

急性期炎症時の肝臓細胞における
ロイシンリッチ α_2 -グリコプロテイン (LRG) の発現

白井 僚一^{*a}, 平野 文康^a, 大蔵 直樹^b, 池田 潔^a, 井上 晴嗣^a

Up-regulation of the Expression of Leucine-rich α_2 -glycoprotein in Hepatocytes
by the Mediators of Acute-phase Response

Ryoichi SHIRAI^a, Fumiyasu HIRANO^a, Naoki OHKURA^b, Kiyoshi IKEDA^a, and Seiji INOUE^a

^a Laboratory of Biochemistry, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara,
Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

^b Department of Clinical Molecular Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,
Kanagawa 229-0195, Japan

(Received October 29, 2009; Accepted November 19, 2009)

Leucine-rich α_2 -glycoprotein (LRG) is a serum glycoprotein in which leucine-rich repeats were first discovered. Although the function of LRG is unknown, increases in the serum level of LRG have been reported in various diseases. In the present study, we found that LRG was induced by recombinant human IL-6 in human hepatoma HepG2 cells. The induction of LRG by IL-6 was up-regulated synergistically with either IL-1 β or TNF α in a pattern similar to those for type I acute-phase proteins. We also found that lipopolysaccharide administered intraperitoneally to mice enhanced dose-dependently the expression of LRG mRNA in the liver as well as that of mouse major acute-phase proteins. These results strongly suggest that LRG is a secretory type I acute-phase protein whose expression is up-regulated by the mediator of acute-phase response. LRG might be useful in qualitative assessments as a biomarker for certain diseases including microbial infections.

Key words—Leucine-rich α_2 -glycoprotein; Leucine-rich repeats; Acute-phase proteins; Interleukin 6; Inflammation; Lipopolysaccharide; Serum amyloid; Hepatocytes

1. はじめに

ヒトの血清中に存在するロイシンリッチ α_2 -グリコプロテイン (LRG) は、1977年に Haupt と Baudner によってヒトの血清から単離され [1], 1985年にはそのアミノ酸配列が決定された [2]. その配列は非常にユニークなもので、312残基の

うち66残基がロイシンで、また、分子の中央部には、ロイシン、プロリン、およびアスパラギンが特定の位置に存在する24残基のコンセンサス配列を8回繰り返す構造が存在する。このような特徴的なコンセンサス配列を複数回繰り返す構造はロイシンリッチリピート (LRR) 構造と呼ばれ、その後、多くのタンパク質に見出されるようになって

* 現所属：鳥取県生活環境部衛生環境研究所保健衛生室, e-mail: shirair@pref.tottori.jp

^a 大阪薬科大学生化学研究室

^b 帝京大学薬学部臨床分子生物学教室

本論者は、白井僚一の博士論文の一部を再構成し、さらに新たな知見を加筆したものである。

た [3, 4] が, LRR 構造が最初に発見された LRG については, 現在までに生理作用が明らかになっていない。

近年, 二次元ゲル電気泳動と質量分析を利用したプロテオミクス技術の発展に伴い, 疾病プロテオーム解析やバイオマーカーの探索が広く行われ, LRG はインフルエンザウィルス感染時に増加すること [5], 嚢胞性線維症のマウス小腸では LRG の発現が約 21 倍に増加していること [6], 急性宿主片対宿主病 (GVHD) の血漿中では LRG が約 3.5 倍に増加していること [7], 肺がん患者の血清では LRG が約 6 倍に増加していること [8], 膵臓がん患者の血漿では LRG が約 3 倍に増加していること [9] など, 種々の病態に伴う血中 LRG 量の増加が次々に報告されている。

そこで本研究では, 炎症時において LRG が増加するかを調べるために, ヒト肝がん由来培養細胞 HepG2 における炎症性サイトカインによる LRG 発現の誘導と LPS 投与マウスの肝臓における LRG 発現について検討した。

