

平成15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

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
<p>896A KH21010</p>	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
<p>897A KH21011</p>	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19 新井洋由 …… 25
<p>898A KH21012</p>	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	葛西正孝 …… 33
<p>899A KH21013</p>	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	井上和秀 …… 39
<p>900A KH21014</p>	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	望月直樹 …… 47
<p>901A KH21015</p>	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	上原至雅 …… 51
<p>902A KH21016</p>	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	江崎 治 …… 55
<p>903A KH21017</p>	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	絵野沢 伸 …… 59
<p>904A KH21018</p>	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	田平 武 …… 62
<p>905A KH21019</p>	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	若宮伸隆 …… 67
<p>906A KH21020</p>	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	鈴木和男 …… 74
<p>907A KH21021</p>	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	川 茂幸 …… 84
<p>908A KH21022</p>	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	北川隆之 …… 89
<p>909A KH21024</p>	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	山越 智 …… 95
<p>910A KH21025</p>	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	辻本豪三 …… 104
<p>911A KH21026</p>	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	桃井 隆 …… 111
<p>912A KH21027</p>	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	鈴木康夫 …… 118
<p>913A KH22071</p>	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	吉村昭彦 …… 121
<p>914A KH22072</p>	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	宮武昌一郎 …… 125
<p>915A KH22073</p>	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	目加田英輔 …… 133
<p>916A KH22082</p>	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	

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

研究要旨 炎症性疾患における新規サイトカインLECT2の役割を遺伝子改変マウスを使い解析した。その結果、サイトカイン産生を制御することで肝炎、関節炎、エンドトキシンショック等の炎症反応に深く関与することが明らかとなり、新しい創薬につながる可能性が示された。

分担研究者

- | | |
|---------------------------------|--------|
| (1) 国立国際医療センター研究所
医療生態学研究所 | 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) 琉球大学遺伝子実験センター
感染免疫制御分野 | 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) 国立感染症研究所
生物活性物質部 | 鈴木 和男 |

A. 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ことが分かっており、*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いる。このように 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 の役割を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、その解析の為に抗体等材料の作

製し、さらに 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を目的とした。第二に、マウス疾患モデルにより明らかとなった LECT2 の関わるヒト肝疾患症例について臨床検体を用いて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。

B. 研究方法

1) 使用したマウス

LECT2、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α/β 、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 α -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。なお、マウスの飼育は全て SPF 環境下で行った。

2) concanavalin A (Con A) 肝炎モデル

B6 マウス (7-12 週齢) および同系統 LECT2 ノックアウトマウス (7-12 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。

3) 肝臓、胸腺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。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) フローサイトメトリー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、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、フローサイトメトリーで解析した。

5) 細胞障害活性の測定

YAC-1 あるいは B6 由来の胸腺細胞を放射性 ^{51}Cr にて標識した。肝臓から調製したリンパ球画分を段階的に希釈して、標識細胞に加えた。37°C で 4 時間インキュベーション後、培地中に放出された放射活性を測定した。

6) 血清中サイトカインの濃度

マウス各疾患モデルにおいて経時的に尾静脈から血液を採取、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。

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 と同背景 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 50 μg /20g のリポポリサッカライド (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) マウスへの遺伝子導入

Hydrodynamic transfection 法を行った。100 μg の遺伝子発現ベクターDNA あるいはベクターDNA を 2.5ml のリングル液に溶かしマウスの尾静脈に 7 秒で注射した。

9) in situ hybridization および免疫組織染色

マウス (ddy 雄、4 週齢) の脳から凍結切片を作成し、常法に従って前処理を行った後、cRNA プローブを用いた in situ hybridization および各種抗体を用いた免疫組織染色で LECT2、MAP2 および GFAP 抗体等の発現の局在を調べた。

10) 組換えマウス LECT2 蛋白質の精製

組換えマウス LECT2 発現 CHO 細胞を培養し、5% FCS-DMEM 培養液中に分泌発現させた。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。

11) マウス LECT2 モノクローナル抗体の作製とサンドイッチ ELISA 系の構築

組換えマウス LECT2 を免疫原として、LECT2 ノ

ックアウトマウス 3 匹を用いてモノクローナル抗体の作製を行った。抗原は 25 μg /匹でフロイントの完全アジュバントと共に 3 回免疫し、採取したリンパ節とミエローマ細胞 (P3U1) とを細胞融合させた。モノクローナル抗体は、マウス LECT2 を固定化したマイクロプレートによる ELISA 法等によりクローンを選択し、限外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 Protein G カラムを用いて IgG を精製し、サンドイッチ ELISA 測定系を組めるクローンを検索した。最適クローンの組み合わせは血清/血漿サンプルを用いた添加回収試験の結果より選択した。

