

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460957

研究課題名(和文) Annexin A2を分子標的にした新規抗TNF療法の開発

研究課題名(英文) Advances in refractory IBD treatment: a new therapeutic target, Annexin A2

研究代表者

谷田 諭史 (Tanida, Satoshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30528782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：TNF- α を産生するADAM17は、その活性化に介在蛋白としてAnnexin A2が必要であることを見出した。Annexin A2遺伝子改変マウス(Annexin A2 $^{-/-}$ マウス)を作製し、炎症性腸疾患(実験腸炎)モデルにおいて、Annexin A2の果たす役割を検討しようとした。Annexin A2 $^{-/-}$ ES細胞を偽妊娠C57Bl/6雌マウス子宮に移入し、キメラマウスを得たが、精巣や子宮付属器の発育が悪く、ノックアウトマウスを作製することができなかった。Annexin A2は、生殖器の発育に関与していることが明らかになった。

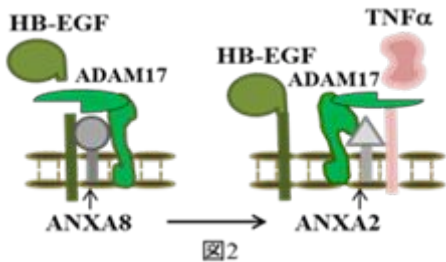
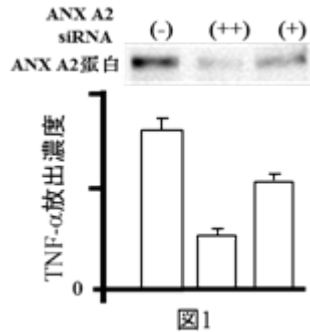
研究成果の概要(英文)：Inhibition of Annexin A2 may be a new therapeutic strategy for the prevention of TNF- α shedding during inflammatory bowel disease inflammation. We try to propose the potential of Annexin A2 as a new molecular target for the treatment of IBD by using Annexin A2 knockout mouse. Annexin A2 knockout mouse cannot be established because chimera mouse's genital organ was immature. Annexin A2 is likely to be associated with mouse's genital organ formation.

研究分野：消化器内科

キーワード：TNF- α ADAM17 Annexin A2

1. 研究開始当初の背景

抗 TNF α 抗体療法は IBD 治療の根底を変えたが、無効例の存在などが問題になりつつある。我々は、最近、ADAM17 が、I 型膜蛋白である EGF リガンドの前駆体から、amphiregulin や HB-EGF を放出 (shedding) する際には、主に ANX A8 (一部 A9) が制御蛋白として作用することを明らかにした。また、この成績にヒントを得て、10 種ある ANX の全種類の遺伝子と有効な siRNA をそれぞれに作成し、スクリーニング実験を繰り返した結果、ADAM17 が TNF- α 転換酵素 (TACE) としての活性を持つためには、ANX A2 が細胞膜上で介在蛋白として作用することを、初めて明らかにした (図 1)。すなわち、ADAM17 が、II 型膜蛋白である前駆体に作用して、細胞外ドメインである TNF- α を shedding するためには、細胞膜上で ANX A8 (A9) に代わり ANX A2 と結合する必要があることを見出した (図 2)。この成績は「ANX A2 と ADAM17 の結合することで、TNF- α 産生を制御している」を明確に示している。ANX A2 が炎症性腸疾患の炎症進展の病態に関与しているメカニズムの詳細は全く不明であった。



2. 研究の目的

- (1) ANX A2 遺伝子ノックアウトマウスを樹立する。TNBS や DSS 惹起炎症性腸疾患腸炎モデルから ANX A2 が炎症の進展にどのように関与しているかを明らかにし治療ターゲットになりうるかを検討する。
- (2) ヒト炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎およびクローン病) 患者において ANX A2 が疾患活動性バイオマーカーとしての役割を果たすかどうかを検討する。

