

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591431

研究課題名(和文)リコンビントニック 2グリコプロテイン1ドメインVを用いた血栓症治療の可能性

研究課題名(英文)Role of recombinant nicked beta2-glycoprotein I domain V in angiogenesis

研究代表者

保田 晋助 (Yasuda, Shinsuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00374231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：2-グリコプロテインI(2GPI)は5つのドメインからなる糖タンパクで、抗リン脂質抗体症候群における自己抗原である。我々は、2GPIがプラスミンによって限定分解されたニック 2GPIがドメインVを介してアンジオスタチン(AS)に結合し、その作用を阻害する事を報告した(Blood 2009)。本研究ではニック 2GPIドメインVをリコンビナント蛋白として作製し、血管新生に与える影響を検討した。インタクト/ニック 2GPIドメインVを用いて分子間相互作用解析を行い、ニック 2GPIドメインVのみASに結合した。血管内皮細胞を用いた増殖アッセイではいずれも軽度の細胞増殖抑制能を有した。

研究成果の概要(英文)：Previously we reported nicked beta2-glycoprotein I (b2GPI) binds to angiostatin via its domain V and exerts pro-angiogenic effect (Nakagawa et al. Blood 2009). The aim of this study was to investigate the role of b2GPI domain V in angiogenesis. Recombinant b2GPI domain V was generated in mammalian cell expression system and bacteria. Purification of the product was done using anti-FLAG column or nickel column. Binding between intact/nicked b2GPI domain V and angiostatin 4.5 (AS4.5) was evaluated using surface plasmon resonance. Nicked b2GPI domain V specifically bound onto AS4.5 at KD of $\sim 5 \times 10^{-8}$ M, whereas intact b2GPI domain V showed no specific binding. Cell proliferation assay using human umbilical endothelial cells (HUVECs) were performed in the presence or absence of intact/nicked b2GPI domain V. Both intact and nicked b2GPI domain V slightly inhibited cell proliferation at 0.4 μ M. In conclusion, nicked b2GPI domain V bound to AS4.5, as observed in nicked form of whole b2GPI.

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：血管新生 アンジオスタチン 2-グリコプロテインI 抗リン脂質抗体症候群

1. 研究開始当初の背景

β 2-グリコプロテインI (β 2GPI) は分子量約50kDの糖タンパク質であり、血漿中に200 μ g/ml前後の濃度で存在する。若年者の二次性血栓症・習慣流産の原因として重要である抗リン脂質抗体症候群では、 β 2GPIに対する自己抗体の産生がその病因形成に大きな役割を果たすことが知られている。抗リン脂質抗体症候群の治療に関しては、抗血小板剤や抗凝固剤を長期に服用するが、治療中にもかかわらず血栓症の再発を来すことが非常に多く、抗原特異的な治療の開発が待たれる。 β 2GPIは繰り返す5つのドメインからなるが、ドメインVは疎水性ループを有し、リン脂質と結合することが知られている。これまでに知られている β 2GPIがもつ生理活性の多くはこのリン脂質への結合を介したものであり、抗凝固作用と向凝固作用をあわせ持ち、アポトーシス細胞処理にも関与する。 β 2GPIドメインV上の疎水性ループは線溶系活性化の状態でプラスミンによる限定分解を受け、リン脂質に対する結合能を失う(ニック β 2GPI)。ニック β 2GPIはこれまで老廃物的なとらえ方をされ、“inactive β 2GPI” と呼ばれてきたが、プラスミノゲンとの結合能をインタクト β 2GPIとニック β 2GPIとで比較した我々の研究では、ニック β 2GPIのみにプラスミノゲンに対する比較的強固な結合性を認め、この結合は β 2GPIドメインV上のリジンクラスターとプラスミノゲンの第5クリングルドメイン上のリジン結合部位を介していることが明らかとなった(Yasuda et al., *Blood*. 2004)。

