

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と 創薬への応用

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部  
研究者 山越 智

### 分担研究者

- |                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| (1) 国立国際医療センター研究所<br>医療生態学研究部   | 山本 健二  |
| (2) 東京大学医科学研究所<br>ヒト疾患モデル研究センター | 岩倉 洋一郎 |
| (3) 新潟大学 医学部                    | 渡部 久実  |
| (4) 東邦大学 理学部                    | 大富 美智子 |
| (5) 獨協医科大学 医学部                  | 大竹 英樹  |
| (6) (株) 医学生物学研究所 応用技術部          | 小島 和夫  |
| (7) 持田製薬株式会社 総合研究所              | 山川 徹   |
| (8) (株) 三菱総合研究所 安全科学研究本部        | 安田 英典  |
| (9) アストラゼネカ (株) 研究開発本部          | 中川 英彦  |

### 要旨

新規サイトカイン LECT2 が、肝機能、骨代謝に関与し病態の発症および進行に影響を与えることを各種トランスジェニックマウスを使った個体および細胞レベルでの分子生物学的、生化学的解析をした。また、各種ヒト疾患の臨床血漿検体を用いて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っており、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、肝機能、骨代謝における LECT2 の作用機序を各種トランスジェニックマウスを使った個体および細胞レベルで分子生物学的、生化学的により解析し、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肝炎を初めとした炎症性疾患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) LECT2 ノックアウトマウスを初めとした各種サイトカイントランスジェニックマウスを用い各種肝障害、肝再生モデルにおける作用メカニズムを分子生物学的、病理学的に解析する。
- 2) 骨の炎症性疾患における LECT2 の作用機構を解明するため、関節炎における LECT2 の役割を各種関節炎モデルマウスを用い解析し、さらに骨代謝における LECT2 の活性を *in vitro* の系で調べる
- 3) 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、臨床的意義があるかどうかを検討する。
- 4) 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。

- 5) 新たな LECT2 の関与する生体機能を探するために LECT2 mRNA のマウス各種臓器での発現を調べる。
- 6) LECT2 の 2 種類の遺伝子多型が LECT2 タンパク質の構造にどのように影響するかを解析するために動物細胞、大腸菌により組換え蛋白質として発現させ大量に精製すること、2 種の組換え型 LECT2 の NMR および X 線結晶構造解析により 3 次元構造を決定する。
- 7) mRNA の安定性は、その転写量と共に、発現量に大きな役割を与え、また、スプライシングは、mature な mRNA の存在量に大きく影響を及ぼすと考えられるため、mRNA の安定性とスプライシングのメカニズムについて計算機を用いて検討する。

## 2. 研究方法

- 1) ノックアウトマウスを使った concanavalin A (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 Con A (10 mg/kg) 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、血清サイトカイン量の測定、ならびに、摘出した肝臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により各種サイトカインの mRNA を検出した。
- 2) 肝臓、胸腺、脾臓、関節はからのリンパ球分離  
肝臓からのリンパ球分離は、摘出した肝臓を細切しステンレスメッシュ上ですりつぶし、35% Percoll 液を用いた比重遠心法により行った。胸腺・脾臓は、肝臓と同様にすりつぶし、溶血バッファーにて赤血球を除去し、リンパ球を得た。関節のリンパ球は、マウス後足の関節部を切り出してすりつぶした後、コラゲナーゼ液で処理し分離を行った。
- 3) Flowcytometry によるリンパ球の解析  
各臓器より分離されたリンパ球は、T 細胞 ( $\alpha\beta$  型 TCR 及び  $\gamma\delta$  型 TCR 細胞を含む)、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、好中球に対する標識モノクローナル抗体で染色し、Flowcytometry で解析した。関節のリンパ球は、骨髄細胞の混入が考えられる為に、骨髄細胞の染色プロファイルと比較検討した。
- 4) ノックアウトマウスを使った D-galactosamine/TNF- $\alpha$  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 D-galactosamine (800ug/kg) を腹腔内投与し、4 時間後にマウス組換え体 TNF- $\alpha$  を尾静脈内投与して肝障害を誘発した。投与 8 時間後、血清 GPT 活性の測定、肝臓を摘出し DNA の断片化を Roche 社の Cell death detection kit で測定した。
- 5) ノックアウトマウスを使った anti-Fas antibody 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 pharmingen 社の anti-Fas antibody (200ug/kg) を尾静脈内投与し、8 時間後、血清 GPT 活性の測定、肝臓を摘出し DNA の断片化を Roche 社の Cell death detection kit で測定した。
- 6) マウス再生肝モデル  
正常 Balb/c マウスおよび LECT2 ノックアウトマウス (メス 8 週令) を肝再生実験に供した。70%肝部分切除術は、Higgins & Anderson の方法によりおこなった。LECT2 の発現等は免疫組織化学的方法により調べた。細胞分裂指数は、それぞれの個体についてランダムに選んだ 5ヶ所視野内の肝臓細胞のうち、幾つの細胞に分裂像がみられるかで求めた。増殖遺伝子 TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、HGF、EGF および増殖関連遺伝子 c-myc、細胞周期遺伝子 cyclin E、アルブミン遺伝子の発現を RT-PCR 法で検討した。
- 7) コラーゲン誘導関節炎  
Chondrex 社の関節炎用カクテルキットを使いそのプロトコールに従った。Balb/c と LECT2-KO マウス (7 週齢オス) に対し 2mg/20g で抗体混合液を尾静脈内投与し、3 日後に 50ug/20g の LPS を腹腔内に投与した。投与後経時的に下肢の関節の厚さ、および clinical score を測定し関節炎の進行を観察した。
- 8) ウサギ骨細胞の調製  
新生仔ウサギ (日本白色種、体重約 110g) の四肢より骨を取り出し、附着している肉片および筋組織を丁寧に取り除いた後、長骨をハサミにて細切した。ボルテックスによる攪拌にて骨片上の破骨細胞を遊離させた後、軽く遠心分離を行い骨片を取り除き、未分画骨細胞を調製した。
- 9) 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。

