

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04215

研究課題名(和文)新規炎症分子LRGによるTGFシグナル調整機構の解明とリウマチ疾患の治療法開発

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of LRG, a novel inflammatory molecule, in modulating TGF-beta signaling for the development of therapy in rheumatic diseases

研究代表者

仲 哲治 (Naka, Tetsuji)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：30303936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：LRGは申請者らが関節リウマチ患者血清のプロテオミクス解析から同定した独自シークスであり、検査マーカーとして実用化され、疾患関連分子としても注目されつつある。本研究では、LRG欠損マウスを使って関節リウマチおよび肺線維症のモデルマウスを作製し、TGFシグナルとの関係性に注目しながらLRGの機能解析を行った。両病態モデルではLRG欠損によりTGFシグナルが減弱し、関節炎および肺線維化の病態が軽減することが明らかになった。つまり、LRGはTGFシグナルの増強によりリウマチ疾患の病態促進に関与する分子であり、治療標的として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多彩な病態生理学的活性をもつTGF-は、難治性疾患の治療標的として以前から注目されている。しかしTGF-欠損マウスは致死であり、TGF-自身を強力に阻害する治療薬には副作用の懸念が大きい。今回の研究によってLRGがリウマチ疾患の病態形成に関わる分子であること、さらにLRG阻害によってTGF-が有する病態促進作用を軽減できる可能性を示すことが出来た。LRG欠損マウスは健康に発育するため、阻害時の副作用の問題が少ないと期待される。LRGは難治性リウマチ疾患の治療標的として有望であり、阻害戦略の確立が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：By proteomics-based strategy, we previously identified LRG as a promising serum biomarker for inflammation. Recent studies highlighted LRG as a functional protein presumably involved in the regulation of TGF signals. In this study, by using both LRG-deficient mice and wild-type mice, we generated animal models of rheumatic diseases (autoimmune arthritis and pulmonary fibrosis) in order to perform functional analysis of LRG. LRG deficiency in mice resulted in the alleviation of joint damage and pulmonary fibrosis, accompanied by reduced activation of TGF signal. This study revealed that LRG is a molecule involved in the pathogenesis of rheumatic diseases by enhancing TGF signal and is a potential therapeutic target for these diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：リウマチ学 難病

## 1. 研究開始当初の背景

LRG (Leucine rich 2 glycoprotein) は、研究代表者らが関節リウマチ患者血清のプロテオミクス解析から見出し (Serada S, Naka T et al. 2010 Ann Rheum Dis) 検査マーカーとして開発中の炎症関連分子である。LRG はさまざまな炎症性疾患の血中に増加するため、その測定値は炎症の程度や疾患活動性を把握するのに有用である。近年、LRG が TGF- $\beta$  の共受容体である endoglin と結合して TGF- $\beta$  シグナルの血管新生作用を亢進させ、病的血管新生を促進することが報告された (Wang X et al. 2013 Nature)。研究代表者らもまた独自に LRG 欠損マウスを作製し、LRG が心筋梗塞後の血管新生に関わること (Kumagai S, Naka T et al. 2016 Cardiovasc Res) や、癌細胞における TGF- $\beta$  シグナルを増強することを明らかにしてきた (Takemoto N, Naka T et al. 2015 Oncotarget)。つまり LRG はさまざまな細胞種や病態において TGF- $\beta$  の作用を修飾することが示唆される。しかも TGF- $\beta$  は多機能分子として、免疫機能調節においても極めて重要な役割をもつため、LRG 自身もまた機能分子として免疫疾患の病態に直接関わる可能性が高まってきた。実際、研究代表者らの予備検討では、LRG 欠損マウスがリウマチ様関節炎発症に抵抗性を示す結果が得られつつあり、LRG はリウマチ疾患の新規創薬標的としても有望と考えられた。

## 2. 研究の目的

TGF- $\beta$  は、免疫系では免疫抑制及び活性化の両面に複雑な作用を發揮し、炎症後の組織修復では線維化促進に作用することから、リウマチ疾患を含むさまざまな病態に深く関与する。TGF- $\beta$  の作用を増強・修飾する LRG は、TGF- $\beta$  とともにこれらの病態に関わる可能性が高い。本研究では研究代表者らが所有する LRG 欠損マウスをリウマチ疾患モデルの作製に利用し、病態の変化を解析することで LRG がもつ病態生理学的意義を解明するとともに、LRG 阻害療法の実現可能性について追求する。より具体的な目的として、以下が挙げられる。

- (1) LRG による TGF- $\beta$  シグナル調節機構の解明
- (2) リウマチ疾患の発症・増悪における LRG の分子機序の解明
- (3) LRG 阻害抗体の作製およびリウマチ疾患に対する治療薬としての評価