プラスミンの分解産物であるアンジオスタチンは血管新生抑制物質として知られている。一般的にアンジオスタチンと呼ばれるものはクリングル1-3あるいはクリングル1-4を示すが、AS4.5(クリングル1-4+クリングル5の85%)は血漿中に検出される唯一のisoformである。最近我々はニック β 2GPIがAS4.5に対する結合能をもち、濃度依存性にその血管新生抑制作用を阻害、すなわち血管新生を促進することを見いだした(Nakagawa et al., *Blood*. 2009)。AS4.5、ニック β 2GPIともに線溶系が活性化されて初めて産生される物質である。生体における生理的意義としては、血栓部位でプラスミノゲンからプラスミンが生成され、その作用によってAS4.5、ニック β 2GPI両者の局所濃度が高まり、AS4.5による血管新生の抑

制をニック β 2GPIが解除する方向に作用し、最終的には側副血路形成を促して生体にとっては有利に働くことが考えられる。一方で、 β 2GPI自体にはそのドメインIを介したVEGF依存性の血管新生抑制作用が報告されており(Yu et al., *J Thromb Haemost*. 2008)、 β 2GPIの血管新生に対する作用を複雑なものにしている。我々の検討でも β 2GPI、ニック β 2GPI共にVEGF存在下で血管新生を抑制することが確認された。

2. 研究の目的

本研究では、ニック β 2GPIのもつアンジオスタチンを介した血管新生亢進作用を血栓症の治療に応用できるかどうか注目した。本研究の目的と逆の作用である血管新生抑制作用を担う β 2GPIドメインIの影響を排除するために、また分子量を小さくするためにニック β 2GPIドメインVをリコンビナント蛋白として作製し、まずはこれ自体にAS4.5を抑制する作用があるかどうかを検討、さらにはこれを用いた血栓症治療への応用の可能性を検証する。

3. 研究の方法

リコンビナントニック β 2GPIドメインVの作製(ほ乳類細胞):

β 2GPIドメインVは、まずほ乳類細胞の系をもちいてリコンビナント蛋白を作製した。これをプラスミン結合ビーズで処理することによってニック β 2GPIドメインVを作製し、インタクト β 2GPIがヘパリンに結合することを利用してヘパリンカラムで残存した β 2GPIドメインVを除去・精製した。第1のステップとして、N端にFLAGタグを付加した β 2GPIドメインV発現ベクターを構築した。用いたベクターはシグナルペプチドおよび3xFLAG構造を有し、CMVを発現プロモータとして有するもので、ほ乳類細胞であるHEK293に物質転換して目的とする蛋白の一時発現を検討した。

ニック β 2GPIドメインVとAS4.5間の結合:

ニック β 2GPIはドメインVを介してAS4.5との結合することが明らかになっており、ニック β 2GPIドメインV-AS4.5間の結合も同様に認められると予測されることから、ほ乳類細胞の系をもちいて作製したニック β 2GPIドメインVを用いて、まずはBIACOREを用いた分子間相互作用解析により、AS4.5との結合試験を行った。

ニック β 2GPIドメインVの血管内皮細胞に対する作用(in vitro):

ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を用いて細胞増殖アッセイ(MTT assay, Promega)を行った。

リコンビナントニックβ2GPIドメインVの作製(大腸菌):

大量のリコンビナント蛋白を得る目的で、β2GPIドメインVコンストラクトをpET32aベクターに挿入し、SタグおよびHisタグをN末に有する構造とした。大腸菌に作製したベクターを形質転換して大量のリコンビナント蛋白を調整した。ニック蛋白の作製は同様に行った。また、LPS除去カラムを用いてLPSコンタミネーションを除去し、リムルステストにてチェックを行った。

4. 研究成果

リコンビナントニックβ2GPIドメインVの作製:

ほ乳類細胞を用いた発現実験の結果、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロット法を行ったところ、予想に反して培養上清への分泌は感度以下であったが、細胞内にはβ2GPIドメインVが高発現していた。

