

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590361

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糸球体腎炎新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a glomerulonephritis therapeutic model with novel protein analogs targeting the polymorphic binding site of osteopontin (Opn)

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（和文）：

申請者らは糸球体腎炎感受性因子である Opn の多型により修飾されるインテグリン結合サイトを阻害する新規アナログを用いた Opn の多型部位の阻害による新たな膠原病治療戦略の確立を企図し、Alpha Screen および GST-capture ELISA により疾患感受性 Opn 機能阻害蛋白をスクリーニングした。スクリーニングされた蛋白のうち3クローンは、T 細胞活性化を抑制し、in vivo の解析では特定のアナログが糸球体腎炎の発症・進展を抑制する傾向を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

We objected to propose a therapeutic model with a certain kind of novel protein analogs inhibiting the binding site of osteopontin (Opn) which is one of the susceptibility polymorphic gene product to glomerulonephritis in mouse model. Screening of the inhibiting protein against Opn function was carried out by Alpha Screen system and GST-capture ELISA followed by the in vivo and in vitro assays which resulted in the suppression of T-cell activation as well as the development of glomerulonephritis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

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検索を継続的に進めてきた中で疾患

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、自己免疫性糸球体腎炎の感受性遺伝子座を同定し、うち、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*は、疾患好発系MRL/lprと嫌発系C3H/lprのアレル間に構造遺伝子多型を有しており、無細胞蛋白合成系を用いたバイオアッセイの結果、*Opn*の遺伝子多型による構造の差異が少なくともマクロファージ活性化能、抗体産生誘導能の差異を通して、糸球体腎炎発症・進展に関与することが示唆された。(1)

また、アミノ酸置換部位を一個ずつ対立アレル型と同じにした改変OPNを作製して解析を行い、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機能的差異を誘導しているアミノ酸多型部位を特定し得た。

MRL/lprを背景に*Opn*を含む糸球体腎炎感受性遺伝子座*Agnm3*領域をC3H系と入れ替えたコンジェニックマウス系MRL/lpr-*Agnm3*^{C3H/C3H}を確立し、*Opn*遺伝子座の遺伝子型が糸球体腎炎の発症を規定していることを直接証明した。

OPNはターゲットによりTh1やTh17を誘導するとともに、Mφを介して抗体産生も誘導する多機能なサイトカインであり(4)、自己免疫疾患治療戦略に於けるターゲット分子としての重要性が認識されている。関節リウマチの治療においてはOPNのインテグリンα9β1結合部位をブロックするキメラ抗体による治療が提唱されている(5)。また、ヒト*Opn*の多型と自己免疫性糸球体腎炎の関係も示唆されている。

2. 研究の目的

これらの研究背景より、今回 OPN の多型を伴う機能的結合部位をブロックする蛋白アナログを投与または発現させることによる、新たな糸球体腎炎の治療方法を開発することを想起した。我々はこれまでに、オステオポンチン(*Opn*)に関し、疾患好発系アレル、嫌発系アレル間で蛋白の構造・機能に差異があることを明らかにしてきた。最近、申請者らは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、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。この部位は、ヒトにおいてもマウスと同じインテグリンとの特異的結合部位となっている。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による自己免疫性糸球体腎炎治療戦略の確立を企図した。

3. 研究の方法

(1) 候補蛋白の作成

当初、蛋白構造予測ソフトを用いて立体構造を設計することを企図していたが、本学無細胞生命科学工学センターに現有する 13,000 種類の cDNA ライブラリーにある蛋白を、コムギ胚芽

を用いた無細胞蛋白合成系でハイ・スループットに合成、スクリーニングできるため、この cDNA ライブラリーから候補蛋白をスクリーニングする方法を採用した。

(2) Alpha Screen による *Opn* 結合阻害蛋白候補のスクリーニング

(1)のライブラリーを用いて、約6500種類の蛋白を合成し、Fluorometric Microvolume Assay の原理による Alpha Screen を用いて、疾患感受性アレルおよび抵抗性アレル両方の *Opn* インテグリン結合サイト(多型部位)のいずれかに強い結合アフィニティーを示す蛋白約80クローンを見出した。

