

令和元年6月18日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08735

研究課題名(和文) リコンビナントインブリード系マウスを用いた膠原病治療反応多様性の解析

研究課題名(英文) Analysis of the diversity of collagen disease treatment response using recombinant inbred mice

研究代表者

宮崎 龍彦 (Miyazaki, Tatsuhiko)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80239384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病治療反応多様性モデルを確立するため、膠原病モデルリコンビナントインブリード系マウス、MXH/lpr系マウスの繁殖および凍結受精卵からの復帰を行い実験に使用するマウスを確保した。Opnおよび自己抗原阻害蛋白のうちOpnとの結合エピトープを含む蛋白を解析し、コムギ胚芽系無細胞蛋白合成システムで合成した。in vitroでの解析と並行して、リンパ系投与によるドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を行った。主に糸球体腎炎の抑制を指標に蛋白投与および治療コントロールとしてシクロフォスファミド投与する実験を行い、DDSを確立するとともに、治療効果を確認し、有害事象の解析も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、多因子疾患である膠原病の治療多様性モデルが確立し、新薬開発等における実験モデルとして有用であることが明らかとなった。また、膠原病治療のためのリンパ節への薬剤投与という新たなdrug delivery systemの開発を果たし得た。さらに、Opnの多型部位阻害蛋白の開発は、膠原病治療の新たな治療戦略につながる大きなシーズとなった。今後さらに蛋白製剤の低分子化をすすめ、治療薬として実用化できる方策を進めることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a diversity model of therapeutic response to collagen diseases, recombinant inbred MXH/lpr mice were bred and returned from frozen fertilized eggs to provide mice for experiments. Among Opn and autoantigen-inhibiting proteins, proteins containing a binding epitope with Opn were analyzed and synthesized by a wheat germ cell-free protein synthesis system. In parallel with the in vitro analysis, we developed a drug delivery system (DDS) by lymphatic administration. Cyclophosphamide was administered to patients with glomerulonephritis. Cyclophosphamide was administered to patients with glomerulonephritis. DDS was established, and the effect of treatment was confirmed and adverse events were analyzed.

研究分野：実験病理学

キーワード：病理学 ゲノム 薬剤反応性 炎症・膠原病 モデル動物 オステオオンチン

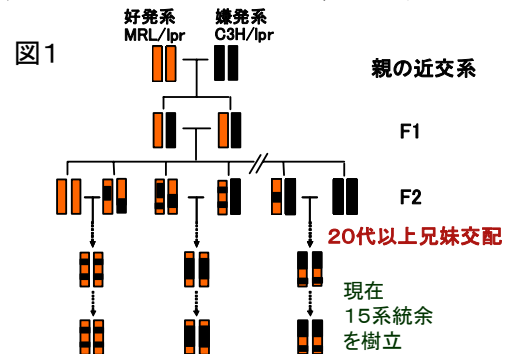
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

従来、申請者らは、同一個体に腎炎、血管炎、関節炎、唾液腺炎などを発症し、膠原病疾患群のモデルとなる MRL/Mp-*Fas*<sup>lpr/lpr</sup> (MRL/lpr)マウスのゲノミクス解析を通じて、各臓器病変の疾患感受性遺伝子座をマッピングし、各々の疾患感受性責任遺伝子を解析すると共に、これらの膠原病疾患群が Mather K (1949)の提唱したポリジーン遺伝形式をとることを示してきた。

さらに、これらの研究成果に立脚して個々の病変の病理発生機序および環境要因について解析をすすめるため、MRL/lpr と膠原病兼発系 C3H/HeJ- *Fas*<sup>lpr/lpr</sup> の兄妹交配系から、世界で初めての膠原病モデル組換え近交系マウス MXH/lpr を 15 系統余樹立し、膠原病の複合病態が遺伝的に分離し

うこと、そしてそれがゲノム多型に基づくポリジーン系遺伝形式に支配されていること、さらに特定の環境要因により修飾されることを再現可能な近交系レベルで明らかにし、これらの系統に於ける系統間分布表 (strain distribution pattern table: SDP 表)、病理組織学的表現型、自己抗体、サイトカインプロファイルのデータベースを確立した(図 1)。(文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B)組換え近交系マウスを用いた膠原病のポリジーンネットワークの解析 H18-H19 年度 代表 能勢真人)



