

## 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 医療生態学研究部  | 山本 健二  |
| (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) 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  |
| (10) 国立感染症研究所 生物活性物質部       | 鈴木 和男  |

### 要旨

炎症性疾患における新規サイトカイン LECT2 の作用機序を各種遺伝子改変マウスを使い分子生物学的、生理学的、病理学的に解析した。また、創薬への応用のために LECT2 の立体構造解析、ヒト各種炎症性疾患の血漿検体を用いて臨床応用への可能性を検討した。

### 1. 研究目的

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は、ヒト好中球に対して走化性を有する蛋白質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と相関することが判明している。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。さらに *C. elegans* にも LECT2 に特徴的なモチーフをもつ蛋白質が見つかっており、LECT2 が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。

本研究では、第一に各種肝炎、エンドトキシンショック、関節炎における LECT2 の作用機序を各種遺伝子改変マウスを使って、分子生物学的、生理学的、病理学的に解析することを目的にした。そのために LECT2 が関与するサイトカインネットワークを主眼にいれ様々な疾患モデルマウスを各種サイトカインノックアウトを用い解析し、その結果を基に LECT2 との関連を調べることにした。第二に、創薬をめざしたドラッグデザインの為に NMR、X 線解析を用い LECT2 の立体構造を決定すること、第三に、ヒト肝疾患、肝移植、さらには他の各種炎症疾患、肝切除以外の大侵襲手術時における血漿中の 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、LECT2 が関与する肝炎を初めとした各種炎症性疾患に対する新しい治療方法等の開発につながると考えられる。

### 2. 研究方法

- LECT2、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha/\beta$ 、及び IL-1Ra 遺伝子 KO マウスは、ES 細胞を用いた相同遺伝子組換えにより作製した。TNF $\alpha$ -KO マウスは関川賢二氏より供与された。これらのマウスはいずれも BALB/c、C57BL/6 マウスに 8 世代以上戻し交配し実験に供した。また、RANKL-Tg マウスは SAP プロモーター下流に可溶性 RANKL 遺伝子を結合して作製したものを東尾氏より供与された。また、RANKL-KO マウスは TakMaK より供与された。なお、マウスの飼育は全て SPF 環境下で行った。
- ノックアウトマウスを使った concanavalin A (ConA) 肝炎モデル  
C57BL/6、BALB/c マウス (7 週齢) および同系統 LECT2 ノックアウトマウス (7 週齢) に Con A (10-25mg/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。
- 肝臓、胸腺、脾臓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。
- 4) 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。
  - 5) 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 7 週齢) および BALB/c LECT2 ノックアウトマウス (雌 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。
  - 6) 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 7 週齢) および BALB/c LECT2 ノックアウトマウス (雌 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。
  - 7) ノックアウトマウスを使った D-galactosamine/LPS 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 7 週齢) に同時に D-galactosamine (800ug/kg) と LPS (50ug/kg) を腹腔内投与し肝障害を誘発した。投与 5 時間後、血清 GPT 活性の測定した。
  - 8) 血清中サイトカインの濃度  
各モデルマウスにおいて経時的に尾静脈から血液を採取し、血清を調製し pharmingen 社の ELISA キットにてサイトカイン濃度を測定した。
  - 9) マウス再生肝モデル  
BALB/c マウスおよび LECT2 ノックアウトマウス (雌 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中の細胞分裂像を示す細胞数より求めた。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。
  - 10) 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 (雄 7 週齢) 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。
  - 11) 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、プロトタイプ ELISA 系にて産生細胞をスクリーニングした。
  - 12) 組換え LECT2 蛋白質の精製  
組換え LECT2 発現 CHO 細胞を培養し、5%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 700 mM 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 50 mM-700 mM 直線的溶出法により精製した。最終的に、MonoS カラムの NaCl 100 mM-500 mM の直線的溶出法により 95% 以上の精製度を得た。
  - 13) マウス LECT2 ELISA 系作成  
組換え体マウス LECT2 を免疫源として、LECT2 ノックアウトマウス 2 匹を用いて、モノクローナル抗体の作製を行った。抗原は 30ug/匹でフロイントの完全アジュバンドと共に 3 回免疫し、採取したリンパ節とミエロマ細胞 (P3U1) とを細胞融合させた。抗体は、マウス LECT2 を固定化したマイクロプレートによる ELISA 法等によりマウス LECT2 に反応するクローンを選択し、限界希釈法により単一クローンとした。その後、対象の培養上清よりプロテイン G カラムを用いて IgG を採取した。
  - 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、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 との共発現を試した。
  - 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) ヒト生体部分肝移植、非肝切除患者検体

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 6 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。肝硬変患者の肝部分切除 6 症例及び大侵襲手術の非肝切除 6 症例（右開胸食道切除 1 症例、門脈塞栓除去 1 症例、直腸癌 3 症例）を対象とし同様に LECT2 濃度を測定した。

### 17) 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、宮崎耕司先生から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、健常人の 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

### 3.1. 各種サイトカイン遺伝子改変マウスを使った炎症モデルにおける解析

肝炎、骨疾患、エンドトキシンショックにおいて、サイトカインネットワークの解析を主眼に入れ、各種炎症モデルを用いて LECT2 ノックアウトマウスを解析し、さらには LECT2 の機能解析のための基礎データの蓄積、応用のため他のサイトカイン遺伝子改変マウスでの解析を行った。