ニックβ2GPIドメインVとAS4.5間の結合:

BIACOREを用いた検討で、ニックβ2GPIドメインVはAS4.5に対して k_a $0.96-1.37e^3$, k_d $3.0-3.8e^{-4}$, K_A $0.91-2.9e^{-8}$, KD $3.5-9.1e^{-8}$ と比較的強い結合を示した(図1a)。

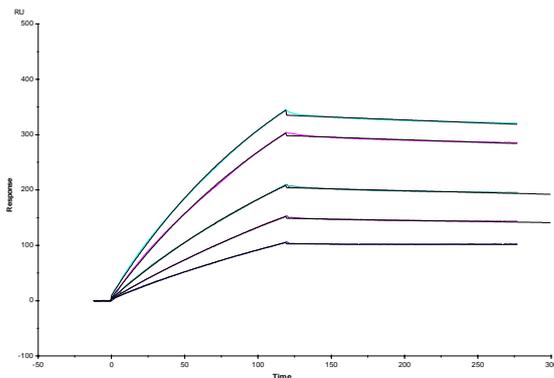
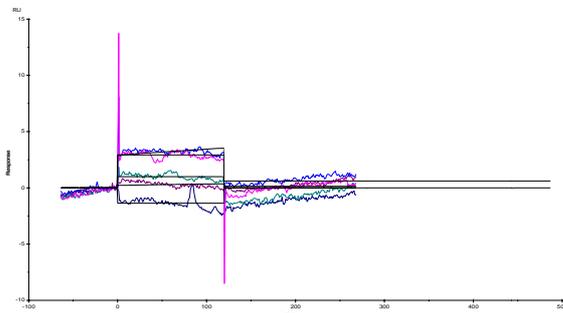


図1a. ニックβ2GPIドメインV- アンギオスタチン間の結合 (BIACOREによる検討)

一方、インタクトβ2GPIドメインVはAS4.5



に対して特異的結合活性を示さなかった(図1b)。

図1b. インタクトβ2GPIドメインV- アンギオスタチン間の結合 (BIACOREによる検討)

ニックβ2GPIドメインVの血管内皮細胞に対する作用 (in vitro):

血管内皮細胞を用いた増殖アッセイではインタクト/ニックβ2GPIドメインVいずれも軽度の細胞増殖抑制能を有した。

リコンビナントニックβ2GPIドメインVの作製(大腸菌):

β2GPIドメインVは大腸菌により充分量が精製された。インタクト/ニックβ2GPIドメインV共に目的通り作成可能であった(図2)。しかし、一方で完全なLPSの除去が困難であり細胞増殖アッセイや今後予定しているin vivoの系に用いるには問題が残った。

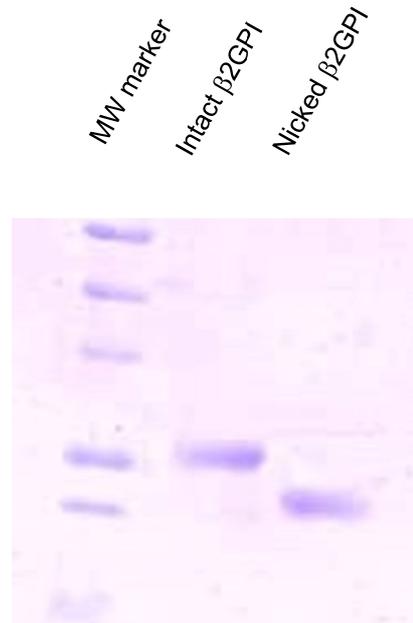


図2. 大腸菌を用いたリコンビナントインタクト/ニックβ2GPIドメインVの作製(CBB染色)