12) ヒト LECT2 アンチセンスペプチドの作製

国立国際医療センターの Dr. Dawson により解析されたヒト LECT2 の構造情報を基に、22aa からなる計 20 種類のアンチセンスペプチドの設計を行った。設計上導入された Cys 残基については Ala 残基へと置換した後、ペプチド合成を行った。

13) ピアコアによるヒト LECT2 とヒト LECT2 アンチセンスペプチドの相互作用の解析

ピアコア解析を行う際のリガンドとして、組換えヒト LECT2、ヒト LECT2 に対するモノクローナル抗体を直接センサーチップ (CM5) に固定化した。アナライトとしてのアンチセンスペプチド (各 20aa) 20 種類については、それぞれをピアコア用のランニングバッファーに溶解し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液として調製した。組換えヒト LECT2 とアンチセンスペプチドの相互作用の測定にあたっては、ペプチド溶液を 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速でインジェクトし、センサーグラムを得た。

14) 接触型過敏症モデル

マウスの腹部の皮膚に 3% TNCB を塗布し、5 日後に片方の耳に 1% TNCB を塗布することにより誘導した。気道過敏症は OVA+alum で 2 回腹腔免疫し、その後、経鼻的に 4 回 OVA で免疫するか、あるいは、alum なしで 7 回免疫後、8 回経鼻的に免疫して、その後メサコリンを投与して気道抵抗性を測定した。

15) 臨床検体

1999 年 1 月から 2003 年 7 月まで新潟大学医学部附属病院及び関連施設において、肝疾患患者等の手術症例及び診断目的に針生検を施行した症例を対象とし、その肝組織及び末梢血を用いた。

倫理面への配慮

本研究は患者由来の肝臓組織、末梢血の取り扱いを含んでおり、インフォームドコンセントを受容したボランティアの協力の下に遂行された。新潟大学医学部の倫理委員会に研究申請を行い、その許可のもとに遂行した。事前に研究の趣旨を十分に説明し、さらには個人の情報が漏洩しないよう万事を期すことを十分に説明し同意が得られた場合のみ患者の検体を本研究に用いた。

動物実験に関しては、各分担研究者の所属する施設の倫理規定により動物愛護によって行われた。動物実験計画書を所属機関の動物委員会に提出し倫理上の問題を含めて許可を得た。遺伝子改変マウスの繁殖及び実験は所属機関で行われた。マウスの運搬は専門の業者によって行われ、不当な環境下での運搬は行われていない。研究の目的と整合して、可能な限り、良好な生活環境を与え、実験にあたっては、必要最小限度の数の、苦痛、不快を可能な限り避けるべく努力した。

C. 研究成果

1. 肝炎モデル

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呈することが知られている。昨年度までに、B6 マウスの LECT2 欠損マウス (LECT2-KO マウス) を用いこの肝炎モデルが重篤になり、その原因の1つとして肝臓 NKT 細胞の増加が示唆された。そこで、今年度は LECT2-KO マウスの NKT 細胞の解析をし、さらに Con A 誘導肝炎との関係を詳細に解析した。

1) B6 背景 LECT2-KO マウスの肝臓 NKT 細胞の CD1d tetramer による解析

昨年、LECT2-KO マウスは野生型に比べて約 2 倍の CD3int NK1.1⁺細胞を持つことがわかった。この細胞集団は主に NKT 細胞と呼ばれる細胞から成り立つことが分かっている。NKT 細胞は、特殊な 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。特に抗原提示細胞の CD1d 依存的に糖脂質抗原 α -galactosylceramide (α -GalCer) により活性化される T 細胞抗原受容体 V α 14-J α 281 を発現する V α 14NKT 細胞が主要な細胞であり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。そこで V α 14NKT 細胞を特異的に検出できる PE 標識の CD1d

tetramer を用いフローサイトメトリーにより解析した。その結果、CD3int NK1.1⁺細胞と同じようにほぼ 2 倍の CD1d tetramer 標識細胞が検出され、LECT2-KO マウスの肝臓 V α 14NKT 細胞が増えていることが示された。