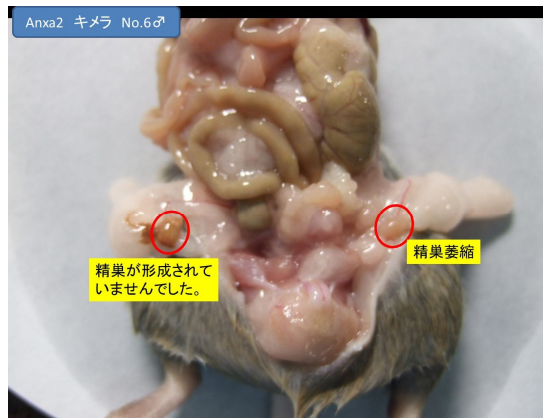
3. 研究の方法

- (1) ANX A2 遺伝子ノックアウトマウスを樹立
ANX A2 遺伝子を不活化するために、チミジンキナーゼ標識 neomycin resistance (neo^r)

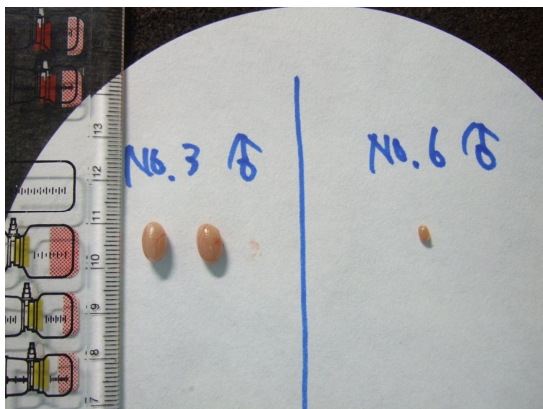
cassette を有するベクターを使い electroporation 法にてマウス ES に遺伝子導入し ANX A2 をコードするマウス genomic DNA 配列 exon3-4 部分を相同遺伝子組換えさせた。neomycin, gancyclovir にて選別することにより作成した ANX A2 ノックアウトマウス ES 細胞を培養、増殖させ、胚盤胞期胚へ ES 細胞 10 - 15 個/胚 \times 200 個顕微注入および移植を行う。状態の良い胚細胞を 25 匹の偽妊娠 C57Bl/6 雌マウス子宮に移入し、16 匹キメラマウス (キメラ率 30-80%) を得た。

4. 研究成果

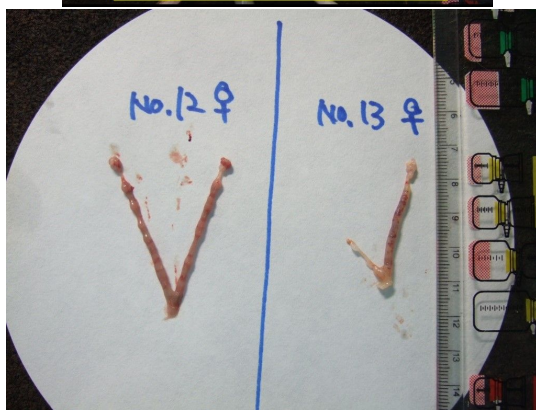
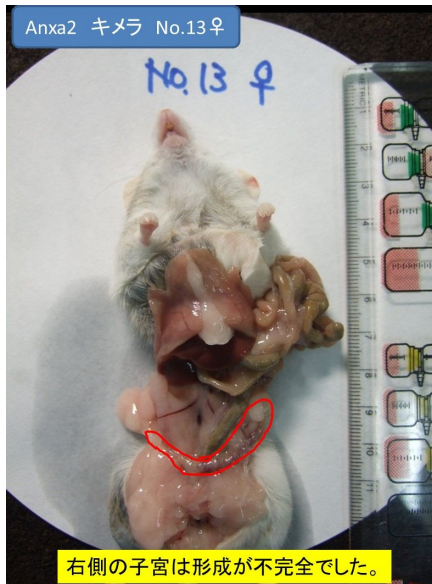
さらにキメラ率 30-80% の 15 匹キメラマウス (雄 11 匹、雌 1 匹) それぞれに、雄には雌を 2 匹ずつ、雌には、雄を 1 匹ずつ一緒に飼育し交配させ、ヘテロマウスを効率よく作製しようとしたが、得ることができなかった。特にキメラ率の高いマウスは、不妊となり、仔ヘテロマウスは生まれてこなかった。原因検索のため、キメラマウスを屠殺、解剖すると、精巣や子宮付属器の発育が非常に悪く、さらに交配し、ヘテロマウスを得るには不可能な生殖器の発育不良が観察された。精巣や子宮付属器の発育が非常に悪い状態。雄キメラマウス (キメラ率 70%)