(3) GST-capture ELISA および cytoELISA による二次スクリーニング

上記で選択した80クローンの蛋白を、さらに GST-capture ELISA を用いて、biotin 標識 *Opn* とのアフィニティーを濃度勾配をつけて詳細に解析し、さらに、Mφおよび樹状細胞との結合アフィニティーを cytoELISA を用いて解析し、クローンを絞り込んだ。

(4) in vitro における候補蛋白アナログによる免疫機能 modulation の解析

上記で絞り込んだ5クローンにつき、マウス脾細胞系および骨髄由来樹状細胞系を用いて、T細胞活性化能、抗体産生誘導能、抗原提示能の修飾を解析した。その結果、3種類の蛋白アナログが、これらの機能を優位に阻害することが明らかになった。

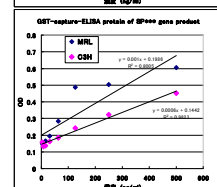
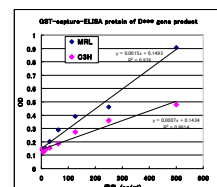
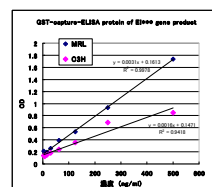
(5) 膠原病モデルマウスへの *Opn* 阻害蛋白アナログ投与による治療実験

上記の3クローンの蛋白アナログについて、静脈内投与、界面活性剤である Span80 を用いたナノベシクルに内包させて静脈内投与、同ベシクルに内包させての腹腔内投与の3通りの投与方法で、糸球体腎炎モデルマウス MRL/lpr および McH/lpr-*Agnm3* に投与し、糸球体腎炎抑制についてスクリーニングを行った。

4. 研究成果

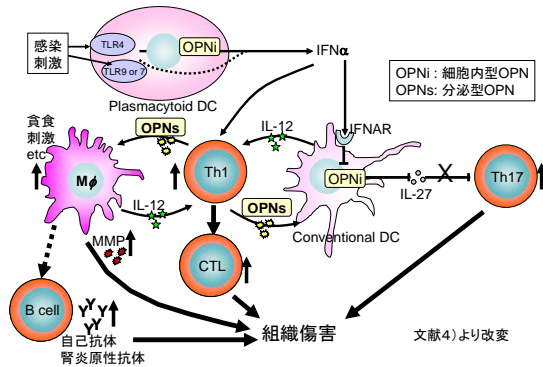
(1)で約 6 5 0 0 種類の蛋白アナログを作成し、上記のごとくスクリーニングを進めた結果、E****、D****、S*****の3つの蛋白のアナログが少なくとも *Opn* の結合を阻害して、さらに in vitro においてMφおよび樹状細胞を介した免疫反応を阻害することが明らかになった。(図参照)

GST-capture ELISA によるMRLアレルOpn-RGDS fragment 結合アフィニティーの定量的解析



これらの蛋白アナログを、マウスに投与したところ、少なくとも S****アナログの腹腔内投与が、糸球体腎炎を抑制する傾向を示した。今後、さらに投与方法を最適化し、長期予後の追跡、遺伝子治療モデルの樹立を行い、ヒト難治性炎症性疾患の治療法確立に結びつけるべく研究を継続したい。

OPNiはTh1, Th17, 抗体産生誘導、MMP産生を介して炎症の増悪因子として機能する



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 12 件)

① Mizutani Y, Matsuo K, Takeda H, Shioyama K, Inada K, Hayakawa K, Yamada H, Miyazaki T, Sawasaki T, Endo Y, Tsutsumi Y. Novel approach to identifying autoantibodies in rheumatoid synovitis with a biotinylated human autoantigen library and the enzyme-labeled antigen method. *J Immunol Methods*. 査読有 387(1-2), 2013, pp57-70. doi: 10.1016/j.jim.2012.09.011.

② 宮崎龍彦. 【血管炎-基礎と臨床のクロストーク】 最新の研究トピックス AP-VAS 2012 から 血管炎の基礎研究 MRL/1pr 由来オステオポンチン遺伝子座特異的コンジェニックマウスと糸球体腎炎. *日本臨床* 査読無 71 (Suppl.1) 2013, pp493-496.

