

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591180

研究課題名（和文） サイトカインLECT2による関節リウマチ抑制メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of repression mechanism by LECT2 in rheumatoid arthritis

研究代表者

山越 智 (YAMAGOE SATOSHI)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任研究官

研究者番号：00212283

研究成果の概要（和文）：サイトカイン LECT2 の関節リウマチにおける抑制作用を解析した。関節炎に関与し LECT2 受容体を発現する細胞を同定した。滑膜細胞は LECT2 受容体を発現していた。そこで、滑膜細胞の増殖、関節炎に関与する炎症性サイトカイン等各種遺伝子発現について LECT2 添加による影響を調べた。LECT2 遺伝子欠損マウスを用いたマウス関節炎モデルにおいて、主に働く炎症性サイトカインに支配される遺伝子を見出した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the repressive mechanism by LECT2 in rheumatoid arthritis. First, we have identified a LECT2 receptor-expressing cell type related in rheumatoid arthritis, and showed the possibility that human synoviocytes expressed the receptor of LECT2. Using those cells, we studied LECT2 effect on the proliferation of the cells, and expression of proinflammatory cytokines and several genes related to rheumatoid arthritis. We identified many genes controlled by main proinflammatory cytokines in a mouse model of rheumatoid arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	0	1,500,000
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：生理活性、免疫学、サイトカイン、自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

(1) LECT2 は好中球走化性活性を持つ蛋白質として、ヒト T 細胞系白血由来培養細胞の培養上清から精製・同定された。研究代表者はアミノ酸配列を決定し、それに基づき cDNA と遺伝子クローニングを行った。LECT2 は肝臓で特異的に発現され、血中に分泌される蛋白質である。様々な生物のゲノムの解析により、この蛋白質は脊椎動物において高度に保存されており、しかもファミリー等も見出さ

れていないことから重要な働きをしていると考えられている。さらに、これまでの国内外の研究者により、この蛋白質は多機能蛋白質であることが示唆されている。

研究代表者らは、LECT2 の機能解析するために遺伝子欠損マウスを作製した。さらに、マウス LECT2 遺伝子を強制的に発現するトランスジェニックマウスも作製して解析を行っている。

(2) ヒト LECT2 には、58 番目のアミノ酸にバリン (Val) またはイソロイシン (Ile) となる遺伝子多型が存在する。日本人の健常人では、Val/Val が 47% を占め、Ile/Ile が 16% で残りはヘテロ Val/Ile であった。一方、関節リウマチ患者を解析したところ、Ile 型の LECT2 を持つ患者では、関節リウマチの増悪度が高いことが明らかとなった。また、発症の頻度も、Ile 型を持つ患者で高い傾向が見られた。このように、LECT2 が関節リウマチに関与することが明らかとなったことから、LECT2 遺伝子欠損マウスを用いて関節炎モデルにおける LECT2 の役割について調べた。

(3) 抗コラーゲン抗体誘導関節炎は、ヒトのリウマチ性関節炎のモデルとして知られている。このモデルにおいて、LECT2 遺伝子欠損マウスは関節炎が増悪することが判明した。その病理像から、関節炎全体の炎症反応が亢進していることが明らかとなった。関節炎に関与する炎症性サイトカインを調べた結果、IL-1 $\beta$ 、IL-6 およびケモカイン MCP-1、MIP-1、MIP-2 の発現の上昇が観察された。LECT2 が関節炎を抑制することを強く示唆したため、LECT2 遺伝子を LECT2 遺伝子欠損マウスの肝臓に導入し発現させたところ、関節炎の症状が改善することが明らかとなった。サイトカインの動態を調べたところ、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、MIP-1、MIP-2 の発現量が低下していた。以上のことから LECT2 は関節リウマチモデルにおいて抑制的に作用することが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

マウス関節炎モデルでの LECT2 の抑制メカニズムを調べる。

(1) 抑制メカニズムを解析するために、関節炎に関与する細胞のなかで LECT2 の標的細胞を同定する。

(2) 同定した候補細胞を使い *in vitro* で LECT2 を作用させ、増殖、サイトカインをはじめとした各種遺伝子発現について調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) LECT2-Fc 融合蛋白質の作製

マウス LECT2 の下流にヒト IgG1 の Fc 領域を連結し、発現プラスミド pCXN2 を用いてマウス LECT2-Fc 発現プラスミドを構築した。それを CHO 細胞に導入し、いくつかの G418 耐性の細胞クローンを得、その中から LECT2-Fc 蛋白質高発現細胞クローンを得た。