2) B6 背景 LECT2-KO マウス肝臓 NKT 細胞の細胞障害活性の解析

昨年、 α -GalCer を用いた *in vivo*, *in vitro* の解析により 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。今年度はさらに NKT 細胞の細胞障害性活性について解析した。B6 マウスより肝臓 mononuclear cells (MNC) 細胞を調製し、NKT 細胞の標的細胞として B6 マウスの胸腺細胞、NK 細胞の標的細胞として YAC-1 細胞を用い調べた。その結果、NKT 細胞障害活性の著しい増加が見られ、先に述べた NKT 細胞の倍増がその原因として考えられた。NK 細胞の細胞障害活性についてはわずかの活性の上昇が見られた。この原因は、今のところ分からないが、LECT2-KO マウスの NK 細胞が活性化している、LECT2-KO マウスの NKT 細胞の YAC-1 細胞への細胞障害性が見られるようになった等の原因が考えられる。

3) B6 背景 LECT2-KO マウスの Con A 誘導性肝障害モデルにおける肝臓 NKT 細胞の動態

マウス Con A 誘導性肝障害モデルにおいて Con A 刺激後 2 時間で肝臓 NKT 細胞の活性化が起こり IL-4 の産生、FasL の発現により自己のアポトーシスが引き起こされることが示されている。そこで、LECT2-KO マウスでの Con A 誘導性肝障害モデルにおける肝臓 CD3int NK1.1⁺(NKT)細胞の動態を調べた。誘導後 3 時間で野生型マウスに比べ多くの NKT 細胞のアネキシン V 染色陽性細胞が観察され、FasL の発現も亢進していた。これは、LECT2-KO マウスの NKT 細胞の量が増えていることにより、Con A 刺激に過剰に反応した結果によるものと考えられた。

4) マウス Con A 肝炎モデルにおける NKT 細胞機能と糖鎖発現の変化

マウス Con A 誘導肝炎における NKT 細胞の細胞傷害活性機構を解析した結果、Con A 肝炎誘導 LECT2-KO マウスでは FasL 分子の発現が亢進しており、上述の様に LECT2-KO マウスは野生型マウスに比して NKT 細胞傷害活性が高いことが明らかになっている。近年、このような細胞増殖や細胞の機能制御に糖鎖が関与することが報告されつつある。そこで Con A 肝炎誘導による肝リンパ球の糖鎖発現を解析した。B6 マウスと Con A 肝炎誘導 B6 マウスで検討した結果、Con A 肝炎 B6 マウスでは、NK 細胞上の WGA レクチン

結合のジ-N-アセチルキトビオースが減少すること、シアル酸 (SSA レクチン結合) の発現が NKT 細胞と T 細胞で増加すること、RCA60 レクチン結合の D-ガラクトースが T 細胞で増加することが見出された。今回の検討では、Con A 肝炎での NKT 細胞の発現糖鎖の変動は明確ではなかった。

2. エンドトキシンショックモデルにおける解析

昨年度の報告で敗血症のモデルとして LPS を使用したエンドトキシンショックを解析した。野生型、LECT2-KO マウスでその作用を調べた結果、LECT2-KO マウスでは低感受性を示すこと、また、劇症肝炎モデルとして知られる D-galactosamine (GalN) /LPS 処理でも同マウスが抵抗性を示すことを報告した。両モデルで誘導される IFN- γ の量が野生型の 1/2-1/3 に低下しており、これが低感受性の原因の 1 つと考えられた。そこで今年度はそのメカニズムを調べた。

1) LECT2-KO マウスにおける LPS 刺激低感受性化のメカニズムの解析

IFN- γ の主な産生細胞は NK, NKT 細胞であると考えられ、主に LPS 刺激により誘導される IL-12 によって誘導されると考えられる。そこで、マウスに IL-12 を投与し誘導される IFN- γ の比較をした。その結果、LECT2-KO マウスでは誘導される血中 IFN- γ の量が野生型マウスの約 1/2 に低下していた。このことは LECT2-KO マウスでは、NK あるいは NKT 細胞の IL-12 に対する反応性が低下していることを意味すると考えられた。そこで、LECT2 が NK, NKT 細胞に直接働き、IL-12 による IFN- γ 誘導を制御する可能性を検討した。肝臓から MNC 画分を調製し、LECT2 存在下 *in vitro* での、サイトカイン刺激による IFN- γ の誘導について解析した。その結果 IL-12 あるいは IL-15 単独刺激による IFN- γ 誘導には LECT2 は影響を与えなかったが、IL-12 と IL-15 の併用処理により誘導される IFN- γ 産生を促進することが明らかとなった。このことは LECT2 が NK, NKT 細胞に直接作用し、IFN- γ の誘導を制御する可能性を示唆するものである。

