

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591185

研究課題名(和文)

強力なリガンド抑制作用を有する受容体-Ig 蛋白ヘテロダイマーの作成法と効果の検証

研究課題名(英文)

Inspection of receptor-Ig protein heterodimer for inhibition of its ligand

研究代表者

埴 晴雄 (HANAWA HARUO)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：40282983

研究成果の概要(和文)：

IL-1 阻害薬は炎症が関わる疾患の治療薬として期待される。我々は、IL-1 受容体アクセサリ蛋白 (Acp)-免疫グロブリン (Ig) と IL-1R タイプ II (IL-1R2)-Ig のヘテロダイマー (Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマーと呼ぶ) を作成し、その IL-1 阻害作用を既存の IL-1 阻害薬と比較検討した。Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマー (ラット, IC₅₀=1.95 pM; ヒト, IC₅₀=0.14 pM) は IL1RA (ラット, IC₅₀=1,935 pM) や Acp-IL1R type I (IL1R1)-Ig ホモダイマー (ラット, IC₅₀=73.7 pM; ヒト, IC₅₀=4.48 pM)、Acp-IL1R2-Ig ホモダイマー (ラット, IC₅₀=72.8 pM) よりも強力に IL-1 を阻害し、それは IL-1 α および IL-1 β 共に強く阻害した。

研究成果の概要(英文)：

Interleukin (IL)-1 inhibitor may be a candidate anti-inflammatory drug. We examined the effect of a heterodimer of IL-1 receptor accessory protein (Acp)-immunoglobulin (Ig) and IL-1R type II (IL1R2)-Ig named AcP-Ig/IL1R2-Ig heterodimer, and compared its effects with other IL-1 inhibitors reported previously. Our results demonstrated that the AcP-Ig/IL1R2-Ig heterodimer (rat, IC₅₀=1.95 pM; human, IC₅₀=0.14 pM) inhibited IL-1 response to a greater extent than IL1RA (rat, IC₅₀=1,935 pM), Acp-IL1R type I (IL1R1)-Ig homodimer (rat, IC₅₀=73.7 pM; human, IC₅₀=4.48 pM) and Acp-IL1R2-Ig homodimer (rat IC₅₀=72.8 pM) and strongly inhibited responses of both IL-1 α and IL-1 β .

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

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：臨床免疫学、生物学的製剤、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

炎症薬ではサイトカインが重要な役割を

担うため、それを調節する薬剤は多くの炎症性疾患に対して有効であると考えられる。こ

のとき、より低濃度でもそのサイトカインを抑制する強力な薬剤の開発が望まれる。一方、IL-1 は炎症を引き起こすサイトカインの中でも中心的役割を演じるサイトカインである。

2. 研究の目的

IL-1 を強力に抑制する薬剤として、IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーの作製法とその効力を検討するとともに、IL-1 が関わってくる様々な反応について検討した。

3. 研究の方法

a) IL-1 阻害薬の作成および IL-1 抑制評価

IL-1 は IL-1 α と IL-1 β があり、それが、細胞表面に存在する IL-1 受容体 type I (IL1R1) に結合し、さらに IL-1 受容体アクセサリー蛋白 (Acp) とより強固に 3 分子構造をとることによって細胞内にシグナルを伝達する。また IL-1 受容体 type II (IL1R2) は同様に IL-1 と Acp と 3 分子構造をとって強固に結合するが、シグナルを伝達しないためデコイ受容体とも言われる。IL-1 の阻害薬として、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL1RA)、アナキンラがあるが、その阻害作用には IL-1 の約 100 倍高濃度が必要である。最近、Acp-IL1R1-Ig のホモダイマー (リロナセプト) が強力に IL-1 を阻害する治療薬として開発された。これは、Acp と IL1R1 が IL-1 とより強固に結合することによって、強い阻害作用を有すると推測されることから開発された薬剤である。しかし、IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマー (Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマー) はリロナセプトよりも自然な形で IL-1 と結合すると推測されることから、Acp-IL1R1-Ig のホモダイマーよりも強力な IL-1 阻害薬になりうるのではないかと我々は考えた。

以上のことから、ラットおよびヒトの pCAGGS-Acp-Ig、pCAGGS-IL1R2-Ig、pCAGGS-Acp、pCAGGS-IL1R2、pCAGGS-IL1RA、pCAGGS-Acp-IL1R1-Ig、pCAGGS-Acp-IL1R2-Ig を作成し、Cos7 細胞に遺伝子導入し、Acp-Ig ホモダイマー、IL1R2-Ig ホモダイマー、Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマー、Acp、IL-1R2、IL1RA、Acp-IL1R1 ホモダイマー、Acp-IL1R2 ホモダイマーを作成した。