一方、申請者らは、MRL/lpr マウスのゲノミクス解析から 5 番染色体に位置するオステオポンチン(OPN)を自己免疫性糸球体腎炎の疾患感受性候補遺伝子として見出し、OPN の構造遺伝子多型に基づく蛋白多型が、糸球体腎炎の疾患感受性を規定すること、その機能的差異を規定するアミノ酸多型を明らかにしてきた。多型サイトの立体構造の違いを解析し、この結合サイトを阻害する新規アナログ作製し、膠原病治療の萌芽的実験を施行してきた (文部科学省科学研究費補助金 基板研究(C) 膠原病モデル組換え近交系マウスを用いた膠原病治療法の開発)。さらに、連携研究者の長谷川らと共に G-protein-coupled receptor を介した炎症性疾患治療応用を企図し、CXCL10 decoy トランスフェクト細胞移入による自己免疫性肺臓炎や唾液腺炎の治療、Treg 移入による GVHD 治療モデルの作出、CD72 遺伝子移入による血管炎治療モデル(図 2)の開発を行ってきた。さらに糸球体腎炎の新たな自己抗原エピトープを見いだした。また、最近、腫瘍の治療抵抗性に関与する survivin (BIRC5)が少なくとも関節炎 (RA) および全身性硬化症 (SS) の病態に重要な役目を果たすことを明らかにした。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、膠原病モデルである MRL/lpr 系マウスと、同じ lpr 変異を持ちながら疾患を発症しない C3H/lpr の F2 交配系から、世界初の自己免疫疾患モデル組換え近交系マウス MXH/lpr を開発してきた。これらの系統は、ゲノム領域をいずれかの親系統由来のホモ接合でモザイクにもち、親系統である MRL/lpr に見られる膠原病疾患が種々の組み合わせで発症し、ときには親系統よりも強い表現型をとり、ヒトに於けるゲノム多様性に基づいたポリジーン系を単純化したモデル系として有用である。そこで、申請者らは、この系を用いて自己免疫疾患の分子標的治療モデルを構築し、治療反応性のゲノム多様性による修飾を明らかにすることを目的として研究を行うことを企図した。

今回の研究では、膠原病疾患群ポリジーン系モデルである MXH/lpr 系マウスを対象に、これまで萌芽的に開発してきた OPN インテグリン結合サイトをブロックする蛋白アナログ、免疫抑制剤としてシクロフォスファミド、腎炎原生自己抗原エピトープの阻害蛋白アナログまたはその decoy cDNA を移入することによる新たな膠原病治療方略の確立とともに、簡素化したポリジーン系モデルによる治療反応性の差異を詳細に解析することを目的として以下を行った。

- ①Opn 阻害蛋白アナログの機能エピトープ検索と低分子蛋白の作成
- ②Opn 阻害蛋白アナログによる糸球体腎炎およびその他臓器病変の治療効果解析
- ③各系統の免疫細胞を用いた治療アナログに対する反応の解析

#### ④Span80 ナノベシクルを用いた膠原病治療 drug delivery system の開発

#### ⑤膠原病モデルリコンビナント近交系マウスへの蛋白アナログをはじめとする薬剤の投与実験

### 3. 研究の方法

平成 28 年度から 30 年度の研究期間に、①Opn 阻害蛋白アナログの機能エピトープ検索とそれを含む低分子蛋白の作成、②Opn 阻害蛋白アナログによる糸球体腎炎およびその他臓器病変の治療効果の解析、③各系統の免疫細胞を用いた治療アナログに対する反応の解析、④Span80 ベシクルを用いた蛋白アナログ drug delivery system の開発、⑤膠原病モデルリコンビナント近交系マウスへの薬剤の投与実験、⑥cDNA を用いた遺伝子治療モデルの萌芽的解析を行った。

#### (1)MXH/lpr 系マウスの繁殖および凍結受精卵からの復帰

兄妹交配を続けている MXH 系マウスと、凍結受精卵として保管している MXH 系マウスの繁殖を行い、実験に使用するマウスを確保した。

#### (2)Opn および自己抗原阻害蛋白アナログの機能エピトープ検索と低分子量蛋白の作製

これまでに Opn に関しては MRL/lpr や McH-Agnm3 系マウスを用いてスクリーニングされた蛋白のうち、効果があると目される蛋白 3 種類(S\*\*\*\*, EI\*\*\*, D\*\*\*\*)につき、機能エピトープを見いだすためのスクリーニングを行った。まず、各蛋白の N 末側半分、C 末側半分のアミノ酸を合成し、GST-capture ELISA により野生型 Opn 蛋白との結合アフィニティー解析を行ったところ、少なくとも S\*\*\*\*蛋白の C 末側で全長蛋白と替わらない結合アフィニティーを認めた。本研究では in vitro, in vivo の解析にはこの合成蛋白を用いた。