2. 炎症性サイトカイン刺激によるヒト肝がん細胞 (HepG2 細胞) における LRG mRNA の発現量の変化

IL-6 などの炎症性サイトカインは, 肝臓における急性期タンパク質の産生を促進することが知られている。もし LRG が急性期タンパク質であるならば, 炎症性サイトカインによる刺激により, 肝臓における LRG 量は増加するはずである。そこで, ヒト肝がん細胞である HepG2 細胞について, 炎症性サイトカインの添加により LRG の mRNA の発現量が増加するかどうかを調べた。LRG mRNA の発現量は, 하우스キーピング遺伝子である GAPDH mRNA の発現量に対する相対値として, リアルタイム PCR 法により求めた。HepG2 細胞を含む培地に, 炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-6, および TNF α をそれぞれの最終濃度

が 10 ng/ml になるように添加し, LRG mRNA の発現量を経時的に調べた。このときに添加するサイトカインの濃度は, 類似の実験報告を参考にし決定した [10]。IL-6 の添加後, LRG mRNA の発現量は経時的に増加し, 添加後 6 時間で約 7 倍になり, 添加 24 時間後にはもとのレベルにもどった。しかし, IL-1 β や TNF α を添加した場合には, IL-6 添加の場合のような顕著な変化はみられなかった (Fig.1, A-D)。一方, IL-6 と IL-1 β , または IL-6 と TNF α を同時添加した場合, LRG mRNA の発現量は通常時の約 10 倍にまで, すなわち IL-6 の単独添加の場合の約 2 倍にまで増加した。また, この場合には, IL-6 の単独添加の場合と異なり, 24-48 時間後においても通常時の約 5 倍の発現量がみられた (Fig.1, E, F)。

LRG mRNA の発現量がサイトカインの添加後 2 時間で増加したことから, LRG は急性期タンパク質として機能する可能性が高いと思われた。そこで, ヒトの代表的な急性期タンパク質として知られる C-reactive Protein (CRP) と Serum Amyloid A (SAA), および II 型 Phospholipase A₂ (PLA₂) の発現時期や発現量を調べ, LRG の発現時期や発現量と比較した。

CRP はヒトにおいて最もよく知られている急性期タンパク質であるが, HepG2 細胞における CRP mRNA の発現量は元々少なく, サイトカインを添加してもほとんど変化しないことがわかった (発現量が検出限界レベルであり誤差が大きいため, データには示していない)。IL-6 などの添加により HepG2 細胞における CRP の発現が 4 倍に増加することを ELISA により認めたとの報告はあるが [11,12], これまでに CRP mRNA の量が増加したとの報告はない。IL-6 や他のサイトカイン添加による CRP プロモーターの活性を調べた報告 [13] はあるが, この場合 1-kb のプロモーターをルシフェラーゼレポーター遺伝子につないだコンストラクトを安定的に発現する HepG2 細胞 (HepG2-ABEK14 cell) が用いられている。通常の HepG2