(2) その細胞を用い数リッターの大量培養を行い、細胞上清から、protein A セファロースを用いたアフィニティクロマトグラム

による精製を行い、90%以上の標品を得た。

(3) LECT2-Fc を関節炎に関与すると考えられる各種細胞に作用させ、PBS で洗浄した後、PE 標識抗マウス IgG 抗体を加え洗浄の後、フローサイトメトリーにて、LECT2-Fc を結合する細胞を同定した。

(4) 東洋紡社ヒト滑膜細胞を培養し、それに対してヒト LECT2 を *in vitro* で作用させた。

(5) ヒト LECT2 は、すでに樹立しているヒト LECT2 産生 CHO 細胞を数リッター培養し、その細胞上清を CM-セファロースによるバッチ法で濃縮し、その後 CM-セファロース、DEAE-セファロース、MonoQ カラムにより 95%以上の精製品を得て、実験に供した。

(6) LECT2 の滑膜細胞の増殖に対する作用を調べた。96 穴プレートで培養した滑膜細胞を各濃度の LECT2 で処理し、1 日後、2 日後 MTT アッセイした。

(7) LECT2 の滑膜細胞の遺伝子発現に対する作用を調べた。6 穴で培養した滑膜細胞に TNF- $\alpha$  あるいは IL-1 $\beta$  を加え、各濃度の LECT2 で処理し、数時間後に mRNA を調整した。RT-PCR で IL-1 $\beta$ 、IL-6、MMP-1、MMP-3、MMP-9、TGF- $\beta$ 、GAPDH の各種遺伝子発現を調べた。

(8) 滑膜細胞と血液から精製したヒトモノサイトを共培養した後、IL-1 $\beta$  処理をした実験区、しない実験区、それぞれに対して各濃度の LECT2 を加え、12 時間後に培地を回収し IL-6 の濃度を ELISA 法にて測定した。

(9) 滑膜細胞を 100 mm ディッシュで培養し、LECT2 を 100 ng/ml の濃度で処理した。6 時間後に mRNA を回収し Agilent Technologies 社マイクロアレイ 4 $\times$ 44K フォーマットを用い 2 色法にて網羅的に遺伝子の発現を調べた。コントロールとして無処理の滑膜細胞の mRNA を用いた。遺伝子発現のデータ解析は GeneSpring 9 で行い、変動した遺伝子の生理機能解析およびネットワーク解析は Ingenuity Pathway Analysis Software で行った。

(10) 抗コラーゲン抗体導入後 5 日目の関節炎を発症した BALB/cAJJc1 および LECT2 遺伝子欠損マウスの関節部分から mRNA を調整し、滑膜細胞と同様にマイクロアレイによる網羅的に遺伝子発現を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LECT2 受容体の滑膜細胞における発現

関節炎に関与すると考えられる滑膜細胞、血球細胞に LECT2 受容体が発現するかどうか調べた。その結果、図 1 のように滑膜細胞に LECT2 受容体が存在することが分かった。正常な細胞でも、リウマチ患者由来でも同様に検出された。

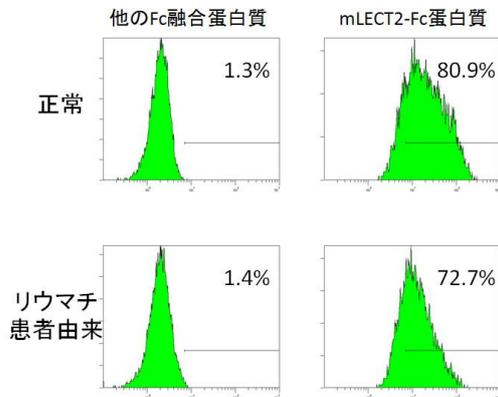


図 1. フローサイトメトリーによる滑膜細胞に対する mLECT2-Fc の特異的結合

##### (2) LECT2 の滑膜細胞の増殖に対する作用

96 穴プレートで培養した滑膜細胞を各濃度の LECT2 で処理し、1 日後、2 日後 MTT アッセイしたが、LECT2 の濃度に依存した作用は観察されなかった。また、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の処理を併用しても細胞増殖に対する LECT2 の影響は観察されなかった。

##### (3) LECT2 の滑膜細胞遺伝子発現に対する作用

6 穴で培養した滑膜細胞を TNF- $\alpha$  あるいは IL-1 $\beta$  処理し、それぞれの実験区に対して各濃度の LECT2 を加え、様々な時間で mRNA を調整し、RT-PCR で IL-1 $\beta$ 、IL-6、MMP-1、MMP-3、MMP-9、TGF- $\beta$ 、GAPDH の各種遺伝子発現を調べた。GAPDH をコントロールに用い、各遺伝子の発現を検討したが、いずれも LECT2 の発現への影響は観察されなかった。