#### 10) ピットフォーメーションアッセイ

厚さ約 30  $\mu\text{m}$  の象牙片上に、調製した未分化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。(マウスの骨細胞を用いる場合には、3日間培養を行なう。)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。

#### 11) *in situ* hybridization

マウス (ddy 雄、4週齢) の腎臓および脳の6部位(嗅球、大脳、間脳、中脳、小脳、延髄)から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により LECT2 mRNA を検出した。また、*in situ* hybridization で LECT2 mRNA の発現分布を調べるため、腎臓と脳の凍結切片を作製し、反応条件の検討と予備的な実験を行った。

#### 12) 組換え LECT2 蛋白質発現細胞の樹立

マウス LECT2 遺伝子を pcDL-SR  $\alpha$  296 のマルチクローニングサイトに導入し、pSV2neo との co-transfection を CHO 細胞に対して行った。2日後、1mg/ml の濃度の G418 存在下で培養した。選択されたコロニーを選び、それぞれ培養し、ELISA 系にて産生細胞をスクリーニングした。

#### 13) 組換え LECT2 蛋白質の精製

組換え LECT2 発現 CHO 細胞を培養し、10%FCS-DMEM 培養液中に組換え LECT2 を分泌発現させた。得られた培養上清は CM セファロースカラムで段階的溶出法により濃縮し、NaCl 700mM 溶出画分を透析後、さらに DEAE セファロースカラムに供した。非吸着画分をさらに CM セファロースカラムの直線的溶出法により精製した。さらに hLECT2 を含む溶出画分は逆相 HPLC による最終精製を行ない得られた溶出画分は次の2つの処理を行った。1つは、重炭酸アンモニウムにより pH を 7.5 に調整した後、直ちに凍結乾燥を行った。もう1方は、3倍量の 1M Tris-HCl (pH 8.0) にて中和し、脱イオン水で希釈後、CM セファロースで濃縮後、PBS で透析した。

#### 14) 大腸菌を用いた発現系の構築と各種条件の検討

LECT2 遺伝子の N 末端に (His)<sub>6</sub>-tag を付加し、これを T7 プロモーターを持つ pET21(a) ベクターに挿入して発現プラスミドを作成した。宿主は BL21 (DE3) を用い蛋白質を発現させた。封入体を減らすために次の操作をした。(1) 培養条件の検討 (2) チオレドキシシン (Trx) との共発現 (3) Trx 融合蛋白として発現 (4) GroES/L との共発現。

#### 15) 封入体からの可溶化、巻き戻し

不溶性タンパク質に 8 M 尿素を添加して可溶化し、Ni-NTA-agarose カラムに結合させ、尿素濃度をゆっくり下げた。その後、酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン混合溶液中で、穏やかに Ni-NTA agarose カラム上に固定した (His)<sub>6</sub>-LECT2 を攪拌した。樹脂からの溶出後更に一週間の空気酸化を行った。

#### 16) LECT2 mRNA の 3 次元構造解析

LECT2 の mRNA 全ゲノム配列情報を利用した。計算機は、SGI 社製 OCTAIN (国立研究所感染症研究所計算機室)、SUN マイクロ社製 Enterprise420R/Soralis (国立国際医療センター研究所)、を用いた。RNA 二次構造予想は、東京大学医科学研究所ゲノム解析センターに保有されている MFOLD (Michel Zukre) 法を用いて計算し、グラフィックスは、上記 SGI 社製 OCTAIN でこれを行った。

#### 17) ヒト生体部分肝移植時の検体

新潟大学医学部附属病院で施行された成人生体部分肝移植 5 症例の Donor と Recipient を対象とした。術前、術後 1.5 時間、3 時間、6 時間、12 時間、1 日、2 日、3 日、5 日、および 7 日の Donor と Recipient の血漿を採取し、ELISA 法を用いて LECT2 濃度を測定した。Recipient の原疾患は、Case1 が原発性アミロイドーシス、Case2 が原発性胆汁性肝硬変、Case3 がウイルソン病、Case4 がシトルリン血症、Case5 が C 型肝硬変・多発性肝癌である。