精巣は萎縮し、精巣が形成されていなかった。



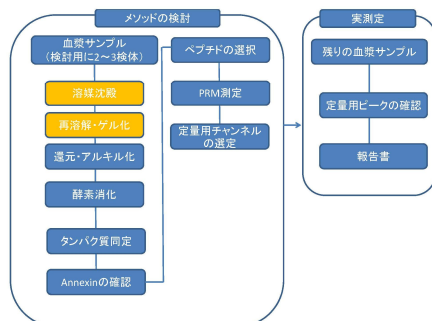
また、雌キメラマウス (キメラ率 70%) でも右の子宮の形成が不完全であった。ANX A2 ノックアウトマウス ES 細胞を培養し、数を増やし胚盤胞にインジェクションし、状態の良い胚盤胞細胞を偽妊娠 C57Bl/6 雌マウ



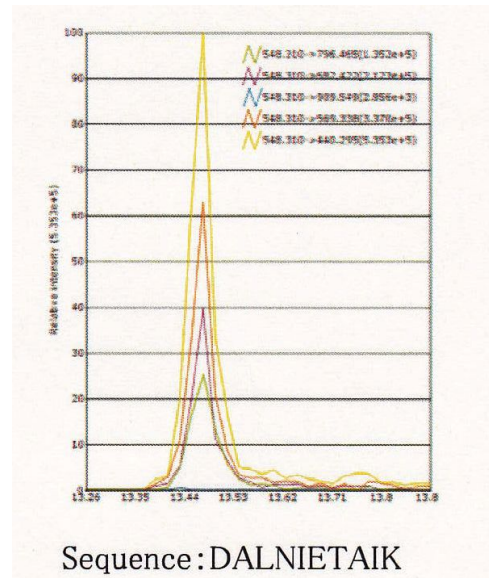
ス子宮に移入し、キメラマウス（キメラ率 30-80%）を複数得る作業を繰り返し 3 回行った。しかしながら、特にキメラ率の高いマウスは、妊孕性がなく不妊となった。解剖すると、精巣や子宮付属器の発育が非常に悪く、不妊の原因と考えた。以上のことから ANX A2 は、生殖器発育にかかわる重要な遺伝子だと結論づけた。

(2) 炎症性腸疾患患者における ANX A2 が疾患活動性バイオマーカーとしての検討、ANX A2 測定系の構築

血清中、尿中 ANX A2 測定のための測定系を確立する。ANX A2 を定量する方法が存在しないため質量分析を使って測定系を構築する必要があると考えた。次の手順に従って測定系を構築した。



まず、ANX A2 リコンビナント蛋白を得るため、共同研究者である愛媛大学東山教室でコムギ胚芽無細胞蛋白質合成法を利用した試験管内蛋白質合成システムで、ANX A2 リコンビナント蛋白を合成、精製した。そのあと、ANX A2 を特異的に検出できる 10 種のペプチドを決定した。



今後、実際の炎症性腸疾患患者において疾患活動性バイオマーカーとしての役割を果たすかどうかを検討している。

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 1 件)

1. Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Katano T, Kataoka H, Kamiya T, Joh T. Advances in refractory ulcerative colitis treatment: A new therapeutic target, Annexin A2. World J Gastroenterol. 2015 Aug 7;21(29):8776-86. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8776. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 谷田諭史、溝下 勤、尾関啓司、片野敬仁、西江裕忠、林 則之、森 義徳、久保田英嗣、片岡洋望、城 卓志 腸管ペーチェット病に対するアダリムマブの長期効果第 12 回日本消化管学会総会学術集会 一般演題 4 「大腸 IBD そのほか 1」 2016.2.26 東京 京王プラザホテル(東

京都新宿区)
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷田 諭史 (TANIDA Satoshi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30528782

(2) 研究分担者

城 卓志 (JOH Takashi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30231369

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA Shigeki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60202272