

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14947

研究課題名(和文) 顕微鏡的多発血管炎モデルマウスの開発と応用

研究課題名(英文) Development of a mouse model of microscopic polyangiitis

研究代表者

佐々木 雄彦 (Sasaki, Takehiko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50333365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡的多発血管炎(Microscopic Polyangiitis, MPA)は、小血管を障害する壊死性血管炎で、肺胞出血、重度の腎不全、多発性単神経炎などの重篤な臓器障害を合併する自己免疫疾患である。MPAは難治性で再発性であるため、病態解明と新たな治療法の開発が望まれている。我々は、新しい*C. albicans* 由来分画を用いてマウスにヒトMPAを模した小血管炎を再現する方法を確立した。PI3K 欠損好中球ではNETs形成が有意に抑制され、この誘発法をPI3K 欠損マウスに適応したところ、MPA様小血管炎の発症は有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Microscopic polyangiitis (MPA) is a form of small vessel vasculitis (SVV) primarily affecting arterioles, capillaries and venules. Aberrant neutrophil extracellular traps (NETs) play a role in MPA induction but a lack of suitable mouse models has precluded elucidation of the mechanism. We have developed a new mouse model of MPA based on administration of a novel fungal immunostimulant, termed CANDE. CANDE induced NET formation both in vitro and in vivo. CANDE-treated mice displayed disease closely recapitulating human MPA, with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCAs) in serum; necrotizing SVV in the lung; and necrotizing glomerulonephritis with crescent formation. Using this MPA model, we demonstrate that loss of phosphoinositide-3-kinase p110 $\alpha$  inhibits NET formation in vitro and in vivo, decreases serum ANCA levels, and alleviates organ damage.

研究分野：脂質生物学

キーワード：血管炎 リン脂質 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ (NETs) は、クロマチン構造にタンパク質が混在する構造物で、形質膜の破裂とともに細胞外に形成され、微生物と結合し、効果的な殺菌に寄与している。NETs の形成には、活性酸素を生成する NOX 活性が必要であることが最近報告されている。NOX 活性は、イノシトールリン脂質による NOX 構成分子群のアセンブリー制御により調節されている。

一方、顕微鏡的多発血管炎 (MPA) は、小型血管に激しい好中球浸潤を伴う難治性の自己免疫疾患で、病因や病態の多くは未解明である。最近、異常な NETs の形成が抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 産生と MPA の発症に関わることが示唆されている。従来の血管炎動物モデルには、特定の近交系で特定の遺伝子変異を有するマウス、*Candida albicans* 水溶性抽出物 (CAWS) 誘発モデルやアルブミン誘発モデルなどが知られている。しかし、いずれのモデルでも血管炎病型がヒトの MPA とは異なり、MPA の病因や病態解明のためにはヒト MPA を再現できる動物モデルの確立が待たれていた。

## 2. 研究の目的

申請者は予備的検討で、従来法の CAWS 腹腔内投与に低用量の Lipopolysaccharide (LPS) を併用することにより C57BL/6 野生型マウスに高力価の ANCA 陽性、肺胞出血を伴う肺毛細血管炎、糸球体腎炎を認め、病型がヒト MPA に非常に近似した小型血管炎を誘導できることを初めて見出していた。本萌芽研究で、MPA 誘発プロトコルを詳細に検討し、至適条件を決定する。さらにこの方法を、申請者が独自に作製・解析したイノシトールリン脂質代謝酵素 PIK3CG (p110 $\gamma$ ) 欠損マウスなどに適用し、血管炎とイノシトールリン脂質代謝の連関を明らかにする。以上により、この独

自の誘発型 MPA モデルを洗練化し、確立するとともに有用性を示し、病態関連新規知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### MPA 誘発物質の調製

顕微鏡的多発血管炎 (MPA) を簡便に誘発できる *C. albicans* 由来物質 (のちに CANDE と名付けた) を調製する。菌株、培養条件 (培地、温度、培養時間) の最適化を行う。

### 投与プロトコルの確立

マウスの性別、週齢、CANDE、LPS 投与量、回数、期間を含むプロトコルを詳細に検討し

### 生物活性評価法

間接蛍光抗体法による好中球細胞外トラップ誘発率、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 力価の測定、ルミノールを用いた経時的活性酸素種定量解析、末梢血好中球数測定、サイトカインレベルの測定、肺毛細血管炎、糸球体腎炎の組織化学的解析。

