

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	網脇 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

## 難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究

所 属 国立小児病院小児医療研究センター  
病理病態研究部

研究者 藤本純一郎

### 分担研究者

- |                  |      |
|------------------|------|
| (1) 北海道大学免疫科学研究所 | 上出利光 |
| (2) 株式会社ツムラ中央研究所 | 雨谷 栄 |
| (3) 大鵬薬品工業株式会社   | 木庭 守 |
| (4) 株式会社免疫生物研究所  | 前田雅弘 |
| (5) 生化学工業株式会社    | 宮浦修一 |
| (6) 東レ株式会社       | 森山雅美 |

### 要 旨

各種の腎炎モデルならびに細菌毒素による腎障害モデルにおける機能分子の役割について検討した。オステオポンチン (OPN) による細胞遊走や細胞接着を阻止する新たな抗体を作成した。また、肝障害、糖尿病性動脈硬化症ならびに肺肉芽腫形成に OPN が関与することを示した。抗糸球体基底膜抗体投与によるマウス腎炎モデルで、抗 OPN 投与が病変の重篤化を抑制すること、OPN がマクロファージ関連病変の形成に関与することを明らかにした。ペロ毒素 (Stx) による腎障害発生機序解析では、Stx1 によるヒト腎尿細管上皮細胞のアポトーシスを NBT が抑制すること、その機序は ATP 枯渇による Stx1 の細胞内輸送の阻止と細胞外への毒素放出によるものであることを示した。また、Stx1 と Stx2 はその受容体である糖脂質 Gb3 との結合親和性が異なることを速度論的に明らかにした。

### 1. 研究目的

各種の難治性腎障害の克服を目指し、その発症を、各種の機能分子の発現変化ならびに機能修飾に着目して研究することを目的とする。また、その成果を新しい疾患制御法の開発に応用する。機能分子として OPN に着目し、各種のリコンビナント蛋白と抗体の作成ならびに定量系作成とそれらによる各種疾患病態解析を行う。また、細菌由来毒素による腎障害克服を目指し、毒素の作用機序を分子レベルで明らかにする。

### 2. 研究方法

#### 1) OPN組み換え体および抗OPN抗体作成

各種のOPN組み換え体作成および各種のモノクローナル抗体作成についてはすでに報告した。本年度は、OPNのアミノ酸配列情報を基に10数個のアミノ酸からなる合成ペプチドを免疫し、新たな抗体を作成した。

#### 2) OPN 定量 ELISA による各種疾患患者血清値の測定

昨年度までに作製したヒトおよびマウス OPN 測定 ELISA を用いて、腎疾患を含む各種難治性疾患患者の血中 OPN 値を測定し、その動態と病態との関係を検討した。

### 3) OPN 発現系の確立

ウイルスベクターに OPN 遺伝子を組み込み、このベクターにより OPN 遺伝子を導入し組織学的変化を解析した。

### 4) 腎炎モデルにおける OPN の関与ならびに治療モデル

抗基底膜抗体の Maus 投与による腎炎モデルを用いた。この Maus にラット抗 Maus OPN 抗体 (OPN1.2, OPN2.2) を投与し、経時的に採取した尿について種々の検討を加えた。Normal 群および Vehicle 群には、rat IgG (Capple)、3mg/600  $\mu$ l/body を腹腔内投与した。さらに、腎炎発症 Maus への rat IgG 投与の影響を確認するために、Control 群を設けた。同様の Maus 腎炎モデルにおける腎 OPN 量の変化を定量 ELISA ならびに免疫染色によって検討した。また、マクロファージの局在を抗 F4/80 抗体で検索した。

### 5) Stx1 感受性試験

市販されているヒト腎尿細管上皮細胞 (HRCEC, human renal cortical epithelial cells) および皮膚毛細管内皮細胞の初代培養細胞を用いた。Stx1 を種々の濃度に添加した後の生存率は MTT アッセイで測定した。この培養に、種々の濃度の NBT を加えその効果を判定した。また、標識 Stx1 の細胞への結合をフローサイトメーター解析した。細胞培養は通常 37°C で行ったが、一部の実験では 19.5°C で行った。アポトーシスの有無は Annexin V の結合性をフローサイトメーターにて測定することによって行った。細胞内 ATP 濃度は、HClO で破壊し KOH で中和した細胞に Luciferin-Luciferase mixture (ATP determination kit; Molecular Probes 社) を加えたのち発光をルミノメーターで測定することによって測定した。