3. 骨疾患モデル

LECT2 は、我々の発見と同時期に chondromodulinII として報告され、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 Val158Ile 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た。昨年度までにヒト関節リウマチのモデルとし

て知られている抗 II 型コラーゲン抗体/LPS 処理により発症する関節炎モデル (CAIA) が、LECT2-KO マウスでは重篤化することが明らかとなり、関節局所における IL-1 β , IL-6 の発現の亢進が原因の 1 つと考えられた。今年度は、さらにその解析を行った。

1) 関節炎発症時の血中および関節局所の LECT2 の濃度

昨年度開発されたポリクローナル抗体を用いたプロトタイプマウス LECT2 ELISA 系を用い関節炎発症時の血中および関節局所での LECT2 濃度の変化を調べた。関節の腫れが見られ始める抗体投与後 5 日後の LECT2 濃度は、無処理マウスに比べて上昇していた。関節局所の LECT2 の上昇が関節に局在する細胞に由来するかどうか調べた。RT-PCR による LECT2 mRNA の検出を試みたが、肝臓の LECT2 発現の 1/1000 程度の量の検出条件でも検出できなかった。また、関節局所の切片を使った抗 LECT2 抗体による免疫組織染色でも産生細胞を特定できなかった。この原因として血中 LECT2 の上昇が関節局所の LECT2 濃度の上昇に寄与しているのかもしれない。

2) LECT2 遺伝子導入による関節炎の軽減化

CAIA が、LECT2-KO マウスでは重篤化することより LECT2 が関節炎の進展を押さえている可能性が考えられた。そこで LECT2 蛋白質あるいは遺伝子をマウスに導入することにより関節炎発症あるいは進行に影響を与えるかどうか検討した。組換え体マウス LECT2 を調製し、LECT2-KO マウスに対して抗 II 型コラーゲン抗体投与する前日より関節局所に毎日 1.5 μ g の量を注射した。7 日後、関節炎の軽減化の傾向は見られたが統計学的な有意差は見られなかった。そこで、Hydrodynamic transfection 法にて LECT2 遺伝子をマウス肝臓に発現、血中に産生させ関節炎への影響を調べた。LPS 処理 1 日前に LECT2 遺伝子を導入し、経時的に足の腫れを測定した。その結果、LECT2 遺伝子を導入した LECT2-KO マウスでは、ベクターのみ導入マウスに比べて関節炎の軽減化が見られた。このように、LECT2 による関節炎の治療効果が観察された。

4. マウス脳における LECT2 の発現局在

昨年、我々は脳における LECT2 mRNA の発現について RT-PCR 法と *in situ* hybridization による検討を行い、LECT2 mRNA が脳でも発現していることおよび部位特異的に発現していることを報告した。本研究では、LECT2 の脳における機能についての考察を行うため、昨年に引き続き *in situ* hybridization と免疫組織染色を用いて、LECT2 の発現の局在につ

いて詳細な検討を行った。

1) 脳における LECT2mRNA の発現の分布

LECT2mRNA の発現は、嗅球の糸球体周辺、僧帽細胞周辺、顆粒細胞層および嗅結節、大脳皮質の前頭野および視覚野の周辺、梨状皮質の一部、中脳の橋核周辺、小脳のプルキンエ細胞周辺および顆粒細胞層に認められた。特に、プルキンエ細胞周辺、嗅球の糸球体周辺、嗅球の僧帽細胞周辺および顆粒細胞層で顕著な LECT2mRNA の発現が認められた。免疫組織染色でもほぼ同様の結果を得た。高倍率顕微鏡観察の結果から、脳においては LECT2mRNA が嗅球糸球体周辺や顆粒層を含むニューロンで発現していると考えられた。

5. マウス LECT2 モノクローナル抗体の作製とサンドイッチ ELISA 系の構築

昨年までのポリクローナル抗体を用いた系での感度/特異性の問題をクリアするため、新規モノクローナル抗体を作製し、モノクローナル抗体同士でのサンドイッチ ELISA 測定系のプロトタイプを構築を試みた。

1) LECT2-KO マウスを用いたマウス LECT2 モノクローナル抗体の作製

LECT2-KO マウスを用いた LECT2 抗体作製においては、免疫後速やかに抗体価が上がり始め、1 次スクリーニングにおいて 10~20%程の陽性クローンを得た。その後、POD 標識マウス LECT2 ウサギポリクローナル抗体でサンドイッチできる抗体としてスクリーニングを行い、限外希釈法によって 22 種を単一クローン化した。

