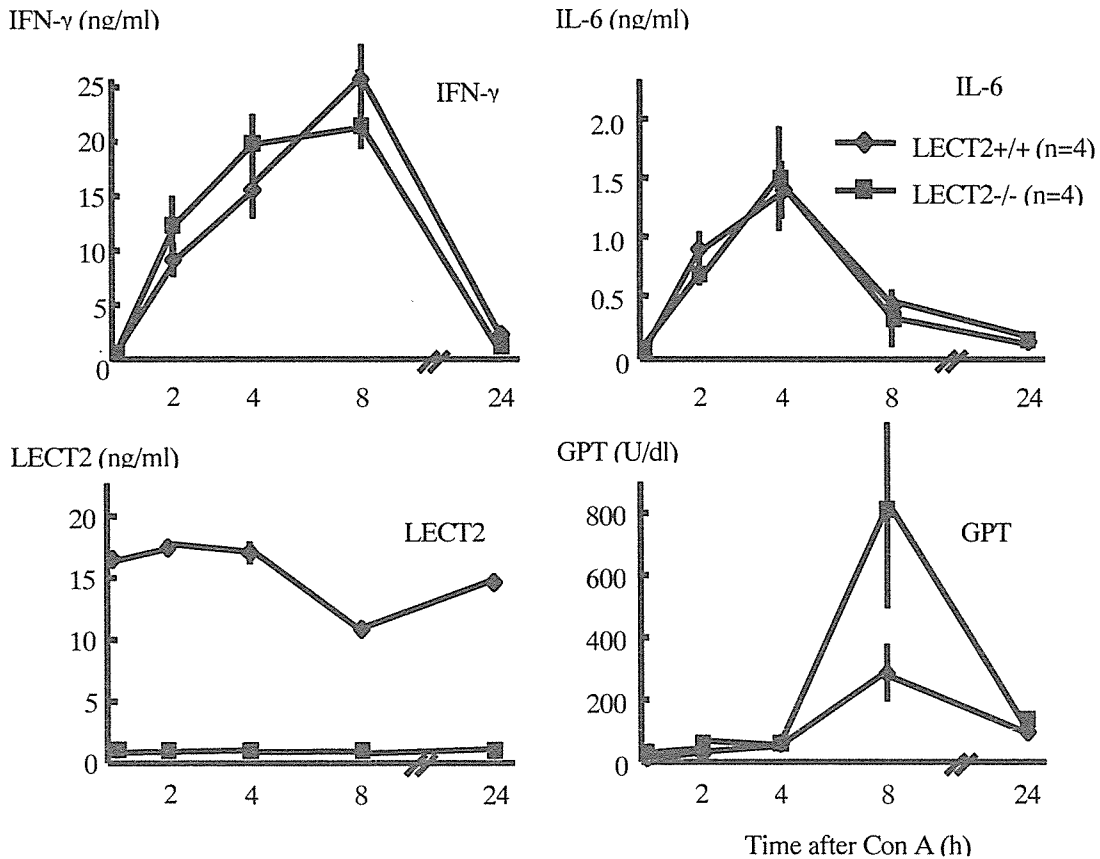


図 1. ConA 肝炎モデルを用いた LECT2(+/+), LECT2(-/-)マウスにおける血中サイトカイン濃度と GPT 活性

6) LECT2 トランスジェニックマウスの作成

2 種のマウスの作成を試みた。一つは肝臓での誘導性を持たせるためにヒトメタロチオネインのプロモーターを、もう一つは恒常的発現のために鶏の beta-actin のプロモーターを用い発現ベクターを C3H/HeJ に導入し、現在発現マウスを選択中である。