### 6) 共焦点レーザー走査型顕微鏡による Stx1 の細胞内輸送の解析

蛍光標識した Stx1 を HRCEC の培養中に添加し一定時間経過後に細胞を固定した。固定した細胞は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus) で観察し、標識 Stx1 の細胞内局在を検討した。細胞内小器官は、Transferin receptor (TFR) を early endosome (EE) と recycling endosome (RE) のマーカー、CD63 を late endosome (LE) のマーカー、抗 Golgi zone 抗体を Golgi 装置のマーカーにそれぞれ用いて標識し、Stx1 との二重染色を行った。

### 7) Stx の Gb3 受容体と結合力に関する速度論的解析

糖脂質 Gb3 を固相化したメンブレンを用いて表面プラズモン解析 (Biacore 解析) を行い、結合速度定数と解離速度定数を求めた。

## 3. 研究成果

### 1) 新たな抗 OPN 抗体作成

OPN の非 RGD 部位に相当する部分の合成ペプチドを免疫した結果、OPN による細胞遊走および細胞接着を抑制する単クローン抗体を樹立した。

### 2) 各種疾患での OPN の作用

肝障害モデル (P. acnes 投与) を用いて OPN の作用を解析した。その結果、病変局所へのマクロファージの浸潤は肝内クッパー細胞によって産生される OPN が制御していることを明らかにした。また、正常ハムスター肺に Maus OPN 遺伝子を導入して、外来性 OPN を発現させることにより、肺に肉芽腫を形成することを明らかにした。また、糖尿病患者における動脈硬化病変の増悪に OPN が関与することを明らかにした。

### 3) 腎炎モデルでの抗 OPN 抗体の治療効果

腎炎モデルでの抗 OPN 抗体投与の成績を Fig. 1 に示す。Control 群では腎炎発症による死亡例は観察されなかったが、Vehicle 群では NTS 注射 13 日目に 1 匹、最終評価日 (28 日) までに 8 匹中 3 匹が死亡した。OPN2.2 投与群では 14 日目より死亡例が確認され、最終評価日までに全例が死亡した。一方、OPN1.2 投与群では死亡例は認められなかった。尿蛋白排泄量は Vehicle および Control 群では NTS 注射

7日後より経時的に増加し、腎炎の発症が確認された。OPN2.2投与群ではFig.2に示すごとく、14日および21日目の尿蛋白排泄量が低値を示す傾向にあった。一方、OPN1.2投与群では、尿蛋白排泄量に対する影響は認められなかった。Normal, VehicleおよびOPN1.2投与群のNTS注射1および28日目の尿中OPN排泄量を測定した。尿中OPN排泄量はNTS注射1日目に顕著な増加が認められたが(Vehicle群)、28日目にはNormal動物レベルに回復していた。なお、OPN1.2投与は1日目の尿中OPN排泄量の増加を明らかに抑制したが、28日目の尿中OPN排泄量に対する影響は認められなかった。血清パラメーターに関しては、Vehicle群ではCr, BUN, T-Cholの有意な増加を認め、TPは有意な減少を認めた。この変化に対しOPN1.2はBUNを有意に抑制したが、他のパラメーターには有意な差を認めなかった。糸球体内細胞数は、Control群ではNormal群に比し有意な増加を認めたものの、VehicleおよびOPN1.2投与群ではNormalと有意な差は認めなかった。メサンギウム領域の細胞外基質の拡張およびボウマン嚢と糸球体の癒着は、Vehicle, OPN1.2およびControl共にNormalに比べ、有意な増加を認めた。また、Vehicleの値はControlに比べても有意に増加していた。一方、OPN1.2はVehicleに比べメサンギウム領域の細胞外基質の拡張およびボウマン嚢と糸球体の癒着を有意に抑制したが、その値はControlと同程度であった。

#### 4) 腎炎モデルでのOPNの変化と局在

抗GBM抗体投与による腎炎モデルマウスでは、蛋白尿は10日目から著増した。マクロファージは正常マウスでは殆ど見られないが、腎炎惹起5日目から糸球体、尿細管の一部に出現し、いったん減少したのちにボウマン嚢周囲、尿細管間質細胞に著しい浸潤を認めた。組織OPN量は15日以降に増加し20日目には正常マウスの約3.5倍に達した。抗OPN抗体染色では、尿細管上皮細胞のみならずマクロファージ浸潤部位に一致して強い陽性所見が得られた。