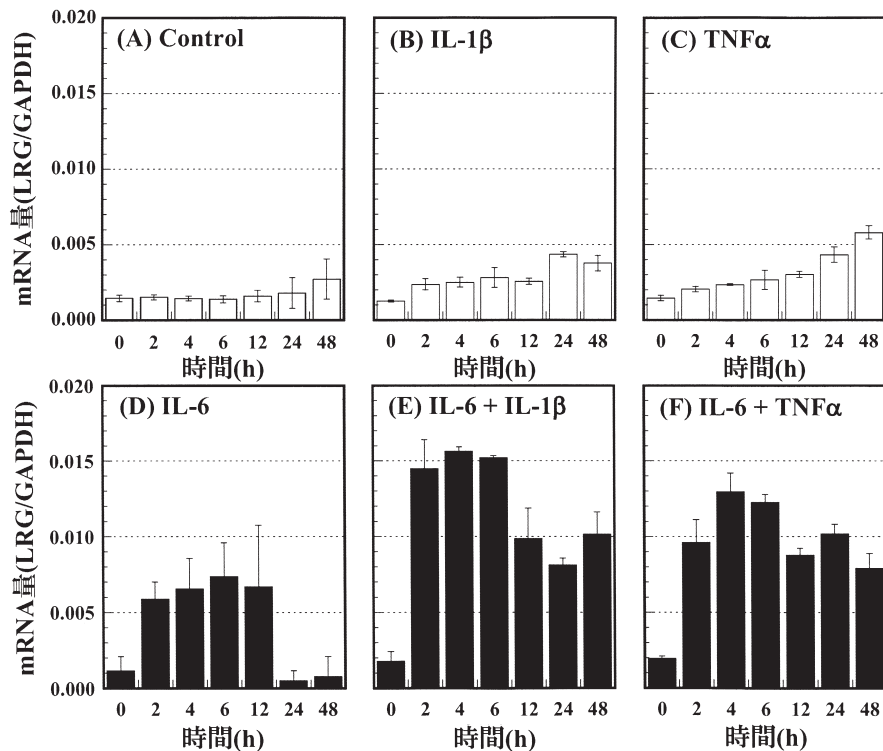


Fig. 1 炎症性サイトカイン添加後 HepG2 細胞の LRG mRNA 発現量の経時的変化

種々の炎症性サイトカインが 10 ng/ml になるように HepG2 細胞に添加し、経時的に細胞を回収した。回収後の細胞の LRG mRNA 発現量を、リアルタイム PCR 法で定量し、何も添加していないもの (A) と比較した。LRG mRNA 量は GAPDH mRNA 量の相対量として算出した。(B) は IL-1 β 単独, (C) は TNF α 単独, (D) は IL-6 単独, (E) は IL-6 と IL-1 β の併用, および (F) は IL-6 と TNF α の併用添加した結果である。

細胞では CRP mRNA の発現はタンパク質レベルでも遺伝子レベルでも確認されていない [13] ので、HepG2 細胞では CRP 遺伝子に変異が起こっているのかもしれない。

一方、SAA mRNA の発現量は、IL-6 を添加して 4 時間後に、添加しなかった場合の約 10 倍に増加し、IL-6 と IL-1 β の同時添加では約 730 倍に増加し、IL-6 と TNF- α の同時添加では約 210 倍にまで増加した。ただし、ヒト SAA 遺伝子には 4 つのサブタイプが存在し、SAA1 と SAA2 が同様に急性期タンパク質として機能す

ることが知られており、今回設計した SAA のプライマーは SAA1 と SAA2 遺伝子の両方を検出でき、それらの PCR 産物の配列も全く同じなので、本実験では SAA1 mRNA と SAA2 mRNA の総量を定量したことになる。他方、PLA₂ mRNA の発現量は、IL-6 を添加して 4 時間後に、添加しなかった場合の約 2.5 倍に増加し、IL-6 と IL-1 β の同時添加では約 30 倍に増加し、IL-6 と TNF- α の同時添加では約 4 倍にまで増加した (Fig.2-A)。このように、LRG mRNA の発現量の増加は SAA mRNA の発現量の増加より小さかったが、PLA₂ mRNA と LRG

mRNA がほぼ同様の発現パターンを示したことから、LRG は急性期タンパク質の一種であると考えられた。

また、HepG2 細胞から分泌された LRG の濃度を LRG 抗体を用いる ELISA により測定することを試みたが、成功しなかった。そこで、サイトカインを添加して 48 時間後の細胞培養培地を濃縮し、LRG 抗体を用いるウェスタンブロッティングを行った結果、何も添加しなかった細胞の培地については LRG を検出できなかったが、サイトカインを添加した細胞の培地については LRG のバンドを検出することができた。また、IL-6 を単独で添加した場合よりも、IL-6 と IL-1 β 、または IL-6 と TNF- α を同時添加した場合の方が LRG のバンドが濃く、その発現量が多いことが確認できた (Fig.2-B)。