③ Oishi H, Tsubaki T, Miyazaki T, Ono M, Nose M, Takahashi S. A bacterial artificial chromosome transgene with polymorphic Cd72 inhibits the development of glomerulonephritis and vasculitis in MRL-Faslpr lupus mice. *J Immunol*. 査読有 190(5), 2013, pp2129-2137. doi: 10.4049/jimmunol.1202196.

④ Kurata M, Okura T, Kumon Y, Tagawa M, Watanabe H, Nakahara T, Miyazaki T, Higaki J, Nose M. Plasma

thrombin-cleaved osteopontin elevation after carotid artery stenting in symptomatic ischemic stroke patients. *Hypertens Res*. 査読有 35(2), 2012 pp207-212. doi: 10.1038/hr.2011.177.

⑤ Miyoshi S, Hamada H, Hamaguchi N, Kato A, Katayama H, Irifune K, Ito R, Miyazaki T, Okura T, Higaki J. Antitumor activity of MEK and PI3K inhibitors against malignant pleural mesothelioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 査読有 41(2): 2012 pp449-456. doi: 10.3892/ijo.2012.1462.

⑥ Hayashi K, Walde P, Miyazaki T, Sakayama K, Nakamura A, Kameda K, Masuda S, Umakoshi H, Kato K. Active Targeting to Osteosarcoma Cells and Apoptotic Cell Death Induction by the Novel Lectin Eucheuma serra Agglutinin Isolated from a Marine Red Alga. *J Drug Deliv*. 査読有 vol 2012, 2012, article 842785. doi: 10.1155/2012/842785.

⑦ 宮崎 龍彦. 樹状細胞の抗原提示能とオステオポンチン. *臨床免疫・アレルギー科* 査読無 58(2). Pp136-142.2012 doi 無

⑧ Nishikawa Y, Miyazaki T, Nakashiro K, Yamagata H, Isokane M, Goda H, Tanaka H, Oka R, Hamakawa H. Human FAT1 cadherin controls cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the localization of β-catenin. *Oncol Rep*. 査読有 26(3), 2011, pp587-592. doi: 10.3892/or.2011.1324.

⑨ Hayashi K, Shimanouchi T, Kato K, Miyazaki T, Nakamura A, Umakoshi H. Span 80 vesicles have a more fluid, flexible and "wet" surface than phospholipid liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 査読有 87(1), 2011, pp28-35. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.029.

⑩ Mizuki S, Oishi H, Zhang MC, Kamogawa J, Miyazaki T, Ono M, Takahashi S, Yamamoto H, Nose M. Genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis mouse models induced by extrinsic and intrinsic factors. *Pathol Int*. 査読有 60(6): 2010, pp430-437. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02537.

⑪ Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y,

Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H, Sawasaki T, Endo Y, Nose M. Evaluating the role of rheumatoid factors for the development of rheumatoid arthritis in a mouse model with a newly established ELISA system. *Tohoku J Exp Med*. 査読有 220(3): 2010, 199-206.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/220/3/220_3_199/article

⑫ Omokawa Y, Miyazaki T, Walde P, Akiyama K, Sugahara T, Masuda S, Inada A, Ohnishi Y, Saeki T, Kato K. In vitro and in vivo anti-tumor effects of novel Span 80 vesicles containing immobilized Eucheuma serra agglutinin. *Int J Pharm*. 査読有 389 (1-2), 2010, pp157-167. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.01.033.

〔学会発表〕 (計 13 件)

①中田浩史, 宮崎龍彦, 岩崎智之, 重川庸介, 林啓太, 中村篤志, 亀井節也, 藤渕剛次, 木谷彰岐, 坂山憲史, 三浦裕正. Span80 ナノベシクルを用いた DDS によるマウス骨肉腫に対する腫瘍特異的カフェイン併用化学療法の萌芽的研究. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012.10.26 名古屋.

