

- 2 Kawabata, H, Kawahara, K, Kanekura, T, Araya, N, Daitoku, H, Hatta, M, Miura, N, Fukamizu, A, Kanzaki, T, Maruyama, I and Nakajima, T Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium-induced keratinocyte differentiation *Int J Mol Med* 9, 147-152 (2002)
- 3 Saitoh, M, Takayanagi, R, Goto, K, Fukamizu, A, Tomura, A, Yanase, T and Nawata, H The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors a three-dimensional imaging study *Mol Endocrinol* 16, 694-706 (2002)
- 4 Takahashi, Y, Kako K, Arai, H, Ohishi, T, Inada, Y, Takehara, A, Fukamizu, A and Munekata, E Characterization and identification of promoter elements in the mouse COX17 gene *Biochim Biophys Acta* 1574, 359-364 (2002)
- 5 Nakazawa, M, Aratani, S, Hatta, M, Araya, N, Daitoku, H, Kawahara, K, Watanabe, S, Nakamura, H, Yoshino, S, Fujii, R, Fujita, H, Fukamizu, A, Nishioka, K and Nakajima, T TNF α induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes *Int J Mol Med* 10, 269-275 (2002)
- 6 Kawabata, H, Kawahara, K, Kanekura, T, Araya, N, Daitoku, H, Hatta, M, Miura, N, Fukamizu, A, Kanzaki, T, Maruyama, I, and Nakajima, T Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium-induced keratinocyte differentiation *J Biol Chem* 277, 8099-8105 (2002)
- 7 Kang, N, Walther, T, Tian, XL, Bohlender, J, Fukamizu, A, Ganten, D and Bader, M Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis *J Mol Med* 80, 359-366 (2002)
- 8 Li, Y, kishimoto, I, Saito, Y, Harada, M, Kuwahara, K, Izumi, T, Takahashi, N, Kawakami, R, Tanimoto, K, Nakagawa, Y, Nakanishi, M, Adachi, Y, Garbers, DL, Fukamizu, A and Nakao, K

- Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogeneous protective mechanism in the heart *Circulation* 106, 1722-1728 (2002)
- 9 Sano, M , Kuwabara, T , Warashina, M , Fukamizu, A and Taira, K Novel method for selection of tRNA-driven ribozymes with enhanced stability in mammalian cells *Antisense Nucl Drug Develop* 12, 341-352 (2002)
- 10 Kunori, Y , Koizumi, M , Masegi, T , Kasai, H , Kawabata, H , Yamazaki, Y and Fukamizu, A Rodent α -chymases are elastase-like proteases *Eur J Biochem* 269, 5921-5930 (2002)
- 11 Hatta, M , Daitoku, H , Matsuzaki, H , Deyama, Y , Yoshimura, Y , Suzuki, K , Matsumoto, A , and Fukamizu, A Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR *Int J Mol Med* 9, 147-152 (2002)
- 12 Daitoku, H , Yamagata, K , Matsuzaki, H , Hatta, M and Fukamizu, A Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and forkhead transcription factor FKHR *Diabetes* 52, 642-649 (2003))
- 13 Araya, N , Hirota, K , Shimamoto, Y , Miyagishi, M , Yoshida, E , Ishida, J , Kaneko, S , Kaneko, M , Nakajima, T , and Fukamizu, A Cooperative interaction of EWS with CBP selectively activates HNF4-mediated transcription *J Biol Chem* 278, 5427-5432 (2003)
- 14 Ishida, J , and Fukamizu, A Stem cells and transgenics Lesson from knockout and transgenic mice for the renin-angiotensin system *J Mol Med* (in press)
- 15 Hirota, K , Daitoku, H , Matsuzaki, H , Araya, N , Yamagata, K , Asada, S , Sugaya, T , and Fukamizu, A HNF-4 is a novel downstream target of insulin via FKHR as a signal-regulated transcriptional inhibitor *J Biol Chem* (in press)
- 16 Saitou, T , Oishi, T , Yanai, K , Shimamoto, Y and Fukamizu, A Cloning and characterization of a novel splicing isoform of USF1 *Int J Mol Med* (in press)

17 Fujita, H, Fujii, R, Aratani, S, Amano, T, Fukamizu, A, Nakajima, T Opposite effects of MBD2a on gene expression Mol Cell Biol (in press)

18 Aratani, S, Fujii, R, Fujita, H, Fukamizu, A, Nakajima, T Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation Int J Mol Med (in press)