上記の目的を追求して得られる成果を、リウマチ疾患の病態解明と新規治療法開発へと繋げていくことが目標である。

## 3. 研究の方法

- (1) LRG による TGF- $\beta$  シグナル調節機構の解明

獲得免疫応答のキープレーヤーというべきヘルパーT細胞に着目し、LRG の作用について検討する。マウスよりヘルパーT細胞を採取し LRG の TGF- $\beta$  /Smad シグナルに対する作用を Western Blot 法など *in vitro* で解析する。またヘルパーT細胞において、LRG の有無で分化の方向づけがどのように変わるかを検討する。LRG の結合相手として以前 endoglin が同定されているが、本分子は必ずしもすべての細胞種に発現していないため、T細胞ではその役割が解析できない可能性が高い。そこで、LRG の作用における endoglin の重要性については、endoglin を発現し LRG にも応答する他の細胞 (例えば、線維芽細胞 L929) を利用して検討する。

- (2) リウマチ疾患の発症・増悪における LRG の分子機序の解明

研究代表者らが作製した LRG 欠損マウスと野生型マウスに対して実験的関節炎を誘導する。病態形成学的に異なる 2 系統のモデル、すなわち、獲得免疫系に依存して発病するコラーゲン誘導性関節炎 (Collagen-induced arthritis; CIA) と自然免疫系に依存して発病するコラーゲン抗体誘導性関節炎 (Collagen-antibody-induced arthritis; CAIA) の 2 つのモデルを作製して検討を行う。LRG の有無による関節症状、免疫活性化状態、関節破壊像の差異を明確にすることで、病態における LRG の分子機序を解明する。さらに、関節リウマチに好発する他臓器病変として知られる間質性肺炎 (代表的なものとして、通常型間質性肺炎 [usual interstitial pneumonia: UIP]) のモデルとして、プレオマイシン誘導性肺線維症モデルを利用し、LRG の役割について検討する。

- (3) LRG 阻害抗体の作製およびリウマチ疾患に対する治療薬としての評価

共同研究の成果として取得した抗 LRG モノクローナル抗体の中から、阻害活性をもつ抗体を *in vitro* でスクリーニングして同定する。その後、*in vivo* 投与のための抗体を調製し、モデルマウスにおける薬効と安全性の検討へと進める。

## 4. 研究成果

- (1) LRG による TGF- $\beta$  シグナル調節機構の解明

内因性 LRG の影響を排除するため、LRG 欠損マウスのヘルパーT細胞を使い、リコンビナント LRG を添加する形で、*in vitro* での分化誘導実験を実施した。すると、TGF- $\beta$  存在化では、LRG を添加することによって、制御性T細胞 (Treg) への分化誘導が亢進する結果が得られた。さらに、IL-6 を追加して Th17 への分化誘導を行うと、LRG 存在下では Th17 形成が促進されるという結果が得られた。ヘルパーT細胞を TGF- $\beta$  で刺激する際に LRG を添加すると、Smad2 リン酸化

の増強がみられた。すなわち、LRG はヘルパーT 細胞において、TGF- $\beta$  の作用増強に作用し、炎症病態においては Th17 への誘導が促進されることが示唆された。

既報(Wang X et al. 2013 Nature)によれば、LRG の結合相手として endoglin が重要であることが示唆されている。しかし、興味深いことに、ヘルパーT 細胞自体には、endoglin の発現が認められなかった。そこで、endoglin を発現し LRG にも応答する線維芽細胞 L929 を利用して、endoglin の役割を検討した。L929 に LRG を強制発現させると、TGF- $\beta$  による Smad2 のリン酸化が増強されるとともに、Smad2 下流因子である Serpine1 および Acta2 の発現が増強された。しかし、endoglin をノックダウンした L929 細胞においても、LRG は TGF- $\beta$  -Smad2 シグナル増強効果を発揮した。つまり LRG の作用には endoglin が必ずしも必要でないことが今回の研究で明らかになった。

## (2) リウマチ疾患の発症・増悪における LRG の分子機序の解明

リウマチモデルマウス(CIA)から得られたデータでは、LRG 欠損によって関節炎臨床スコア、関節部の病理学的所見(図1左)、IL-17A 等の炎症性サイトカイン産生量(図1右)など、検討した指標すべてが軽減したことから、LRG 自体は関節炎病態を促進させることが示された。その

