

200/0457

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

腎疾患機能遺伝子の同定及びゲノム創薬に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮田 敏男

平成14(2002)年3月

目次

序文

主任研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授

I. 総括研究報告

腎疾患機能遺伝子の同定及びゲノム創薬に関する研究 1 - 10

主任研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授

II. 分担研究報告

1. メサンギウム細胞特異的遺伝子発現システムの開発 11 - 17

分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学際領域センター 教授

2. メグシン機能の解析 19 - 24

分担研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手

序 文

日本における末期腎不全透析患者数は人口あたりに換算すると世界第一位である。日本においては、腎移植は年間700症例余に過ぎず、この数値はここ数年増加していない。近年の高齢化に伴い透析患者年齢もますます高齢化してきた。このため腎疾患を治療し、腎不全への進展を防ぐ薬剤の必要性が認識されている。しかし、残念なことに、腎疾患治療薬を開発目標として掲げている製薬企業は皆無である。この理由は、創薬の標的分子などの情報が得られていないこと、有用な自然発症腎炎モデルが得られていないため創薬開発の良い評価系が存在しないこと、すなわち創薬のための研究基盤が不十分であり、創薬のモチベーションを高められないことが強い原因である。最近になって複数のアメリカのベンチャーが腎疾患治療開発のための標的分子同定を目指して研究を開始したことが報告されているが、メサンギウム細胞機能遺伝子の具体的な報告はない。

我々は腎疾患の発症進展に中心的役割を演ずるメサンギウム細胞に発現する特異遺伝子群の量的・質的解析を完了し、メサンギウム細胞に特異的に発現する機能的蛋白であるメグシンをはじめ幾つかの新規遺伝子群 (PP4Rmeg、meg-2、meg-3、meg-4) を同定した。メグシンは活性型 serpin に属し、ヒト腎炎や実験腎炎において発現が著明に亢進している。また、ヒトメグシン遺伝子導入マウスにおいてはヒトメサンギウム増殖性腎炎と類似の病像を呈することなどから、メグシンの発現増強がメサンギウム基質のリモデリングやメサンギウム細胞の免疫複合体処理能を低下させ、病態の形成に関与する事が示唆されている。本研究の目的は、腎疾患ゲノム創薬に向けての標的分子などの情報と研究材料 (リコンビナント蛋白、抗体、遺伝子改変マウス) などの研究基盤を提供することである。

本年度の研究では

1. ヒトメグシン遺伝子転写の cis-acting element を含む promoter 領域を同定し、この領域を GFP/LacZ に連結させ、トランスジェニックマウスを製作した
2. ヒトリコンビナントメグシンに対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を確立し、生体試料 (尿、血液) 中メグシンの定量に取り組んだ

3. メグシン活性を中和する抗体の獲得およびその抗体認識部位アミノ酸配列の決定を行った
4. メグシン高発現マウスを用いた評価系モデル動物の作製を行った
5. meg-3、meg-4 の機能解析を目的としたノックアウト用コンストラクト作製を完了した

本年度の研究により、メグシンに対する情報と研究材料の準備が完了した。特筆すべき点は、メグシン活性を中和する抗体が獲得されたことであり、その抗原認識部位が reactive center loop (RCL)内のセリンプロテアーゼ切断部位である P1-P1' を含む6 残基 (NIVEKQ) のペプチドに決定されたことである。また、メグシン遺伝子改変マウスに少量の抗基底膜抗体を投与することにより短期間でのメサンギウム傷害評価を可能にする腎炎モデルが得られたことである。

本研究によって、メサンギウム細胞の情報が得られ、創薬のための研究基盤や研究材料が得られれば、製薬企業の創薬リスクがヘッジされ、この遅れた分野の創薬開発が加速されることが期待できる。急増する腎不全透析患者数を減少させ、増大する医療費を大幅に削減できるであろうし、それによって医療経済面で重要視されている保健医療制度の破綻を防ぐことにも繋がる。さらに、患者ならびにその家族の社会・経済活動の活性化を図ることにも大いに貢献する。本年度の研究成果で得られたリコンビナント蛋白・中和抗体・評価系モデルをゲノム創薬に向け来年度活用していきたい。

平成 14 年 3 月

主任研究者 宮田 敏男
(東海大学医学部内科 助教授)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

腎疾患機能遺伝子の同定及びゲノム創薬に関する研究

主任研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授
分担研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手
分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学際領域センター 教授