図1

マウスMeg-4 ゲノム

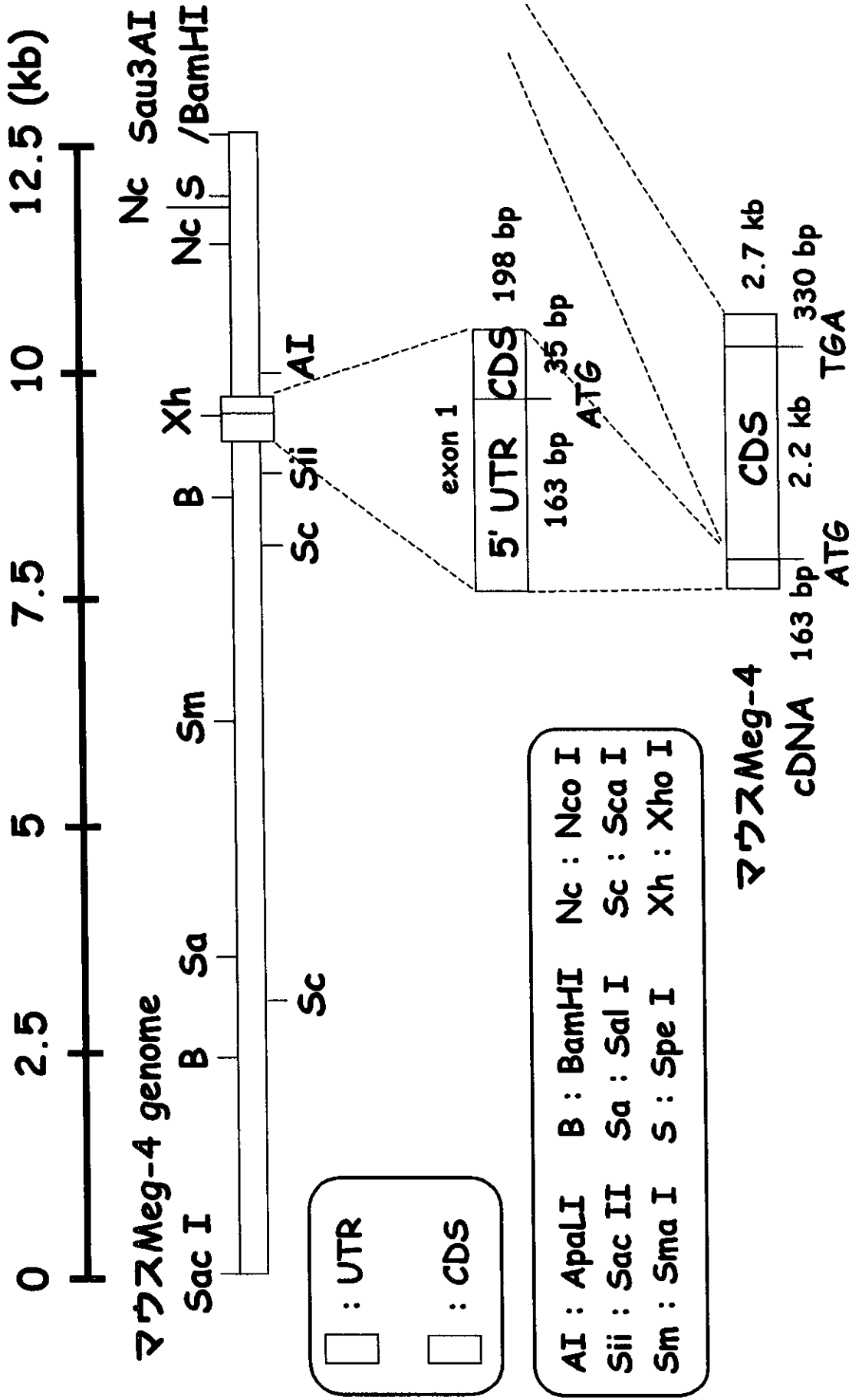
