

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 5月31日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591101

研究課題名（和文） 自己免疫疾患の病態における新規炎症マーカータンパク質（LRG）の機能解析

研究課題名（英文） Study on the function of a novel inflammatory marker protein (LRG) in the pathogenesis of autoimmune disorders

研究代表者

仲 哲治 (Naka Tetsuji)

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 部長

研究者番号：30303936

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能不明分子であるマーカータンパク質 LRG の、免疫疾患病態における機能解析を行った。プロテオミクス及びツーハイブリット手法を用いて LRG と相互作用する蛋白（受容体等）の候補分子を同定した。LRG 欠損マウスを作製し、本マウスが正常に出生・発育するも、免疫疾患等の疾患誘導により表現型が変化することを見出した。LRG は創薬標的として有望と考えられ、製薬企業との共同研究を開始することとなった。

研究成果の概要（英文）：The uncharacterized function of LRG, a novel biomarker for autoimmune disorders, was investigated in this study. By proteomics approach and two-hybrid screening, several candidates of LRG-interacting proteins including possible receptors have been identified. Generation and analysis of LRG knockout mice have revealed that LRG is dispensable for the survival of mice, but is involved in the progression of several immune diseases. The results suggest that LRG is a promising target of immune disorders. Further studies on LRG as a potential therapeutic target will be on the way in collaboration with a pharmaceutical company.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

1. 研究開始当初の背景

LRG (Leucine rich alpha2 glycoprotein) は申請者らがプロテオミクス手法による血清バイオマーカー探索にて同定した新規炎症マーカータンパク質である。

LRG は、関節リウマチや潰瘍性大腸炎等の自己免疫疾患の活動性上昇に応じて、血清中ならびに炎症局所に強く発現するが、LRG 自身の自己免疫疾患における機能的役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自己免疫疾患における LRG の機能解析を通じて LRG が新規の創薬標的になりうるかどうかを検討し、難病治療法の開発へとつなげることである。

3. 研究の方法

(1) 生体における LRG の作用を解明するため、LRG ノックアウト (KO) マウスを作製し、KO

マウスに実験的免疫疾患を誘導して表現型の変化を観察した。

(2) LRG の機能解明の鍵として、未だ不明である LRG の受容体蛋白を、プロテオミクス手法や酵母ツーハイブリッド法にて探索した。

4. 研究成果

(1) LRG 欠損が胎生致死となる可能性を懸念し、まず LRG のコンディショナル KO マウスを作製し、このマウスを元に LRG を完全に欠損するマウスの作製を試みた。すると予想に反し LRG KO マウスの生体を得ることができ、さらにその交配で得られる産仔 (KO) も正常に生まれ健康に成長した。LRG が生命の維持や繁殖に必須ではないという点は、LRG の治療標的としての意義を考察する上で重要である。繁殖した KO マウスを用いて種々の疾患モデルの作製を行い、表現型の変化を観察した。具体的には、L P S 投与 (菌血症モデル)、関節炎・腸炎・ぶどう膜炎などの自己免疫疾患誘導、加齢性黄斑変性症様の血管新生誘導、癌細胞移植 (担癌モデル) などを行い、野生型マウスとの比較を行った。この結果、複数の疾患モデルにおいて、病状の変化が見られ、LRG の機能的重要性を示唆する結果が得られた。LRG は創薬標的として有望と考えられ、新たに製薬企業との共同研究を開始することとなった。現在、論文作成に向けた各データの蓄積と分子レベルでの病態解析が進行中である。

(2) 申請者らの検討により、精製 LRG を細胞に作用させると、特定の細胞内シグナル伝達経路が活性化することが明らかになっている。そこで、LRG 結合性膜表面タンパク質のカラム精製・プロテオミクス手法による分子同定により LRG 受容体の候補タンパク質をいくつか同定し、中和抗体を用いたシグナル伝達系への影響を検討した。結果、ある受容体に対する中和抗体の存在下では、精製 LRG 刺激後のシグナル伝達が抑制されることが明らかになった。しかしながら、この受容体を発現する細胞であっても必ずしも LRG による細胞内シグナル活性化が認められないことから、本受容体は LRG シグナル伝達に必須ながら十分ではないことが示唆された。そこで、他の受容体分子を同定するため、酵母ツーハイブリッド法による結合分子探索を開始し、プロテオミクス手法による分子同定を再度行った。現在、新たに同定された候補分子の重要性について、培養細胞レベルにて個別検討中である。

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 23 件)

1) Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E. Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease.

Inflamm Bowel Dis. 2013;19(2):321-31.

DOI: 10.1097/MIB.0b013e318280eade

査読あり

2) Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T, Naka T.

Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer.

Int J Cancer. 2013; 132(2):472-84.