#### 18) 各種肝疾患患者検体

国立埼玉病院消化器内科の関塚永一先生、宮崎耕司先生より頂いた血漿検体を用いた。具体的には、ウイルス性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、自己免疫性肝炎、脂肪肝 等の検体を使用した。そして、主に、(1) 肝疾患患者の LECT2 の日内変動 (2) 肝疾患における LECT2 の分布 (3) 急性期における LECT2 の変動 (4) 正常人のアルコール摂取と LECT2 について検討した。また、参考正常値は、正常人検体の平均値+3S.D. の値(10ng/ml)とし、それ以上の検体を陽性とした。

### 3. 研究成果

#### 1) マウス ConA 肝炎モデルにおける LECT2 ノックアウト (LECT2-KO) マウスによる解析

これまで、ウイルス性肝炎のモデルとして知られる ConA 肝炎モデルを解析し、LECT2-KO マウスでは肝炎がより重篤になることを見出してきた。BALB/c の野生型、LECT2-KO マウスに 10 mg/kg Con A を尾静脈内投与した。経時的に血清を採取、同時に肝臓を摘出し、各種サイトカインの血清中のレベルを 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 (図 1)。KO マウスで 1 時間後に 2 倍もの発現量の増加が IL-4 で観察された。同時に、血中サイトカイン量ををはかったところ IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  では差が見られなかったが、IL-4 ではやはり 1 時間で 2 倍の差が見られた。

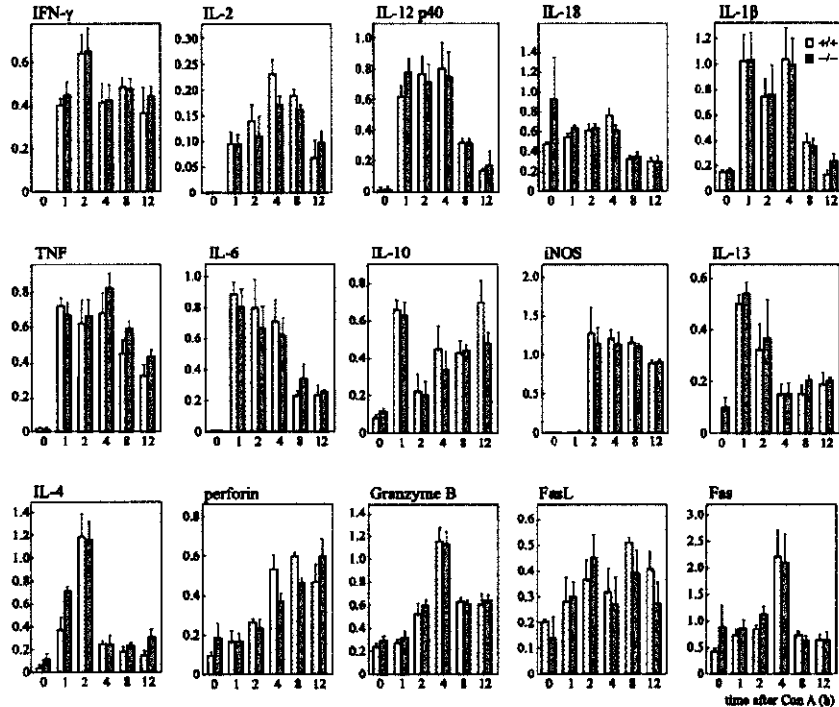


図 1. ConA 肝炎に関わるサイトカインを初めとした各種遺伝子の発現

Con A (13 mg/kg) を尾静脈内投与後、摘出した肝臓より total RNA を抽出し RT-PCR 法により各種遺伝子の mRNA を検出した。

#### 2) ConA 刺激した肝臓リンパ球画分におけるサイトカイン遺伝子発現

野生型、LECT2 KO マウスの肝臓を摘出後、リンパ球画分を分離し以下の解析を試みた。まずは、野生型、KO マウス肝でリンパ球画分のフローサイトメトリーによる解析をした。T 細胞、B 細胞、NKT 細胞とも野生型と LECT2-KO マウスの間に若干の個体間の差は見られるものの大きな差は認められなかった。分離したリンパ球画分を 3 $\mu$ g/ml ConA で刺激して経時的に mRNA を調整しサイトカインの発現量を調べた (図 2)。その結果、IL-4 のみが顕著に差が見られた。