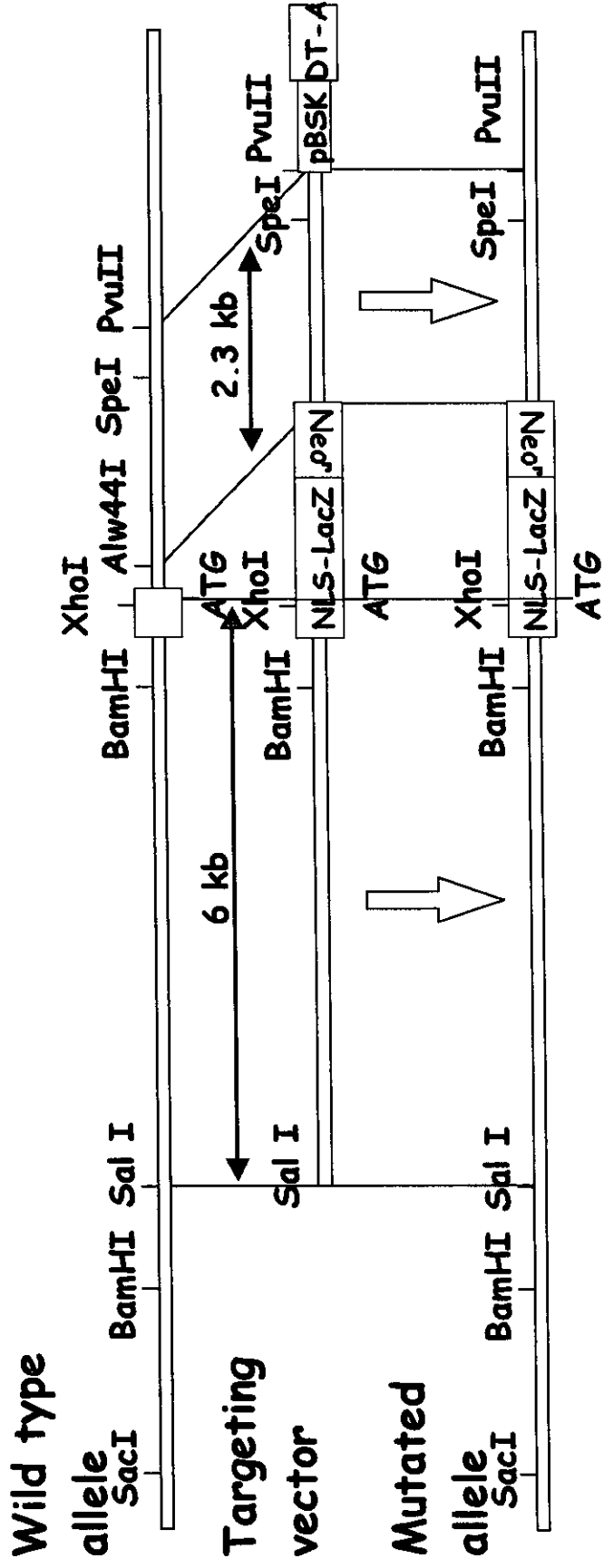