#### (3)リンパ系投与による蛋白アナログ drug delivery system の開発

申請者らは、界面活性剤 Span80 を用いた脂質二重膜ベシクルによる DDS を用いて薬物投与を行う研究を予定していたが、リンパ節への薬剤投与による腫瘍治療のための DDS の技術供与を受け予備実験を行ったところ、ベシクル使用の必要性なく全身臓器に到達することが明らかになったため、本研究に於いてはリンパ節投与を主とした DDS を用いて治療モデルを展開することとなった。

#### (4)蛋白アナログによる各近交系マウス由来免疫細胞の免疫機能修飾の解析

組換え近交系から MXH86/lpr 系統を選択、および MRL/lpr から各々腹腔マクロファージ、脾細胞、骨髄由来樹状細胞 (GM-CSF 存在下で誘導) を採取し in vitro 実験に供した。マクロファージ活性化、脾細胞を用いた抗体産生誘導能・T 細胞活性化能 (Th1, Th17) の阻害などについて解析を行った。また、マウス脾細胞系を用い、regulatory T cell の誘導、regulatory dendritic cell の誘導に関する解析も行った。

#### (5)膠原病モデルマウスへの投与実験

上記Ⅱ、Ⅲでスクリーニングした蛋白アナログ、シクロフォスファミドおよびプレドニゾロンを投与薬剤として使用した。近交系マウス 10～15 系統を選択して臓器病変を発症する 4 ヶ月例よりこれらを投与し、各臓器病変に対する治療効果を解析する。具体的には、①尾静脈内投与、②鼠径リンパ節への注射によるリンパ系への投与を施行し、実際の膠原病臓器病変抑制が得られるか病理組織学的に網羅的に解析した。また、同時に有害事象による病理学的変化がないか全臓器を詳細に検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) MXH/lpr 系マウスの繁殖および凍結受精卵からの復帰

実験に使用するマウスを確保するために兄妹交配を続けている MXH 系マウスと、凍結受精卵として保管している MXH 系マウスの戻しを行った上で繁殖を行い、MRL/lpr, MXH73, MXH81, MXH86, MXH95, MXH98, MXH100, MXH104, MXH105, MXH106 の 10 系統について解析に必要な個体を確保、継代を行った。これらを用いて、投与実験、臓器病変のスクリーニングを施行した。

#### (2) Opn および自己抗原阻害蛋白アナログの機能エピトープ検索と低分子量蛋白の作製

これまでに Opn に関しては MRL/lpr や McH-Agnm3 系マウスを用いてスクリーニングされた蛋白のうち、効果があると目される蛋白 3 種類(S\*\*\*\*, EI\*\*\*, D\*\*\*\*)につき、機能エピトープを見いだすた

めのスクリーニングを行った。まず、各蛋白の N 末側半分、C 末側半分のアミノ酸を合成し、GST-capture ELISA により Opn Wt との結合アフィニティーを行ったところ、少なくとも S\*\*\*\*蛋白の C 末側で全長蛋白と替わらない結合アフィニティーを認めた。

この蛋白の機能を明らかにするため、Opn によるマクロファージ刺激系にこの蛋白を添加したところ、用量依存性にマクロファージによる TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  酸性、IL-6 酸性を阻害することが明らかになった。

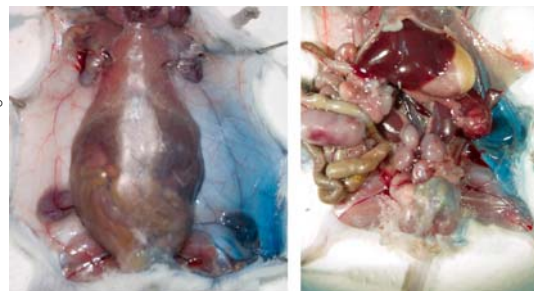
そこで、この後の *in vitro*, *in vivo* の解析にはこの蛋白を用いた。