②宮崎龍彦, 水野洋輔, 末盛浩一郎, 増本純也. Wegener 肉芽腫症の経過中死の転帰を取り剖検で侵襲性 NK/T 細胞リンパ腫が発見された一例. 第17回血管 b 表裏研究会. 2012.10.26. 東京

③中田浩史, 宮崎龍彦, 岩崎智之, 重川庸介, 林啓太, 中村篤志, 亀井節也, 藤渕剛次, 木谷彰岐, 坂山憲史, 三浦裕正. Span80 ナノベシクルを用いた DDS によるマウス骨肉腫に対する腫瘍特異的カフェイン併用化学療法の基礎的研究. 第28回日本 DDS 学会学術集会. 2012.7.5 札幌

④宮崎龍彦. ゲノミクスからプロテオミクスへ: オミックスを用いた自己免疫疾患感受性因子の解析. 第101回日本病理学会総会 (シンポジウム・招待講演). 2012.4.27. 東京

⑤水谷泰嘉, 松岡和弘, 竹田浩之, 早川和恵, 宮崎龍彦, 塩竈和也, 稲田健一, 澤崎達也, 遠藤弥重太, 山田治基, 堤寛. コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を利用した病変局所で産生される抗体の標的抗原検索法の開発 関節リウマチをモデルとして. 第52回日本組織細胞化学会総会学術集会. 2011.9.24. 金沢

⑥茂久田翔, 宮崎龍彦, 能勢真人, 高杉潔.

関節リウマチの病院・病態 滑膜免疫組織化学を利用したサバイビン半定量解析による OA と RA の鑑別. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2011.7.18. 神戸

⑦加藤敬一, 大澤弘幸, 岩崎智之, 宮崎龍彦, 林啓太, 森木文進, 重川庸介, 増田晴造. 癌治療 DDS 薬物キャリアとしての次世代型 Span80 ベシクルの優位性. 第27回日本 DDS 学会学術集会. 2011.6.10. 東京

⑧林啓太, 島内寿徳, 加藤敬一, 宮崎龍彦, 馬越大. コレステロール添加による Span80 ベシクルのダイナミクス変化. 第27回日本 DDS 学会学術集会. 2011.6.10. 東京

⑨Miyazaki T, Tanaka Y, Ono M, Kurata M and Nose M. Osteopontin gene locus specific congenic MRL/lpr mice strain shows amelioration of glomerulonephritis associated with different immunological traits. The Asian Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. 2012.3.28. Tokyo.

⑩Oishi H, Tsubaki T, Miyazaki T, Ono M, Nose M and Takahashi S. A BAC transgene with a polymorphic Cd72 inhibits the development of glomerulonephritis and vasculitis in murine lupus. The Asian Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. 2012.3.28. Tokyo.

⑪Miyazaki T, Tanaka Y, Ono M, Kurata M and Nose M. Allelic polymorphism of murine osteopontin implicates functional differences in antigen presentation by dendritic cells. The 14th International Congress of Immunology, 2010.8.23. Kobe

⑫宮崎龍彦, 田中ゆき, 倉田美恵, 小野栄夫, 能勢真人. 糸球体腎炎感受性遺伝子座特異的コンジェニックマウスの immunophenotype の解析. 第100回日本病理学会総会. 2011.4.30. 東京

⑬宮崎龍彦, 田中ゆき, 小野栄夫, 倉田美恵, 能勢真人. マウスオステオポンチン蛋白多型は樹上細胞機能を修飾してモデルマウスの腎炎発症に関与する. 第99回日本病理学会総会. 2010.4.29. 東京

〔図書〕 (計 2 件)

① 宮崎龍彦, 能勢真人. 最新医学社. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 全身性エリテマトーデス (竹内勤 編)

第2章「病理」 2010, 178 ページ

- ② 宮崎龍彦. 羊土社. はじめの一步のイラスト病理学 (深山正久 編) 第4章「免疫」, 第11章「難病」 2012, 262 ページ

[その他]

ホームページ等

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

倉田 美恵 (Kurata Mie)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80423440

(3) 連携研究者

能勢眞人 (Masato Nose)
東北大学・大学院医学研究科・客員教授
研究者番号：70030913

長谷川均 (Hitoshi Hasegawa)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40164826

藤野貴広 (Takahiro Fujino)
愛媛大学・総合科学研究支援センター・
准教授
研究者番号：40292312

研究協力者

田中ゆき (Yuki Tanaka)
愛媛大学総合科学研究支援センター・技術職員