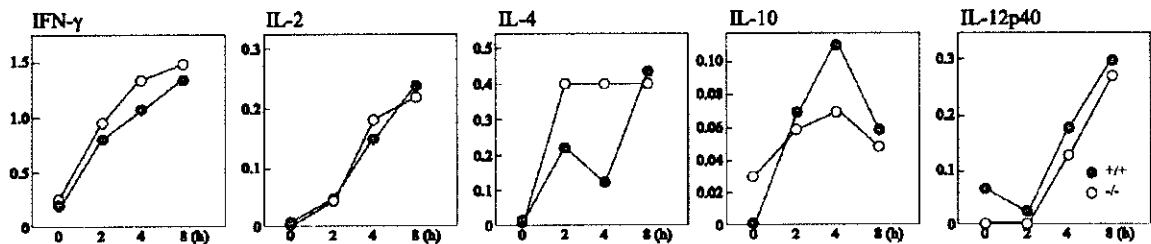


図 2. ConA 刺激した肝臓リンパ球画分のサイトカイン遺伝子の発現

肝臓からリンパ球を分離し、ConA (3 $\mu$ g/ml) で刺激し経時的に細胞から mRNA を調整し RT-PCR で発現量を半定量した。

### 3) 劇症肝炎のモデルの LECT2-KO マウスによる解析

D-galactosamine/TNF- $\alpha$  と anti-Fas antibody の尻尾静脈からの投与によるマウスの肝炎発症モデルが知られる。それらの系について LECT2-KO マウスにおける影響を調べたところ、図3, 4に示されたように、血中GPT、肝臓細胞のアポトーシスの抑制が観察された。

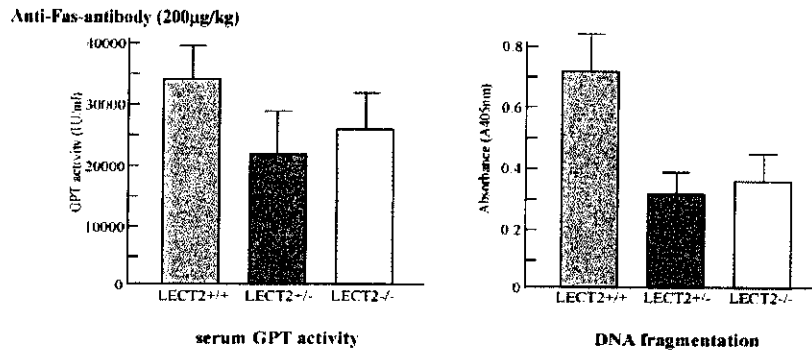


図3. D-galactosamine/TNF- $\alpha$  肝炎モデルにおけるノックアウトマウスの肝障害  
野生型、LECT2 ノックアウトマウスに D-galactosamine (800ug/kg) を腹腔内投与し、4 時間後にマウス組換え体 TNF- $\alpha$  を尾静脈内投与して肝障害を誘発した。投与 8 時間後、血清 GPT 活性を測定、肝臓を摘出し DNA の断片化を測定した。

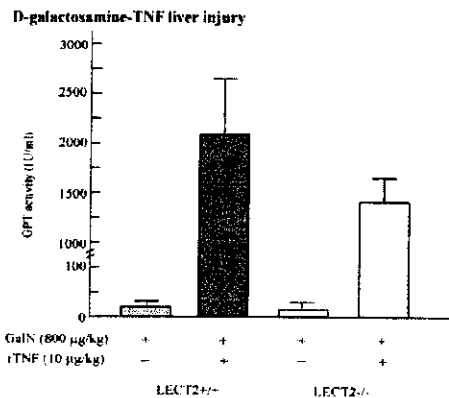
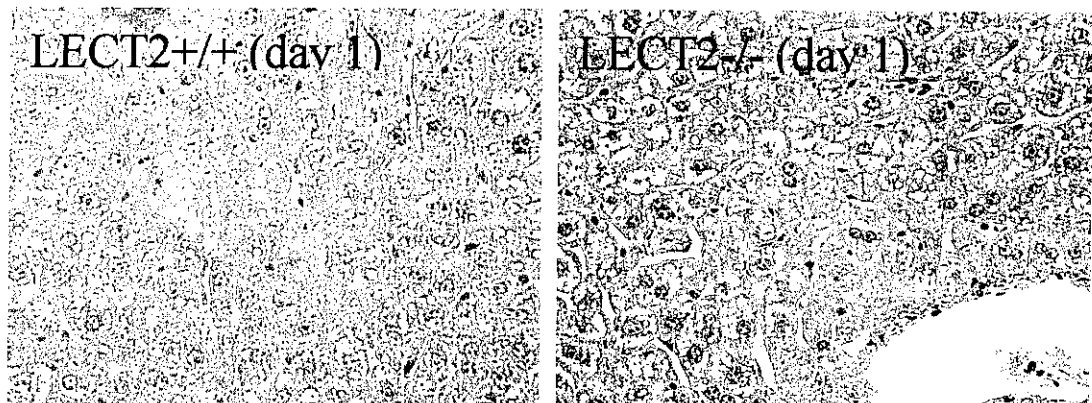


図4. anti-Fas antibody 肝炎モデルにおけるノックアウトマウスの肝障害  
野生型、LECT2 ノックアウトマウスに (200ug/kg) を尾静脈内投与し、8 時間後、血清 GPT 活性を測定、肝臓を摘出し DNA の断片化を測定した。