2) 作製したモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 系の構築

昨年度に作製したモノクローナル抗体 8 クローンと今年度に作製した 22 クローンを合わせて、サンドイッチできる組み合わせを検討したところ、1 クローン (Clone 8G2) のみいづれのクローンともサンドイッチ可能であった。最適な組み合わせを添加回収試験の結果より選択し、捕捉用抗体 8G2-検出用抗体 4C3 としてプロトタイプ系を構築した。

6. ビアコアによるヒト LECT2 とヒト LECT2 アンチセンスペプチドの相互作用の解析

LECT2 の作用機序を調べる上でレセプターの解析は重要である。LECT2 のレセプターについては未だ明らかにされていない。そこで LECT2 レセプターもしくは LECT2 と相互作用する分子のスクリーニングを目的とし、アンチセンスペプチドを用いた実験を

行うこととした。アンチセンスペプチドの研究は、蛋白質の分子内もしくは分子間においてセンス・アンチセンスの関係になっているペプチド部分が存在する場合、それらのペプチドは結合するという報告に基づいたものである (例: HIV gp160、エンドセリンレセプター等)。

1) ビアコアによる相互作用の確認 (1)

センサーチップには蛋白質とペプチドの相互作用を解析するにあたって充分量の組換えヒト LECT2 (rhLECT2) が固定化され (リガンド固定化量: 6,800RU、ペプチドの理論最大結合量: 1,050RU)、かつ、抗 rhLECT2 抗体との相互作用を保持していることを確認した。しかしながら、全てのペプチドにおいて rhLECT2 との相互作用は確認されなかった。

2) ビアコアによる相互作用の確認 (2)

充分量の rhLECT2 が抗 hLECT2 抗体にキャプチャーされた (リガンド固定化量: 4,800RU、ペプチドの理論最大結合量: 700RU) が、全てのペプチドにおいて rhLECT2 との相互作用は確認されなかった。

3) ビアコアによる相互作用の確認 (3)

センサーチップに固定化された抗 hLECT2 抗体と rhLECT2 の相互作用を充分確認できる条件下において、アナライトとして用いた rhLECT2 溶液の中にモル比で約 600 倍のアンチセンスペプチドを加えることにより抗 hLECT2 抗体と rhLECT2 の相互作用の変化を調べた。しかしながら、抗 hLECT2 抗体と rhLECT2 の相互作用に変化は認められなかった。

7. 蛍光ナノ粒子を用いた LECT2 の標識

蛍光ナノプローブを用いて LECT2 分子にタグgingし LECT2 の生体内動態を解析し、また LECT2 ノックアウトマウスやその他の自己免疫疾患モデルマウスなどにおいてその生体内動態を解析することを通じて LECT2 が保わる疾患メカニズムを明らかにする目的で以下の条件検討を行った。既に合成手法が確立されている 5 nm の Cd/Se の半導体ナノ粒子 (量子ドット) を利用し、細胞を標識し、その標識された細胞をマウス生体内に導入し、その細胞の生体内動態を解析した。

1) 細胞内安定性の検討

細胞内安定性を見るため、まず *in vitro* において、シャーレで培養したマウスリンパ球系株化細胞 (EL4) に、赤色半導体ナノ粒子 (Cd/Se; 蛍光波長 560 nm) を導入した。導入方法としては、羊アルブミンを同じモル濃度赤色半導体ナノ粒子と混和し、それを培地に入れ、しばらく取り込ませた後、洗い流し、培養しながら蛍光顕微鏡 (オリンパス)

にて観測した。表面加工した、量子ドットを、培養液に添加し、しばらく培養を続けた。その後細胞を撒き直して染色した細胞を観測した結果、その標識能力が十分に有効であることが確認された。

2) マウス生体内に導入しその生体内動態

上記で標識された細胞をマウス生体内に導入しその生体内動態を解析した。その結果、脾臓、肺、腎臓、肝臓に存在する細胞を観測することができた。

8. 各種炎症モデルを使ったサイトカインの役割

LECT2 がサイトカインの発現制御を介して様々な炎症疾患に関わることが明らかとなってきた。各種サイトカイン欠損マウスを使い、様々な炎症モデルを解析することによりそのメカニズムを解明し、LECT2 の機能解析に応用する基礎を作ることを試みた。