##### (4) 滑膜細胞とモノサイトの共培養における LECT2 の作用

滑膜細胞と血液から調整したヒトモノサイトを混ぜたのち、IL-1 $\beta$  処理をした実験区、しない実験区のそれぞれに対して、各濃度の LECT2 を加え、12 時間後に培地を回収し IL-6 濃度を ELISA 法にて測定した。いずれの実験区でも LECT2 の作用が観察されなかった。

##### (5) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現による解析

抗コラーゲン抗体導入後 5 日目の関節炎を

発症した BALB/cAJJc1 および LECT2 遺伝子欠損マウスの関節部分から mRNA を調整し、Agilent Technologies 社マイクロアレイ 4  $\times$  44K フォーマットを用いて 2 色法にて網羅的に遺伝子の発現を調べた。コントロールとして野生型 BALB/cAJJc1 の mRNA を用いた。ネットワーク解析により IL- $\beta$  と IL-6 の上昇に伴う一連の遺伝子の発現上昇が明らかとなった (図 2)。LECT2 遺伝子欠損マウスの関節炎の増悪において、2 つの主要なサイトカインにより発現上昇すると推定される遺伝子が同定された。これまでわかっていたケモカインの遺伝子以外に、多数の遺伝子の変化が明らかとなった。さらに、滑膜細胞に対して、LECT2 を 100 ng/ml の濃度で処理し、6 時間後に mRNA を回収し同様のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。その結果、新たにいくつかの炎症性サイトカインの抑制が観察された。また、細胞運動機能に係るいくつかの遺伝子が上昇することも明らかとなった。

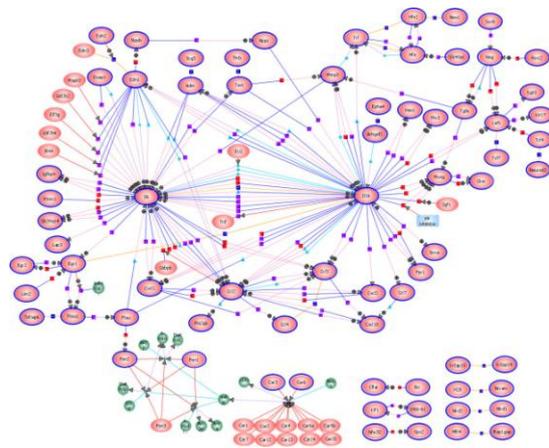


図 2. 抗コラーゲン抗体誘導関節炎の関節局所におけるマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

#### 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 4 件)

- ① Dang MH., Kato H., Ueshiba H., Omori-Miyake M, Yamagoe S., Ando K, Imanishi K., Arimura Y., Haruta I., Kotani T., Ozaki M., Suzuki K., Uchiyama T., Yagi J. Possible role of LECT2 as an intrinsic regulatory factor in SEA-induced toxicity in D-galactosamine-sensitized mice. *Clin Immunol.* **137**, 311-321 (2010) 査読有

② Okumura A., Suzuki T., Dohmae N., Okabe T., Hashimoto Y., Nakazato K., Ohno H., Miyazaki Y., Yamagoe S. Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *BioScience Trends*. **3**, 139-43 (2009) 査読有

③ 奥村彰規、山越 智、マウスコラーゲン関節炎における LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) の役割の解析, *リウマチ科*, **41**, 71-79 (2009) 査読無

④ Okumura A., Saito T., Otani I., Kojima K., Yamada Y., Ishida-Okawara A., Nakazato K., Asano M., Kanayama K., Iwakura Y., Suzuki K., Yamagoe S. Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. **58**, 413-421 (2008) 査読有

[学会発表] (計3件)

① 奥村彰規、大川原明子、山越 智、ガラクトサミン/LPS 肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析、第39回日本免疫学会総会・学術集会、平成21年12月2-4日、大阪

② 大森深雪、安藤一義、上芝秀博、有村 祐、山越 智、鈴木和男、八木淳二：敗血症における LECT2 の役割、第39回日本免疫学会総会・学術集会、平成21年12月2-4日、大阪

③ 奥村彰規、大谷 功、大川原明子、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智、Suppressive Role of LECT2 in Mouse Anti-Type-II Collagen Antibody-Induced Arthritis、第38回日本免疫学会総会学術集会、平成20年12月1-3日、京都

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称：骨吸収抑制剤

発明者：国立感染症研究所長、鈴木和男

権利者：鈴木和男、山越 智、山川 徹

番号：特許第4378439号

取得年月日：2009年10月2日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 智 (Yamagoe Satoshi)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任研究官

研究者番号：00212283