#### 3.1.1 肝炎モデル

##### 1. LECT2-KO マウスを用いたマウス Concanavalin A (Con A)肝炎モデルの解析

Con A をマウスに投与することによりヒトのウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎に似た症状を示すことが知られている。BALB/c マウスを用いこの肝炎モデルにおいて血中 LECT2 の量を測定したところ Con A 投与後 8 時間から 24 時間にかけて一過性の発現量の低下が観察されている。アポトーシス阻害剤の実験からこの一時的低下は肝細胞の破壊に伴う二次的な結果ではなく、サイトカインなどのシグナル伝達により引き起こされた結果であり、Con A 肝障害に対する何らかの生体側の反応だと考えられた。そこで LECT2 欠損マウス (LECT2-KO マウス) を用い同モデルの解析をおこなった。C57BL/6 (B6) マウス、同背景の LECT2-KO マウスに 25 mg/kg Con A を尾静脈内投与、肝障害の指標として血中 GPT の活性と肝臓の DNA 断片化を調べた。

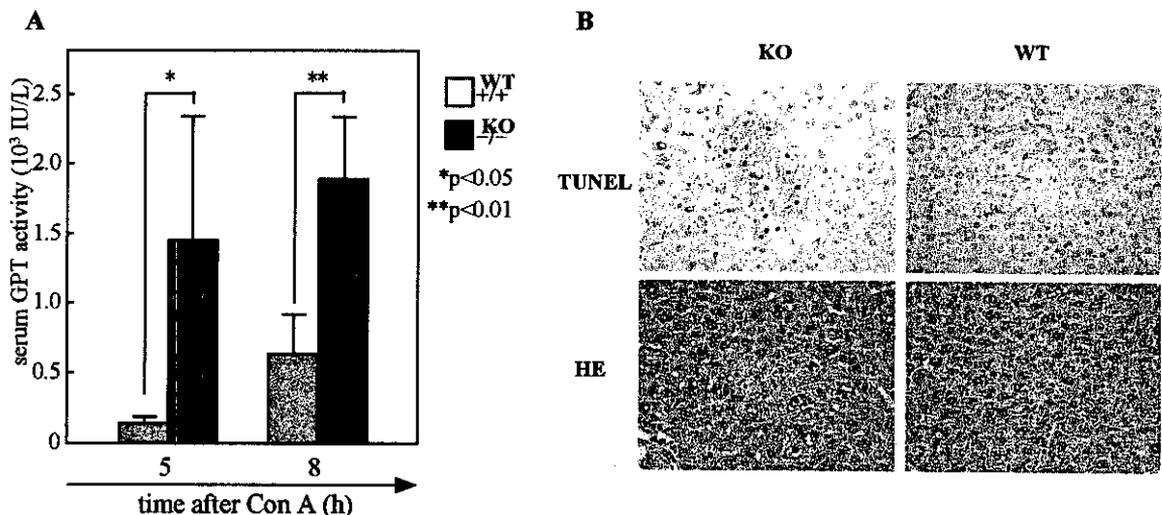


図 1. B6 背景の LECT2-KO マウスにおける Con A 肝炎の重篤化 A は血中 GPT の活性、B は肝臓の組織像 (Tunel 法によるアポトーシス陽性細胞、HE はヘマトキシリン-エオジン染色) を示す。

処理 5 時間後に、野生型では変化が認められなかったが LECT2-KO マウスではすでに GPT の上昇が観察され、組織染色において肝細胞のアポトーシスをはじめとする肝細胞の変性が観察されより重篤になることが明らかとなった (図 1)。各種サイトカインの血清中のレベルを ELISA 法で測定し、肝臓における遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法により検討した。その結果、IL-4 が LECT2-KO マウスにおいて処理後 1 時間という極めて初期に発現量の倍増が見られた。肝臓での発現同様、血中サイトカイン量においても TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10 では差が見られなかったが、IL-4 は処理後 1 時間で 2 倍の差が見られた。Con A 肝炎の重篤化は BALB/c 背景 LECT2-KO マウスでも再現された。すでに IL-4 が Con A 肝炎発症に必須でありその産生細胞が NKT 細胞であることが報告されていることから、フローサイトメトリーにより LECT2-KO マウスの肝臓 mononuclear cells (MNC) 画分における NKT 細胞の割合を調べた。その結果、LECT2-KO マウスは野生型