7) TTV 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製とその病原性を検討

- ① TTVORF1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは腹水の貯留を起こし、5 週齢までに全て死亡することがわかった。他の ORF を導入したマウスにはこのような異常は認められなかった。
- ② ORF1 遺伝子の発現は腎臓で一番強く、肝臓、脳でも発現が見られた。
- ③ ORF1mRNA はスプライシングを受け、143 アミノ酸から成る N 末が塩基性アミノ酸に富むタンパク質を作ることがわかった。

- ④ ORF1 トランスジェニックマウスでは血中アルブミン濃度が低く、クレアチニン、尿素窒素、総コレステロールが増加していた。これらの結果、腎機能が傷害され、ネフローゼ様の症状を示していることがわかった。
- ⑤ 腎臓の病理を検討したところ、尿細管に多数のシストが認められ、polycystic kidney の状態であった。また、糸球体の変性、硬化、capsule 細胞の肥厚、尿円柱が認められた。
- ⑥ 電子顕微鏡による検討の結果、糸球体の podocyte が未分化であり、foot process を欠損していることがわかった。この結果、TTV は腎上皮の分化を阻害することが示唆された。

8) LECT2 による破骨細胞の骨吸収活性の抑制

ウサギ破骨細胞の調製をし TRAP 染色を行うことにより、調製した破骨細胞の精製度を確認した。その結果、得られた細胞の 90%以上が TRAP 陽性の多核巨細胞（破骨細胞）であることが確認された。調製した未分画骨細胞および精製破骨細胞は象牙片上に骨吸収窩（ピット）を形成し、その細胞培養上清中に加えた rhLECT2 は濃度依存的にピットの形成を阻害することが確認された（図2）。すなわち、rhLECT2 が破骨細胞によるピット形成を抑制することにより、骨吸収抑制活性を有していることが確認された。

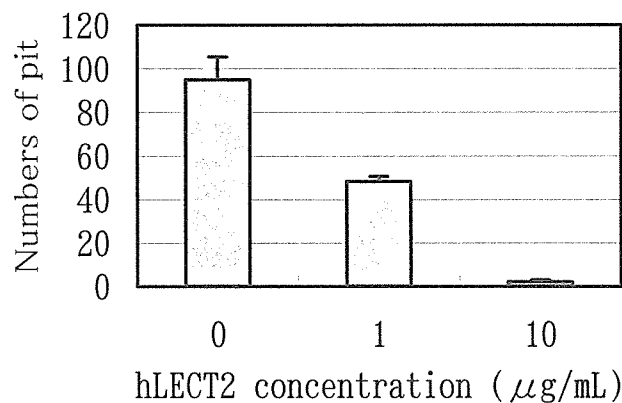


図2. ウサギの未分画骨細胞を用いた rhLECT2 による象牙片上ピット形成の阻害

9) 好中球の LTB4 による TEM 亢進作用の機序としての NO の関与

トランスウェルの下層に種々遊走因子を添加すると好中球は 120 分後に有意な遊走を示した。HUVEC を炎症性サイトカインである IL-1β や TNFα で処理すると、TEM が亢進することが明らかにされている。遊走因子の 1 つである LTB4 で HUVEC を処理すると、有意な TEM が観察された。この作用は好中球を LTB4 receptor antagonist で処理しても認められることから、HUVEC に対する作用と考えられた。LTB4 による TEM 誘導の機序を解析する目的で NO の産生阻害剤、N-Nitro-L-arginine methylester (L-NAME) を用いたところ、好中球の TEM は亢進した。従って NO は好中球の TEM に対し、抑制的に作用していると考えられた。TEM 測定系に L-NAME 存在下に NO donor を添加すると、L-NAME の TEM 亢進作用は完全に抑制された。一方 LTB4 に誘導される TEM 亢進作用は、活性酸素の消去剤である SOD や catalase によって何ら変化を示さなかった。また LTB4 で処理した血管内皮細胞の培養上清には、IL-8 や PAF は確認されなかった。