#### 5) NBTによるStx1毒性抑制効果

昨年度、NBTが皮膚毛細血管内皮細胞のStx1感受性を抑制することを報告したが、本年度はHRCECについても同様な作用が見られるか否かを解析した。MTTアッセイによる細胞生存率測定では、Fig.3に示すごとく、NBTの用量依存性にStx1毒性を抑制することが判明した。HRCECはStx1の添加によりアポトーシスを来たすため、Annexin V結合性が増加する(59.3%、Fig.4)。一方、NBT添加ではAnnexin V結合性が低下(19.1%)したことより、NBTによるStx1毒性抑制はアポトーシス抑制の結果であると考えられた。

#### 6) Stx1の細胞内輸送の詳細とNBTの効果

HRCECへのStx1添加培養を行ったのちに細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、ほとんどの細胞で細胞質内での毒素の集積を認めた。一方、NBT処理した場合には、殆どの細胞では毒素の集積を認めず、ごく一部の細胞にのみ毒素集積を認めた。NBT処理によりStx1の細胞への結合量が変化しているか否かを検討したが、NBT処理後もStx1は未処理の場合と同等の結合性を示すことが判明した。そこで、培養温度を19.5℃で行った後に同様に顕微鏡観察を行ったところ、NBT処理、未処理に関わらず、殆どの細胞で毒素の集積を認めた。しかし、培養温度を19.5℃から37℃に戻した場合、NBT未処理の場合はStx1が細胞内に留まるのに対し、NBT処理したものでは殆どの細胞で細胞内から毒素が消失することが判明した。NBT未処理の細胞ではStx1が細胞内に取り込まれた後、EE→LE→Golgiへと輸送されることが明らかになったため、NBT処理細胞ではEEからLEへ至らずに細胞外で放出されると予想された。また、HRCEC、毛細血管内皮細胞のいずれにおいてもNBT処理した場合には、細胞内ATP濃度が減少することが判明した。

#### 7) 表面プラズモン共鳴を用いたStxとGb3受容体との結合親和性解析

糖脂質Gb3を種々の比率で固相化したセンサー膜を用い、Stxとの結合親和性を解析した。その結果、Stx1は結合速度定数、解離速度定数がともに高く、逆にStx2は両定数がともに低いことが判明した。

#### 4. 考 察

本研究では、各種の難治性腎炎における OPN などの機能分子の発現変化ならびにその役割の解明、Stx などによる細胞膜糖脂質を介する腎障害の病態解明と治療法開発、を目指している。OPN については、解析に必要な各種組み換え体作成、抗体作成および ELISA 定量系開発をすでに終了した。OPN の重要性はすでに各種の腎炎モデルでの有用性を示していたが、本年度はさらに肝障害や糖尿病などの病態とも関連することを明らかにした。特に、種々の疾患においてマクロファージが関与する病態に OPN が深く関与する可能性を示すことができた。新たに開発したアアデノウイルスベクターを用いた OPN 発現系を用いて OPN が肉芽腫形成に関与することを示せたことは、上記観察を裏付ける所見であると考えられる。

腎疾患に OPN が関与することは、その機能を制御することによる治療法開発につながる。マウス腎炎モデルへの抗 OPN 抗体投与による症状の改善結果はそのひとつの成果である。また、本年度新たに開発した抗 OPN 抗体は非 RGD 部位に対する抗体であるが、それが OPN による細胞遊走や細胞接着を抑制する特徴を持つ。すなわち、RGD 部位のみならず他の部位も機能ドメインとして作用することを示す新しい知見である。病態成立や治療法開発を考慮する上で重要な情報である。