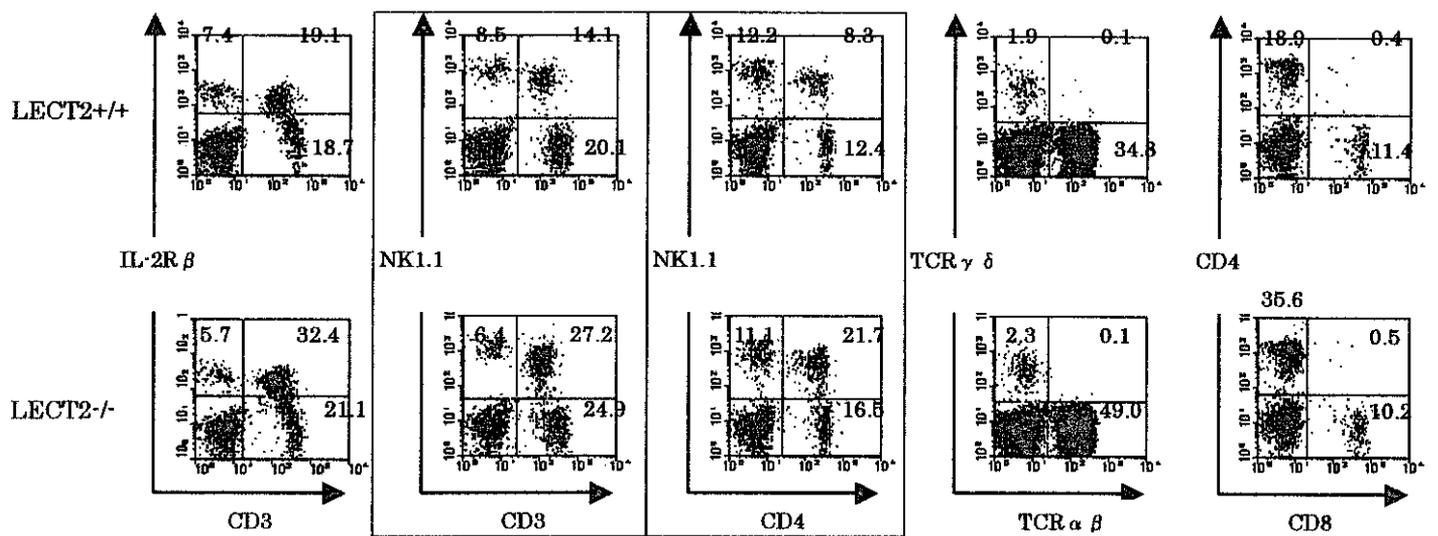


図2. B6バックグラウンドの野生型とLECT2-KOマウスの肝臓Mononuclear Cells画分のフローサイトメーターによる解析

に比べて約2倍のCD3<sup>int</sup>NK1.1<sup>+</sup>(NKT cells)細胞を持つことがわかった。一方、CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>細胞(NK cells)、及びCD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>細胞(conventional T cells)の割合はほとんど差が見られなかった。また、胸腺、および脾臓のmononuclear cells画分でも同様にNKT細胞の割合が高いことが判った。T細胞抗原受容体Vα14-Jα281を発現するNKT細胞は、糖脂質抗原α-galactosylceramide(α-GalCer)で活性化し多量のIFN-γ、IL-4を産生する。LECT2-KOマウスのα-GalCer投与により産生される2時間後のIFN-γは、野生型とほとんど差が見られなかったが、IL-4産生は約2倍多く誘導された。さらに、肝臓、脾臓からmononuclear cell画分を調製しin vitroでα-GalCer刺激をしてもマウス個体を用いて得られた場合とほぼ同様の結果がえられた。

以上のことから、Con A肝炎におけるLECT2-KOマウスでのIL-4の過剰産生は肝NKT細胞の増加が原因であること、Con A処理及びα-GalCer処理ではIFN-γの産生にあまり影響がなかったことからLECT2-KOマウスのNKT細胞の性質がTh2型に傾いている可能性が示唆された。また、このNKT細胞の増加が肝臓特異的で無いことより、LECT2がNKT細胞の発分化、或いは生体内での恒常性維持の機能調節を抑制的に制御することが考えられた。

## 2. LECT2-KOマウスを用いた劇症肝炎モデルの解析

D-galactosamine(GalN)/TNF-αあるいはanti-Fas antibody投与によるマウスの劇症肝炎発症モデルが知られる。これらの系についてBALB/c背景の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(DNA fragmentation)の抑制がみられた。

## 3. LECT2-KOマウスを用いたマウス肝再生の解析

様々な肝障害には肝再生が関係することから、BALB/cを用い再生肝実験を行った。70%肝切除後1と7日目の組織像の比較では、LECT2-KO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緩くなり、細胞が丸くなっている組織像が得られた。また、1日後の細胞分裂像は野生型では認められたが、LECT2-KOマウスでは認められなかった。さらに7日後、野生型の分裂像は減少しているのに対して、LECT2-KOマウスでは野生型の1日後と同じ値を示した。増殖遺伝子TGF-α、TGF-β、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は、両マウスでほとんど差が見られなかった。

## 4. IFN-γ欠損マウスを用いたB16メラノーマ細胞による肝転移モデルの解析

IFN-γ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-γR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、抗アシアロGM1抗体によって強く阻害されることが分かった。これらのことより、NK細胞が転移抑制に関与していること、IFN-γR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-γによるNKの活性化は起こっていないことが分かった。

## 5. IFN-γ欠損マウス線維芽腫(L929)、腎腺種(Renca)による肝転移モデルの解析

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-γを欠損させるとTRAILの活性化が起らず、IFN-γ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

胞上の 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。

### 6. IFN- $\gamma$ 欠損マウスによるコロナウイルス MHV による肝炎モデルの解析

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- $\gamma$  を欠損させると野生型には影響がない弱毒ウイルスに感受性になることが判明した。