### 4) LECT2-KO マウスを用いたマウス肝再生の解析

肝切除後 1 日目の組織像の比較では、正常マウスに比べノックアウトマウス再生肝では、脂肪滴の大きさの増大、細胞と細胞の結合がよりルーズになり、細胞も丸くなっている組織像が得られた。(下図、それぞれ 2/3 匹)。



7日後、ノックアウトマウス再生肝ではルーズな細胞間結合が顕著に認められるのに対し、正常マウス再生肝で細胞間結合はタイトであった。また、正常マウスでは、1日後に細胞分裂像が認められるが、ノックアウトマウスでは認められなかった。一方、7日後では、正常マウスの分裂像は減少しているのに対して、ノックアウトマウスでは正常マウスの1日後と同じ値を示した。

		day1	day7	(%)
LECT2	+/+	0.1	0.025	
LECT2	-/-	0	0.1	

#### 5) コラーゲン誘導関節炎モデルの LECT2-KO マウスによる解析

4種類の抗 Type II collagen モノクローナル抗体を投与し、エンドトキシンである LPS を追加投与することで他のマウスでもコラーゲン誘導関節炎ができる。そこでその系を利用し、LECT2-KO マウスでの発症について解析した (図5)。その結果、LECT2-KO マウスでは、野生型に比べ LPS 投与後の関節炎の発症が促進されることが明らかとなった。この系では抗体の量を増やすことで LPS 刺激なしでも関節炎を誘導できるが、そのような処理では野生型、LECT2-KO マウスでは発症に差が見られなかった。

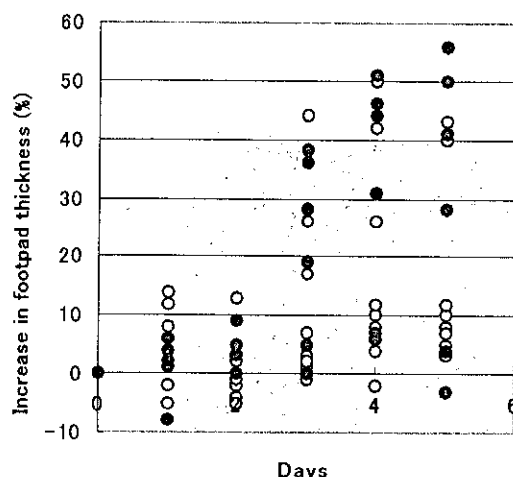


図5. LECT2-KO マウスを使ったコラーゲン誘導関節炎モデルの解析  
抗体混合液を尾静脈内投与し、3日後に LPS を腹腔内に投与した。経時的に下肢の関節の厚さを測定した。白丸は野生型、黒丸は LECT2-KO を示す。

#### 6) B16 メラノーマ細胞による実験的肝転移実験

IFN- $\gamma$  欠損マウスは、野生型に比べ、肝への転移が5-10倍増大することが分かった。同じ傾向は肺においても認められた。ところが、IFN- $\gamma$ R を欠損させた場合は、転移数に全く変化が認められなかった。メラノーマの転移抑制は、抗シアロ GM1 抗体によって強く阻害されることが分かった。従って、NK細胞が転移抑制に関与していることが示された。IFN- $\gamma$ R を欠損させても転移数が増加しなかったことから、この系では IFN- $\gamma$  による NK の活性化は起こっていないことが分かった。

#### 7) 線維芽腫(L929)や腎腺種(Renca)を用いた肝転移実験

これらの腫瘍はNK細胞上に発現する TRAIL による細胞障害作用に感受性であり、肝への転移が TRAIL に対する抗体によって大きく増加することが分かった。IFN- $\gamma$  を欠損させると TRAIL の活性化が起これず、このため、IFN- $\gamma$  欠損マウスでは抗 TRAIL 抗体の細胞障害活性や、転移数への影響が認められなかった。この結果、NK細胞上への TRAIL の発現が IFN- $\gamma$  によってコントロールされていることが分かった。

#### 8) コロナウイルス MHV による肝炎

ヒトのウイルス肝炎のモデルと考えられているコロナウイルスを用いて、ウイルス排除に果たす IFN- $\gamma$  の役割を検討したところ、IFN- $\gamma$  を欠損させると通常は宿主を殺さないような弱毒ウイルスでも宿主を殺すよう

になることが分かった。

#### 9) RT-PCR と *in situ* hybridization 各組織での LECT2 mRNA の発現

RT-PCR により、LECT2 mRNA は量的な違いはあるものの腎臓、脳6部位のいずれでも発現していることが明らかとなった。特に、腎臓、大脳、小脳で発現量が高い傾向が見られた。*in situ* hybridization の予備的な実験から、腎臓の尿細管細胞、大脳皮質の細胞、小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞で特異的に発現していることが判明した。