10) LECT2 レセプターのクローニング

① 組換え hLECT2 蛋白質の精製

組換え CHO 細胞の培養上清より精製された組換え rhLECT2 は、SDS-PAGE 上で単一バンドであり、また、質量分析の結果からも理論分子量と完全に一致する単一蛋白質であることが証明された。

② hLECT2 蛋白質のヨード標識

外部に委託した rhLECT2 蛋白質のヨード標識においては、放射比活性 0.2MBq/mg 以上の標識蛋白質 ([¹²⁵I] rhLECT2) が得られ、また、SDS-PAGE およびオートラジオグラフィーの結果から蛋白質の分解等が認められず、バインディングアッセイに使用可能であることが確認された。

③ COS-1 細胞へのトランスフェクションとスクリーニング

ポジティブコントロールとして用いた IL-8/IL-8R のバインディングアッセイにおいて、1000 分の 1 の割合で含まれているポジティブクローンの検出が可能であった。このことから、1 プールあたり 100 クローンの組換え体を含むプールを用いて、IL-8R と同一の条件にて rhLECT2R のスクリーニングを行った。構築した全 cDNA ライブラリーのスクリーニングを終了したが、ポジティブクローンは得られなかった。

- 11) ヒト LECT2 ELISA 測定系を用いて、肝疾患患者検体と肝移植検体を測定した。また、陽性域は、正常人検体の平均値+3S.D.以上とした。肝疾患患者検体群ではかなり高値の値を示すグループが存在した。また、肝移植検体では、ほとんどの検体が正常人レベルであったが、数例が陽性に出た。今後、これらの陽性の検体は臨床症状や他の臨床検査等の解析を行う予定である。
- 12) マウス LECT2 ELISA 測定系構築のために抗体を作製した。モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体共に十分な抗体価であった。そこで、固相抗体と検出抗体の組み合わせを検討したが、モノクローナル抗体—ポリクローナル抗体の組み合わせでは、抗原濃度依存的な反応性が確認できなかった。そこで、ポリクローナル抗体—ポリクローナル抗体の組み合わせで構築することにした。野生型と LECT2 ノックアウトマウスの血清を用い予備実験的に測定したところ、野生型のマウス血清では定量され、ノックアウトマウス血清では血中に LECT2 がほとんど確認できなかった。

4. 考察

Con A 誘発肝障害マウスはヒトのウイルス性肝炎に類似した病態モデルとして緊用されており、その発症機序には、T 細胞やクッパー細胞などから産生されるサイトカイン (TNF- α , IFN- γ など) や活性化 T 細胞を介した肝細胞アポトーシスが関与する。Con A 誘発肝障害モデル系において Nude マウスでは、Con A 投与後の肝中 LECT2 mRNA の発現低下を示さなかった。さらに、Con A 投与による肝中 LECT2 mRNA 発現低下は、T 細胞の活性化を抑制する CsA および FK506 ならびにクッパー細胞を枯渇する GdCl₃ の前処置により阻止されることが明らかとなった。一方、DEX およびロリプラムは、Con A 投与による肝中 LECT2 mRNA の発現低下に対して、何ら影響を及ぼさなかった。さらに、DEX は NF- κ B 阻害によるサイトカイン産生抑制、ロリプラムは TNF- α 産生抑制を介して、それぞれ肝障害を抑制することが知られている。DEX およびロリプラムは Con A 投与による血清 GPT 活性の上昇を抑制したが、リコンビナントの TNF- α 、IFN- γ および IL-2 の静脈内投与は、肝中 LECT2 mRNA の発現に何ら影響を及ぼさなかった。これらのことから、肝中 LECT2 mRNA 発現の調節機構には、活性化された T 細胞およびクッパー細胞が関与すると考えられるものの TNF- α 産生の関与は少ないものと推察される。一方、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の IM は Con A 投与による血清 GPT 活性の上昇および肝中 LECT2 mRNA の発現低下に何ら影響を及ぼさなかったことは、LECT2 の発現機構だけではなく、肝障害発症過程にもシクロオキシゲナーゼの関与は少ないと考えられる。