1) IL-1 欠損マウスを使った接触型過敏症の解析

IL-1 欠損マウスでは接触型過敏症の発症が抑制されることがわかった。同様に、TNF α 欠損マウスに於いても発症は抑制された。その作用機序を調べた結果、IL-1 欠損マウスのT細胞はTNPに対する応答性が低下しているのに対し、TNF α 欠損マウスの応答性は正常であることがわかった。また、免疫後 IL-1 欠損T細胞を移植した場合は反応が低下しているのに対し、TNF α 欠損マウスの場合には正常であった。この結果、IL-1 はT細胞のプライミングに関与していることがわかった。また、予め免疫した野生型T細胞を TNF α 欠損マウスに移植すると、発症が抑制され、TNF α が炎症誘導期に機能していることが示された。さらに、欠損マウスでは IP-10 の発現が低下していた。IP-10 が TNF α によって発現誘導されること、抗 IP-10 によって発症が抑制されること、TNF α 欠損マウスに IP-10 を投与することにより、発症が回復することから、TNF α は IP-10 の発現を誘導することにより、炎症を増悪化させていることがわかった。

2) IL-1 関連欠損マウスを使った OVA 誘導気道過敏症の解析

OVA 誘導気道過敏症に於いて、IL-1 を欠損させると発症が抑制され、逆に IL-1Ra 欠損マウスでは反応が亢進することが分かった。免疫時、alum が存在するとこのような IL-1 の効果は見られなかったことから、alum によって誘導される他のサイトカインが IL-1 の作用を代行していることが示唆された。また、IL-1 欠損マウスではT細胞の活性化の程度が低く、IL-4 や IL-5 などの Th2 サイトカインの産生が低下しており、IgG 1、IgE の血中レベルが低下していた。このことから、IL-1 は Th2 細胞の活性化に関与して

いることがわかった。IL-1 α 、あるいは IL-1 β によって共に気道過敏症の発症は抑えられたが、血中 IgG 1 レベルの低下は IL-1 β 欠損に於いてのみ認められ、IL-1 α 欠損では認められなかった。このことは、 α と β の機能分担があることを示唆する。

9. 肝疾患症例における肝 NKT 細胞と樹状細胞の動態

LECT2 遺伝子欠損マウスでは、肝臓 NKT 細胞が増加しており Con A 肝炎モデルで重篤となったことから、ヒト臨床検体を用い各種肝疾患 NKT 細胞との関係を調べた。

1) 原発性胆汁性肝硬変症例

生体部分肝移植を施行した原発性胆汁性肝硬変レシピエント 7 例 (Symptomatic PBC) と無症候性原発性胆汁性肝硬変 8 例 (Asymptomatic PBC) を対象とした。その結果、NKT 細胞のなかでも regulator 細胞と考えられている CD57⁺NKT 細胞は病期の進行に伴い有意な増加を認めた。一方、effector 細胞である CD56⁺NKT 細胞の CD28 の発現は、病期に関わらず有意な低下を認めた。PBC の進行期では、CTLA-4 を発現し活性化した CD56⁺NKT 細胞が増加しており、また、FasL の発現の割合が増加し、免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の門脈域への浸潤が認められた。

2) 薬剤性劇症肝炎症例

生体部分肝移植施行の薬剤性劇症肝炎レシピエント 2 例を対象とした。その結果、肝内及び末梢血中の NK 細胞と NKT 細胞 (CD16⁺、CD56⁺、CD57⁺) の両細胞とも健常者に比べて減少していた。しかし、細胞の活性化誘導分子である CD28 の発現は有意に増加していた。

3) C 型慢性肝炎・肝硬変及び肝細胞癌症例

C 型慢性肝炎・肝硬変 31 例と肝細胞癌 9 例を対象とした。NKT 細胞は、末梢血で CD57⁺NKT 細胞が増加傾向を示したが、肝内の CD56⁺NKT 細胞は有意に減少していた。T 細胞活性化のシグナル伝達に必要な CD28 抗原の発現を CD56⁺NKT 細胞と T 細胞で比較した。CD56⁺NKT 細胞では末梢血及び肝内とも CD28 の発現は低下していた。T 細胞に関しては末梢血での変化は見られず、肝内では発現が増加し特に癌部で顕著であった。樹状細胞 (DC) の動態は、活性化マーカーの CD83 及び活性シグナル受容体の CD28 と抑制シグナル受容体である CD152 (CTLA-4) のリガンドである CD80 と CD86 抗原の発現で調べた。末梢血及び肝内とも CD83⁺DC は減少していた。DC 上の CD86 の発現には変化が見られなかったが、CD80 は末梢血 DC では発現が増加し、一方、肝内 DC での発現は低下し