図2

マウス Meg-4 ターゲティング

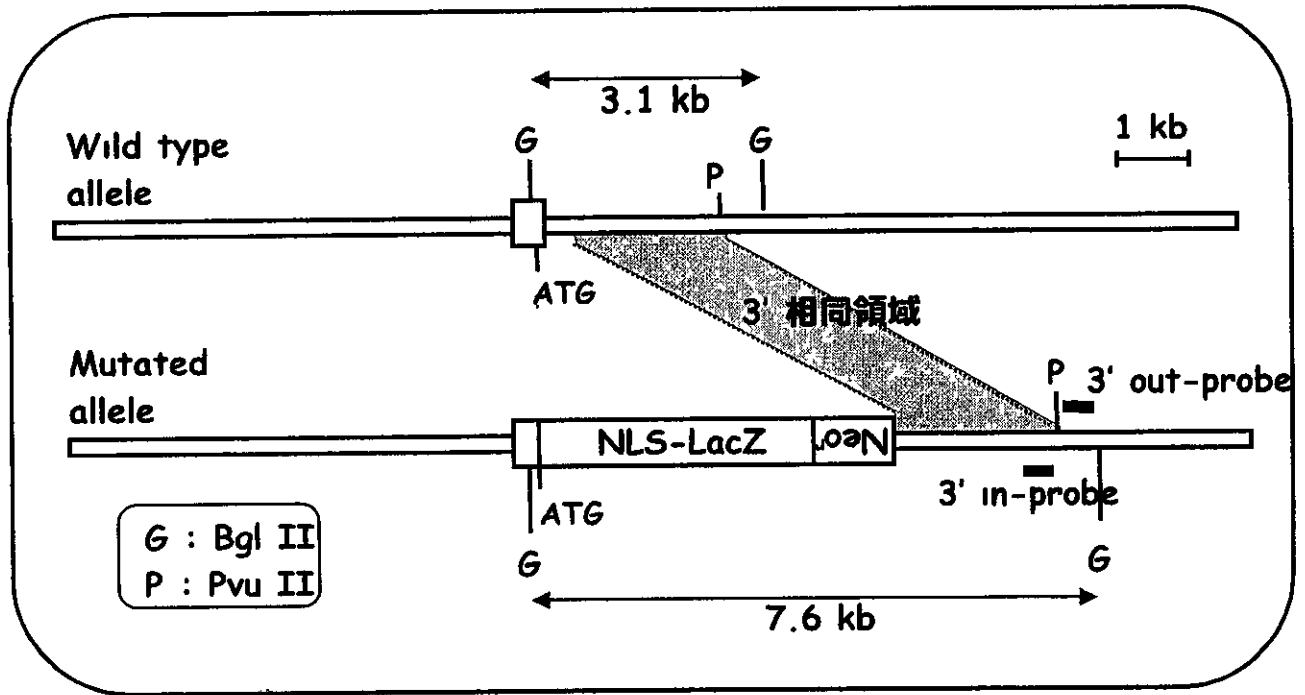


NLS-LacZ : 核移行シグナル付加 LacZ遺伝子
Neo^r : ネオマイシン耐性遺伝子
DT-A : ジフテリア毒素遺伝子
pBSK : クローニングベクター pBluescript II KS (+)

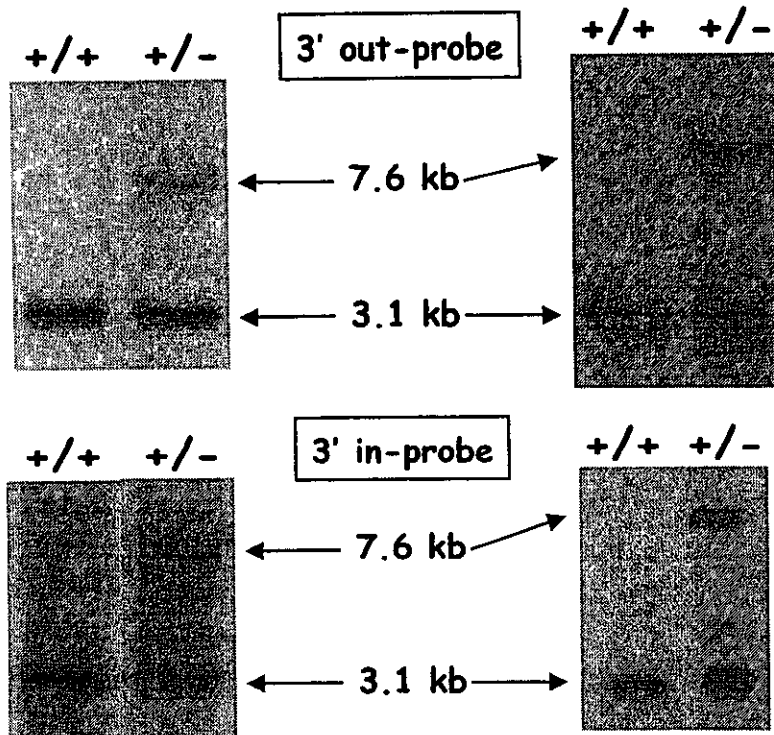
: Meg-4 遺伝子 exon 1
 : 相同領域

3

Meg-4 Southern Blot Analysis



ES細胞相同組換え体検定 キメラマウス生殖系列移行検定
(ヘテロ欠損マウスの作製)



厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

腎メサンギウム細胞高発現新規遺伝子群に関する研究
（抗ヒトメグシン抗体作製と診断・治療用抗体の探索）

分担研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手

研究要旨

これまでに我々は、ヒトメサンギウム細胞特異的に発現する新しいセリンプロテアーゼインヒビター（SERPIN）として”メグシン”を単離同定した。メグシンは、ヒトのみならずラットやマウスにも種差を超えて保存されており、ヒト、及びラットの糸球体障害時にその発現が増加することから、機能的SERPINとしての重要性が強く示唆されてきた。

本研究ではメグシンのポストゲノム研究の知見に基づき、メグシン抗体を用いた新しい腎疾患診断・治療法開発を目指し、各種抗ヒトメグシン抗体の作製、その抗体群からメグシン検出用サンドイッチ ELISA 用抗体、治療用中和抗体の探索を行い、その有用性について検討した。その結果、高感度メグシン検出用 ELISA の確立と中和抗体の作製を完了した。