3. リポ多糖 (LPS) 投与マウスにおける LRG mRNA の発現量の変化

HepG2 細胞を用いた実験では、IL-6 などのサイトカインによる刺激により LRG mRNA の発現量が増加することが確認されたので、in vivo でも同様の変化が起こるかどうかを調べた。LPS はグラム陰性菌の主要な細胞外毒素 (エンドトキシン) であり、マクロファージを刺激して IL-6 などの炎症性サイトカインを放出させるので、LPS をマウスに投与することにより急性期タンパク質の発現量の変化を調べることができる。そこで、LPS を 20mg/ 体重 kg で投与し、エンドトキシンショックで死亡した 12 匹のマウスの肝臓における LRG mRNA 発現量を先述と同様なリアルタイム PCR 法により求めた (Fig. 3-A)。その結果、LPS を投与

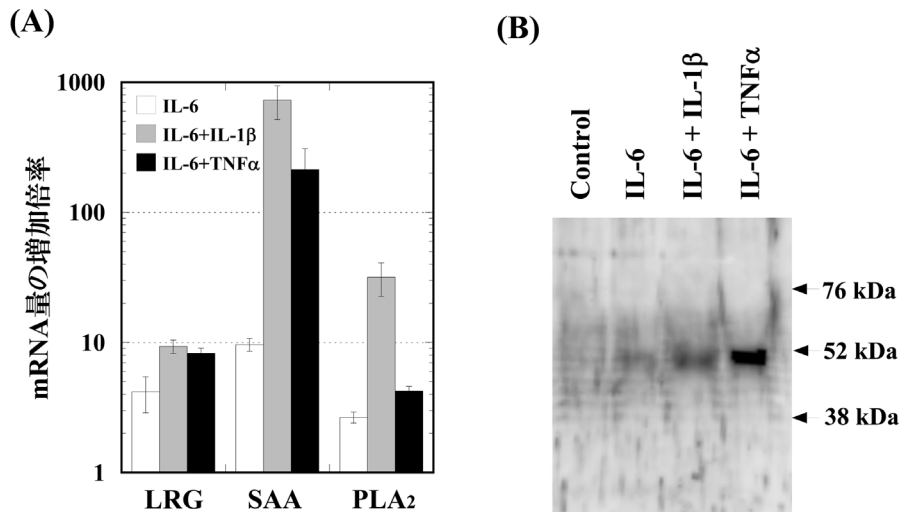


Fig. 2 サイトカイン同時添加による LRG mRNA 発現量の相乗効果

(A) HepG2 細胞に、IL-6 単独 (10 ng/ml)、IL-6 (10 ng/ml) と IL-1 β (10 ng/ml) の併用、および IL-6 (10 ng/ml) と TNF α (10 ng/ml) の併用添加し、4 時間後の細胞における LRG mRNA、SAA mRNA、および PLA₂ mRNA 発現量を比較した。それぞれの mRNA 発現量は GAPDH mRNA 量の相対量としてリアルタイム PCR 法により定量し、非添加時におけるそれぞれの遺伝子の mRNA 量を 1 とした増加倍率で表した。

(B) HepG2 細胞に、IL-6 単独 (10 ng/ml)、IL-6 (10 ng/ml) と IL-1 β (10 ng/ml) の併用、および IL-6 (10 ng/ml) と TNF α (10 ng/ml) の併用添加し、48 時間後の細胞培養液中の LRG 発現量を、抗 LRG 抗体を用いるウェスタンブロット法で調べた。

したものは、何も投与していないものに比べ、3-10 倍もの LRG mRNA が発現していることがわかった。このことから、LRG は敗血症などの炎症時に多量に発現することが考えられた。

マウスにおいて、炎症時に多量の発現がみられる代表的な急性期タンパク質には、SAA や Serum Amyloid P (SAP) などがある [14]。このエンドトキシンショックで死亡したマウスの肝臓を用いて、リアルタイム PCR 法によってこれらの mRNA の発現量を求め、LRG mRNA の発現量変化との相関があるかどうかを調べた。Fig. 3-B に示すように、エンドトキシンショックで死亡したマウスの SAP mRNA 量は、2 匹を除いて、何も投与していないものに比べ、4-20 倍に増加