本研究では、また、Stx による難治性腎障害をモデルとしてその発症機序の臨床病理学的、生化学的解析を行い、予防法や治療法の開発基盤を作成することも研究対象とした。昨年度までの研究で、ヌクレオチド輸送阻害剤である NBT がヒト毛細血管内皮細胞培養の Stx 感受性を抑制することを明らかにしたが、本年度はヒト腎尿細管上皮細胞初代培養についても同様の結果を得ることができた。NBT の作用機序解析は障害発生を予防する上で重要と考えられたため、Stx1 の細胞内輸送の詳細を検討した。その結果、Stx1 は EE→LE→Golgi へと輸送されることを明らかにした。また、NBT 処理では Stx1 は同様に細胞内に取り込まれるものの、EE から LE への輸送が行われず細胞外に放出される機構が存在する可能性が示唆された。EE から LE への分子輸送はエネルギー依存性であると考えられていることから、NBT 作用による細胞内 ATP の減少がその背景にあると予想される。事実、NBT 処理では細胞内 ATP が減少している所見を得た。これらの成果は、いったん細胞内に取り込まれた毒素も特定の条件では細胞外に放出されうることを示しており、薬剤標的としての毒素輸送回路同定の意義は大きい。

本年度はまた、表面プラズモン共鳴を用いた Stx と Gb3 受容体との結合親和性解析を行い、Stx1 と Stx2 では全く異なる結果を得た。患者の病態解析からは、Stx2 産生株の感染がより重篤となることが知られており、その分子基盤の解明が求められている。結合親和性の違いがその原因の一部になっている可能性があり、より詳細な解析への重要情報となる。

#### 5. 結論

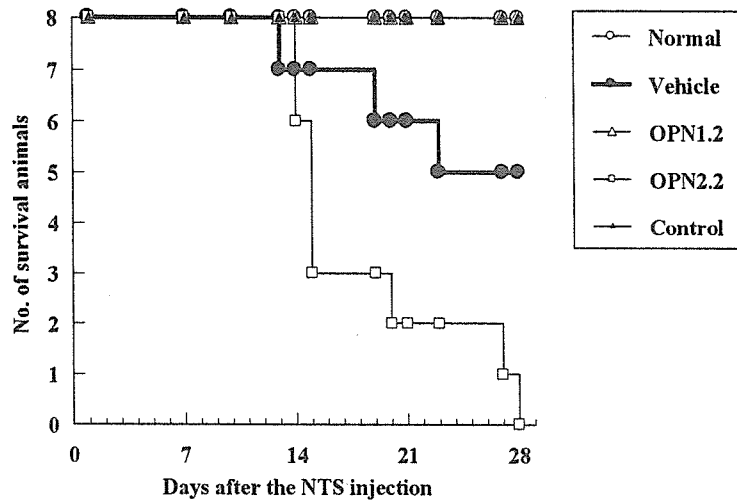
- 1) 合成ペプチドを用いて OPN による細胞遊走や細胞接着を阻止する新たな抗体を作成した。
- 2) OPN が肝障害、糖尿病性動脈硬化症、肉芽腫形成に関与することをアデノウイルス発現系などを通じて明らかにした。
- 3) 抗 GBM 抗体投与によるマウス腎炎モデルにおいて、OPN がマクロファージ関連病像の形成に関与することを示した。また、同系での抗 OPN 抗体投与により疾患の重篤化を抑制することができた。
- 4) NBT は Stx1 による HRCEC のアポトーシスを抑制することにより Stx1 毒性を抑制する作用を有することを示した。
- 5) Stx1 は細胞内に取り込まれた後、EE→LE→Golgi へと輸送されるが、NBT 処理細胞では EE から LE への輸送が阻止されており EE から細胞外に放出される機序の存在を示した。
- 6) Stx1 と Stx2 は受容体 Gb3 への結合親和性が異なることを速度論的に明らかにした。

#### 6. 研究発表

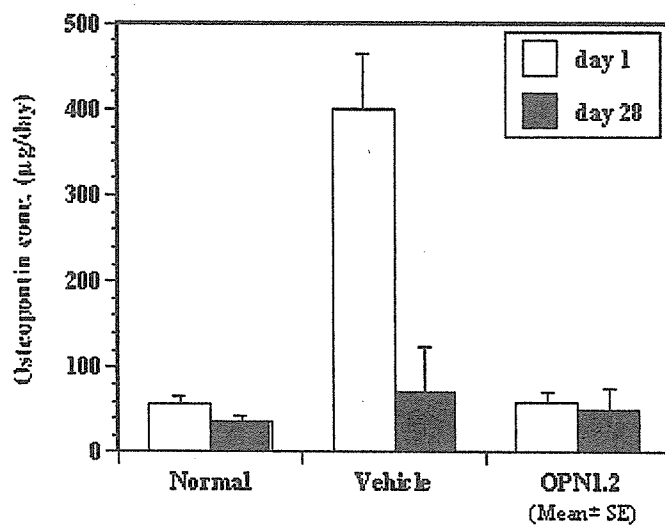
1. Mori T, Kiyokawa N, Katagiri-U Y, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Sato N, Ohmi K, Nakajima H, Takeda T and Fujimoto J. Globotriaosyl ceramide (CD77/Gb3) in the glycolipid-enriched