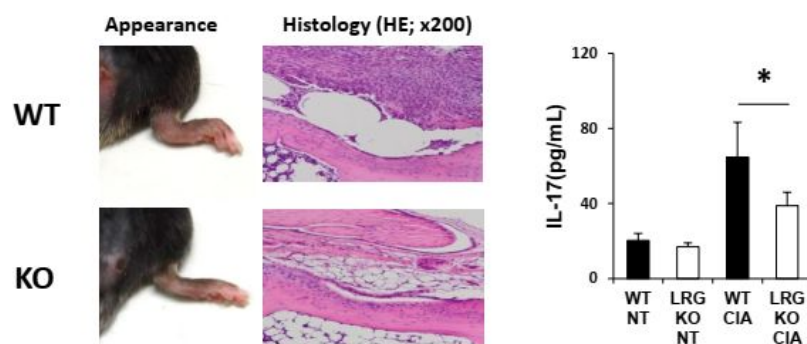


図1. LRG欠損マウスにおける関節炎(CIA)の低減と血清IL-17レベルの低下

機序として上述のように、Th17 細胞分化を増強することで炎症病態を促進することがデータから示唆された。実際、CIA マウスから採取したリンパ節細胞や血清では、LRG 欠損により Th17 応答が減弱することが示唆されていた。続いて、抗型コラーゲン抗体カクテルと LPS の投与で誘発される関節炎モデル(CAIA)を検討してみたところ、LRG 欠損マウスでは関節炎症状が軽減した。ただ、LPS 投与直後の症状が野生型マウスと LRG 欠損マウスで異なる傾向が認められており、LRG 欠損マウスでは LPS 刺激そのものへの応答性が減弱している可能性がある。LRG の構造的特徴である LRR (leucine rich repeat) は TLR 等の自然免疫系レセプターのリガンド結合部位によくみられる構造であり、自然免疫系シグナルに LRG が関与することも十分考えられる。この点は現在も検証を進めている。両モデルの検討からは、LRG が関節炎病態を促進させる方向にはたらく分子であることが示唆された。

関節リウマチに合併する臓器病変として、線維化病変を主体とする間質性肺炎(通常型間質性肺炎)がよく知られている。肺線維化病変における LRG の役割を検討するため、プレオマイシン誘導性肺線維症を LRG 欠損マウスに誘導して、肺病変の観察を行った。H&E 染色と Masson's trichrome 染色で肺を評価すると、LRG 欠損マウスでは線維化病変の広がりが軽度であり、膠原線維の沈着が抑制されていた(図2左)。さらに、プレオマイシン投与後の肺コラーゲン含量は

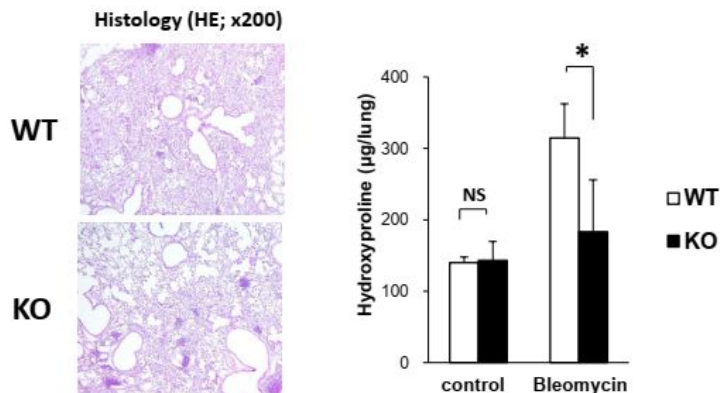


図2. LRG欠損マウスにおけるプレオマイシン誘導性肺線維症の低減

野生型マウスよりも有意に少なかった(図2右)。また、このモデルにおいて、LRG 欠損マウス

では野生型マウスよりも肺組織のリン酸化 Smad2 の発現が弱く、線維芽細胞の活性化指標である  $\alpha$ -SMA の発現が減弱していた。上述したように、線維芽細胞では LRG によって TGF- $\beta$  -Smad2 シグナル増強効果がみられることから、LRG は活性化線維芽細胞に機能増強に関与すると考えられる。すなわち LRG は組織修復の際の TGF- $\beta$  の作用を増強し、病的な線維化の促進に寄与することが示唆された。