していた。また、LRG mRNA と SAP mRNA の発現量には、相関係数 0.54 の正の相関がみられた (Fig.3-C)。この値は危険率 $p < 0.05$ であり統計的に有意である。一方、SAA mRNA については複数の PCR 産物が得られたため、定量値は正確でないが、明らかにコントロールよりも多量に発現していることがわかった。SAA には塩基配列が極めて似ている 4 つのサブタイプが存在することが確認されており [15]、SAA1 に対するプライマーを設計したが、このプライマーが SAA2 に対しても反応したため、定量値が正確でなかったと考えられる。マウスでは SAA1 も SAA2 も急性期タンパク質として機能していることが知られているので [16]、SAA についても、エンドトキシンショック

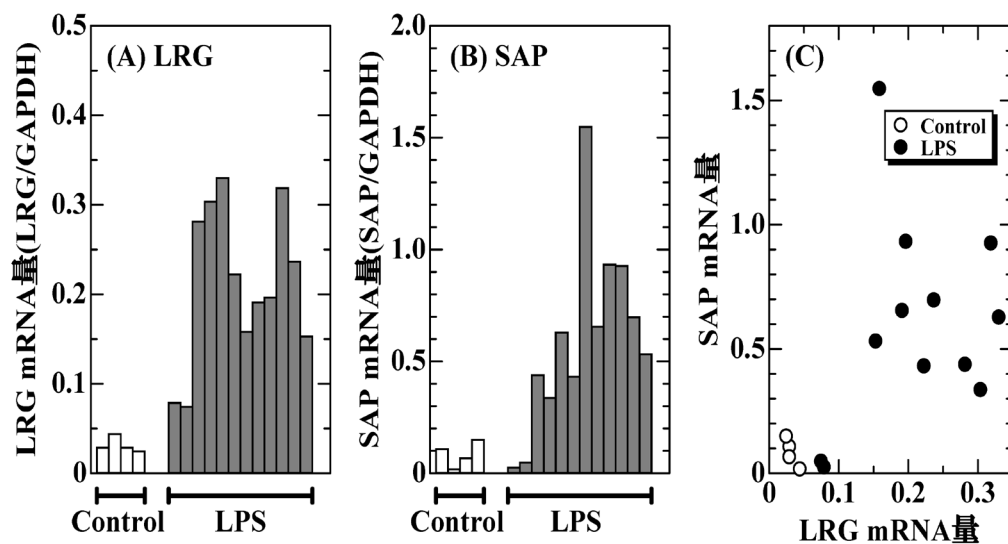


Fig. 3 エンドトキシンショックで死亡したマウス肝臓の LRG mRNA および SAP mRNA の発現量

致死量の LPS を 12 匹のマウス腹腔内に投与し、エンドトキシンショックで死亡した後の肝臓における LRG mRNA 発現量、および SAP mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。LRG mRNA および SAP mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH mRNA 発現量の相対値として算出した。(A) は LRG mRNA 発現量を (B) は SAP mRNA 発現量を示す。また、LRG mRNA 発現量 と SAP mRNA 発現量の相関性を調べるために、横軸に LRG mRNA 発現量を縦軸に SAP mRNA 発現量を取り、それぞれの個体の値をプロットした結果を (C) に示す。

で発現が増加していることは確かであろう。LRG mRNA の発現量が SAP mRNA の発現量と正の相関を示したことから、LRG も急性期タンパク質として機能している可能性が高い。