A. 研究目的

日本における末期腎不全透析患者数は人口あたりに換算すると世界第一位である。日本においては、腎移植は年間 700 症例余に過ぎず、この数値はここ数年増加していない。近年の高齢化に伴い透析患者年齢もますます高齢化してきた。このため、腎疾患を治療し、腎不全への進展を防ぐ薬剤の必要性が認識されている。しかし、残念なことに、有効な治療薬はなく、腎疾患治療薬を開発目標として掲げている製薬企業も皆無である。腎疾患治療薬開発へのモチベーションは全く低い。この理由は、市場が小さいためではなく、創薬の標的分子などの情報が得られていないこと、創薬開発の評価系として有用な腎炎動物モデルが得られていないことなどゲノム創薬の研究基盤が不十分であることが強い原因である。

我々は腎疾患の発症進展に中心的

役割を演ずるメサンギウム細胞に発現する特異遺伝子群の量的・質的解析を完了し、メサンギウム細胞に特異的に発現する機能的蛋白であるメグシンをはじめ幾つかの新規遺伝子群（PP4Rmeg、meg-2、meg-3、meg-4）を同定した。メグシンは活性型 serpin に属し、ヒト腎炎や実験腎炎において発現が著明に亢進している。また、ヒトメグシン遺伝子導入マウスにおいてはヒトメサンギウム増殖性腎炎と類似の病像を呈することなどから、メグシンの発現増強がメサンギウム基質のリモデリングやメサンギウム細胞の免疫複合体処理能を低下させ、病態の形成に関与する事が示唆されている。本研究の目的は、腎疾患ゲノム創薬に向けての標的分子などの情報と研究材料（リコンビナント蛋白、抗体、遺伝子改変マウス）などの研究基盤を提供することである。

本年度の研究では、1) メサングウム細胞特異的遺伝子発現システムの開発、2) メサングウム特異的発現分子に対する抗体を用いた診断法の開発、3) メグシン蛋白活性を抑制する中和抗体の作製、4) メグシントランスジェニック (Tg) マウスを用いた評価系モデル動物の作製、5) 腎特異的高発現新規遺伝子群の機能解析 (PP4Rmeg、meg-2、meg-3、meg-4) を行った。

B. 研究方法

1) メサングウム細胞特異的遺伝子発現システムの開発

メグシン転写開始点上流域の cis 転写領域を解析し、正の転写領域を解析する。腎臓メサングウム細胞に特異的に遺伝子が発現するシステムの開発をめざして、メグシン転写開始点上流域の下流に緑色蛍光蛋白(GFP)を結合させ、メグシンプロモータートランスジェニックマウスを作製する。cis-acting element を含む promoter 領域を安定導入したマウスメサングウム細胞を樹立し既存のサイトカインの影響につき検討する。

2) メサングウム特異的発現分子に対する抗体を用いた診断法の開発

ヒトリコンビナント精製メグシンを免疫源として免疫を行い単一クローン抗体を作製し、メグシンを検出するサンドイッチ ELISA を確立する。このアッセイ系を用いて、健常人、腎不全患者、メグシントランスジェニックマウスの生体試料 (血液、尿) 中のメグシンを定量する。

3) メグシン蛋白活性を抑制する中和抗体の作製

得られた単一クローン抗体のなかから、メグシン活性の阻害作用 (中和抗体) の検索を行う。中和活性の評価には、生物学的解析としてメグシンがプラスミン活性を阻害する事を、さらにメグシン・プラスミン複合体形成反応を利用する。中和抗体が得られれば、その抗体認識アミノ酸配列につき検討する。

4) メグシントランスジェニック (Tg) マウスを用いた評価系モデル動物の作製

Megsin Tg マウスはヒトに類似の糸球体腎炎を自然発症するのに 40 週間かかる。その表現系を加速するために、幾つかの負荷 (片腎摘出、薬剤、抗糸球体基底膜抗体投与など) を与えて検討する。

5) 腎特異的高発現新規遺伝子群の機能解析 (PP4Rmeg、meg-2、meg-3、meg-4)

メグシン以外のメサンギウム細胞高発現遺伝子の機能につき解析する。meg-2、meg-3、あるいは meg-4 メグシントランスジェニックマウスを作製し解析する。meg-3 及び meg-4 ノックアウトマウスを作製する。

(倫理面への配慮)

これまで本研究においてヒト組織を用いた実験は、全て東海大学医学部医の倫理委員会によって承諾されており、その規則に従って施行している。よって、いずれの検体も提供者にご依頼・説明書を提示し、同意書によるインフォームドコンセントを得、そのプライバシーが十分に保たれた条件にて用いている。本研究課題ではその性質上、マウスを用いた動物実験を多く施行する。したがってすべての動物実験は動物福祉の立場からの要請や法的規制に十分従い、個体に最も負担の少ない実験手技を用いる。