#### 10) 大腸菌による LECT2 の大量生産と巻き戻し

Val 型 LECT2 蛋白質の組換え体を作成することを試みた。LECT2 遺伝子の N 末端に (His)<sub>6</sub>-tag を付加し、蛋白質を発現させたが、ほとんどすべてが封入体画分に入った。各種方法を試みたが可溶性画分への発現増加は見られなかった。そこで、封入体からの可溶化、巻き戻しを試みた。精製後の最終収量は最小培地 1 リットル当たり約 1 mg だった。この方法で得た再生 (His)<sub>6</sub>-LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞から発現精製した LECT2 のものと比較したところ、CD スペクトルはいずれも 230 nm にピークを持つβ構造に特徴的なパターンを示した。さらに、NMR スペクトル (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY) においてもシグナルが一致した。

#### 11) LECT2 mRNA の 3 次元構造解析

従来イントロンは、特に重要な構造を持たないとする従来定説とは異なり、LECT2 のイントロンは、すべてランダムな配列がつくるエネルギー分布からは大幅に離れていることが判明した。イントロンについて二次構造計算結果を初期条件とし3次元構造 MD シミュレーションを行った結果、5'端と3'端が3次元空間的に 5 nm 程にまで近接している事が判明した。

#### 12) ヒト成人身体部分肝移植時の血中 LECT-2 濃度の動態

正常人である Donor と各種原疾患を有する Recipient の術前の血中 LECT-2 濃度に明らかな差は認められなかった。Donor の血中 LECT2 濃度は、術後急速に低下し、3-12 時間後に最低値を示し、症例 5 を除き術後 2-3 日で再上昇し始めた。一方、Recipient の血中 LECT2 濃度は、術後 3-24 時間後に最低値となり、術後 3 日を過ぎた頃より再上昇し始めた。Donor の血中 LECT2 濃度は、術後 5 日を過ぎると術前より高値を示した。肝障害の指標となる GPT の濃度は術後に上昇し、その最高値は Donor の方が高値を示した症例が 4 症例認められた。また、平均値においても Donor の方が高値となる傾向が認められた。

#### 13) 肝疾患患者の LECT2 の日内変動

肝疾患患者検体 2 症例について検討したが、どちらの検体も採血日の違いにより LECT2 値に大きな変動はなかった

#### 14) 肝疾患における LECT2 の血中濃度

各種肝疾患患者検体において、正常人検体の平均値+3S. D. 以上の検体を陽性検体とすると、50%以上の陽性率を示す疾患は、肝細胞癌、肝硬変症、C 型肝炎、自己免疫性肝炎、アルコール性肝炎、脂肪肝であった。しかし、陽性疾患に顕著な傾向は見られなかった。

#### 15) アルコール摂取と LECT2 血中濃度

アルコール性肝硬変症患者は、治療に従って LECT2 値が上昇する傾向を示した。正常人のアルコール摂取前後での LECT2 値の変動は、大きな値の違いは見られないが、摂取後、上昇する傾向があるように思われた。

## 4. 考察

### 各種疾患モデルマウスでの解析

ウイルス性肝炎のモデルとして知られる ConA 肝炎モデルを解析し、LECT2-KO マウスでは肝炎がより重篤になるメカニズムの解明を試みた。その結果、ConA 投与後極めて初期に IL-4 の発現の上昇が見られた。さらに、肝臓から分離したリンパ球画分を培養し ConA 刺激したときにおいても、LECT2-KO マウス由来のリンパ球画分での IL-4 発現が顕著に見られた。IL-4 は、ConA 肝炎発症に必要なサイトカインであることが知られている。これらのことから LECT2-KO マウスでは、何らかの原因で Th2 type の T 細胞、或いは NKT 細胞の ConA 刺激に対して反応性が高まり、その理由で肝炎が重篤になる可能性が考えられた。

劇症肝炎のモデルとして知られる D-galactosamine/TNF-α と anti-Fas antibody の系において LECT2-KO マウスにおける影響を調べたところ、血中 GPT、肝臓細胞のアポトーシスの抑制が観察された。これは、ConA 肝炎とは逆の結果であり今のところ原因については分らないが、ConA 肝炎は、T細胞がその発症に関わる肝炎であり、D-galactosamine/TNF-α と anti-Fas antibody では直接肝臓細胞に作用すると考えられ、そのことが肝炎モデルでの結果の違いに反映されているのではないかと考えられる



肝部分切除後の再生肝では、術後早期に細胞間の結合がルースになることが報告されているが、その生理学的意義として、細胞周期から外れ G<sub>0</sub> 期にある細胞が再び細胞周期に入るために既に構築されている肝小葉の構造を崩す必要性があるのではないかと考えられている。ノックアウトマウスの再生肝 3 例とも細胞間結合がルースになっているのが認められた。この結果と細胞分裂指数の結果から、ノックアウトマウスでは肝部分切除後の再生過程が正常マウスに比べてゆっくりと進行している可能性が強く示唆された。