次に、0 - 1 mg/ 体重 kg の用量で LPS をマウスに投与し、肝臓における LRG mRNA の量と SAA mRNA の量、および SAP mRNA の量を定量した。Fig.4 に示すように、これらすべての mRNA の発現量は LPS によって投与量依存的に増加した。LPS の投与量とそれぞれの mRNA の発現量の相関を調べた結果、LRG については $r = 0.51$, $P = 0.006$, SAA については $r = 0.47$, $P = 0.012$, SAP については $r = 0.35$, $P = 0.071$ で、LRG の相関性が最も高いことがわかった。また、LRG mRNA の発現量の増加は、SAA mRNA の発現量の増加といくらか高い相関を示した ($r = 0.60$, $P = 0.0007$)。

一方、マウス血液中の LRG タンパク質の濃度を、ウサギ抗マウス LRG 抗体を用いる ELISA 法により調べることを試みたが、成功しなかった。

4. 考察

以上の結果から、LRG は急性期タンパク質の一つとして発現することが明らかになった。急性期タンパク質は、それらの誘導に効果的なサイトカイン刺激の種類によって I 型と II 型に分類される [17]。IL-6 と他のサイトカインによる同時刺激による発現量の増加が、IL-6 による単独刺激の場合よりも大きいのが I 型急性期タンパク質で、例として SAA や CRP、および PLA₂ がある。一方、IL-6 のみによる単独刺激によって発現量が最大になるのは II 型急性期タンパク質で、fibrinogen や

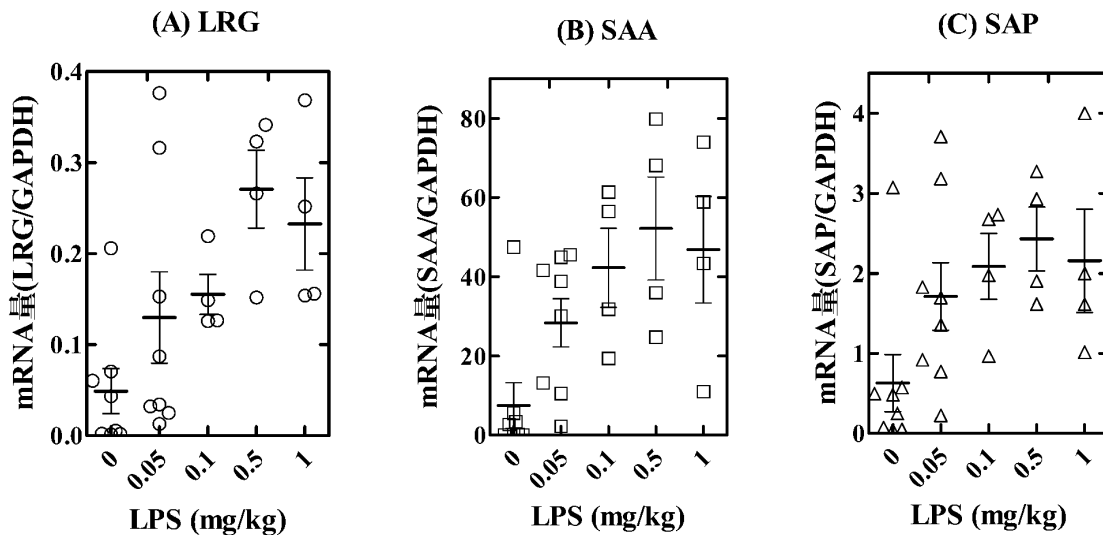


Fig. 4 LPS 投与量とマウス肝臓における LRG mRNA, SAA mRNA, および SAP mRNA の発現量の相関

種々の濃度の LRG をマウスの腹腔内に投与し、6 時間後の肝臓における LRG mRNA 発現量, SAA mRNA 発現量, および SAP mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH mRNA 発現量の相対値として算出した。

α_2 -macroglobulin がその例である [18]. 本研究において, LRG の発現量の増加は, IL-6 による単独刺激よりも, IL-6 と IL-1 β または TNF α による同時刺激の場合の方が大きいことから, LRG は I 型急性期タンパク質であると判断した.