C. 研究結果及び考察

1) メサンギウム細胞特異的遺伝子発現システムの開発

メグシン転写開始点上流域 (約 6 kbp) の cis 転写領域を解析し、正の転写領域 (cis-acting element) を同定した。メグシン転写開始点上流域 (約 6 kbp) の下流に緑色蛍光蛋白(GFP)を結合させ、メグシンプロモータートランスジェニックマウスを2系統作製したが、糸球体をはじめいかなる主要臓器にも GFP 発現は認めなかった。おそらく正常メサンギウム細胞においてはメグシンプロモーターの活性が弱いためと推測された。promoter 領域導入マウスメサンギウム細胞で検討したところ、既存のサイトカインのなかで TGF-beta がメグシンの転写を亢進した。そこで、メグシンプロモータートランスジェニックマウスの糸球体障害時や TGF-beta 負荷時の GFP 発現につき検討している。

2) メサンギウム特異的発現分子に対する抗体を用いた診断法の開発

ヒトリコンビナントメグシンを用いて最終的に64個の単一クローン抗体を得た。これら全ての抗体の反応特性を ELISA、ウエスタンブロットティング、免疫組織染色、BIACORE などの方法を用いた解析を行い抗体評価のパネル作製を完了した。次に、サンドイッチ ELISA 解析用の抗体を選択する目的で様々

な組み合わせの比較検討を行い、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体による最適な組み合わせを決定し、精製リコンビナントメグシンを数 ng/ml のオーダーまで検出できるサンドイッチ ELISA 法の確立を完了した。このアッセイ系を用いて健康人、腎不全患者、メグシントランスジェニックマウスの生体試料（血液、尿）中のメグシン定量を試みたが、メグシンは検出できなかった。今後、生体成分中の夾雑物質による妨害とメグシンの安定性の問題に関する検討を行う。

3) メグシン蛋白活性を抑制する中和抗体の作製

得られた単一クローン抗体につき、メグシン活性の阻害作用（中和抗体）の検索を行った。最終的に1個の候補抗体を得られ、抗原特異性（他のセルピンとの交差性）、中和活性能の特異性を確認した。中和抗体の抗体認識アミノ酸配列検索は、reactive center loop (RCL)内を中心とした様々なペプチドを合成し検討した。その結果、抗原認識部位が明らかとなり、RCL 内のセリンプロテアーゼ切断部位である P1-P1' を含む6 残基 (NIVEKQ) のペプチドであることが決定された。

4) メグシントランスジェニック (Tg) マウスを用いた評価系モデル動物の作製

Megsin Tg マウスに認められた腎傷害を加速するために、幾つかの負荷（片腎摘出、薬剤、抗糸球体基底膜抗体投与など）を与えて検討したところ、抗糸球体基底膜抗体による糸球体傷害を与えることにより、正常では糸球体障害が継時的に回復するのに対し、Tg マウスは修復機能が遅延した。これにより Tg 腎炎の発症を短期間で加速させる一つの手法が見出された。

5) 腎特異的高発現新規遺伝子群の機能解析 (PP4Rmeg、meg-2、meg-3、meg-4)

メグシン以外のメサンギウム細胞高発現遺伝子に関しても、いくつかの知見が得られた。PP4Rmeg は protein phosphatase 4 の新規調節サブユニットであることを同定した。meg-3 は転写調節に関与する SH3 ドメインとの結合モチーフを有する高プロリン領域を有すること、meg-4 は ATP 依存性 metalloprotease に属することなどが示されたが、その腎臓に於ける病態生理学的意義は不明である。そこで、これらの遺伝子改変マウスを作製した。meg-2、meg-3、あるいは

は meg-4 メグシントランスジェニックマウスを作製し、腎臓における発現が強い系統において経時的腎病理、腎機能変化を検討してきたが、40 週令までの経過観察においては、有意な腎機能障害の自然発症は確認できなかった。現在、片腎摘出・抗糸球体基底膜抗体投与などの負荷を与えて検討中。meg-3 及び meg-4 ノックアウトマウス作製に向けてのコンストラクトも完了した。