以上、メグシンを標的分子とした新規診断・治療法開発に必要な診断・治療用メグシン抗体が作製できた。今後、これらの臨床的有用性の実証と実用化に向けての最適化が期待される。

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

A 研究目的

我が国では腎疾患による末期腎不全透析患者数は現在 20 万人を超え、透析医療費は年間 1 兆円を超えた。しかし、未だに腎疾患の診断は侵襲

的な生検が中心であり、治療薬もステロイド・降圧剤以外には皆無である。我々は、腎炎発症進展において重要なメサンギウム細胞のゲノミクス、トランスクリプトーム解析によ

り、メグシン, PP4Rmeg, meg-2, meg-3, meg-4 などいくつかの新規メサンギウム細胞高発現機能遺伝子群を単離同定した。中でもメグシンはヒトメサンギウムに高発現する新しいセリンプロテアーゼインヒビター (SERPIN) で、一連のポストゲノム研究から糸球体障害に深く関与する機能遺伝子の可能性が示唆されている。

本研究では、これら遺伝子のポストゲノム研究をさらに展開し、腎疾患診断・治療に有用な標的分子を提供することを目的に、メグシン蛋白の活性を抑制する中和抗体の開発を試みる。

B 研究方法

1 哺乳類細胞由来リコンビナントメグシンの精製

ヒトメグシン遺伝子導入 CHO 細胞の上清を回収し、ゲル濾過法、イオン交換カラムクロマトグラフィー法を用いてリコンビナントメグシンを精製する。

2 抗ヒトメグシンモノクローナル抗体の作製

上記の精製リコンビナントメグシンを、各種系統のマウス (BALB/c, A/J, C3H/J) に免疫し、融合法にてモノクローナル抗体産生クローンを作製する。

得られたクローンの上清を用いてメグシン固相化 ELISA 法にて陽性クローンを選択する。さらに陽性クロー

ンは限界希釈法にて単クローン化し、Western blot 法にて精製メグシンとの反応性を確認し、抗ヒトメグシンモノクローナル抗体産生クローンを選択する。また、メグシン以外のセリンプロテアーゼインヒビター (セルピン) との交叉反応性も各種セルピン (antichymotrypsin, antitrypsin, plasminogen activator inhibitor I, plasminogen activator inhibitor II) を用いた western blot 法にて検討した。

3 ヒトメグシン検出用のサンドイッチ ELISA の開発

抗ヒトメグシンモノクローナル抗体産生クローンの上清から抗体を生成する。それら抗体を組み合わせて、効率よく精製メグシンを検出するサンドイッチ ELISA 法を確立する。この際、これまでに作製したウサギ抗ヒトメグシンペプチドポリクローナル抗体も用いて最適な抗体の組み合わせを検討した。

4 抗ヒトメグシン中和活性の探索

精製抗ヒトメグシンモノクローナル抗体をメグシン活性測定系 (プラスミン、プラスミンに対する合成基質、精製メグシンを用いた酵素活性測定系 ; MCA assay、プラスミン・メグシン複合体形成能測定系) に添加し、メグシン活性を中和する抗体を選択する。

5 抗ヒトメグシン中和抗体のエピトープマッピング

ヒトメグシンの合成ペプチドを各種合成し、抗ヒトメグシン中和抗体のメグシン活性阻害能を中和する合成ペプチドを選択し、抗原認識部位を決定する。

C 研究結果

1 リコンビナントメグシンの精製

20 L のヒトメグシン産生 CHO 細胞培養上清から、純度 95%以上の精製メグシンを約 2 mg 精製した。精製メグシンはプラスミンの酵素活性を阻害し、活性型であることも確認でした。

2 抗ヒトメグシンモノクローナル抗体の作製

約 100 クローンの抗ヒトメグシン抗体を産生するハイブリドーマを作製した。

これらの抗体の一部は、メグシン以外のセルピン（セリンプロテアーゼインヒビター）とは交叉反応しなかった。

3 ヒトメグシン検出用の ELISA の開発

固相化に適した抗体と検出に適した抗体をそれぞれ 10 種類選択し、それらを組み合わせ、最も感度の良いサンドイッチ ELISA の確立を試みた。その結果、数 ng/ml オーダーの精製メグシン検出を可能にするサンドイッチ ELISA 系が確立された。この系を用いて、メグシン高発現マウス/ラットの尿中、濃縮正常尿、糸球