今後の計画としては、LPS混入のリスクが少なく大量に蛋白を発現できる昆虫細胞発現系を用いて充分量のリコンビナント蛋白を作製する必要がある。その上で血管内皮細胞の遊走への影響を評価する目的でMatrigel Invasion chamber (BD Biosciences)を用い、ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)の遊走実験を行う。マトリゲルを通過したHUVECを染色・カウントし、AS4.5存在下にニックβ2GPIドメインVを添加することでAS4.5による内皮細胞遊走抑制効果が阻害されるかどうか確認する。次に、HUVECと線維芽細胞をVEGF, FGF存在下に共培養するin vitro tube formation Assay (Kurabo)を用いてニックβ2GPIドメインVがAS4.5の管腔形成抑制効果を阻害し、結果的

に血管形成を促進するかについて検討する。さらに、マウス皮下における細胞外基質への血管進入を定量的に評価できるアンジオリアクター (Trevigen Inc.) を用いた *in vivo* の検討を行い、AS4.5による血管新生抑制作用をニックβ2GPIドメインVが効果的に阻害しうるかどうかを検討する。

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 18 件)

1. Sakai R, Cho SK, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Amano K, Tanaka Y, Sumida T, Ihata A, Yasuda S, Nakajima A, Sugihara T, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Miura Y, Miyasaka N, Harigai M. The risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors decreased over time; a report from the registry of Japanese rheumatoid arthritis patients for long-term safety (REAL) database. *Rheumatol Int.* 2014 in press (査読有)
2. Kono M, Yasuda S, Kato M, Kanetsuka Y, Kurita T, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Oba K, Kondo M, Mukai M, Yanai M, Fukasawa Y, Atsumi T. Long-term outcome in Japanese patients with lupus nephritis. *Lupus.* 2014 in press (査読有)
3. Kurita T, Yasuda S, Oba K, Odani T, Kono M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amenguak O, Horita T, Atsumi T. The effect of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford).* 2014; in press (査読有)
4. Kataoka H, Yasuda S, Fukaya S, Oku K, Horita T, Atsumi T, Koike T. Decreased expression of Runx1 and lowered production of Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells in systemic sclerosis. *Mod Rheumatol.* 2014 in press (査読有)
5. Amengual O, Horita T, Binder W, Norman GL, Shums Z, Kato M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Atsumi T. Comparative analysis of different enzyme immunoassays for assessment of phosphatidylserine-dependent antiphospholipid antibodies. *Rheumatol Int.* 2014 in press (査読有)
6. Cho SK, Sakai R, Nanki T, Koike R, Watanabe K, Yamazaki H, Nagasawa H, Tanaka Y, Nakajima A, Yasuda S, Ihata A, Ezawa K, Won S, Choi CB, Sung YK, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Miyasaka N, Bae SC, Harigai M; for the RESEARCH investigators; the REAL Study Group. A comparison of incidence and risk factors for serious adverse events in rheumatoid arthritis patients with etanercept or adalimumab in Korea and Japan. *Mod Rheumatol.* 2014 in press (査読有)
7. Jin H, Arase N, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Tanimura K, Matsuoka S, Ebina K, Shi K, Toyama-Sorimachi N, Yasuda S, Horita T, Hiwa R, Takasugi K, Ohmura K, Yoshikawa H, Saito T, Atsumi T, Sasazuki T, Katayama I, Lanier LL, Arase H. Autoantibodies to IgG/HLA class II complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(10):3787-92 (査読有)
8. Oku K, Amengual O, Zigon P, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by