D. 評価

I. 達成度について

本年度の研究により、メグシンに対する情報と研究材料の準備が完了した。特筆すべき点は、メグシン活性を中和する抗体が獲得されたことであり、その抗原認識部位が reactive center loop (RCL) 内のセリンプロテアーゼ切断部位である P1-P1' を含む 6 残基 (NIVEKQ) のペプチドに決定されたことである。また、メグシン遺伝子改変マウスに少量の抗基底膜抗体を投与することにより短期間でメサンギウム傷害を評価することを可能にする腎炎モデルが得られたことである。腎疾患ゲノム創薬研究に必須な研究材料（リコンビナント蛋白、抗体、遺伝子改変マウスなど）の準備が予定通りに遂行され、メサンギウム特異的遺伝

子発現機構の解明も進んでいる。

II. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

日本における末期腎不全透析患者数は人口あたりに換算すると世界第一位である。このため、腎疾患を治療し、腎不全への進展を防ぐ薬剤の必要性が認識されているが、残念なことに、有効な治療薬はなく、腎疾患治療薬を開発目標として掲げている製薬企業も皆無である。この理由は、創薬の標的分子などの情報が得られていないこと、創薬開発の評価系として有用な腎炎動物モデルが得られていないこと、などゲノム創薬の研究基盤が不十分であることが強い原因である。最近になって複数のアメリカのベンチャーが、腎疾患治療開発のための標的分子同定を目指して研究を開始したことが報告されている。しかし、メサンギウム細胞機能遺伝子の具体的な報告をしたのは我々が初めてであり、この分子の解析を行うことは腎臓病の発症、進展機序について理解を深めるとともに、創薬開発の観点からも多大な意義がある。

本研究は、診断及び治療という視点で全く糸口のなかった腎疾患研究に初めてのゲノム創薬のターゲット分子を同定し、その基礎的研究を推

進することにより腎疾患診断・治療薬開発を目指す上で極めて有用な基幹技術を提供する。

ゲノム創薬により腎疾患に対する薬剤が開発されれば、急増する腎不全透析患者数を減少させ、増大する医療費を大幅に削減でき、保健医療制度の破綻を防ぐこともできる。さらに患者ならびにその家族の社会・経済活動の活性化を図ることにも大いに貢献する。

III. 今後の展開について

1. メグシン転写開始点上流域 cis-acting element を利用したメグシンプロモータートランスジェニックマウスの糸球体障害時や TGF-beta 負荷時の GFP 発現につき検討する。

2. 健常人、腎不全患者、メグシントランスジェニックマウスの生体試料（血液、尿）中のメグシンを定量できるサンドイッチ ELISA を確立する。

3. より中和活性の高い中和抗体の獲得を目指し、効果的な免疫あるいは phage display による検索を行い、抗体治療の可能性に向け研究を展開させる。

4. 上記で得られた中和抗体を抗糸

球体基底膜抗体による糸球体傷害を与えたメグシントランスジェニックマウスに投与し病態軽減に対する有用性を評価する。

meg-2、meg-3、あるいは meg-4 メグシントランスジェニックマウスに片腎摘出・抗糸球体基底膜抗体投与などの負荷を与えて検討する。また meg-3 及び meg-4 ノックアウトマウスの作製を継続する。

E. 結論

我々は腎疾患の発症進展に中心的役割を演ずるメサンギウム細胞に発現する特異遺伝子群の量的・質的解析を完了し、メサンギウム細胞に特異的に発現する機能的蛋白であるメグシンをはじめ幾つかの新規遺伝子群（PP4Rmeg、meg-2、meg-3、meg-4）を同定した。メグシンは活性型 serpin に属し、ヒト腎炎や実験腎炎において発現が著明に亢進している。また、ヒトメグシン遺伝子導入マウスにおいてはヒトメサンギウム増殖性腎炎と類似の病像を呈することなどから、メグシンの発現増強がメサンギウム基質のリモデリングやメサンギウム細胞の免疫複合体処理能を低下させ、病態の形成に関与する事が示唆されている。本研究の目的は、腎疾患ゲノム創薬に向けての標的分子などの情報と研究材

料（リコンビナント蛋白、抗体、遺伝子改変マウス）などの研究基盤を提供することである。

本年度の研究により以下の結果が得られた。

1) ヒトメグシン遺伝子転写の cis-acting element を含む promoter 領域を同定し、この領域を GFP/LacZ に連結させ、トランスジェニックマウスを作製した。

2) ヒトリコンビナントメグシンに対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を確立し、生体試料（尿、血液）中メグシンの定量に取り組んだ。