## 4. 研究成果

(1) 我々の新製法による *C. albicans* 由来分画は、*in vitro* で NET inducer として知られている lipopolysaccharide と同等の NETs 誘発率を認めた。これは従来の *C. albicans* 由来分画 (アルカリ抽出法) よりも有意に高率だった。この新しい *C. albicans* 由来分画はマウス皮下組織に過剰な NETs 形成を誘発した。この *C. albicans* 由来分画の 6 週間の反復投与により野生型マウスは検尿異常 (尿タンパク陽性、尿潜血陽性)、ANCA 抗体価の上昇、肺の壊死性小血管炎、肺胞出血、細胞性半月体を伴う分節性壊死性糸球体腎炎を来し、低頻度ながら末梢神経炎を合併した。これらの所見はヒトの MPA に非常に類似するため、この方法を用いることにより、マウスに MPA を模した小血管炎を再現できることが明らか

になった。この MPA マウスモデルでは、生体内で NETs の誘発から疾患発症までを観察できることから、MPA の病態解明と新たな治療法の有効性の評価に有用と思われる。

(2) Phosphoinositide 3 kinase gamma (PI3K  $\gamma$ ) は PI(3,4,5)P3 産生酵素の 1 つで好中球の ROS 産生や遊走に必須である。PI3K  $\gamma$  欠損マウス由来好中球では、in vitro および in vivo で NETs 形成が有意に抑制された。PI3K  $\gamma$  欠損マウスに前述の方法で MPA 様小血管炎を誘発した結果、検尿異常、ANCA 抗体価、肺および腎の MPA 関連病変の重症度は軽減された。以上から、PI3K  $\gamma$  は MPA 治療において有望な標的分子となり得ることが示唆された。

#### 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 15 件)

1. Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, Takubo K, Goto M, Nagata K, Nakanishi H, Shindou H, Okamura T, Ito C, Toshimori K, Sasaki T, Shimizu T: Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J Biol Chem.* in press, 2017
2. Shindou H, Koso H, Sasaki J, Nakanishi H, Sagara H, Nakagawa KM, Takahashi Y, Hishikawa D, Iizuka-Hishikawa Y, Tokumasu F, Noguchi H, Watanabe S, Sasaki T, Shimizu T: Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem.* in press, 2017
3. Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A.: MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2017.58., 2017
4. Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa SI, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H.: Decreased 16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Sci Rep.* 7:45050, 2017
5. Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T: Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. *JCI Insight* 2, e89462, 2017
6. Morioka S, Nigorikawa K, Sasaki J, Hazeki K, Kasuu Y, Sasaki T, Hazeki O: Myeloid cell-specific inositol polyphosphate-4-phosphatase type I knockout mice impair bacteria clearance in a murine peritonitis model. *Innate Immun* 6, 444-451, 2016
7. Huang M, Koizumi A, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Nakanishi H, Numakura K,

- Tsuruta H, Saito M, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T: Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis* **5**, e195, 2016
8. Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki SO, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-Ya K, Mimori K, Suzuki A.: Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- $\beta$  signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **113**, E71-80, 2015
  9. Norton L, Lindsay Y, Deladeriere A, Chessa T, Guillou H, Suire S, Lucocq J, Walker S, Andrews S, Segonds-Pichon A, Rausch O, Finan P, Sasaki T, Du CJ, Bretschneider T, Ferguson GJ, Hawkins PT, Stephens L: Localizing the lipid products of PI3K $\gamma$  in neutrophils. *Adv Biol Regul* **60**, 36-45, 2015
  10. Hammond GR., Takasuga S., Sasaki T, Balla T.: The ML1Nx2 phosphatidylinositol 3,5 bisphosphate probe shows poor selectivity in cells. *PLoS One* **10**: e0139957, 2015
  11. Nigorikawa K., Hazeki K., Sasaki J., Omori Y., Miyake M., Morioka S., Guo Y., Sasaki T, Hazeki O.: Inositol polyphosphate-4-Phosphatase type I negatively regulates phagocytosis via dephosphorylation of phagosomal PtdIns(3,4)P2. *PLoS One* **10**: e0142091, 2015
  12. Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T.: INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discovery*. **5**, 730-739, 2015
  13. Chew CL, Lunardi A, Gulluni F, Ruan DT, Chen M, Salmena L, Nishino M, Papa A, Ng C, Fung J, Clohessy JG, Sasaki J, Sasaki T, Bronson RT, Hirsch E, Pandolfi PP: In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K/AKT signaling at endosomes. *Cancer Discovery*. **5**, 740-751, 2015
  14. Ip LR, Poulgiannis G, Viciano FC, Sasaki J, Kofuji S, Spanswick VJ, Hochhauser D, Hartley JA, Sasaki T, Gewinner CA.: Loss of INPP4B causes a DNA repair defect through loss of BRCA1, ATM and ATR and can be targeted with PARP inhibitor treatment. *Oncotarget*. **6**, 10548-10562, 2015
  15. Ayukawa T., Akiyama M., Mummery-Widmer JL., Stoeger T., Sasaki J., Knoblich JA., Senoo H., Sasaki T, Yamazaki M.: Dachous-Dependent Asymmetric Localization of Spiny-Legs Determines Planar Cell Polarity Orientation in Drosophila. *Cell Rep*. **8**, 610-621, 2014