DOI: 10.1002/ijc.27679

査読あり

3) Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Ripley B, Nomura S, Mizuguchi H, Shimada S, Takahashi T, Kawase I, Kishimoto T, Naka T

SOCS-1 gene delivery cooperates with cisplatin plus pemetrexed to exhibit preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma.

Int J Cancer. 2013; 132(2):459-71.

DOI:10.1002/ijc.27611

査読あり

4) Ishii H, Jin X, Ueno M, Tanabe S, Kubo S, Serada S, Naka T, Yamashita T.

Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury.

Cell Death Dis. 2012; 3:e363.

DOI:10.1038/cddis.2012.106

査読あり

5) Iwahori K, Suzuki H, Kishi Y, Fujii Y, Uehara R, Okamoto N, Kobayashi M, Hirashima T, Kawase I, Naka T.

Serum HE4 as a diagnostic and prognostic

marker for lung cancer.
Tumour Biol. 2012; 33(4): 1141-9.
DOI: 10.1007/s13277-012-0356-9
査読あり

6) Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, **Naka T**, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. J Immunol. 2012; 189(4): 2043-53. DOI:10.4049/jimmunol.1103610
査読あり

7) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello A M, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, **Naka T**, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. PLoS One. 2012; 7(5): e37803. DOI:10.1371/journal.pone.0037803
査読あり

8) Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, **Naka T**, Murota H, Katayama I. Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma. PLoS One. 2012;7(7):e41994. Epub 2012 Jul 24. DOI:10.1371/journal.pone.0041994
査読あり

9) Serada S, Fujimoto M, Terabe F, Iijima H, Shinzaki S, Matsuzaki S, Ohkawara T, Nezu R, Nakajima S, Kobayashi T, Plevy SE, Takehara T, **Naka T**. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2012; 18(11):2169-79. doi: 10.1002/ibd.22936.
査読あり

10) Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, **Naka T** Katayama I.

Dysregulation of Melanocyte Function by Th17-related Cytokines: Significance of Th17 Cell Infiltration in Autoimmune Vitiligo Vulgaris. Pigment Cell Melanoma Res. 2012; 25(2):219-30. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00945.x
査読あり

11) Souma Y, Nishida T, Serada S, Iwahori K, Takahashi T, Fujimoto M, Ripley B, Nakajima K, Miyazaki Y, Mori M, Doki Y, Sawa Y, **Naka T**. Anti-proliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells. Int J Cancer. 2012; 131(6):1287-96. DOI:10.1002/ijc.27350
査読あり

12) Ontsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway S, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, **Naka T**. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. Exp Dermatol. 2012; 21(5):331-336. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01454.x
査読あり

13) Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, **Naka T**, Kishimoto T, Katayama I. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. Am J Pathol. 2012; 180(1): 165-76. DOI:10.1016/j.ajpath.2011.09.013
査読あり

14) Yamashita T, Iwakura T, Matsui K, Kawaguchi H, Obana M, Hayama A, Maeda M, Izumi Y, Komuro I, Ohsugi Y, Fujimoto M, **Naka T**, Kishimoto T, Nakayama H, Fujio Y. IL-6-mediated Th17 differentiation through RORgammat is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. Cardiovasc Res. 2011; 91(4): 640-8. DOI: 10.1093/cvr/cvr148
査読あり

15) 藤本 穰、寺部 文隆、**仲 哲治**. IL-6 によるレギュラトリーT 細胞の抑制:

nTreg と iTreg の相違
臨床免疫・アレルギー科
2012: 57(1):79-86
査読なし
DOI なし

16) Haruta H, Ohguro N, Fujimoto M, Hohki S, Terabe F, Serada S, Nomura S, Nishida K, Kishimoto T, **Naka T.**
Blockade of interleukin-6 signaling suppresses not only th17 but also interphotoreceptor retinoid binding protein-specific Th1 by promoting regulatory T cells in experimental autoimmune uveoretinitis.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52(6): 3264-71.
DOI: 10.1167/iovs.10-6272
査読あり

17) Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, Ripley B, Serada S, Nishikawa T, Kimura A, Nomura S, Kishimoto T, **Naka T.**
The Influence of Excessive IL-6 Production In Vivo on the Development and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells.
J Immunol. 2011: 186(1):32-40.
DOI: 10.4049/jimmunol.0903314
査読あり

18) Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Chun Man Lee, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, **Naka T.**
Overexpression of SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma.
Int J Cancer. 2011: 129(4):1005-17.
DOI:10.1002/ijc.25716
査読あり

19) Terabe F, Fujimoto M, Serada S, Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M, Hayashi N, Nomura S, Kawahata H, Myoung Ho Jang, Miyasaka M, Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T, **Naka T.**
Comparative analysis of the effects of anti-IL-6 receptor mAb and anti-TNF mAb treatment on CD4+ T-cell responses in murine colitis.
Inflamm Bowel Dis.
2011: 17(2):491-502.
DOI: 10.1002/ibd.21384
査読あり