3) メグシン活性を中和する抗体の獲得およびその抗体認識部位アミノ酸配列の決定を行った。

4) メグシン高発現マウスを用いた評価系モデル動物の作製を行った

5) meg-3、meg-4 の機能解析を目的としたノックアウト用コンスト

ラクト作製を完了した。

本年度の研究により、メグシンに対する情報と研究材料の準備が完了した。特筆すべき点は、メグシン活性を中和する抗体が獲得されたことであり、その抗原認識部位が reactive center loop (RCL)内のセリンプロテアーゼ切断部位である P1-P1' を含む 6 残基 (NIVEKQ) のペプチドに決定されたことである。また、メグシン遺伝子改変マウスに少量の抗基底膜抗体を投与することにより短期間でのメサンギウム傷害を評価を可能にする腎炎モデルが得られたことである。来年度は、このモデルマウスに中和抗体を投与し、腎炎の軽減効果が得られるかにつき検討を行いたい。さらに、より中和活性の高い抗体の獲得を目指し、効率的な免疫方法あるいは phage display 法を行う。

F.研究発表

論文発表

—国外—

1. Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Yoshino A, Onogi H, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K. Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion. **J Clin Invest.** 2002 Mar 1;109(5):585-593.
2. Nangaku M, Miyata T, Suzuki D, Umezono T, Hashimoto T, Wada T, Yagi M, Nagano N, Inagi R, Kurokawa K. Cloning of rodent megsin revealed its up-regulation on mesangioproliferative nephritis. **Kidney Int** 2001; 60: 641-652.
3. Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Ueda Y, Izuhara Y, Sakai H, Nangaku M, Kurokawa K. Specific tissue distribution of megsin, a novel serpin, in the glomerulus and its up-regulation in IgA nephropathy. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 286: 1098-1106.
4. Suzuki D, Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl Stress, Type-2 diabetic nephropathy in Japan from bench to bedside. **Contributions to Nephrology** 2001; 13: 36-45.
5. Wada T, Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Suzuki D, Wagatsuma M, Wadinski B, Kurokawa K. Cloning and characterization of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4 from mesangial cells. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 2601-2608.

学会発表

—国外—

1. Inagi R, Miyata T, Imasawa T, Kurokawa K, Nangaku M. Mesangial cell-predominant gene, megsin. **The 3rd Japanese-European Nephrology Forum.** in Hakone (Japan). March 2- 4, 2001.

2. Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Suzuki D, Sugiyama S, Kurokawa K. Progressive mesangial matrix expansion and hypercellularity in transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin. **ASN/ISN World Congress of Nephrology**. in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
3. Nangaku M, Yamada K, Gariepy CE, Yanagisawa M, Gordon KL, Inage R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Johnson RJ. ETB receptor protects the tubulointerstitium in experimental thrombotic microangiopathy. **ASN/ISN World Congress of Nephrology**. in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
4. Ueyama H, Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Kurokawa K. Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. **ASN/ISN World Congress of Nephrology**. in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
1. 宮田敏男. Molecular approaches to diabetic nephropathy. 第17回四国インスリン治療研究会. 特別講演 2000.10.7. 徳島.
2. 宮田敏男. 進行性糸球体障害に対するポストゲノム研究・ゲノム創薬. 第一回腎不全病態治療研究会. 2000.11.18. 東京.
3. 宮田敏男. ゲノム創薬に向けての標的遺伝子探索. 第11回関東腎研究会. 特別講演. 2001.2.3. 東京.
4. 宮田敏男. 糖尿病性腎症に対する分子的アプローチ. 第3回神奈川糖尿病フォーラム. 特別講演 2001.2.3. 東京.
5. 宮田敏男. 腎疾患ゲノム創薬にむけての標的遺伝子探索. 第2回 Aging Science Forum. 2001.04.14. 横浜.
6. 宮田敏男, 稲城玲子, 南学正臣, 鈴木大輔, 杉山 敏, 堺秀人, 黒川 清. ヒトメサンギウム細胞高発現遺伝子改変マウスにおけるメサンギウム増殖性腎炎. 第43回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27~5.29. 東京.