LECT2 ノックアウトマウスを用いた実験から LECT2 が肝炎症反応を抑えている可能性が明らかとなった。が、肝臓の障害ならびに治癒機転に応じて一時的低下という発現を示すが、この低下は急性期タンパク質の変化する時期とほとんど一致する。その意味は今のところ不明である。この 2 つのことを考え合わせると LECT2 の作用が肝炎の進展において多面的な作用機序を持つことを示唆するものと考えられる。今後、LECT2 トランスジェニックマウスなど外来 LECT2 タンパク質のマウスでの産生システムが確立すればさらに詳細な作用機序が判明すると考えられる。また、抗 Fas 抗体による肝障害にもノックアウトの影響が見られなかったことは、ConA 投与から肝細胞のアポトーシス誘導前までの経路にこれまで知られていない LECT2 が関わる制御メカニズムが存在することを示唆する。

好中球の血管内皮細胞を介した遊走には、遊走因子のほか種々の因子によって制御されていると考えられる。今回血管内皮細胞の代表的遊走因子の 1 つ、LTB4 で処理したところ、TEM は著明に亢進した。この作用は LTB4 が持つ遊走因子活性ではなく、血管内皮細胞に対する作用の結果と考えられた。LTB4 による TEM 亢進作用の機序として NO の関与を検討した。血管内皮細胞による NO 産生を抑制すると TEM は亢進し、NO donor の添加はこれを抑制したことから、TEM には NO が深く関与すると考えられた。

トランスフェクションおよびスクリーニングでのポジティブコントロールとして IL-8R 発現プラスミドを用いた感度の高いスクリーニング系を構築し、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行ったが、結果として LECT2R cDNA はクローニングされなかった。その原因として、①cDNA ライブラリーを構築する際に材料とした細胞が初代培養細胞であったため十分な mRNA を得ることができず、cDNA ライブラリーにおける総クローン

数が少なくなってしまった、②トランスフェクションおよびバインディングアッセイのポジティブコントロールとして IL-8/IL-8R を用いたが、LECT2/LECT2R の結合力 (Kd 値) との乖離が大きすぎた等が考えられた。一方、LECT2 の標的細胞を探索する過程で、LECT2 に骨吸収抑制活性が確認されたということは生体内における LECT2 の作用を解明する上で重要な知見であると考えるとともに、LECT2R のクローニングにおける新たな cDNA ライブラリー構築のための材料を選択する上で重要な知見であると考えられた。

ヒト LECT2 ELISA 測定系を用いて、肝疾患患者検体と肝移植検体を測定した。どちらの検体群の中にも陽性になる検体が存在し、特に、肝疾患患者検体で高値を示す検体が存在した。これらの検体のバックグラウンドについては今後、解析する予定である。また、マウス LECT2 ELISA 測定系に関しては、ポリクローナル抗体—ポリクローナル抗体の組み合わせで構築し、LECT2 ノックアウトマウス血中では LECT2 が定量されなかったので測定系は動いているのではないかと考えられた。