### 3.1.2 エンドトキシンショックモデルにおける解析

#### 1. LPS の LECT2-KO マウスに対する作用

敗血症のモデルとして LPS 処理をした野生型、LECT2-KO マウスで比較を行った。8 週齢の BALB/c マウスに対し 10mg/kg LPS を腹腔内投与し致死率を調べた。その結果、LECT2-KO マウスは抵抗性を示した。LPS により起きる様々な病態は、おもに炎症性サイトカインの産生が原因となっていることが報告されている。そこで主に単球・マクロファージから産生される TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-18 および NK 細胞、NKT 細胞等から産生される IFN- $\gamma$  の血中濃度を測定した。その結果 IL-18 を除くいずれのサイトカインとも LECT2-KO マウスでは 1/2-1/3 に低下していた。

#### 2. LECT2-KO マウスを用いた D-galactosamine (GalN)/LPS 劇症肝炎モデルの解析

エンドトキシンによる様々な組織障害が観察されるがその中でも、劇症肝炎モデルとして知られる GalN/LPS 処理において LECT2-KO マウスでの影響を調べた。ノックアウトマウスでは、血中 GPT 活性が低下し肝障害が軽減していることが明らかとなった。さらにその時の血中サイトカイン濃度を測定したところ LPS 単独投与のときと同様に TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の誘導量の 1/2-1/3 の低下が観察された。

以上の様に LPS 投与によるエンドトキシンショックにおいて LECT2-KO マウスが抵抗性を示すことが明らかとなり、その原因の 1 つに単球・マクロファージからの TNF- $\alpha$ 、IL-12 等サイトカインの産生能の低下が生じ、そのことにより制御下の IFN- $\gamma$  産生低下につながりエンドトキシンに対する感受性が低下したものと考えられた。現在、各種細胞を単離し in vitro での実験系を使い、LECT2 の作用機序を解析している。

### 3.1.3 骨疾患モデル

LECT2 は、chondromodulinII としても報告され、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進活性を指標にしてウシ胎児軟骨組織から精製された。また、我々はヒト LECT2 の遺伝子多型 Val58Ile を見出し、Ile 型の遺伝子型を持つ慢性関節リウマチ患者で重篤度が高くなることを報告している。これらのことから LECT2 の関節炎における役割を調べた。

#### 1. anti-typeII collagen antibodies/LPS 処理により引き起こされる関節炎における LECT2-KO マウス解析

anti-typeII collagen antibodies/LPS 処理により発症する関節炎は、マウスの系統に関わらず発症させる事のできる実験モデルである。コラーゲン誘導関節炎は、ヒト慢性関節リウマチのモデルとして知られているが、マウスにコラーゲンを免疫しそれに対して抗体が産生されることで関節炎が発症する。今回用いた系は、4 種類の anti-typeII collagen antibodies を尾静脈投与し関節部分に蓄積させ、LPS により炎症を惹起させるため、抗体のできるステップを省略し、抗体のできた後の炎症反応のみを観察することができる。BALB/c 背景のマウスに同処理を施し、LECT2-KO マウスでの影響を調べた。anti-typeII collagen antibodies を尾静脈から投与後 3 日後に LPS を腹腔内投与した結果、後脚において LECT2-KO マウスでは顕著に関節が腫れることが判った (図 3)。LPS 投与 2 日後の足根関節の病理的評価を行った結果、関節の

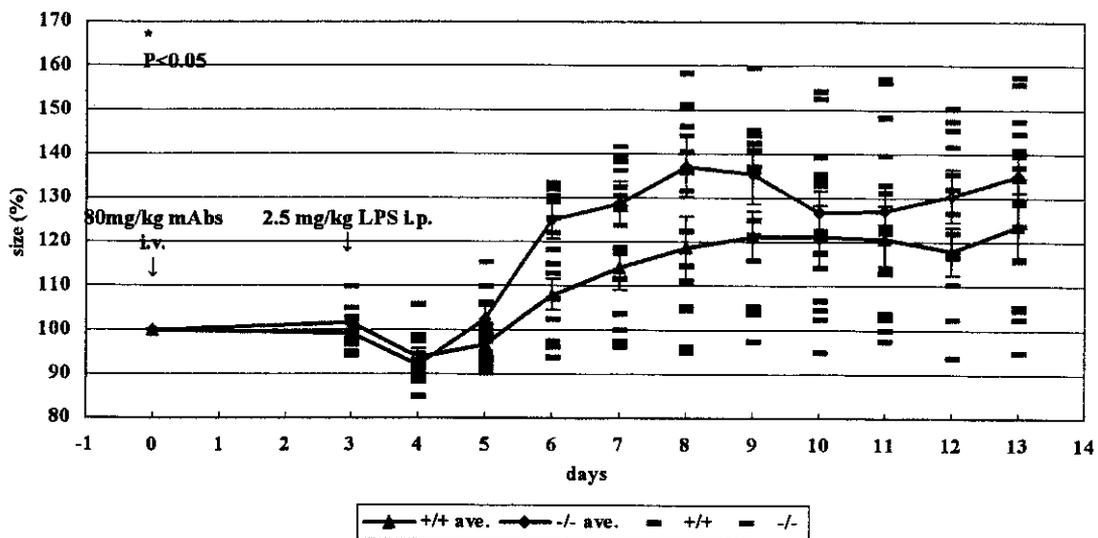


図 3. anti-typeII collagen antibodies/LPS 関節炎モデルでの経日変化  
後脚足根関節の腫脹を測定し 0 日を 100% とした。