-国内-

7. 和田健彦, 宮田敏男, 南学正臣, 稲城玲子, 鈴木大輔, 堺秀人, 黒川 清. ヒト培養メサンギウム細胞よりのプロテインホスファターゼ新規サブユニットのクローニングと解析. 第 43 回日本腎臓学会 学術総会. 講演. 2001.5.27~5.29. 東京.
8. 宮田敏男. 糖尿病性腎症に対する分子的アプローチ. 第 1 回糖尿病と血管障害セミナー. 特別講演. 2001.06.15. 大阪.
9. 宮田敏男. ゲノム創薬にむけての標的遺伝子探索. 北里医学会招待学術講演会. 特別講演. 2001.07.26. 神奈川.
10. 宮田敏男. 糸球体障害治療に向けてのゲノム創薬. 第 45 回中部日本糸球体腎炎談話会. 特別講演. 2001.07.28. 名古屋.
11. 宮田敏男. 進行性糸球体障害に向けてのゲノム創薬. 第 15 回京都腎臓セミナー. 特別講演. 2001.09.01. 京都.
12. 宮田敏男. 進行性糸球体疾患に向けてのゲノム創薬. 神戸大学大学院講義「先端医学トピックス」. 特別講演. 2001.09.13.神戸.
13. 宮田敏男. ゲノム創薬に向けてのポストゲノム解析. 第 26 回日本医用マススペクトル学会. シンポジウム. 2001.09.28. 東京.
14. 稲城玲子, 宮田敏男, 南学正臣, 黒川 清. メサンギウム細胞高発現遺伝子メグシンのポストゲノム研究. 第 2 回腎不全病態治療研究会. 2001.12.8. 東京.
15. 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川 清. メサンギウム細胞高発現遺伝子メグシンのポストゲノム研究. 第 39 回日本臨床分子医学会学術総会. 2002.3.1. 大阪.
16. 宮田敏男. 第 39 回日本臨床分子医学会学術総会. 学会賞受賞講演 2002.3.2. 大阪.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

メサンギウム細胞特異的遺伝子発現システムの開発

分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学際領域センター 教授

研究要旨

我々はこれまでにメサンギウム細胞の機能を分子生物学的に解明し、さらには腎メサンギウム細胞高発現機能遺伝子群の同定とそれら遺伝子産物の腎炎に病態生理学的意義を明らかにする目的で、メサンギウム細胞に発現している遺伝子の定量的プロファイルを行い、この結果と遺伝子データベースを参照することでメグシンを含む 5 種のメサンギウム細胞高発現新規遺伝子を同定した。メグシンはその構造および生理活性の特徴から serine protease inhibitor superfamily に属する蛋白をコードしていると考えられ、種々の腎疾患において発現が亢進していることが示されている。

本年度の本研究では、メグシンのメサンギウム細胞特異的遺伝子発現機構を明らかにすることを目的として、メグシン転写開始点上流域（約 6 kbp）の cis 転写領域を解析し、正の転写領域（cis-acting element）を同定し、AP-1 がその活性の一部を担っている可能性を示した。さらに cis-acting element を含む promoter 領域を安定導入したマウスメサンギウム細胞を樹立し、その転写活性調節機構を検討したところ、既存のサイトカインのなかで TGF- β がメグシンの転写を亢進する可能性が明らかとなった。そこで腎臓メサンギウム細胞に特異的に遺伝子が発現するシステムの開発をめざして、メグシン転写開始点上流域（約 6 kbp）の下流に緑色蛍光蛋白(GFP)を結合させ、メグシンプロモータートランスジェニックマウスを 2 系統作製したが、糸球体をはじめ主要臓器に GFP 発現は認めなかった。おそらく正常メサンギウム細胞においてはメグシンプロモーターの活性が弱いためと推測された。今後、このメグシンプロモータートランスジェニックマウスを用いて糸球体障害時や TGF-beta 負荷時の GFP 発現変動につき検討し、メグシンの発現調節機構を in vivo にて解明を目指す。

研究組織

研究協力者

稲城 玲子

東海大学総合医学研究所 講師

上山 浩

東海大学総合医学研究所 研究員

南学 正臣

東京大学医学部腎臓内科学 助手

A. 研究目的

我々はこれまでに、メサンギウム細胞の生物学的性質を分子レベルで解析するために、メサンギウム細胞に発現する遺伝子の profile、特異的発現遺伝子の同定を試みてきた。その際、定量的なメサンギウム細胞発現遺伝子 profile を作製することを慎重に考慮し、従来の subtraction library 法、differential hybridization 法を用いず、大規模で高速度な cDNA 3'末端配列決定、およびコンピューターによるデータ処理を利用した独創的な方法(3'-directed cDNA library 法)を導入した。最近この方法を用いて肝臓や肺の細胞特異的遺伝子の解析が報告されているが、糸球体細胞への応用は本研究が初めての試みであった。

その結果、我々はこれまでに、ヒ

トメサンギウム細胞に発現する遺伝子の定量的解析を世界に先駆けて報告し(Yasuda et al., *Kidney Int* 53:154-158, 1998)、