### (3) リンパ系投与による蛋白アナログ drug delivery system の開発

申請者らは、界面活性剤 Span80 を用いた脂質二重膜ベシクルによる DDS を用いて薬物投与を行う研究を予定していたが、脂質二重膜ベシクルの作製に時間がかかること、その安定性に問題があることが予備実験により判明し、この DDS の使用を再考していたところ、東北大学の森、小玉らが、リンパ節への薬剤投与による腫瘍治療のための DDS を開発しており、技術供与を受けて脂質二重膜ベシクルに色素を入れて臓器への到達をみる予備実験を行った。

左鼠径リンパ節に 50  $\mu$ l のエバンスブルー溶液を投与し、4 時間後に解剖したところ、ベシクルの必要性なく全身臓器にエバンスブルーの送達認められ、有効な DDS として機能することを明らかにした。本研究に於いてはリンパ節投与を主とした DDS を用いて治療モデルを展開することとした。

図2 エバンスブルーによる DDS 予備実験



### (4) 蛋白アナログによる各近交系マウス由来免疫細胞の免疫機能修飾の解析

組換え近交系から MXH86/lpr 系統を選択、および MRL/lpr から各々腹腔マクロファージ、脾細胞、骨髄由来樹状細胞 (GM-CSF 存在下で誘導) を採取し *in vitro* 実験に供した。

#### ①マクロファージ活性化能の阻害

Thioglycolate 培地を用いて定法で腹腔マクロファージを採取し、合成 Opn 添加による TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  産生誘導を合成阻害蛋白の添加により抑制できるかをアッセイしたところ、用量依存的に mRNA レベル、蛋白レベルともに産生を抑制した。

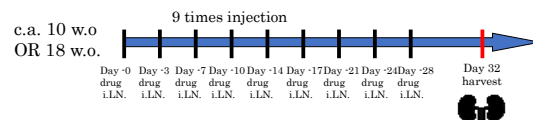
#### ②ポリクローナルな抗体産生能の阻害

脾細胞に Zymosan を加えて、マクロファージ活性化およびポリクローナルな抗体産生を誘導する実験系に、合成阻害蛋白を加えたところ、用量依存的に TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  産生誘導を阻害した。また、IgG、IgM の産生量も有意に減少した。脾細胞を用いたアッセイで Treg 誘導は有意差を認めなかった。

### (5) 膠原病モデルマウスへの投与実験

リンパ系投与による病変抑制を明らかにするため、まずシクロフォスファミドの投与実験を行った。臓器病変が確立する前の 10 週齢、および確立する 18 週齢の MXH86, MXH100, MXH104, MXH105 系マウスにシクロフォスファミドを 10 ng/gBw で週2回、4週間、計9回投与し、最終投与4日後に解剖して、血清学的所見、蛋白尿、各臓器病変の抑制について解析した。

図3 投与プロトコール



脾臓重量、腋窩リンパ節重量、腎臓の病理形態学的スコア、血清中の Cr 値、BUN 値を定量し、CPA 投与群と Control 群で比較した。

MXH100 および MXH104 系統で、シクロフォスファミド投与群では、生理食塩水投与群に比べて、有意に BUN 値の低下を認めた(図 4)。腋窩リンパ節、脾重量の有意な抑制も認めた。糸球体腎炎組織学的スコアを評価したところ、投与群で有意な糸球体腎炎抑制を認めた。また、腎臓の動脈炎もスコアリングしたところ、投与群で有意に動脈炎は抑制されていた。これらの投与群に於いて、組織学的に明らか有害事象は認めなかった。

Opn 阻害蛋白投与群は投与実験継続中であり、preliminary な結果ではあるが、糸球体腎炎および腎臓動脈炎の抑制傾向を認めている。組換え近交系マウスを用いた膠原病治療モデルでは、系統