ており肝細胞癌症例の非癌部で顕著であった。

D. 考察

1) マウス各種疾患モデルを使った解析

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、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製しその性状解析を行った。これまでの結果から、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事が明らかとなった。

LECT2 ノックアウトマウスにおいて肝臓 NKT 細胞が増加していることから、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が示唆された。また、LPS による致死率、肝障害が LECT2 ノックアウトマウスでは抑制されたが、NK 細胞あるいは NKT 細胞の産生する IFN- γ の量が抑制されたこと、さらには肝臓 MNC 画分を用いた *in vitro* の解析から IL-12、IL-15 による IFN- γ の産生が LECT2 により増強されたことから LECT2 が NK 細胞あるいは NKT 細胞に直接作用し制御していることが示唆された。NK 細胞と NK 細胞は相互に制御し合いその活性、発生分化が制御されていることが分かっていることから LECT2 が直接 NK 細胞、あるいは NKT 細胞に働いている可能性が示唆される。

抗 II 型コラーゲン抗体誘導関節炎モデルを使い、野生型マウスでは関節炎の発症と共に血中および関節局所の LECT2 濃度の上昇が観察されたこと、LECT2-KO マウスでは、野生型に比べ関節炎の発症進行が促進されたこと、さらに LECT2 遺伝子を LECT2-KO マウスに導入することにより関節炎が軽減化されたことより LECT2 が関節炎では抑制的に働く可能性が示唆された。しかし、現時点ではこの関節炎における LECT2 の作用点がどこにあるかは不明である。遺伝子導入実験では LECT2 の関節炎の治療薬としての可能性が示唆された。

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接触型過敏症、OVA 誘導気道過敏症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た。これら炎症モデルを使ったサイトカインと LECT2 との関係を探る基礎ができてきた。

2) マウス LECT2 モノクローナル抗体の作製とサンドイッチ ELISA 系の構築

LECT2-KO マウスを用いてマウス LECT2 モノクローナル抗体の作製を行ったところ、10~20%程度の陽

性クローンが得られた。昨年度の検討で LECT2-KO マウスの固有の現象と考えられた高いハイブリドーマ陽性率 (66.9%) が得られなかったことから、昨年観察された現象は単なる実験上の振れであると考えられた。ELISA 系構築に関しては、前年度と合わせて 30 種程度のクローンを単離することができた。その中で、いずれのクローンともサンドイッチ可能なクローン (Clone 8G2) が見つかった。他のクローン同士ではサンドイッチできないことからこのクローンのみマイナーエпитープに反応するものと思われた。

3) ピアコアによるヒト LECT2 とヒト LECT2 アンチセンスペプチドの相互作用の解析

LECT2 は好中球活性化蛋白質として見出されて以来、これまで様々な方法で遺伝子のクローニング等同定を試みてきたがそのレセプターについては未だ明らかにされていない。そこで LECT2 レセプターもしくは LECT2 と相互作用する分子のスクリーニングを目的とし、アンチセンスペプチドを用いた実験を行った。Dr. Dawson の予測したヒト LECT2 の構造情報を基にアンチセンスペプチドの設計を行ったが、結果として今回解析をしたペプチドの中にはヒト LECT2 と相互作用するものは確認されなかった。この理由として、①LECT2 の構造情報が十分ではなく、レセプターとの反応部位が他に存在する、②アンチセンスペプチドの相互作用には Cys 残基が重要である、③今回の実験条件 (バッファー組成等) ではペプチドが正しい立体構造をとることができなかったなどの可能性も考えられた。

E. 結論

- LECT2 ノックアウトマウスでは、肝臓 NKT 細胞の増加が観察され、肝臓の NKT 細胞障害性活性の増加も見られた。これまで得られている結果と合わせて考えると、肝臓 NKT 細胞の増加が Con A 誘導肝炎の重篤化の原因であることがわかった。また、LPS を使ったエンドトキシンショックの解析から、誘導される IL-12 による NK あるいは NKT 細胞からの IFN- γ の産生が LECT2 ノックアウトマウスでは抑制されており、*in vitro* で LECT2 が IL-12、IL-15 による IFN- γ の産生を増強した。これらのことは LECT2 が NK あるいは NKT 細胞に直接作用する可能性を示唆するものと考えられた。
- 関節炎における LECT2 の役割を抗 II 型コラーゲン抗体/LPS 関節炎マウスモデルを用い解析した。野生型マウスでは関節炎が発症すると血中および関節局所の LECT2 濃度が上昇すること、