これまで LECT2 が軟骨細胞、骨芽細胞の増殖促進活性があること、val58Ile の遺伝子多型がヒト慢性関節リュウマチの重篤度と関係があることを報告した。コラーゲン誘導関節炎モデルで LECT2-KO マウスは、野生型に比べ LPS 投与後の関節炎の発症が促進されることが明らかとなり、さらに、それが関節炎の発症ではなく進行度に影響を与えている可能性を示唆するデータを得た。このことは、遺伝子多型がヒトの慢性関節リュウマチの発症ではなく、進行度に関与するという点に関係する可能性が考えられ、LECT2 が関節炎の憎悪化を抑えていることが示唆された。

B16 メラノーマ細胞を用いた実験的肝転移実験において、IFN- $\gamma$  欠損マウスでは、肝への転移が 5 - 10 倍増化することが分かった。同じ傾向は肺においても認められた。従って、IFN- $\gamma$  はメラノーマの肝転移抑制に重要な役割を果たしていることが分かった。しかし、IFN- $\gamma$ R を欠損させた場合は、転移数に全く変化が認められなかった。この結果は、IFN- $\gamma$  の作用は、宿主免疫系の活性化によるものではなく、IFN- $\gamma$  の直接的な細胞増殖抑制によることを示唆している。これは IFN- $\gamma$  を欠損させても、CTL 活性に変化は認められず、IFN- $\gamma$  による細胞増殖抑制が認められたことから裏付けられた。

コロナウイルスによるマウス肝炎では、IFN- $\gamma$  を欠損させると通常は宿主を殺さないような弱毒ウイルスでも宿主を殺すようになることが分かった。従って、IFN- $\gamma$  は宿主防御に重要な役割を果たしていることが分かった。興味あることにこの時のウイルス増殖を検討したところ、BALB/c マウスでは選択的に肝炎が発症し、C57BL/6 マウスでは腹膜炎が発症することが分かった。この結果は、IFN- $\gamma$  以外にマウスの系統特異的に、ウイルスの増殖を制御する因子が存在することを示している。

#### 組換え体 LECT2 の作成

大腸菌で得られた巻き戻し (His)<sub>6</sub>-LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞から発現精製した Val 型 LECT2 のものと比較した実験から、大腸菌由来の (His)<sub>6</sub>-LECT2 は CHO 細胞由来の LECT2 とほとんど同じ立体構造を持つと結論づけた。このことは、ここで用いた Ni-NTA-agarose カラム法は非常に有効であり native に近い形で巻き戻しを行うことのできる系の 1 つであることを意味する。

また、動物細胞で Ile 型の LECT2 の産生系を確立したが、100 株もの細胞をスクリーニングにより選別したが発現量が Val 型の様に高発現のものは得られなかった。このことは Ile 型は Val 型と比べ CHO 細胞での発現に構造の違いなど何らかの原因で発現しにくいということを示しているのかも知れないと考えられた。

#### 各種肝疾患との関係

ヒト成人生体部分肝移植時の血中 LECT2 濃度の解析では、Donor 及び Recipient 共、肝切除後急速に低下し、再生が最も盛んな 24 時間付近で最低値を示した。このことは、臨床においても LECT2 が肝再生及び肝再生時の細胞周期の制御に深く関与している可能性が強く示唆されていると考えられる。一方、肝再生を促進するとされる免疫抑制剤 FK506 を使用した Recipient において、立ち上がりが遅延する傾向が認められることから、LECT2 は肝再生に関して T 細胞を介した細胞性免疫との関連が示唆された。また、Donor の GPT が Recipient より高値を示す傾向が認められることから、免疫抑制剤の使用が術後の肝細胞障害に働いている可能性も示唆される。

#### 5. まとめ

- 1) ウイルス性肝炎のモデルとして知られる ConA 肝炎モデルを解析し、LECT2-KO マウスでは肝炎が重篤になるメカニズムの解明を試みた。その結果、IL-4 が ConA 投与後極めて初期に変化していた。さらに、肝臓から分離したリンパ球画分を培養し ConA 刺激をしたときにおいても、LECT2-KO マウス由来のリンパ球画分での IL-4 発現が顕著に見られた。
- 2) D-galactosamine/TNF- $\alpha$  と anti-Fas antibody の劇症肝炎モデルでは、LECT2-KO マウスにおいて血中 GPT、肝臓細胞のアポトーシスの抑制が観察された。
- 3) ノックアウトマウスでは肝部分切除後の再生過程が正常マウスに比べてゆっくりと進行している可能性が強く示唆された