腫脹に対応して顕著な滑膜の増生、好中球浸潤、フィブリン沈着、浮腫、軟骨、骨の破壊が LECT2-KO マウスにおいて観察されたが、野生型マウスではほとんど観察されなかった。また、LECT2-KO マウスで関節炎の亢進は見られたが関節炎自体に特長な病理像は見られなかった。関節炎の発症、進展に各種サイトカインの産生が必要であることが判っており、特に IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  が発症に重要であることが報告されている。そこで関節部分の各種サイトカイン濃度を測定した結果、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現の亢進、IL-4 の発現の低下が見られた。しかし、TNF- $\alpha$  の産生では差が見られなかった。LECT2-KO マウスにおいて関節炎の亢進がみられた 1 つの原因として、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の産生量の増加が炎症を促進し、抗炎症性サイトカイン IL-4 が低下するという両面の作用が協調したことによることが示唆された。

## 2. TNF $\alpha$ -KO マウス、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ -KO マウスにおける骨代謝異常

TNF $\alpha$ -KO マウス、および IL-1 $\alpha$ / $\beta$ -KO マウスの大腿骨を軟 X 線写真により調べたところ、骨量が増加していることが分かった。DXA により骨密度を測定したところ、有意に増加していることが分かった。さらに大腿骨の病理標本を作製し、HE 染色により皮質骨の厚みが有意に増加し、海綿骨も増加していることが判った。増加の程度は TNF $\alpha$ -KO マウスより IL-1 $\alpha$ / $\beta$ -KO マウスの方が大きい傾向が見られた。しかし、IL-1 $\alpha$ / $\beta$ -KO マウスと TNF $\alpha$ ・IL-1 $\alpha$ / $\beta$ -トリプル KO との間には有意な差は見られなかった。さらに IL-1 $\alpha$ -KO マウスと IL-1 $\beta$ -KO マウスを比較したところ、両者とも骨量及び骨密度の増加が見られた。IL-1 $\alpha$  より IL-1 $\beta$  欠損の方が増加の程度が大きい傾向が見られた。しかし、IL-1 $\beta$  単独 KO マウスと IL-1 $\alpha$ / $\beta$  ダブルノックアウトマウスの間には有意な差は認められなかった。以上のことより IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  などのサイトカインが、生理的条件下に於ける骨代謝において重要な役割を担っていることがわかった。これらのサイトカインは試験管内で破骨細胞の活性化可能を示すことや、骨芽細胞には影響を与えないことから、破骨細胞の活性化を介して骨代謝に関与していることが示唆された。

## 3. RANKL-KO マウスにおける骨代謝異常の SAP-RANKL-Tg マウスによる部分的回復

RANKL-KO マウスにおける骨代謝異常（骨化石症）が可溶性 RANKL を産生する SAP-RANKL-Tg との掛け合わせによって回復するかどうかを調べた。大腿骨など調べた限りの骨では有意に骨量、骨密度の低下が認められ、可溶性 RANKL によって破骨細胞の活性化が起こることが分かった。しかし、歯の異常は回復しなかった。これは歯の萌出時期に十分な RANKL が供給されなかったためではないかと考えられる。さらに、可溶性 RANKL の血中濃度は正常マウスの血中濃度と大差なく、可溶性 RANKL の比活性は膜結合型の分子とあまり変わらないことが示唆された。

## 3.4. LECT2 トランスジェニックマウスの作成

C57BL/6 マウスを用い、ニフトリ $\beta$  アクチンのプロモーター制御下でマウス LECT2 を発現できる pSA21 を作成した。インジェクションした合計 220 個 C57BL/6 マウスの胚を仮腹に移植した。計 54 匹の離乳を確認し PCR にてスクリーニングした結果、No. 12, 21, 33 の 3 匹のマウスが LECT2 遺伝子を持つ事がわかった。サザンブロットによる解析から、LECT2 遺伝子は、No. 12 (雄) で 1 コピー、No. 21 (雌) で 10 コピー以上、No. 33 (雄) は、数コピーは持っていることが判った。No. 21 に関しては出産直後、産仔と共に死亡した。現在、残った 2 匹の LECT2 発現等の解析を行っている。

## 3.5. マウス LECT2 ELISA 測定系の構築

得られたハイブリドーマ細胞は、CHO 細胞より精製した組換え体マウス LECT2 抗原を固定化したマイクロプレートによる ELISA 法において、91/136 (66.9%) という非常に高い陽性率を示した。この中から、ウエスタンブロット法をスクリーニング系にし Peroxidase 標識抗マウス LECT2 (ウサギ) で CHO および大腸菌で発現させたマウス LECT2 抗原がサンドイッチできる 10 クローンを選択した。この抗体を用いて、ELISA 系を構築中である。