- membrane domain participates in the B cell receptor-mediated apoptosis by regulating Lyn kinase activity in human B cells, *Exp-Hematol*, 2000 Nov 1;28(11):1260-1268.
2. Kaneko K, Kiyokawa N, Ohtomo Y, Nagaoka R, Yamashiro Y, Taguchi T, Mori T, Fujimoto J and Takeda T. Apoptosis of renal tubular cells in Shiga toxin mediated hemolytic uremic syndrome, *Nephron*, 2001;87:182-187.
  3. Kiyokawa N, Mori T, Taguchi T, Saito M, Minori K, Suzuki T, Sekino T, Sato N, Nakajima H, Katagiri-U Y, Takeda T and Fujimoto J. Activation of the caspase cascade during Stx1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells, *J-Cell-Biochem*, 2001 Apr 1;81(1):128-142.
  4. Katagiri-U Y, Kiyokawa N and Fujimoto J. A role for lipid rafts in immune cell signaling. (review), *Microbiol-Immunol*, 2001;45(1):1-8.
  5. Katagiri-U Y, Kiyokawa N and Fujimoto J. The effect of Shiga toxin binding to globotriaosylceramide in rafts of human kidney cells and Burkitt's lymphoma Ramos cells. (review), *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, in press.
  6. Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri-U Y and Fujimoto J. CD24 induces apoptosis in human B cells via the GEM/rafts mediated signaling system. *J-Immunol*, in press.
  7. Nakajima H, Katagiri-U Y, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Minori K, Saito M, Nakao H, Takeda T and Fujimoto J. Single step method for purification of Shiga toxin 1 B subunit using receptor mediated affinity chromatography by globotriaosylceramide conjugatin octyl sepharose CL-4B. *Protein Expression and Purification*, in press.
  8. Wang, Y., Mochida, S., Kawashima, R., Inao, M., Matsui, A., YouLuFuz, Y., Nagoshi, S., Uede, T. & Fujiwara, K. Increase expression of osteopontin in activated Kupffer cells and hepatic macrophage migration in *Propionibacterium acnes*-treated rat liver. *J. Gastroenterol.* 35, 696-701(2000).
  9. Shijubo, N., Uede, T., Kon, S., Nagata, M. & Abe, S. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. *Crit. Rev. Oncog.* 11, 135-146(2000).
  10. Chiba, S., Rashid, MM., Okamoto, H., Shiraiwa, H., Kon, S., Maeda, M., Murakami, M., Inobe, M., Kitabatake, A., Chambers, AF. & Uede, T. The role of osteopontin in the development of granulomatous lesions in lung. *Microbiol. Immunol.* 44, 319-332(2000).
  11. Kon, S., Maeda, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Horikoshi, Y., Chikuma, S., Tanaka, K., Rashid, MM., Inobe, M., Chambers, AF. & Uede, T. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J. Cell. Biochem.* 77, 487-498(2000).
  12. Takemoto, M., Yokote, K., Nishimura, M., Shigematsu, T., Hasegawa, T., Kon, S., Uede, T., Matsumoto, T., Saito, Y. & Mori, S. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 624-628(2000).
  13. 上出利光, 今重之, 前田雅弘. 肉芽腫形成とオステオポンチン. *臨床免疫* 34, 91-96(2000).
  14. 上出利光, 今重之, 堀越優子, 前田雅弘, 堀田裕, 塚本泰司, 片桐洋子. オステオポンチンと疾患. *病理と臨床* 18, 342-348(2000).