LECT2-KO マウスでは関節炎が重篤になること、さらに LECT2 遺伝子をマウスに導入すると LECT2-KO マウスでの関節炎が軽減化することから LECT2 が関節炎では抑制的に働く可能性が示唆された。

- 3) LECT2 遺伝子欠損マウスを用いてマウス LECT2 抗体を作製し、22 種を単一クローン化した。作製したマウス LECT2 モノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 測定系を構築した。
- 4) 半導体ナノ粒子がタンパク質やその他の生体分子に標識しその生体内動態を観察するのに十分な特性を有する事が分かった。更に、細胞にも標識可能であり、その標識された細胞を EX-vivo および生体内動態について広範な動態解析する事も可能となるという極めて特徴的な性質を有するため、生物・医療において今後の展開に向けての素地が築かれたと言える。LECT2 に量子ドットを結合させその細胞内動態を見る事を今後計画している。
- 5) IL-1 が接触型過敏症、および気道過敏症に於いても重要な役割を果たしていることがわかった。これまで報告されてきたことを合わせると、IL-1 が広くアレルギー反応を仲介していることが考えられる。いずれの病態においても IL-1 が重要な働きをしておりアレルギーの治療薬のターゲットとして非常に重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 278, 16675-82 (2003).
- 2) Ohashi YY, Kameoka Y, Persad AS, Koi F, Yamagoe S, Hashimoto K, Suzuki K. Novel missense mutation found in a Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene.* 327, 195-200 (2004).
- 3) Ovejero C, Cavard C, Perianin A, Hakvoort T, Vermeulen J, Godard C, Fabre M, Chafey P, Suzuki K, Romagnolo B, Yamagoe S, Perret C. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of s-catenin in the liver. *Hepatology* in press.
- 4) Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. Tanokura, M. 1H, 13C, 15N resonance assignments of the cytokine LECT2. *Journal of Biomolecular NMR*, in press.
- 5) Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- γ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, 15, 251-260 (2003).
- 6) Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, 15, 483-490 (2003).
- 7) Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2645-2650 (2003).
- 8) Miyake-Nishijima, R., Iwata, S., Saijo, S., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Souta-Kuribara, A., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Ikeda, E., Okada, Y., Iwakura, Y., and Morimoto, C. Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of rheumatoid arthritis in *tax* transgenic mice and in humans. *Arthritis Rheum.*, 48, 1890-1900 (2003).
- 9) Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.*, 171, 6173-6177 (2003).
- 10) Miyakawa, R., Ichida, T., Yamagiwa, S., Miyaji, C., Watanabe, H., Sato, Y., Yokoyama, H., Tsukada, C., Ishimoto, Y., Sugahara, S., Yang, X-H., Abo, T. and Asakura, H. Hepatic NK and NKT cells markedly decreased in two cases of drug-induced fulminant hepatic

failure rescued by living donor liver transplantation. *J. Gastroent. Hepat.*, in press.

- 11) Sato, Y., Ichida, T., Watanabe, H., Yamamoto, S., Abo, T. and Hatakeyama, K. Macrochimerism of donor type CD56+ CD3+ T cells in donor specific transfusion via portal vein following living donor liver transplantation. *Hepatogastroenterol.* 50: 2161-2165, 2003
- 12) 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.
- 13) A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki and K. Yamamoto, Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, B.B.R.C. (in press).
- 14) K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Omoto,, Y. Yamaguchi and K. Yamamoto. Semiconductor quantum dot/albumin complex Is a long-life and highly photostable endosome marker, B.B.R.C. (In press).

2. 学会発表

- 1) 齊藤 武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、安保 徹、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 : Concanavalin A 肝障害モデルを用いたサイトカイン LECT2 の機能解析 第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月

- 2) 奥村彰規、齊藤武、大谷功、浅野雅秀、大川原明子、金山喜一、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 : 関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析 第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月
- 3) 山越 智、齊藤 武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、安保 徹、岩倉洋一郎、鈴木和男 : Concanavalin A 肝障害モデルを用いたサイトカイン LECT2 の機能解析 第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月
- 4) 奥村彰規、齊藤武、大谷功、大川原明子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 : 関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析 第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月
- 5) Dawson, W., Ito-Ishida, M., Kameoka, Y., Yamagoe, S., Fukamura, Y., Yamamoto, K., Tanokura, M., Suzuki, K. Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies : 第 26 回日本分子生物学会、2003 年 12 月

G. 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15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16年9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