## 3.6. LECT2 の立体構造の解析

### 1. 大腸菌によるヒト LECT2 の大量生産と巻き戻しと NMR による高次構造解析

ヒト Val 型 LECT2 蛋白質の組換え体を作成することを試みた。ヒト LECT2 遺伝子の N 末端に (His) $_6$ -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ため、封入体からの可溶化、巻き戻しを試みた。精製、巻き戻し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) $_6$ -LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞から発現精製したヒト 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 $\beta$ 構造に特徴的なパターンを示した。さらに、NMR スペクトル ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) においてもシグナルが一致した。 $^{15}\text{N}$  および  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  で標識した (His) $_6$ -LECT2 を調製し、3 核 3 次元 NMR の測定と解析を行った。天然型立体構造を持つタンパク質に特徴的な分離の良いスペクトルが得られ、50 mM 硫酸ナトリウム存在下で測定したスペクトルを帰属した。その結果、観測可能と期待される 130 スピン系 (140 アミノ酸-(N 末端+Pro 残基 9 個))のうち 110 について帰属をすることができた。さらに、帰属した化学シフトの値を素に、CSI (chemical shift index) を用いて二次構造の分布を解析した結果、(His) $_6$ -LECT2 は $\beta$ シートに富むタンパク質であり、 $\alpha$ ヘリックスを含まないことが明らかとなった。

### 2. 動物細胞 CHO 細胞発現系を用いたヒト LECT2 の X 線結晶構造解析

CHO 細胞に高発現プロモーター制御下でヒト LECT2 遺伝子を発現させ。陽・陰イオン交換を組み合わせ、

SDS-PAGE において単一バンドとして最終精製物を得た。1 リットル培養あたり約 0.5 mg の収量であった。調製されたタンパク溶液を用いて Crystal Screen kit I, II, Wizard I, II による結晶化を試みた。いくつか結晶が得られ、X 線を当てた結果、分解能 1.8 Å の回折データが得られた。

### 3.7. LECT2 の臨床的解析

#### 1. 患者および健常者におけるヒト LECT2 の日内変動

アルコール性肝炎、C 型肝炎、各 1 例、健常者 2 例による日内変動は観察されなかった。

#### 2. 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。

#### 3. 急性肝炎における LECT2 血中濃度

アルコール性肝炎 2 例、B 型肝炎 2 例、A 型肝炎 2 例により見たところ、LECT2 値が低下傾向を認め、回復とともに上昇する傾向を示した。また、劇症肝炎の症例を測定した時、他の急性期疾患と比し LECT2 値は 0 ng/ml まで低下していた。

#### 4. アルコール摂取と LECT2 血中濃度

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、上昇する傾向が見られた。

#### 5. ヒト成人生体部分肝移植時の血中 LECT2 濃度の動態

LECT2 濃度は donor 及び recipient とも術後 3~24 時間に最低値となりその後上昇し始めたが、donor では術後 5 日までに術前のレベルまで回復したが、recipient ではその回復が遅延した。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 4 症が例認められた。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。

#### 6. 肝切除以外の大侵襲手術時の血中 LECT2 濃度の動態

肝切除症例と同様に LECT2 濃度は術後 12~24 時間後に最低値となりその後急速に上昇し、術前のレベルまで回復した。これらのことは、手術侵襲に伴う炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  や IL-6 等) の上昇と考え合わせるとそれらと密接な関連があるものと推察される。

## 4. 考察

### 4.1. 各種疾患モデルマウスでの解析

これまで LECT2 のいくつか *in vitro* での活性が報告されていたが、必ずしもそれらは明確な活性ではなく生体内での生理活性については何ら判っていなかった。そこで、ノックアウトマウスを作成しその性状解析を行った。これまで 2 年間の結果から、肝炎、関節炎、エンドトキシンの各種炎症反応に関わること、特に、炎症性サイトカインの産生制御に関わることが明らかとなった。

Con A 肝炎モデルを用いることで LECT2 ノックアウトマウスにおいて NKT 細胞の増加し、それが IL-4 の産生増加につながり Con A 肝炎の感受性上昇の原因であることがわかった。NKT 細胞は、近年その機能が明らかとなってきており、T 細胞抗原レセプターと NK 細胞の標識分子を発現するリンパ球である。特に CD1d 依存的に  $\alpha$ -GalCer により活性化される NKT 細胞について詳しく研究されている。また、獲得免疫と自然免疫の橋渡しをするリンパ球であることが明らかとなり、腫瘍免疫、自己免疫、感染免疫、免疫寛容等の広い領域で重要な働きをしていることが判ってきている。LECT2-KO マウスで NKT 細胞の増加が見られたことより、LECT2 が NKT 細胞の発生分化、或いは維持に重要な役割をしており、しかもその制御に抑制的に働いていることを示唆した。これまで、NKT 細胞の発生、増殖に関係する様々な遺伝子が報告されてきているが、いずれも発生分化を促進する方に働いているものであり、LECT2 が NKT 細胞の増加の抑制に働きうることを示した初めての例であり極めて意義が大きいものと考えられる。今後 NKT 細胞の関与する様々な生体反応に LECT2 が関わる可能性がある。