- the phosphatidylserina-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatology (Oxford)*. 2013; 52(10):1775-84 (査読有)
9. Kato M, Atsumi T, Oku K, Amengual O, Nakagawa H, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The involvement of CD36 in monocyte activation by antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2013;22(8):761-71 (査読有)
 10. Yasuda S. Disseminated intravascular coagulation in the presence of antiphospholipid antibodies: differential diagnosis from catastrophic or microangiopathic antiphospholipid syndrome. *Intern Med*. 2013;52(2):169-70 (査読有)
 11. Amengual O, Atsumi T, Oku K, Suzuki E, Horita T, Yasuda S, Koike T. Phospholipid scramblase 1 expression is enhanced in patients with antiphospholipid syndrome. *Mod Rheumatol*. 2013; 23(1):81-8 (査読有)
 12. Fujieda Y, Atsumi T, Amengual O, Odani T, Otomo K, Kato M, Oku K, Kon Y, Horita T, Yasuda S, Koike T. Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012;21(14):1506-14 (査読有)
 13. Odani T, Yasuda S, Ota Y, Fujieda Y, Kon Y, Horita T, Kawaguchi Y, Atsumi T, Yamanaka H, Koike T. Up-regulated expression of HLA-DRB5 transcripts and high frequency of the HLA-DRB5*01:05 allele in scleroderma patients with interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(10):1765-74 (査読有)
 14. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The efficacy of antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum*. 2012;64(2):504-12 (査読有)
 15. Hashimoto T, Yasuda S, Koide H, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R154 (査読有)
 16. Kato M, Atsumi T, Kurita T, Odani T, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. Hepatitis B virus reactivation by immunosuppressive therapy in patients with autoimmune diseases: Risk analysis in hepatitis B surface antigen-negative cases. *J Rheumatol*. 2011;38(10):2209-14 (査読有)
 17. Kato M, Kataoka H, Odani T, Fujieda Y, Otomo K, Oku K, Horita T, Yasuda S, Atsumi T, Tsujino I, Nishimura M, Koike T. The short-term role of corticosteroid therapy for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases: report of five cases and a literatural review. *Lupus*. 2011;20(10):1047-56 (査読有)
 18. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nakajima A, Atsumi T, Yasuda S, Tanaka Y, Saito K, Tohma S, Fujii T, Ihata A, Tamura N, Kawakami A, Sugihara T, Ito S, Miyasaka N, Harigai M. The REAL database reveals no significant risk of serious infection during treatment with a methotrexate dose of more than 8 mg/week in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2011;21(4):444-8 (査読有)
- [学会発表](計 5 件)
- 1) Yasuda S. Diagnosis and treatment of RA in Japan, Experience and recommendations of

using Tocilizumab in general. The 6th Rheumatology Meeting in Aubrac. Best Western Lagiore, Aubrac, France, Jun 11-12, 2013

- 2) Yasuda S, Kubota A, Nakagawa H, Kuroki K, Fujieda Y, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Maenaka K, Atsumi T, Role of β_2 -glycoprotein I Domain V in Angiogenesis. CORA meeting, Novotel Budapest City, Budapest, Hungary, Apr 4-6, 2013
- 3) Yasuda S. IL-6 rationale in RA – from bench side. AURORA meeting. London, UK, Oct 19-20, 2012
- 4) Yasuda S, Odani T, Ota Y, Fujieda Y, Kon Y, Horita T, Kawaguchi Y, Atsumi T, Yamanaka H, Koike T. Haematopoietic stem cell transplantation for interstitial lung diseases in patients with systemic sclerosis; Therapeutic effect and evaluation of up-regulated genes. The 8th international congress on autoimmunity. Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada, Granada, Spain, May 9-13, 2012
- 5) Yasuda S, Kono M, Horita T, Atsumi T, Koike T. Aberrant expression of Mx1 in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. 5th Asian congress on autoimmunity. Singapore, Nov 17-19, 2011

〔図書〕(計 2 件)

1. 保田 晋助, 小池 隆夫; 全身性エリテマトーデスに対する抗体治療 – 分子標的治療開発の道のりと現状 (中山俊憲・中島裕史編; 別冊医学のあゆみ, 抗体医薬 Update – 開発コンセプトから最新治療実績まで, 医歯薬出版株式会社, 東京都) 2012 (総ページ数: 146)
2. 保田 晋助; 顕微鏡的多発血管炎 (宮坂信之編; 膠原病の肺合併症診療マニュアル, 医薬ジャーナル社, 大阪市) 2012

(総ページ数: 207)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

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
<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

保田 晋助 (Shinsuke Yasuda)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 00374231

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :