

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590394
 研究課題名（和文） オステオポンチン蛋白多型部位を標的とする膠原病治療モデルの確立
 研究課題名（英文） Development of a therapeutic model for collagen diseases targeting amino acid polymorphism of osteopontin
 研究代表者
 宮崎 龍彦 (MIYAZAKI TATSUHIKO)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80239384

研究成果の概要：

膠原病疾患モデルマウスの疾患感受性を規定する候補遺伝子として同定され、その中で構造遺伝子多型に基づく蛋白多型を持つ因子、オステオポンチン(Opn)に関し、その多型に基づく膠原病治療モデルの確立を目的として研究を遂行した。まず、MRL型とC3H型のOpnの立体構造の差異をNMR、UV分光法にて解析し、蛋白多型によってインテグリン結合部位の立体構造に差異があることを明らかにした。この部位をブロックする機能阻害物質を検索したところ、ある糖脂質がOpnによる免疫誘導を阻害することが明らかとなった。そこで、この糖脂質をSpan80リポソームに結合させてMRLマウスに投与し、少なくとも予防的投与により糸球体腎炎が抑制されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

従来、申請者らは自己免疫病モデルマウスであるMRL/lpr系を用いた自己免疫疾患発症感受性因子の研究を継続的に進めており、そのなかで、疾患好発系MLR/lprと嫌発系C3H/lpr

を用いたゲノムワイドスクリーニングの結果、自己免疫性臓器血管炎、大動脈炎の感受性遺伝子座、関節炎の感受性遺伝子座を同定するとともに、自己免疫性糸球体腎炎の感受性遺伝子座も同定し、そのひとつ第5番染色

体上の *Agnm3* に疾患感受性候補遺伝子としてオステオポンチン (Opn) を見出した。

Opn には、疾患好発系である MRL/lpr と嫌発系である C3H/lpr のアレル間に構造遺伝子多型を有し、その多型により立体構造が修飾されて機能的差異を誘導する可能性がある。コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白合成系による合成多型 Opn を用いたバイオアッセイの結果、MRL 型合成 OPN は、マクロファージに対しても TNF α 、IL-1 β をはじめとするサイトカインの発現亢進を誘導し、その効果は C3H 型を加えた場合に比べ有意に高かった。さらに同様の系において、MRL 型 OPN の添加は脾細胞においてもポリクローナルなイムノグロブリンの産生を誘導し、その効果も C3H 型を加えた場合に比べて有意に高かった。これらの結果は、少なくとも *in vitro* において合成 OPN はマクロファージの活性化能とマクロファージ存在下でのイムノグロブリン産生誘導能を有し、その効果は MRL 型のほうが C3H 型よりも強いことをあらわし、オステオポンチンの遺伝子多型による構造の差異がマクロファージ活性化能、抗体産生誘導能における機能的差異を通して、糸球体腎炎発症・進展に関与している可能性が示唆された。

続いて、無細胞合成系による蛋白合成の利点を用いて、C3H 型 cDNA を操作してアミノ酸置換部位を一個ずつ MRL 型 OPN と同じにした合成 OPN を作成して機能的差異を誘導しているドメインを明らかにする解析を行ったところ、RGDS モチーフ近傍にある Asn126/Asp を互いに置換した一塩基置換による MRL 型および C3H 型 OPN ではマクロファージ活性化能、サイトカイン産生誘導能に関して蛋白機能が逆転することを見出した。Opn 遺伝子座を含む、糸球体腎炎感受性遺伝子座である *Agnm3* 領域を MRL 系、C3H 系で特異的に入れ替えたコンジェニックマウス系 MRL/lpr-Agnm3C3H/C3H を確立し、この遺伝子座のアレルが MRL 型ホモであるもの、MRL/C3H ヘテロであるもの、C3H 型ホモであるものを比較したところ、C3H ホモとヘテロの群では、MRL ホモの群に比べて有意に生存期間が延長し、また糸球体腎炎の発症率、重症度も有意に下がることをあきらかにし、これらのことから、Opn 遺伝子座の遺伝子型が MRL/lpr における糸球体腎炎の発症を規定していることを明らかにした。

これらの研究背景より、今回 Opn をブロックする蛋白を投与する、もしくはその発現バクターをトランスフェクトすることにより新たな膠原病の治療モデルを確立することを想起した。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、膠原病疾患モデルマウスの疾患感受性を規定する候補遺伝子として同定され、その中で構造遺伝子多型に基づく蛋白多型を持つ因子、オステオポンチン (Opn) に関し、コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白合成システムにより多型蛋白を合成し、それぞれの蛋白の構造・機能に差異があること、生体においては、Opn の発現量に疾患好発系と嫌発系のマウス間で差異があることを明らかにしてきた。最近、我々は Opn 遺伝子座特異的コンジェニックマウスを用いた病態解析により、この遺伝子座の遺伝子型がコンジェニックマウス群の生命予後と糸球体腎炎発症率を規定していることをあきらかにし、さらに疾患好発系と嫌発系のアレル間にみられる 10 カ所のアミノ酸多型のうち特定の一カ所が、少なくとも炎症誘導能に関する機能的差異を規定していることを突き止めた。そこで、本研究では、Opn の蛋白多型に基づく機能部位を特異的に阻害する蛋白または合成物による膠原病治療モデルの確立を目的とし、1) Opn 蛋白多型による立体構造差異の解析、2) Opn 蛋白機能的結合部位阻害蛋白の設計、3) Opn による免疫担当細胞活性化能を阻害する蛋白のスクリーニング、4) 上記で有効性が確認された Opn 阻害蛋白アナログの膠原病モデルマウスへの投与実験の 4 項目の研究を行った。

3. 研究の方法

1) Opn 蛋白多型による立体構造差異の解析

1)-1 紫外線近赤外線分光光度計をもちいた結晶解析による立体構造差異の検索

コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白合成システムをつかって Opn 多型蛋白を作製し、精製のうえ日本分光製 J-820 型円二色分散計を用いて結晶解析を行い、MRL 型、C3H 型の全長蛋白、多型により立体構造変異があると目されるインテグリン結合サイトを含む N 末側の蛋白に関して結晶による吸光スペクトルに差異がないか解析した。

1)-2 NMR による立体構造差異の検索

Se-Met でラベルした Opn を合成し、フーリエ変換核磁気共鳴装置 (日本電子製 JNM-EX400) NMR による立体構造解析を行った。

2) Opn 蛋白機能的結合部位阻害蛋白の設計

上記で導き出した立体構造情報をもとに、阻害蛋白として機能すると目される配列を数個程度候補として抽出した。

3) Opn による免疫担当細胞活性化能を阻害する蛋白のスクリーニング

上記で結合アフィニティーを持つと目された候補蛋白を PCR base のテンプレート cDNA を用いて、コムギ胚芽による無細胞系で合成し、in vitro における Opn 機能阻害が行われるか、樹状細胞の T 細胞クローンに対する抗原提示を指標とした bioassay を用いて解析した。

MRL/lpr マウスの骨髄細胞を採取し、GM-CSF 存在下に 6 日間培養し、immature dendritic cell を誘導した。ここに、合成多型 Opn を加えるとともに、Opn 機能阻害候補蛋白を添加した。また、樹状細胞機能を修飾すると目される新規糖脂質 (Glycolipid A; 以下 GLa) を加える群も設けた。陽性コントロールとしては LPS を加え、さらに、なにも加えない陰性コントロールも設定した。

これらの因子を加えて後、卵白アルブミンを加え、ついで卵白アルブミン反応性 T 細胞ハイブリドーマ細胞株 (OT1) を共培養した。1 overnight 経過後、抗原提示により活性化された T 細胞ハイブリドーマから分泌された培養上清中の IL-2 を beads array assay で測定した。

4) 膠原病モデルマウスへの Opn 阻害アナログ投与による治療実験

前項 III. の in vitro 解析において、結合阻害コントロールとして用いた RGDS アナログに類する有意な阻害作用を示す蛋白を見出すに至らなかったが、糖脂質 (GLa) が Opn による樹状細胞に対する T 細胞への抗原提示能増強を抑制することが明らかとなったため、GLa の in vivo における膠原病治療効果を解析する投与実験を行った。

GLa を界面活性剤である Span80 リポソームベシクルの膜構造に定量的に植え込み、(研究協力者 加藤敬一により供与) 投与実験に用いた。

2 ヶ月例の MRL/lpr マウスに 0.5 mg/kgBW となるように上記の GLa 含有 Span80 ベシクルを腹腔内投与した。陰性コントロール群には GLa を含有しない Span80 ベシクルを同様に投与した。3 日おきに腹腔内投与を行い、4.5 ヶ月齢で屠殺して、糸球体腎炎、腎血管炎の組織学的スコアリングを行い、実際の膠原病抑制が得られるか解析した。また、同時に副作用による病理学的変化がないか全臓器を詳細に検索した。

4. 研究成果

1) Opn 蛋白多型による立体構造差異の解析

紫外線近赤外線分光光度計をもちいた結晶解析による立体構造差異の検索では、MRL 型、C3H 型の全長蛋白、N 末側蛋白ともに allele による吸光スペクトルに差が見られ、立体構造変異があると考えられた。

NMR による解析を、N 末側蛋白に行ったところ、インテグリン結合サイトの立体構造の中に、MRL 型と C3H 型の間で、約 20% の差異があることが明らかとなった (図 1)

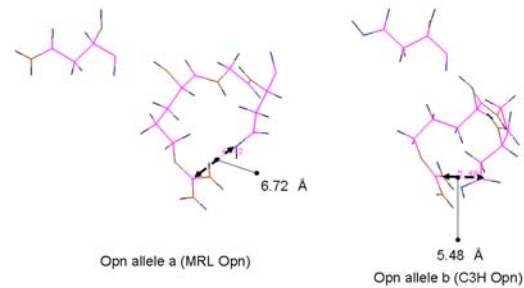


図 1. polymorphism in alignment of integrin binding site of Opn protein

2) Opn 蛋白機能的結合部位阻害蛋白の作成と、in vitro における bioassay を用いた機能解析

Opn のインテグリンとの結合を競合的に阻害する可能性があると考えられたアミノ酸配列を 3 種類無細胞系で作成し、in vitro の解析に供したが、結合阻害コントロールとして用いた RGDS アナログに類する有意な阻害作用を示す蛋白を見出すに至らなかった。一方で、糖脂質 (GLa) が Opn による樹状細胞に対する T 細胞への抗原提示能増強を抑制することが明らかとなった (図 2)。

Antigen presentation assay by OT1 cells

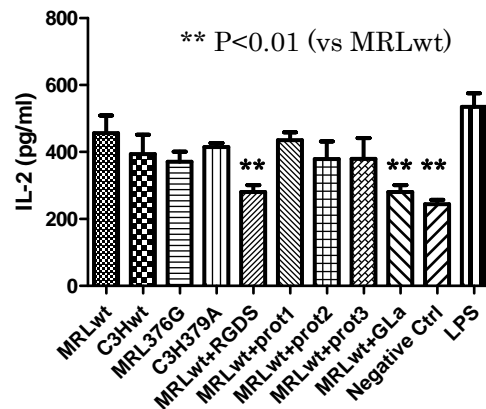


図 2. Opn による樹状細胞機能修飾の阻害

3) 膠原病モデルマウスへの Opn 阻害アナログ投与による治療実験

GLa 含有 Span80 ベシクルを腹腔内投与した群では、陰性コントロール群に比較して、有意に糸球体腎炎 index が低値を示し、少なくとも GLa の予防的投与により糸球体腎炎が抑制されることが明らかになった(図4-6)。同様に、GLa 投与群では、間質、血管周囲のリンパ球集簇も抑制されていた。一方、腎血管炎に関しては、投与群で発症率が下がる傾向が見られたが、有意差は認めなかった。