さらにその遺伝子発現 profile を他の細胞のそれと比較することによって、5つの未知のメサンギウム細胞特異的遺伝子(メグシン、PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4)を見い出すことに成功した。その一つは、新しいセリンプロテアーゼインヒビター(serpin)をコードする遺伝子で(メグシン megsin : mesangial cell-specific gene with a homology to serpin と名付けられた)、メサンギウム増殖性 IgA 腎症や Thy-1 腎炎モデルラットでその発現が亢進していることを明らかにした(Miyata et al., *J Clin Invest* 120:828-836, 1998, Suzuki et al., *J Am Soc Nephrol*

10:2606-2613, 1999, Inagi et al., Biochem Biophys Res Commun 286:1098-1106, 2001, Nangaku et al., Kidney Int 60:641-652, 2001)。さらに、ヒトメグシン高発現マウスは、ヒトに類似のメサングウム増殖性糸球体腎炎を自然発症することも明らかとした (Miyata et al., J Clin Invest 109:585-593, 2001)。

本研究の目的は、メグシンのメサングウム細胞におけるにおける特異的発現のメカニズムを解明し、細胞特異的遺伝子発現システムの開発を目指すことである。

B. 研究方法

1. メサングウム細胞発現遺伝子メグシンの翻訳開始点上流域のクローニング

ヒトメグシン遺伝子を含むゲノムをクローニングするため、bacterial artificial chromosome (BAC)ライブラリーをメグシンの3‘および5‘の非翻訳領域をプローブとしてスクリーニングした。陽性となったクローン F581 は、pBluescript SK(-)にサブクローニングし、シーケンスを行った。

メグシン遺伝子のエクソン-イントロン構造の解析には、上記クローンと Genome Walker human genomic library を用いた。

2. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

F581 を digoxigenin dUTP でラベルし、phytohemagglutinin で刺激したヒト末梢血中リンパ球の染色体と反応させ、これを蛍光ラベルした抗 digoxigenin 抗体で検出した。

3. Primer extension analysis

メグシン遺伝子の5‘非翻訳領域に相応する primer を作製し、これを放射性ラベルした後、ヒト培養メサングウム細胞より得た total RNA と反応させた。primer の伸長は SuperScript II RNase H- reverse transcriptase (GIBCO BRL)を用いて行い、産物をシーケンスゲルに流動して解析した。

4. レポータープラスミドの作成

ヒトメグシン遺伝子のプロモーター活性を調べるため、メグシン遺伝子から制限酵素処理あるいは polymerase chain reaction により得られた種々のフラグメントを pGL3-Basic Vector (Promega)に組み込んだ。また、転写調節領域の詳細な解析のためには、Quick change site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いた。

5. Luciferase assay

様々なヒト培養細胞に、レポーターベクターを LipofectAMINE Plus (GIBCO BRL)を用いて遺伝子導入した。一定時間後、細胞は融解液により処理され、dual luciferase reporter assay system (Promega)を利用し、Lumat LB 9507 luminometer (EG & G Berthold)により蛍光強度測定を施行した。

6. ヒトメグシンプロモーター領域安定導入マウスメサングウム細胞株の樹立とそれを用いた luciferase assay

マウスメサングウム細胞にヒトメグシンプロモーター領域を導入し、G418 選択にて安定導入株を樹立した。その細胞に各種サイトカインを添加し、上記と同様の luciferase assay にて転写活性を比較検討した。

7. メグシンプロモータートランスジェニックマウスの作製と in vivo におけるプロモーター活性の解析

ヒトメグシンプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子として緑色蛍光蛋白 (GFP) を結合させた transgene をマウス受精卵に microinjection にて導入し、メグシンプロモータートランスジェニックマウスを作製。得られたトランスジェニックマウスの臓器を採材し、GFP 発現を蛍光顕微鏡にて検鏡した。

C. 結果と考察

1. メグシン遺伝子 5'末端非翻訳領域のクローニングと転写開始点の決定

メグシン遺伝子は、8個の exon と 7個の intron よりなる、全長約 20 kbp の遺伝子であった。この遺伝子構造は、serpin superfamily に属する遺伝子によく保たれているものであった。Exon-intron 境界は、GT/AG rule に則っていた (表1)。

シークエンスにより、ヒトメグシン遺伝子 5'末端の 6022 bp の核酸配列が決定された (Gene Bank accession number: AF234618)。