劇症肝炎のモデルとして知られる D-galactosamine/TNF- $\alpha$ 、D-galactosamine/LPS、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わからないが、ConA 肝炎は、T 細胞がその発症に関わる肝炎であり、D-galactosamine/TNF- $\alpha$ 、D-galactosamine/LPS と anti-Fas antibody は T 細胞の関与が少ないことが予想され、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た。

リポポリサッカライド (LPS) による致死率、肝障害がノックアウトマウスでは抑制された。このモデルでは炎症性サイトカインが病態形成に重要な働きをしていると考えられるが、IFN- $\gamma$ 、IL-12 の産生が抑制されたことから LECT2 が単球・マクロファージの機能を増強していることが予想される。単球・マクロファージにより産生される IL-12 がリンパ球に働き IFN- $\gamma$  産生を誘導すると考えられているため、ノックアウトマウスの IFN- $\gamma$  の産生低下は、IL-12 の産生の低下が原因と考えられた。しかし、IL-12 をマウスに投与し IFN- $\gamma$  の産生を調べたところ、LECT2-KO マウスでは、野生型の約 1/2 に産生量が減ることが判っていることか

ら、LPS 処理により誘導されるサイトカインの産生において、LECT2 が単球・マクロファージおよびリンパ球 (NK 細胞、NKT 細胞あるいは T 細胞) と広く血球細胞に作用することを意味していると考えられる。

肝炎には肝再生も関係するため LECT2-KO を用い解析した。肝部分切除後の肝再生では、術後早期に細胞間の結合が緩く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があるのではないかと考えられている。LECT2-KO マウスの肝再生では細胞間結合が緩くなる時間の延長が認められた。細胞分裂像の観察される時間も遅くなっていることから LECT2-KO 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。

コラーゲン誘導関節炎モデルで LECT2-KO マウスは、野生型に比べ関節炎の発症が促進されることが明らかとなった。関節局所のサイトカインの変化を調べた結果、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現の亢進が見られたが、TNF- $\alpha$  の産生では差が見られなかった。一般的に関節炎では IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  が重要であるが、本モデルでは IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  がメインに作用し、IL-6 の関与は少ないことが報告されている。LECT2-KO マウスの IL-6 の産生量の増加が関節炎の重篤化に関与するか否かは今後の課題である。

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。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。

本実験では、いくつかのサイトカイン遺伝子改変マウスを使い様々な肝炎、関節炎モデルの解析を行うことで発症、病態の進行に重要なサイトカインが判ってきた。このように、これらのサイトカインと LECT2 との関係を探る基盤ができてきたことから、今後、肝疾患、関節炎モデルでのサイトカインネットワークにおける LECT2 の機能を探っていく予定である。

#### 4.2. LECT2-KO マウスに組換え体 LECT2 を免疫したときに得られたハイブリドーマの数

マウス ELISA 作成過程で面白い現象を得た。LECT2-KO マウスにマウス LECT2 組換え体を免疫し、ハイブリドーマを作成したところ、抗 LECT 抗体産生細胞が 70% 近い陽性率を得た。通常 10% 程度の陽性率であることからその原因解明は重要であると考えられる。LECT2-KO マウスに LECT2 を免疫したことによる特有の原因なのか、あるいは LECT2-KO マウスが様々な抗原に対して、同様の現象を示すのかは興味あることである。

#### 4.3. 組換え体 LECT2 の作成と立体構造解析

大腸菌で得られた巻き戻しヒト (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ヒト 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。3 核 3 次元 NMR の測定と解析を行って観測可能と期待される 130 スピン系 (140 アミノ酸-(N 末端+Pro 残基 9 個)) のうち 110 について帰属をすることができたが、シグナルの重なりにより、3 次元構造を解析するに至らなかった。しかし、CHO 細胞より得られた組換え体での X 線構造解析では、回折データ分解能 1.8 Å のかなり精度の高いシグナルが得られた。現在、重原子置換による結晶化の条件が決まりつつあり、今後 X 線構造解析により LECT2 の立体構造が決定される可能性がでてきた。

#### 4.4 臨床との関係

今のところ症例が少ないため肝疾患と LECT2 の血中濃度との明確な相関は見られていないが、少なくとも急性肝炎時には、LECT2 が低下しており回復と共に上昇する傾向が観察された。これはマウスの Con A 肝炎モデルと同じ結果を示した。さらに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。これらのことより、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 GTP 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。また、非肝切除症例でも肝部分切除と同じように LECT2 の変動が見られたことは、その変化が炎症反応全般に関わる可能性を示唆するものと考えられ、今後エンドトキシンショック等のマウスを用いた系での詳細な解析が必要と考えられる。