1. 佐々木雄彦, 細胞膜リン脂質の修飾, 国際高等研究所 研究プロジェクト「生命活動を生体高分子へ修飾から俯瞰する」2014年第1回 研究プログラム、平成26年9月9-10日 京都
  2. Takehiko Sasaki, Critical roles of class III PI3K in myofibril maintenance and protein quality control in cardiomyocytes, 39th Symposium on Hormones and Cell Regulation European Society of Endocrinology 平成26年10月9-12日 Mont Ste Odile, Alsace, France
  3. Takehiko Sasaki, A New Methodology for Studying Phosphoinositide Signaling at the Molecular Species Level, PI3-Kinase Signaling Pathways in Disease, Keyston Symposium, 平成27年1月13-18日, Vancouver, British Columbia, Canada
  4. Takehiko Sasaki, Endosomal phosphoinositide metabolism and associated diseases, 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 平成27年2月10-12日, Tokyo, Japan
  5. Hirotaka Kimura, Satoshi Eguchi, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, The Class III PI3K and phosphatidylinositol 3-phosphate ensure structural and functional integrity of cardiomyocytes, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会, 平成27年3月21-23日、神戸
  6. 中西広樹、江口賢史、石川将己、鈴木聡、佐々木純子、佐々木雄彦, ホスホイノシタイドの新しい解析方法, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会 平成27年12月1-4日 神戸
  7. 木村洋貴、江口賢史、久場敬司、今井由美子、高須賀俊輔、伊藤玲悦、中村亮太郎、中西広樹、石川将己、佐々木純子、山崎正和、佐々木雄彦, 心肥大におけるホスホイノシタイド代謝酵素 Vps34 のタンパク質分解機構の役割, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会 平成27年12月1-4日 神戸
  8. 佐々木雄彦, ホスホイノシタイドによる生体調節機構, 第28回高遠シンポジウム 平成28年8月25-26日 長野
  9. 佐々木雄彦, イノシトールリン脂質代謝と病態, 日本脂質栄養学会 第25回大会 平成28年9月16日 秋田
  10. Takehiko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Satoshi Eguchi, Masaki Ishikawa, Akira Suzuki, Junko Sasaki, A method for studying quality of phosphoinositides, 第39回日本分子生物学会 平成28年11月30-12月2日 横浜
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 佐々木雄彦(2015) 細胞内脂質シグナル関連因子 序. 脂質代謝異常と関連疾患(下巻)、269、エル・アイ・シー社
  2. 高須賀俊輔、佐々木雄彦(2015) イノシトールリン脂質代謝酵素. 脂質代謝異常と関連疾患(下巻)、303-313、エル・アイ・シー社
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 2 件)
- 名称: 新規リン脂質およびその利用  
 発明者: 佐々木雄彦、中西広樹、石川将己、上野紀子、江口賢史、佐々木純子  
 権利者: 秋田大学・ALTe LLC.  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-144177  
 出願年月日: 平成28年7月20日  
 国内外の別: 国内
- 名称: ホスホイノシタイド分離測定法の開発

発明者：中西広樹、佐々木雄彦、佐々木純子、  
江口賢史、中西貴代  
権利者：秋田大学・ALTe LLC.  
種類：特許  
番号：特願 2017-51354  
出願年月日：平成 29 年 3 月 14 日  
国内外の別：国内

○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.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 雄彦 (SASAKI, Takehiko)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50333365

### (2) 研究分担者

木村 洋貴 (KIMUTA, Hirotaka)  
秋田大学・生体情報研究センター・助教  
研究者番号：30382899

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

なし ( )