Primer extension analysis では、転写開始点は TATA 配列の 35 bp 下流に、翻訳開始点の 391 bp 上流にあることが判明した (図1)。

2. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

メグシン遺伝子は、第18染色体長腕に存在した。ラベルされた第18染色体10個について解析を行ったところ、centromere から telomere 方向に68%の距離の場所、18q 21.3に相当する所に存在した (図2)。

3. メグシンプロモーター領域の機能解析

メグシン遺伝子の5'末端領域のプロモーター活性を調べるため、ヒトメサンギウム細胞、皮膚線維芽細胞、血管内皮細胞などの培養細胞に、メグシン遺伝子5'末端領域6152 bp (-6022 bpより130 bpまで)を組み込んだ luciferase レポーターベクターを遺伝子導入し、解析した。メサンギウム細胞および最近メグシンの発現が報告されたA431細胞において、他のヒト初代継代細胞株や腫瘍細胞株に比して相対的に高いプロモーター活性を示した(図3)。

A431細胞を用いてプロモーター領域に対し deletion をかけたところ、-240 bpまではプロモーター活性にはあまり変化がみられなかったが、-72 bpでは活性は5%程度に低下した。同様の活性はヒトメサンギウム細胞においても認められた(図4)。

4. メグシンプロモーターの転写調節領域

メグシンプロモーターの転写調節領域を調べるため、5'領域についてモチーフサーチを行ったところ、AP-1、c-Myb、Oct-1、TCF11、NF- κ Bなどの転写調節モチーフが見出された。

Deletion analysis により強い転写調

節能が見出された-240 bpから-72 bpの間には高く保存された転写因子結合モチーフとして AP-1、Oct-1 が存在する。それらに変異を与えて、転写活性に与える影響を検討したところAP-1結合モチーフの変異はプロモーター活性を約半分に低下させることが確認された(図5)。

5. ヒトメグシンプロモーター領域安定導入マウスメサンギウム細胞株の樹立とそれを用いた luciferase assay

樹立されたヒトメグシンプロモーター領域安定導入マウスメサンギウム細胞に各種サイトカインを添加し、12時間後に luciferase assay にて転写活性を比較検討したところ、TGF- β 添加によって活性が約4倍に亢進することが示された(図6)。

6. メグシンプロモータートランスジェニックマウスの作製と in vivo におけるプロモーター活性の解析

2系統のメグシンプロモータートランスジェニックマウスを作製することができた。それらからF1を作製し、腎臓を含む主要臓器を採材し、それにおけるGFP発現を検討したが、いずれの臓器においてもその発現は検出限度以下であった。

D. 結論

メグシンのメサンギウム細胞における特異的発現のメカニズムを解明し、細胞特異的遺伝子発現システムの開発を目指す目的で、メグシン転写開始点上流域（約 6 kbp）をクローニングし、その領域に正の転写調節領域（シスエレメント）が存在すること、その正のシスエレメントには Ap-1 が結合する可能性などを明らかにした。また、解析したプロモーター領域の活性は TGF- β によって亢進することも示された。

しかし、ヒトメグシンプロモーター領域トランスジェニックマウスを用いた in vivo における転写活性の細胞特性は確認されなかった。これはおそらく正常メサンギウム細胞においてはメグシンプロモーターの活性が弱いため検出されなかったと推測された。今後、このメグシンプロモータートランスジェニックマウスに糸球体障害時や TGF- β 負荷などを施行し GFP 発現程度や発現部位を検討する必要があると思われる。

研究の成果は、メサンギウム細胞の生理機能を分子レベルで理解するうえで基礎的に重要であり、またメサンギウムにおける特異的遺伝子発現機構を調べることにより細胞特異的な遺伝子発現に関する知見が得られ、臓器特異的治療の糸口がつかめる。本研究は、糸球体硬化のメカニズム

の解明や糸球体硬化を伴う腎疾患の進展を抑制する新しい治療法の開発などに大きく寄与するものと考えられる。

E. 研究発表 論文

1. Hisada, Y., Sugaya, T., Yamanouchi, M., Uchida, H., Fujimura, H., Sakurai, H., Fukamizu, A., and Murakami, K. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. **J. Clin. Invest.** 103, 627-635 (1999)
2. Yanai, K., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Shigematsu, Y., Shimamoto, Y., Saito, T., Chowdhury, S., Takiguchi, M., Arakawa, M., Nibu, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., and Fukamizu, A. Regulated expression of human angiotensinogen gene by hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF). **J. Biol. Chem.** 274, 34605-34612 (1999)
3. Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y.,