## 5. まとめ

- 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遺伝子改変マウスを用い各種肝炎モデル、肝再生モデル、肝転移モデルにおける作用メカニズムを分子生物学的、病理学的に解析した。
- 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 anti-type II collagen antibodies/LPS 関節炎モデルマウスを用い分子生物学的、病理学的に解析した。また、骨代謝異常を TNF $\alpha$ -KO、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ -KO、RANKL-KO、および SAP-RANKL-Tg マウスを用い解析した。
- 3) ヒト肝疾患、肝移植、及び肝切除以外の大侵襲手術時の血漿中の LECT2 濃度を測定し病態との因果関係を調べた。その結果、LECT2 の血中変化は、少なくとも炎症反応に関与していることが示唆された。現在、症例をさらに増やし臨床意義を調べる予定である。
- 4) 血中マウス LECT2 測定系の構築のためマウスハイブリドーマ細胞を多数得た。現在、それらを用いマウス ELISA 系を構築している。
- 5) 創薬を目指したタンパク分子構築のために LECT2 タンパク質の立体構造の決定を試みた。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した。大腸菌組換え体を用いて NMR による解析を行い二次構造の大部分を決定した。現在、動物細胞由来組換え体を用いて結晶化に成功し、X 線解析像を得た。現在、重原子置換を行い結晶構造解析を行っている。

## 6. 研究発表

1. Yamagoe, S., Kanno, T., Kanno, Y., Sasaki, S., Siegel, RM., Lenardo, MJ., Humphrey, G., Wang, Y., Nakatani, Y., Howard, BH, Ozato, K. Interaction of histone acetylases and deacetylases *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1025-1033 (2003)
2. Ito-ishida, M., Nagata, K., Oda, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K., Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Expression Purif.* in press
3. Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S, Yoshimura Y. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Biol. Chem.* in press
4. 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 Res.*, 55, 161-168 (2002)
5. Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, 83, 141-150 (2002)
6. Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- $\gamma$  through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*, 105, 92-100 (2002)
7. Kyuwa, S., Shibata, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Machii, K., Urano, T. Acute hepatic failure in IFN- $\gamma$ -deficient BALB/c mice after murine coronavirus infection. *Virus Research*, 83, 169-177 (2002)
8. Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y., 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*, 516, 63-66 (2002)
9. Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H., Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in IL-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40L and OX40 expression on T cells. *Arth. Rheum.*, 46, 533-544 (2002)
10. Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., Miyake, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.*, 3, 667-672 (2002)
11. Ishida, Y., Kondo, T., Ohshima, T., Fujiwara, H., Iwakura, Y., Mukaida, N. A pivotal involvement of IFN- $\gamma$  in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J.*, 16, 1227-1236 (2002)
12. Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13, 341-355 (2002)
13. Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *tax* gene. *Gann Monograph*, in press.
14. Bannai, M., Kawamura, T., Naito, T., Kameyama, H., Abe, T., Kawamura, H., Tsukada, C., Watanabe, H., Hatakeyama, K., Hamada, H., Nishiyama, Y., Ishikawa, H., Takeda, K., Okumura,

- K., Taniguchi M. and Abo, T. Abundance of unconventional CD8<sup>+</sup> natural killer T cells in the large intestine. *Eur. J. Immunol.* 31, 3361-3369 (2001)
15. Minagawa, M., Watanabe, H., Miyaji, C., Tomiyama, K., Shimura, H., Ito, A., Ito, M., Domen, J., Weissman, IL. and Kawai, K. Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice. *J. Immunol.*, 169 4153-4160 (2002)
  16. Kawamura, H., Kameyama, H., Kosaka, T., Kuwahara, O., Bannai, M., Kawamura, T., Watanabe, H. and Abo, T. Association of CD8<sup>+</sup> natural killer T cells in the liver with neonatal tolerance phenomenon. *Transplantation* 73, 978-994 (2002)
  17. Abe, T., Kawamura, H., Kawabe, S., Watanabe, H., Gejyo, F. and Abo, T. Liver injury due to sequential activation of natural killer cells and natural killer T cells by carrageenan. *J. Hepatology* 36, 614-623 (2002)
  18. Wang, S., Li, C., Kawamura, H., Watanabe, H. and Abo, T. Unique sensitivity to  $\alpha$ -galactosylceramide of NKT cells in the uterus. *Cell. Immunol.* 215, 98-105, (2002)
  19. Miyakawa, R., Miyaji, C., Watanabe, H., Yokoyama, H., Tsukada, C., Asakura, H. and Abo, T. Unconventional NK1.1<sup>+</sup> intermediate TCR cells as major T lymphocytes expanding in chronic graft-versus-host disease. *Eur. J. Immunol.* 32, 2521-2531 (2002)
  20. Morshed, S. R. M., Mannoor, K., Halder, R. C., Kawamura, H., Bannai, M., Sekikawa, H., Watanabe, H. and Abo, T. Tissue-specific expansion of NKT and CD5<sup>+</sup>B cells at the onset of autoimmune disease in (NZB×NZW)<sub>F1</sub> mice. *Eur. J. Immunol.* 32, 2551-2561 (2002)
  21. Miyaji, C., Watanabe, H., Miyakawa, R., Yokoyama, H., Tsukada, C., Ishimoto, Y. and Abo, T. Identification of effector cells for TNF $\alpha$ -mediated cytotoxicity against WEHI164S cells. *Cell. Immunol.* 216, 43-49, (2002)
  22. 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.*, 2, 1079-86 (2002)
  23. Ikemoto, M., Inoue, K., Akiduki, S., Osugi T., Imamura, T., Ishida, N., Ohtomi, M. Identification of adducin/GTRAP3-18 as a chronic morphine-augmented gene in amygdala. *NeuroReport*, 13, 2079-2084 (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