5. 結論

- 1) Con A 肝障害における肝中 LECT2 の発現低下調節機構には、T 細胞およびクッパー細胞の活性化が関与し、これらの細胞機能を制御する低分子化合物は、LECT2 の発現を調節できる可能性が推察された。
- 2) Con A 誘発肝障害モデルにおいて、LECT2 ノックアウトマウスを用いることにより LECT2 が肝炎症反応の過度な進展を抑制する可能性が明らかとなった。しかし、これまで知られている肝炎症に關わるサイトカイン等には顕著な影響が見られなかったこと、抗 Fas 抗体による肝障害には LECT2 ノックアウトマウスと野生型マウスで差が無かったことから、ConA 投与から肝細胞のアポトーシス誘導前までの経路にこれまで知られていない LECT2 が關わる制御メカニズムが存在することが示唆された。
- 3) TTV は腎上皮の分化を阻害し、腎不全を引き起こすことが示された。これまで、このウイルスの病原性が示されたことはなく、本研究によりはじめて TTV に病原性があることが示された。腎透析患者では、TTV の感染率が高いことが報告されており、今後慎重に本ウイルスとの関連を検討する必要がある。当初、このウイルスは肝炎を引き起こすことが疑われたが、肝臓の異常は認められなかった。
- 4) LECT2 の新たな標的細胞を探索する過程において、LECT2 が破骨細胞に直接作用し、骨吸収を抑制することが確認された。
- 5) 好中球は血管内皮細胞を経て、流血中から組織へと移行する。この過程は好中球と血管内皮細胞の一連の相互作用から成り立っている。特に炎症時やある種の病的状態では、サイトカインのほか血小板等も加わって、極めて複雑な反応系を形成していると考えられる。LECT2 が好中球に対する遊走因子活性を持つことから、好中球と血管内皮細胞の反応系にどのような作用を及ぼすか、興味あるところである。今回の基礎的検討によって測定系が確立したため、この系における LECT2 の作用を検討する予定である。好中球と血管内皮細胞の相互作用について明らかにすることは、血栓形成をはじめ血管炎等の病態を解明する上で重要と考えられる。
- 6) rhLECT2 と反応を示したヒトマクロファージ様細胞を材料として cDNA 発現ライブラリーを作製し、LECT2R cDNA のスクリーニングを行ったが、ポジティブクローンは得られなかった。
- 7) 臨床検体を用いてヒト血漿中の LECT2 の測定意義を検討した。今後明確な臨床的有用性を見出すためには、更に疾患群を広げて検討する必要があると思われた。
- 8) マウス LECT2 測定系のプロトタイプの系を作った。

6. 研究発表

- (1) Kameoka, Y., Yamagoe, S., Hatano, Y., Kasama, T. Suzuki, K. Val58Ile polymorphism of the neutrophil chemoattractant LECT2 and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis and Rheumatism* 43, 1419-1420 (2000).
- (2) Segawa, Y., Itokazu, Y., Inoue, N., Saito, T. & Suzuki, K. Possible changes in expression of a chemotaxin LECT2 mRNA in mouse livers after concanavalin A-induced hepatic injury. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 425-428 (2001).
- (3) Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191, 313-320 (2000).
- (4) Tagawa, Y., Matthys, P., Heremans, H., Dillen, C., Zaman, Z., Iwakura, Y., and Billiau,

- A. Bimodal role of endogenous interleukin-6 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *J. Leukocyte Biology*, 67, 90-96 (2000).
- (5) Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Koda, T., Nishimura, Si., Iwakura, Y., Sekikawa, K., and Nishimura, T. Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. *J Immunol.*, 165, 956-961 (2000).
- (6) Kawakami, K., Koguchi, Y., Qureshi, M. H., Miyazato, A., Yara, S., Kinjo, Y., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Kurimoto, M., and Saito, A. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK Cells. *J Immunol.*, 165, 941-947 (2000).
- (7) Miura, T., Nishikawa, S., Sasaki, S., Yamada, K., Hasegawa, S., Mizuki, D., Mizuki, M., Hatayama, I., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nakane, A. Roles of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 28, 335-41 (2000).
- (8) Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., Okumura, K., and Takeda, K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7, 94-100 (2001).
- (9) Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement for NKT cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, 98, 2577-2581, (2001).
- (10) Takano, K., Kaganoi, J., Yamamoto, K., Takahashi, A., Kido, T. & Sasada, M. Rapid and prominent up-regulation of high-affinity receptor for Immunoglobulin G (Fc γ RI) by cross-linking of β 2 integrins on polymorphonuclear leukocytes. *Int J Hematol* 72, 48-54 (2000).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社