**Fig. 1** Effects of OPN1.2 and OPN2.2 on survival in mouse anti-GBM nephritis model



**Fig. 2** Effect of OPN1.2 on urinary osteopontin excretion in mouse anti-GBM nephritis model

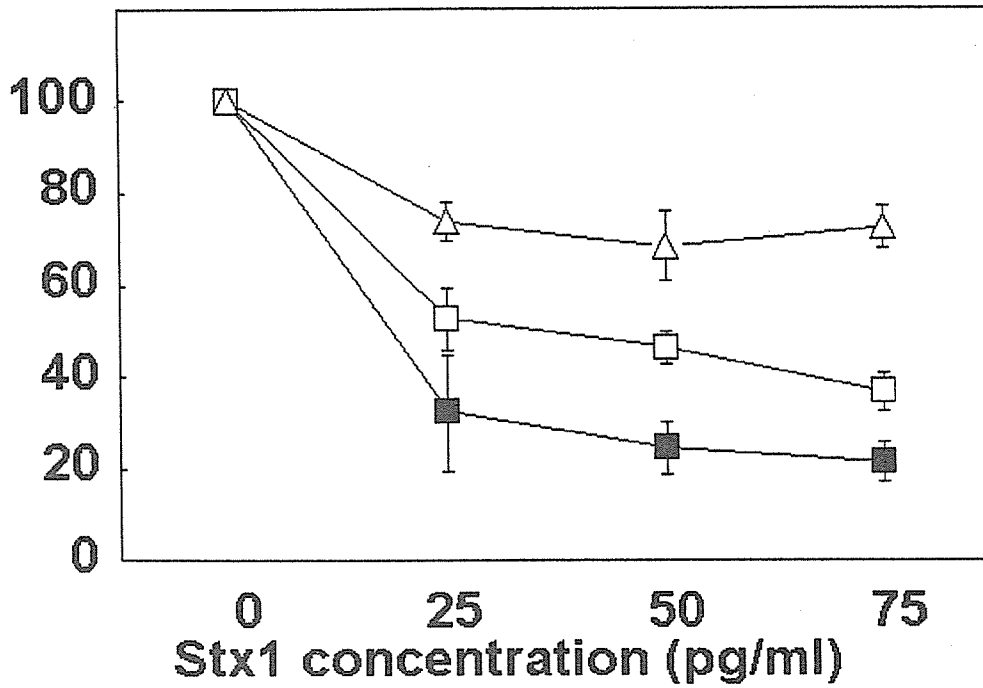


Fig. 3 NBT Inhibits Cytotoxicity of Stx against HRCEC

NBT was added to Stx1 mediated cytotoxicity assay.

Concentration of NBT: ■ (0 μM), □ (10 μM), and △ (100 μM).

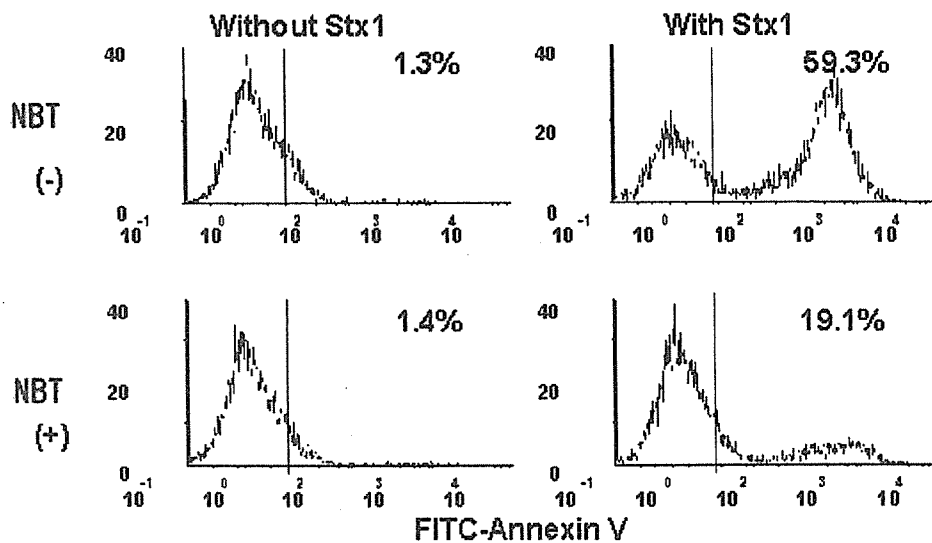


Fig. 4 Apoptosis Detection by Annexin V Binding

When NBT was added to Stx1-mediated cytotoxicity of HRCEC, binding of Annexin V was significantly reduced.

---

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