- 4) ヒト慢性関節リュウマチのマウスコラーゲン誘導関節炎モデルで LECT2-KO マウスは、関節炎の憎悪化を促進することが明らかとなった。
- 5) IFN- $\gamma$ 、および IFN- $\gamma$  レセプター遺伝子欠損マウスを用いた解析から、メラノーマの肝転移抑制には IFN- $\gamma$  の免疫活性化作用ではなく、細胞増殖に対する直接的な抑制作用が重要な役割を果たしていることが分かった。
- 6) 線維芽腫や腎腺腫の場合は、IFN- $\gamma$  が NK 細胞上に TRAIL を誘導し、腫瘍排除に重要な役割を果たすことが分かった。
- 7) MHV を IFN- $\gamma$  欠損マウスに感染させたところ、BALB/c 背景では肝障害によって死亡するのに対し、C57BL/6 背景では腹膜炎を発症し、遺伝背景により病態が異なることが分かった。
- 8) LECT2 mRNA は腎臓、脳 6 部位のいずれでも発現していることが明らかとなった。特に、腎臓、大脳、小脳で発現量が高い傾向が見られた。*in situ* hybridization では、腎臓の尿細管細胞、大脳皮質の細胞、小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞で特異的に発現していることが判明した。
- 9) 大腸菌で Val 型 LECT2 組換え体蛋白質を大量に産生させたところ封入体に入ったが、巻き戻しに成功した。Ni-NTA agarose 樹脂に固定することで、液相での巻き戻し法に比べて、高濃度での取り扱いが可能となった。
- 10) LECT2 には val158Ile の遺伝子多型が知られるが、これまでの Val 型だけでなく Ile 型の組み換え体も CHO 細胞に発現させ大量に精製することができた。
- 11) これまでスプライゾームシステムを用いてスプライシングを行うイントロンに特別な構造が報告されていないが、LECT2 mRNA イントロンは一見ランダムに見える構造であるが、実際機能するために必要な構造が取られている事が判明した。
- 12) ヒト成人人体部分肝移植時の検体を用いて血中 LECT2 濃度を経時的に解析したところ、マウスモデルと同様な結果が得られた。このことは、LECT2 が肝再生に深く関与することがヒトでも証明され、臨床応用への道が開けたものと考えられた。
- 13) 各種肝疾患患者検体を用いてヒト血漿中の LECT2 の測定意義を検討した。肝疾患において、ある程度高い陽性率を示すものの、特徴的に陽性率が高くなる疾患は見られず、今後、症例を増やし確認する必要があることがわかった。

## 6. 研究発表

- 1) Murakami, Y., Fukazawa, H., Kobatake, T., Yamagoe, S., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M., Uehara, Y. A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. *Antiviral Research* (in press)
- 2) Ohtsuka, T., Ohtake, H., Matsuzaki, S., Ichimura, K., Ichikawa, A., Yamakage, A. and Yamazaki, S., Upregulation of histidine decarboxylase mRNA expression in scleroderma skin., *Arch Dermatol Res* (2001) 293: 171-177.
- 3) Sakai, H., Koibuchi, N., Ohtake, H., Tamai, K., Fukui, N., Oda, H. and Saotome, K., Type I and type III procollagen gene expressions in the early phase of ligament healing in rabbits: an *in situ* hybridization study., *Journal of Orthopaedic Research* (2001) 19: 132 - 135.
- 4) Fujinoki, M., Ohtake, H. and Okuno, M. Serine phosphorylation offlagellar proteins associated with the motility activation of hamster spermatozoa. *Biomedical Research* (2001) 22: 45-58.
- 5) Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, 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).
- 6) Kyuwa, S., Kawamura, S., Shibata, S. Machii, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Urano, T. The severity of hepatic lesion after intraperitoneal JHMV infection in IFN-gamma deficient mice is parallel to viral replication in hepatocytes *in vitro*. *Adv Exp Med Biol.*, 494, 95-99 (2001).
- 7) Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal

- epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, 83, 141-150 (2002).
- 8) Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., and Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- $\alpha$  through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*, 105, 92-100 (2002).
  - 9) Kyuwa, S., Shibata, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Machii, K., and Urano, T. Acute hepatic failure in IFN- $\alpha$ -deficient BALB/c mice after murine coronavirus infection. *Virus Research*, 83, 169-177 (2002).
  - 10) Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Yoshida, T. Involvement of tumor necrosis factor  $\alpha$ , rather than interleukin-1 or nitric oxides in the HEME Oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide in the mouse liver. *FEBS Letters*, in press.
  - 11) Wayne Dawson, Kazuo Suzuki and Kenji Yamamoto. A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidence by cross-linking entropy: I. *J. theor. Biol.* (2001) 213, 359-386.
  - 12) Wayne Dawson, Kazuo Suzuki and Kenji Yamamoto. A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidence by cross-linking entropy: II. *J. theor. Biol.* (2001) 213, 387-412.
  - 13) Abe, T., Kawamura, H., Kawabe, S., Watanabe, H., Gejo, F. and Abo, T. Liver injury due to sequential activation of natural killer cells and natural killer T cells by carrageenan. *J. Hepatology* in press.
  - 14) Miyaji, C., Miyakawa, R., Watanabe, H. and Abo, T. Mechanisms underlying the activation of cytotoxic function mediated by hepatic lymphocytes following the administration of glycyrrhizin. *Int. Immunopharmacol.* in press.
  - 15) 佐藤好信、渡部久実、山本 智、中塚英樹、竹石利之、大矢 洋、小林 隆、渡辺隆興、嶋村和彦、宮路智香子、安保 徹、畠山勝義 免疫抑制療法の現状と今後の展開 *消化器外科* 25、337-346 (2002) .

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし

---

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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