また, LPS 投与量と LRG mRNA の発現量の増加は, 他の急性期タンパク質の発現量増加に比べて最も高い相関性を示したことから, 種々の疾患におけるバイオマーカーとしての応用が可能になることも考えられる.

謝辞 本研究において, エンドトキシンショックで死亡したマウスをご提供いただきました大阪薬科大学臨床薬剤学研究室の津倉由里博士ならびに田中一彦教授に深く感謝いたします.

REFERENCES

- Haupt, H. & Baudner, S. (1977) Isolation and characterization of an unknown, leucine-rich 3.1-S- α_2 -glycoprotein from human serum, *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.*, **358**, 639-646
- Takahashi, N., Takahashi, Y. & Putnam, F. W. (1985) Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich α_2 -glycoprotein of human serum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 1906-1910
- Buchanan, S. G. & Gay, N. J. (1996) Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **65**, 1-44
- Kobe, B. & Kajava, A. V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 725-732
- Bini, L., Liberatori, S., & Pallini, V. (2004) In *Biomedical Application of Proteomics*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 227-243
- Norkina, O., Kaur, S., Ziemer, D., & De Lisle, R. C. (2004) Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **286**, G1032-1041
- Wang, H., Clouthier, S. G., Galchev, V., Misek, D. E., Duffner, U., Min, C. K., Zhao, R., Tra, J., Omenn, G. S., Ferrara, J. L., & Hanash, S. M. (2005) Intact-protein-based high-resolution three-dimensional quantitative analysis system for proteome profiling of biological fluids. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 618-625
- Okano, T., Kondo, T., Kakisaka, T., Fujii, K., Yamada, M., Kato, H., Nishimura, T., Gemma, A., Kudoh, S., & Hirohashi, S. (2006) Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*, **6** 3938-3948
- Deng, R., Lu, Z., Chen, Y., Zhou, L., & Lu, X. (2007) Plasma proteomic analysis of pancreatic cancer by 2-dimensional gel electrophoresis. *Pancreas*, **34**, 310-317
- Crowl, R. M., Stoller, T. J., Conroy, R. R., & Stoner, C. R. (1991) Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response, *J. Biol. Chem.*, **266**, 2647-2651
- Smith, J. W., & McDonald, T. L. (1992) Production of serum amyloid A and C-reactive protein by HepG2 cells stimulated with combinations of cytokines or monocyte conditioned media: the effects of prednisolone, *Clin. Exp. Immunol.*, **90**, 293-299
- Shimetani, N., Suzuki, M., Shimetani, K., Nishikawa, T. & Mori, M. (2003) Effects of cytokines and immunosuppressants on the production of serum amyloid A protein and C-reactive protein in HepG2 cells, *Dokkyo Journal of Medical Sciences*, **30**, 131-139
- Ivashchenko, Y., Kramer, F., Sch?fer, S., Bucher, A., Veit, K., Hombach, V., Busch, A., Ritzeler, O., Dedio, J. & Torzewski, J. (2005) Protein kinase C pathway is involved in transcriptional regulation of C-reactive protein synthesis in human hepatocytes, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 186-192
- Sipe, J. D., Vogel, S. N., Szein, M. B., Skinner, M. & Cohen, A. S. (1982) The role of interleukin 1 in acute phase serum amyloid A (SAA) and serum amyloid P

(SAP) biosynthesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **389**,137-150

- 15) Yamamoto, K., Goto, N., Kosaka, J., Shiroo, M., Yeul, Y. D. & Migita, S. (1987) Structural diversity of murine serum amyloid A genes. Evolutionary implications, *J. Immunol.*, **139**, 1683-1688
- 16) Yamamoto, K. & Migita, S. (1985) Complete primary structures of two major murine serum amyloid A proteins deduced from cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 2915-2919
- 17) Baumann H., & Gauldie J. (1994) The acute phase response. *Immunol. Today*, **15**, 74-80.
- 18) Baumann H. & Gauldie J. (1990) Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol. Biol. Med.*, 7147-7159.