### (3) LRG 阻害抗体の作製およびリウマチ疾患に対する治療薬としての評価

上記の検討結果から、LRG を標的とする薬剤は、リウマチ疾患の関節病変および肺病変の両者の治療に有望であることが明らかになった。したがって LRG の作用を阻害する抗体を樹立すれば、リウマチ疾患の治療薬として臨床へと応用できる可能性が高い。しかしながら、バイオマーカーとしても有用である LRG は、比較的高濃度に存在する血清蛋白であり、*in vivo* での作用阻害には高い中和活性をもつ抗体の選定が最も重要である。今回の研究では、作製したモノクローナル抗体の LRG 阻害活性をクローンごとに検討した。L929 等の細胞株を使用して、*in vitro* における機能阻害スクリーニングを実施し、さらに、定量的スクリーニングとして、TGF- $\beta$  シグナルのモニター細胞 (HEK-Blue cells) で検討を行った。しかしながら、期待するような中和活性を両実験系において発揮するクローンを決定することができなかった。そこで全く異なるアプローチを用いて追加の検討を実施する。LRG、TGF- $\beta$ 、および TGF- $\beta$  受容体分子 (ALK5, TGF-RII, Endoglin) のリコンビナント蛋白を使用し、結合阻害活性を元に抗体をスクリーニングする方針である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Fujimoto Minoru, Matsumoto Tomoshige, Serada Satoshi, Tsujimura Yusuke, Hashimoto Shoji, Yasutomi Yasuhiro, Naka Tetsuji  | 4. 巻<br>10                    |
| 2. 論文標題<br>Leucine-rich alpha 2 glycoprotein is a new marker for active disease of tuberculosis   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>3384            |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-020-60450-3   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Lee Hyun, Fujimoto Minoru, Ohkawara Tomoharu, Honda Hiromi, Serada Satoshi, Terada Yoshio, Naka Tetsuji   | 4. 巻<br>498                   |
| 2. 論文標題<br>Leucine rich -2 glycoprotein is a potential urinary biomarker for renal tubular injury   | 5. 発行年<br>2018年               |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>1045 ~ 1051     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2018.03.111   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Urushima Hayato, Fujimoto Minoru, Mishima Takashi, Ohkawara Tomoharu, Honda Hiromi, Lee Hyun, Kawahata Hirohisa, Serada Satoshi, Naka Tetsuji   | 4. 巻<br>19                    |
| 2. 論文標題<br>Leucine-rich alpha 2 glycoprotein promotes Th17 differentiation and collagen-induced arthritis in mice through enhancement of TGF- $\beta$ 1-Smad2 signaling in naive helper T cells | 5. 発行年<br>2017年               |
| 3. 雑誌名<br>Arthritis Research & Therapy  | 6. 最初と最後の頁<br>137             |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13075-017-1349-2  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Honda Hiromi, Fujimoto Minoru, Serada Satoshi, Urushima Hayato, Mishima Takashi, Lee Hyun, Ohkawara Tomoharu, Kohno Nobuoki, Hattori Noboru, Yokoyama Akihito, Naka Tetsuji           | 4. 巻<br>5                     |
| 2. 論文標題<br>Leucine-rich -2 glycoprotein promotes lung fibrosis by modulating TGF- $\beta$ 1 signaling in fibroblasts  | 5. 発行年<br>2017年               |
| 3. 雑誌名<br>Physiological Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>e13556 ~ e13556 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.14814/phy2.13556  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>仲 哲治                      |
| 2. 発表標題<br>関節リウマチおよび炎症性疾患におけるLRGの意義  |
| 3. 学会等名<br>第71回日本皮膚科学会西部支部学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>仲 哲治、金井隆典、松岡克善、世良田聡、藤本 穰、飯島英樹、新崎信一郎、水野慎大 |
| 2. 発表標題<br>新規炎症マーカーLRGの同定からIBD バイオマーカーとしての実用化まで     |
| 3. 学会等名<br>第46回日本臨床免疫学会総会                           |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤本 穰、大河原知治、李 賢、世良田聡、三森経世、寺田典生、仲 哲治                                 |
| 2. 発表標題<br>新規炎症マーカー分子LRG (Leucine rich 2 glycoprotein) の腎疾患における尿検査マーカーとしての可能性 |
| 3. 学会等名<br>第46回日本臨床免疫学会総会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>仲 哲治                      |
| 2. 発表標題<br>関節リウマチおよび炎症性腸疾患におけるLRGの意義 |
| 3. 学会等名<br>第45回日本臨床免疫学会              |
| 4. 発表年<br>2017年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤本穰、宇留島隼人、川畑浩久、大河原知治、李賢、本田宏美、世良田聡、仲哲治 |
| 2. 発表標題<br>新規炎症マーカーLRGの自己免疫性関節炎の病態進行における役割の検討    |
| 3. 学会等名<br>第45回日本臨床免疫学会総会                        |
| 4. 発表年<br>2017年                                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 新規炎症マーカー分子LRGの同定とその臨床応用<br><a href="http://www.kochi-ms.ac.jp/~nanby/researche02.html">http://www.kochi-ms.ac.jp/~nanby/researche02.html</a> |
|--|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                           | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 藤本 穰<br><br>(FUJIMOTO Minoru)<br><br>(00379190) | 高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授<br><br><br><br>(16401) |    |
| 研究協力者 | 宇留島 隼人<br><br>(URUSHIMA Hayato)                 |   |    |
| 研究協力者 | 本田 宏美<br><br>(HONDA Hiromi)                     |   |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|           | 氏名<br>(研究者番号)                                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|-----------|---|---|----|
| 研究<br>協力者 | 李 賢<br><br>(Lee Hyn)                            |   |    |
| 連携<br>研究者 | 世良田 聡<br><br>(Serada Satoshi)<br><br>(50463302) | 高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授<br><br><br>(16401) |    |