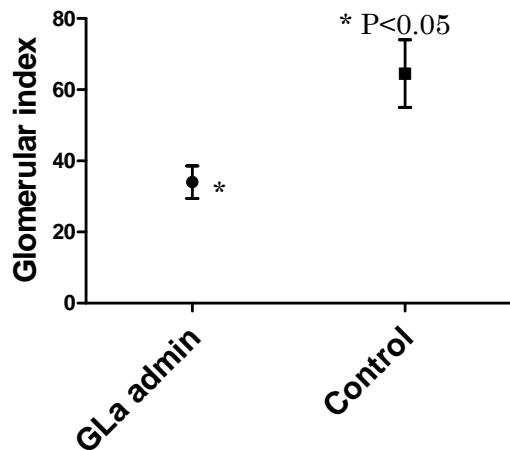


図4. GLa 投与による糸球体腎炎抑制

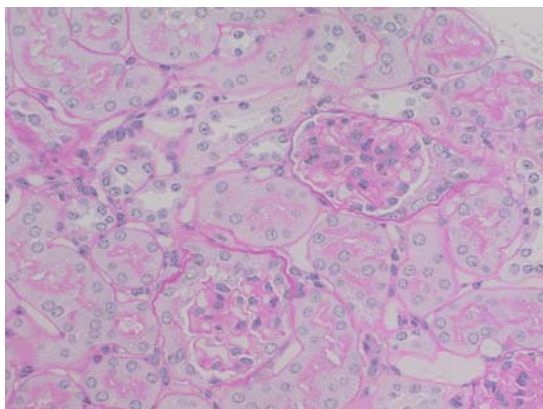


図5. GLa 投与群の代表的糸球体組織像

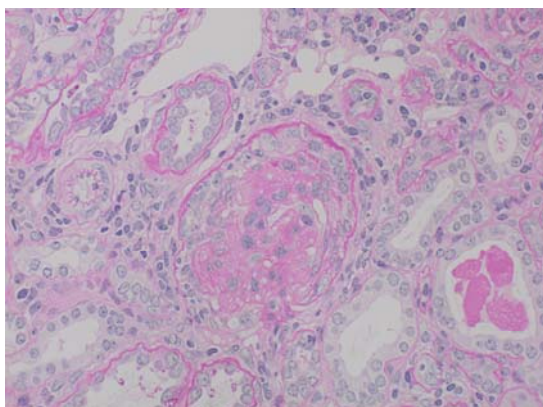


図6. コントロールの代表的糸球体組織像

今回の研究結果において、Opn のインテグリン結合サイトには、蛋白多型に基づく立体構造の変化が誘導されることを明らかにした。このサイトのインテグリンとの結合を競合的に阻害する蛋白アナログを同定するには至らなかったが、新規糖脂質が少なくとも、Opn の樹状細胞活性化機能を抑制し、また、予防的投与により糸球体腎炎の発症を予防することが明らかになった。今後さらに、Opn とインテグリンの結合を競合的に阻害する蛋白アナログのスクリーニングを続けるとともに、今回の研究で明らかになった糖脂質に関し、発症後の治療効果が見られるか否か、また、他の膠原病疾患の予防・治療効果が見られるか否かの検索を進めていくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Kamada K, Arita N, Tsubaki T, Miyazaki T, Nose M, et al. Expression of sphingosine kinase 2 (SPHK2) in synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis and its possible role in the regulatory mechanism. *Pathol. Int.* 2009, in press (査読あり)
2. Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Nose M, et al. Genetic dissociation of dacryoadenitis and sialadenitis in a Sjogren's syndrome mouse model with common and different susceptibility gene loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 in press (査読あり)
3. Soga Y, Komori H, Miyazaki T, Arita N, Kamada K, Nose M, et al. Toll-like receptor 3 signaling induces chronic pancreatitis through the Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Tohoku J Exp Med.* 2009, 217(3):175-84. (査読あり)
4. Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Lei J, Miyazaki T, Yoshie O, et al. Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. *Gene Ther.* 2008, 15(3):171-82. (査読あり)
5. Hasegawa H. Chemokine blockade for lupus model mice. *Front Biosci.* 2008, 99: 2900-2908. (査読あり)
6. Misu N, Zhang M, Mori S, Miyazaki T, Nose M, Ono M, et al. Autosomal loci associated with a sex-related

difference in the development of autoimmune phenotypes in a lupus model. Eur J Immunol. 2007, 37(10):2787-2796. (査読あり)

7. Nose M. A proposal concept of a polygene network in systemic vasculitis: lessons from MRL mouse models. Allergol Int. 2007, 56(2):79-86. (査読あり)
8. Nakatani K, Qu WM, Zhang MC, Fujii H., Furukawa H., Miyazaki T., Iwano M., Saito Y., Nose M., Ono M. Scand. J. Immunol. 2007, 66(6):654-661. (査読あり)

[学会発表] (計 2件)

1. Kamao T, Miyazaki T., Nose M., et al. Common and different gene loci susceptible to sialoadenitis and dacryoadenitis in a sjögren's syndrome mouse model. 6th International Congress on Autoimmunity. 2008.9.10-14, Porto, Portugal.
2. Miyazaki T., Kato K, Sakayama K, Moriki F, Nose M et al. Span80 vesicle with lectin ESA induces specific apoptosis in Colon26 tumor cell line in vivo. 92nd annual meeting of German Society of Pathology. 2008.5.1-18, Berlin, Germany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 龍彦 (MIYAZAKI TATSUHIKO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80239384

(2) 研究分担者

能勢 真人 (NOSE MASATO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70030913

長谷川 均 (HASEGAWA HITOSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40164826

(3) 連携研究者