20) Fujimoto M, **Naka T.**
SOCS1, a negative regulator of cytokine signals and TLR responses, in human liver diseases. Gastroenterol Res Pract.
Online journal 2010; Article ID 470468
DOI: 10.1155/2010/470468
査読あり

21) Hohki S, Ohguro N, Haruta H, Nakai K, Terabe F, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Kawahata H, Kishimoto T, **Naka T.**
Blockade of Interleukin-6 Signaling Suppresses Experimental Autoimmune Uveoretinitis by the Inhibition of Inflammatory Th17 Responses.
Exp Eye Res. 2010: 91(2):162-70.
DOI: 10.1016/j.exer.2010.04.009
査読あり

22) Ripley BJ, Fujimoto M, Serada S, Ohkawara T, Nishikawa T, Terabe F, Matsukawa Y, Stephanou A, Knight RA, Isenberg DA, Latchman DS, Kishimoto T, **Naka T.**
Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits cell signaling by inducing SOCS1 gene expression.
Int Immunol. 2010: 22(5):359-66.
DOI: 10.1093/intimm/dxq015
査読あり

23) Serada S, Fujimoto M, Ogata A, Terabe F, Hirano T, Iijima H, Shinzaki S, Nishikawa T, Ohkawara T, Iwahori K, Ohguro N, Kishimoto T, **Naka T.**
iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases.
Ann Rheum Dis 2010;69:770-774
DOI: 10.0036/ard.2009.118919
査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1) Serada S, Fujimoto M, **Naka T.**
Heterogeneous Nuclear RNP-K Is a Novel Cold-Related Autoantigen in Patients with Raynaud's Phenomenon.
ACR2012 第 78 回米国リウマチ学会議
2012 年 11 月 09 日~2012 年 11 月 14 日
米国 (ワシントン)

2) Serada S, Fujimoto M, Terabe F, **Naka T.**
Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is
a novel biomarker for monitoring disease
activity in patients with Ulcerative
Colitis.

第40回日本免疫学会総会
2011年11月28日 (千葉)

3) Fujimoto M, Kotobuki Y, Kitaba S, Ukita
T, Terabe F, Haruta H, Kishimoto T, **Naka
T.**

The effect of IL-6 overproduction in vivo
on wound healing.

Cytokines in Infectious Diseases,
Autoimmune Disorders and Cancer
(Cytokines 2010)

2010年10月4日 アメリカ (シカゴ)

4) Fujimoto M, Terabe F, Ukita T, Mei Y,
Serada S, Nishikawa T, Ripley B, Kishimoto
T, **Naka T.**

The effect of IL-6 overproduction on T
helper cell differentiation in vivo.

14th International Congress of Immunology
2010年8月25日 (神戸)

5) 世良田聡、藤本穰、寺部文隆、西川哲平、
仲哲治

自己免疫疾患の新規活動性マーカーとして
の leucine rich alpha 2 glycoprotein
Proteomics-based identification of
leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as
a novel biomarker associated with disease
activity of inflammatory autoimmune
disorders.

第8回 日本プロテオーム学会
2010年7月26日 (千葉)

[図書] (計2件)

1) 永井良三 許俊鋭 鄭忠和 澤芳樹 堀正二
小川聡 田林暁一 佐野俊二 天野篤 筒井裕
之 小川久雄 寺田弘司

世良田聡 **仲哲治**

先端医療技術研究所

「先端医療シリーズ 43 循環器疾患の最新
医療」

2012:506 (13-16)

2) 工藤進英

世良田聡 藤本穰 **仲哲治** 他

日本メディカルセンター

「Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein
is a disease activity biomarker in
ulcerative colitis. 潰瘍性大腸炎の疾患活
動性マーカーとしての血清ロイシンリッチ

アルファ2グリコプロテイン INTESTINE」
2013:112 (107-109)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 膠原病に伴うレイノー症状を診断する
方法及び診断用キット

発明者: 仲哲治、藤本穰、世良田聡

権利者: 独立行政法人医薬基盤研究所

種類: 特許権

番号: 特願 2012-141434 号

出願年月日: 2012年6月22日

国内外の別: 国内

名称: 結核検査用バイオマーカー

発明者: 仲哲治、藤本穰、世良田聡、

松本智成

権利者: 独立行政法人医薬基盤研究所

種類: 特許権

番号: 特願 2012-84996 号

出願年月日: 2012年4月3日

国内外の別: 国内

名称: 創傷治癒剤

発明者: 寿 順久、世良田 聡、仲 哲治

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス

振興財団

種類: 特許権

番号: 特願 2010-151139 号

出願年月日: 2010年7月1日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲 哲治 (Naka Tetsuji)

独立行政法人医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 部長

研究者番号: 30303936