間で治療に対する反応性の違いも明らかとなった。

図4 MXH マウスに於けるシクロフォスファミド投与群と生理食塩水投与群の血清 BUN 値

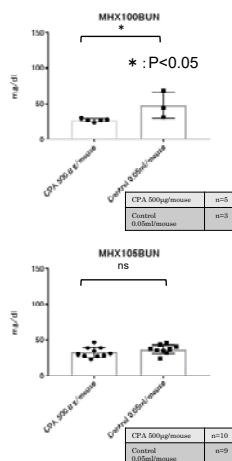
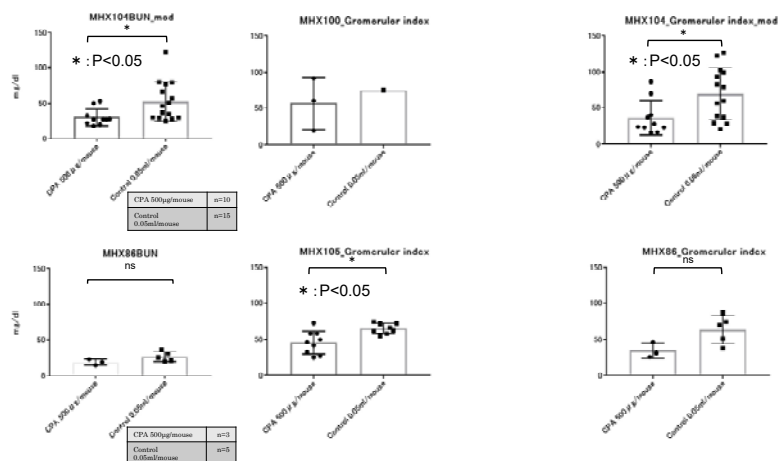


図5 糸球体腎炎スコアの群間の比較



今後さらに、基盤研究(C)一般19K07478「リコンビナント・インブリード系マウスを用いた膠原病治療モデルのゲノム病理学的解析」で引き続き解析を行い、治療反応性の個体差を規定する遺伝因子を明らかにしていくことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Kobayashi K., Hisamatsu K., Suzui N., Hara A., Tomita H., Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med.* 2018;7(9). DOI: 10.3390/jcm7090241(査読あり)
2. 宮崎龍彦. 【血管炎(第2版)-基礎と臨床のクロストーク-】 最新の研究トピックス 基礎研究の進歩 巨細胞性動脈炎における Galectin-3 の病理学的・臨床病理学的意義. *日本臨床.* 2018;46:456-460. (査読あり)
3. Nguyen H. T., Tsuchiya M. C., Yoo J., Iida M., Agusa T., Hirano M., Kim E. Y., Miyazaki T., Nose M., Iwata H. Strain differences in the proteome of dioxin-sensitive and dioxin-resistant mice treated with 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p- dioxin. *Arch Toxicol.* 2017;91(4):1763-1782. DOI: 10.1007/s00204-016-1834-4 (査読あり)
4. Nakashima T., Tomita H., Hirata A., Ishida K., Hisamatsu K., Hatano Y., Kanayama T., Niwa A., Noguchi K., Kato K., Miyazaki T., Tanaka T., Shibata T., Hara A. Promotion of cell proliferation by the proto-oncogene DEK enhances oral squamous cell carcinogenesis through field cancerization. *Cancer Med.* 2017;6(10):2424-2439. DOI: 10.1002/cam4.1157 (査読あり)
5. Matsuyama K., Mizutani Y., Takahashi T., Shu E., Kanoh H., Miyazaki T., Seishima M. Enhanced dendritic cells and regulatory T cells in the dermis of prokeratosis. *Arch Dermatol Res.* 2017;309(9):749-756. DOI: 10.1007/s00403-017-1779-3 (査読あり)
6. Klemis V., Ghura H., Federico G., Wurfel C., Bentmann A., Gretz N., Miyazaki T., Grone H. J., Nakchbandi I. A. Circulating fibronectin contributes to mesangial expansion in a murine model of type 1 diabetes. *Kidney Int.* 2017;91(6):1374- 1385. DOI: 10.1016/j.kint.2016.12.006 (査読あり)
7. Kawashima M., Usui T., Okada H., Mori I., Yamauchi M., Ikeda T., Kajita K., Kito Y., Miyazaki T., Fujioka K., Ishizuka T., Morita H. TAFRO syndrome: 2 cases and review of the literature. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association.* 2017;27(6):1093-1097. DOI: 10.3109/14397595.2015.1059982 (査読あり)
8. Ideta T., Shirakami Y., Ohnishi M., Maruta A., Obara K., Miyazaki T., Kochi T., Sakai H., Tomita H., Tanaka T., Blaner W. S., Shimizu M. Non-alcoholic steato- hepatitis-related liver tumorigenesis is suppressed in mice lacking hepatic retinoid storage. *Oncotarget.* 2017;8(41):70695- 70706. DOI: 10.18632/oncotarget.19978 (査読あり)
9. Hisamatsu K., Niwa M., Kobayashi K., Miyazaki T., Hirata A., Hatano Y., Tomita H., Hara A. Galectin-3 expression in hippocampal CA2 following transient forebrain ischemia and its inhibition by hypothermia or antiapoptotic agents. *Neuroreport.* 2016;27(5):311-317.