体障害腎疾患患者の一部からメグシンが検出できた。

4 抗ヒトメグシン中和活性の探索

2 種類のメグシン活性を中和する抗体を取得した。両抗体のメグシン活性阻害能はほぼ同程度であった。

5 抗ヒトメグシン中和活性のエピトープマッピング

得られた 2 種類の抗ヒトメグシン中和抗体は、いずれもメグシン活性中心部位内にあるプロテアーゼ切断部位近傍の 6 アミノ残基を認識することが判明した。

D 考察

約 100 クローンの抗ヒトメグシンモノクローナル抗体を用いて、数 ng/ml オーダーのメグシン検出を可能にするサンドイッチ ELISA 系が確立され、腎障害を呈するメグシン高発現マウス/ラットの尿中からメグシンが検出された。このことは、メグシンは尿中でも安定で存在することを示しており、事実、正常人・患者濃縮尿からもメグシン蛋白が検出できた。

また、同じ抗ヒトメグシン単クローン抗体ライブラリーからメグシン活性を阻害する幾つかの中和抗体も取得出来た。この中和抗体の認識部位もペプチドマッピングにより決定でき、メグシン活性中心部位内にあるプロテアーゼ切断部位近傍 6 アミノ残基を認識していた。

E 結論

メグシンが腎疾患診断・治療に有用な標的分子であることを示す一連の知見から、抗ヒトメグシン抗体を製し、診断用抗体と治療用抗体としての臨床有用性が期待される抗体を取得した。ただし、実用化には向けて、より詳細な裏付け成果や最適化が必要と思われる。

F 研究発表

論文発表

- 1 Onogi H, Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K Serpin, megsin and plasmin Contrib Nephrol in press
- 2 Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T Future perspectives of chronic renal failure Am J Kidney Dis in press
- 3 Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Ueyama H, Takeyama K, Kato S, Kurokawa K Transcriptional regulation of mesangium-predominant gene, megsin J Am Soc Nephrol 13, 2715-2722, 2002
- 4 Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K Progressive mesangial expansion and hypercellularity in transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin J Clin Invest 2002, 109 585-593

- 5 Inagi R, Miyata T, Imasawa T, Nangaku M, Kurokawa K Mesangial cell-predominant gene, megsin Nephrol Dial Transplant 17 Suppl 9 1-2, 2002

学会発表

—国外—

- 1 Nangaku M, Yamamoto T, Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Johnson RJ, Goligorsky MS, Noiri E The efficacy of transplanted endothelial cells to ameliorate a model of thrombotic microangiopathy in rats American Society of Nephrology, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
- 2 Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Izuhara Y, Onogi H, Kurokawa K Mesangium-predominant serpin, megsin, inhibits the serine protease activity of plasmin American Society of Nephrology, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
- 3 Yamada K, Kawachi H, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Shimizu F, Fujita T, Nangaku M T cell deficient rats develop anti-Thy1 nephritis American Society of Nephrology, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
- 4 Shao J, Nangaku M, Yamada K, Inagi R, Kurokawa K, Miyata T, Fujita T Imbalance of T cell subsets in

- angiotensin II infused rats American Society of Nephrology, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
- 5 Nangaku M Complement and glomerulonephritis University of Pennsylvania Nephrology Seminar, 11 5, Philadelphia, U S A
- 4 第33回補体シンポジウム（東京）「教育講演：補体学への招待」7 11-13
- 5 九州ループス腎炎研究会（福岡）8 24
- 6 題24回腎臓セミナー「蛋白尿の尿細管間質障害機序」（東京）8 31
- 国内—
- 1 日本腎臓学会第45回学術総会（大阪）「大島賞受賞講演・腎疾患の進展の final common pathway」5 23-25
- 2 日本腎臓学会第45回学術総会（大阪）「日本語CME・カリウム代謝異常とその分子メカニズム」5 23-25
- 3 九州大学大学院講義「腎疾患と補体」（神戸）6 11
- 7 日本腎臓学会第32回東部学術集会（東京）「ワークショップ腎炎関連因子：補体調節蛋白」10 18-19
- 8 第3回腎不全病態治療研究会（東京）「指定講演：腎不全の進行と蛋白尿および虚血の役割」11 30
- 9 東海大学部附属病院 Renal Round（伊勢原）1 18