また、それらの IL-1 の抑制作用については、ラットでは NRK-49F、ヒトでは MRC-5 の培養系に、IL-1 α あるいは IL-1 β と共にそれぞれの IL-1 阻害薬を添加し、MCP-1 あるいは IL-8 の遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR にて測定し評価した。

b) IL-1 の関わる様々な反応

IL-1 は様々な炎症誘導蛋白の発現に関わっていることが知られているが、鉄の運搬や

代謝に関わる蛋白の発現にも影響を及ぼすことが最近明らかになってきた。鉄は、体の必須元素であるが、過剰になると活性酸素種 (ROS) の産生にも関わり、その動態は炎症に密接に関わってくるものと考えられる。また最近、炎症は病原体などの外因性のリガンドだけでなく、組織傷害によって放出される内因性のリガンドによっても Toll-like 受容体などを介して誘導されることが明らかになってきている。

以上のことから、我々は心筋炎や心筋梗塞などの心臓傷害における鉄関連蛋白であるヘプシジン、リポカリン 2/NGAL (Lcn2/NGAL) などの動態を検討し、鉄原子とポルフィリンから成るフリーのヘムによって、心臓の在住細胞はどのように変化するかを検討した。

4. 研究成果

a) IL-1 阻害薬の効果

IL-1 阻害作用は、Acp-Ig ホモダイマー、IL1R2-Ig ホモダイマー、Acp、IL-1R2 ではほとんど見られず、Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマーでのみ強い IL-1 阻害作用が見られた。また Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマーの阻害作用は、IL-1RA の約 1000 倍強力であり、Acp-IL1R1 ホモダイマー、Acp-IL1R2 ホモダイマーの約 37 倍強力であった。これは、ラットおよびヒトでも同様にみられ、また IL-1 α 、IL-1 β 両方にも強い阻害作用を認めた。さらに His-tag、Myc-tag を用いて Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマーは精製可能であったが、それでも同様な強い阻害効果が見られた。

b) IL-1 の関与する反応

心筋炎、心筋梗塞の心臓局所では、ヘプシジン、Lcn2/NGAL、ヘムオキシゲナーゼ-1 の遺伝子発現が急激に増加していた。これらの増加の多くは、IL-1 および IL-1 β によって誘導される IL-6 とその発現が相関しており、炎症性サイトカインと密接に関連していると考えられた。一方、心臓では心筋傷害時に、心筋細胞に多量に存在するミオグロビンが細胞外に放出され、フリーのヘムが局所に多量に飛散すると考えられる。今回の研究結果から、フリーのヘムは強力に ROS を産生し、主に心臓在住マクロファージを介して IL-1 をはじめとする炎症誘導蛋白の発現を強力に誘導することが明らかになった。

総括

Acp-Ig/IL1R2-Ig ヘテロダイマーは IL-1 を阻害する新しい生物学的製剤として期待できるのではないかと考えられた。また、IL-1 は、組織傷害で流出すると考えられるフリーのヘムなどの内因性リガンドによって強く誘導され、組織傷害をさらに進展させる可能性が考えられた。よって、Acp-Ig/IL1R2-Ig

ヘテロダイマーは、感染や自己免疫疾患以外の様々な臓器傷害にも有効な薬剤になりうる可能性が示唆された。

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) Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K, Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura Y, Kodama M, Ota Y, Hayashi J and Aizawa Y: Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. J Nutr Biochem 21: 749-756, 2010. 査読有り

2) Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M and Aizawa Y: Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. Circ J 74: 523-530, 2010. 査読有り

3) Hanawa H, Ota Y, Ding L, Chang H, Yoshida K, Otaki K, Hao K, Kasahara S, Kodama M, Nakazawa M and Aizawa Y: IL-1 Receptor Accessory Protein-Ig/IL-1 Receptor Type II-Ig Heterodimer Inhibits IL-1 Response More Strongly than Other IL-1 Blocking Biopharmaceutical Agents. J Clin Immunol in press 査読有り

4) Hao K, Hanawa H, Ding L, Ota Y, Yoshida K, Toba K, Ogura M, Ito H, Kodama M and Aizawa Y: Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. Mol Immunol 48: 1191-1202, 2011. 査読有り

[学会発表] (計4件)

1) Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Otaki K, Hao K, Ding L, Kodama M, Aizawa Y, Crosstalk between component cells in rat autoimmune myocarditis (EAM) with cytokine/chemokine
The 25th annual meeting of ISHR
2008年12月6日 横浜

2) Kazuhisa Hao, Haruo Hanawa, Limin Ding, ken Toba, Rituo Watanabe, Tsuyoshi Yoshida, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa

Free heme strongly induces expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts
第74回 日本循環器学会総会学術集会
2010年3月7日 京都

3) Haruo Hanawa, Tsuyoshi Yoshida, Rituo Watanabe, Kazuhisa Hao, Limin Ding, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa
Autoimmune myocarditis and its mechanism
XXth World Congress of ISHR
2010年3月30日 京都

4) Haruo Hanawa, Kazuhisa Hao, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa
Cytokine induced gene expression in cardiomyocytes can be identified by quantitative RT-PCR analysis in multiple samples from myocarditis hearts
第14回日本心不全学会学術集会
2010年10月8日 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 生物学的製剤
発明者: 埜 晴雄
権利者: 国立大学法人 新潟大学
種類: 特許
番号: 特許 PCT/JP2008/051457
出願年月日: 平成20年1月30日
国内外の別: 外国

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

埜 晴雄

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号: 40282983

(2)研究分担者

小玉 誠

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10242447