DOI: 10.1097/WNR.0000000000000538 (査読あり)

10. 宮崎龍彦. 「特集/ANCA 関連血管炎-最近の話題-」に寄せる 膠原病疾患モデル組換え近交系マウスを用いた膠原病治療法の開発. アレルギーの臨床.2016;36:465-469 (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 宮崎 龍彦, 小林 一博, 久松 憲治, 浅野 奈美, 松本 宗和, 酒々井 夏子. 病原性自己抗体と腎・血管障害 抗リン脂質抗体と抗リン脂質抗体症候群. 第 107 回日本病理学会総会. 2018.6.21-23, 札幌 (招待講演)
2. 小林 一博, 酒々井 夏子, 浅野 奈美, 久松 憲治, 松本 宗和, 宮崎 龍彦. 組換え近交系膠原病マウスを用いた糸球体腎炎・血管炎に対する萌芽的ドラッグデリバリー治療モデル. 第 107 回日本病理学会総会. 2018.6.21-23, 札幌
3. Miyazaki T. Implication of survivin+ cells in the dermal lesions of autoimmune diseases including systemic sclerosis and lupus erythematosus. The 18th German-Japan Society of Dermatology (国際学会), 2018.6.13-15, ロートアッハ・エガーン, ドイツ連邦
4. 宮崎 龍彦, 小林 一博, 久松憲治, 酒々井 夏子. 組換え近交系膠原病モデルマウスを用いた血管炎感受性遺伝因子の解析. 第 1 回血管炎病因・病態研究会, 2018.3.3, 東京 (招待講演)
5. 宮崎 龍彦, 小林 一博 酒々井夏子, 野口慶. 組換え近交系膠原病マウスを用いた糸球体腎炎の萌芽的治療モデル. 第 106 回日本病理学会総会, 2017.4.27-29, 東京
6. 宮崎 龍彦, 小林 一博, 野口 慶, 酒々井 夏子, 原 明. 組換え近交系膠原病モデルマウスを用いた全身性血管炎感受性遺伝因子の解析. 第 37 回日本川崎病学会・学術集会, 2017.10.27-28, 東京
7. Miyazaki T., Noguchi K., Kobayashi K., Suzui N., Hara A. Analyses of responsible genetic factors for systemic vasculitides using recombinant inbred collagen disease model mice. The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop 2017 (国際学会), 2017.3.25-28, 東京
8. 宮崎龍彦, 小林一博, 酒々井夏子, 齊郷智恵美, 能勢真人. 遺伝子組換えから病態へのアプローチ 自己免疫病モデル組換え近交系マウスを用いた疾患感受性因子の解析. 第 106 回日本病理学会総会, 2016.5.12-14, 仙台市 (招待講演)
9. 宮崎龍彦, 小林一博, 酒々井夏子, 齊郷智恵美. 血管炎の組織学的診断マーカーの探索. 第 106 回日本病理学会総会, 2016.5.12-14, 仙台市 (招待講演)

〔図書〕(計 5 件)

1. 宮崎龍彦 他. 組織細胞化学 2018. 日本組織細胞化学会, 2018, 232
2. Miyazaki, T. et al. The Question of Caffeine (Latosinska, J.N. Latosinska, M. ed.). Intech, 2017, 170.
3. 宮崎龍彦 他. 組織細胞化学 2017. 日本組織細胞化学会, 2017, 214.
4. 宮崎龍彦 他. はじめの一步の病理学 (深山正久 編), 2017, 278.
5. 宮崎龍彦 他. ANCA 関連血管炎診療ガイドライン, 診断と治療社, 2016, 180.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 酒々井 夏子

ローマ字氏名: SUZUI Natsuko

研究協力者氏名: 小林 一博

ローマ字氏名: KOBAYASHI Kazuhiro

研究協力者氏名: 野田塔子

ローマ字氏名: NODA Touko

研究協力者氏名: ヘルマン・ヨゼフ・グレーネ

ローマ字氏名: Hermann-Josef Gröne