

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01386

研究課題名(和文) 緊急時に対応可能な血中自己抗体の簡易除去システムの創製

研究課題名(英文) A novel nanomaterial-based system for the removal of antibodies in the blood through macrophages

研究代表者

姜 貞勲 (Kang, Jeong-Hun)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50423512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血中抗体の除去を目的とした新たな除去システムは生体内に存在するマクロファージ(大食細胞)の貪食・分解能力を最大に利用したものである。除去システムはマクロファージを選択的に認識する本体に抗体と結合できるタンパク質の修飾を施すことにより作製された。心筋炎動物モデルを用いた評価では統計学的有意差はなかったものの、PBS投与群に比べ除去システム投与群で血中抗体量の減少が確認された。この結果から更なる改良によって生体内マクロファージを標的とする抗体除去システムの創製は可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

装置に頼らない、より簡便で、持ち運びや保存に便利な血中抗体の除去システムは自然災害など免疫吸着療法の実施が困難な緊急時にも使用可能である。患者の生体内に存在するマクロファージに血中抗体を選択的に運んで分解・除去するシステムの開発は非常に独創的な研究であり、心筋炎動物モデルを用いた評価でその可能性を確認したことに大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：A novel nanomaterial-based system that could selectively recognize macrophages and effectively remove antibodies in the blood through macrophages was developed. This system consisted of a main body that could target macrophages and a grafted protein that could bind with blood antibodies such as immunoglobulin G. Injection of system into mouse models of experimental autoimmune myocarditis decreased the levels of blood immunoglobulin G compared with those in the phosphate-buffered saline (PBS)-injected group, although this treatment failed to show a statistically significant difference.

研究分野：人間医工学

キーワード：生体材料 血液浄化療法 炎症性自己免疫疾患 ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

重篤な自己免疫疾患の症状の改善のためには血液浄化療法（アフェレシス療法）による血中自己抗体の除去と同時に、免疫抑制剤の投与が推奨される。自己免疫疾患を持つ患者の血中自己抗体を除去するための有効な手段として用いられるのが血液浄化療法の一つである免疫吸着療法である。しかし、免疫吸着療法は血流ポンプ、血漿分離器、自己抗体除去カラムなどの装置と電源を必要とするため、自然災害などの緊急時には免疫吸着療法を適切に実施することは困難であり、症状の悪化を招くリスクが高くなる。この問題を解決する対策として、体内に埋め込むことを視野に入れた小型透析装置の開発や持ち運べる携帯型装置の開発などが注目されている。これまでの研究は装置の小型化とそれに必要な材料の開発がメインになっているが、装置に頼らない、より簡便で、持ち運びや保存に便利な血中自己抗体の除去システムの開発も重要である。

2. 研究の目的

緊急時に対応できる、より簡便な血中抗体除去システムの開発にあたって着目したのは、生体内に存在するマクロファージ（大食細胞）である。マクロファージは死んだ細胞、体内に侵入した細菌などの異物を貪食し、細胞内で消化・除去する能力を有している。マクロファージに血中自己抗体を選択的に運ぶ除去システムを開発し、マクロファージが持つ高い分解力により血中自己抗体の分解・除去を行うことが本研究の目的である。この除去システムは患者の体内に存在するマクロファージを利用するため、装置を必要としないメリットがある。

3. 研究の方法

1) マクロファージによる血中抗体の選択的な認識と取り込みを実現するために、マクロファージを選択的に認識するシステムの本体に抗体と結合できるタンパク質を修飾した。サイズによる効果を検討するために、サイズの異なる2種類の除去システム（ $<100\text{ nm}$ と 300 nm ）を作製し評価した。

2) マクロファージにおける除去システムの選択性評価は細胞を用いて行った。骨髓から採取した単球をマクロファージに分化誘導させた骨髓由来マクロファージに加え、腹腔浸出性マクロファージと Raw264.7 細胞を実験に用いた。コントロール細胞はヒト肝癌細胞（HepG2）、ヒト子宮がん細胞（HeLa）、およびマウス線維芽細胞（NIH-3T3 と L929）を使用した。

3) 炎症性自己免疫疾患（心筋炎）動物モデルの作製のために、A/J マウス（7週齢）にブタの心筋由来のミオシン（ 0.5 mg/マウス ）を完全アジュバントと混合し、皮下投与した。また、Pertussis toxin（ 500 ng/マウス ）を腹腔内投与した。1週間後、同様の作業を行った。

4) 除去システムによる血中抗体（IgG）の除去評価を検討するために、心筋炎動物モデルの尾静脈から除去システムを2回（10日と17日）投与した。21日目に血液を採取し、血中抗体の濃度を測定した。また、除去システムの投与による心筋炎の変化を調べるために摘出した心臓に対し HE 染色と F4/80 染色を行った。

4. 研究成果

除去システムはマクロファージに対する高い指向性を示し、コントロール細胞である HepG2、HeLa、NIH-3T3、および L929 においては低い指向性を示した。この結果から除去システムはマクロファージに高い親和性を示すことが分かった。

サイズによる評価では、 300 nm に比べ $<100\text{ nm}$ のほうが長時間マクロファージに結合していることを確認した。一方で、マクロファージによる除去システムの取り込み量は 300 nm のほうが $<100\text{ nm}$ よりも多かった。マクロファージの取り込み量に影響を与える要因は結合するレセプターの違いによるものであることが分かった。取り込み量の結果に基づき、 300 nm のサイズの除去システムを動物実験に用いた。

心筋炎動物モデルは A/J マウスにブタの心筋由来のミオシンを皮下投与することで作製した。投与 14 日目から体重減少と炎症性サイトカイン産生量の増加が始まり、21 日目には心重量の増加、血中 IgG 濃度の増加、炎症性免疫細胞の心筋組織内への浸潤が確認された。この心筋炎動物モデルに除去システムを投与し、血中抗体 (IgG) 濃度の変化を調べた。ポジティブ群 (心筋炎マウス + PBS 投与群) に比べ、除去システム投与群 (心筋炎マウス + 除去システム投与群) では血中 IgG 濃度が減少したものの、統計学的有意差は認められなかった (図 1)。一方で、除去システムの投与群では心筋炎の発症が著しく抑制されることを確認した (図 2)。マクロファージ選択性を実現するために除去システムに混合した eat-me signal 物質は抗炎症機能を有しており、この物質が心筋炎の抑制効果に繋がったと考えられる。

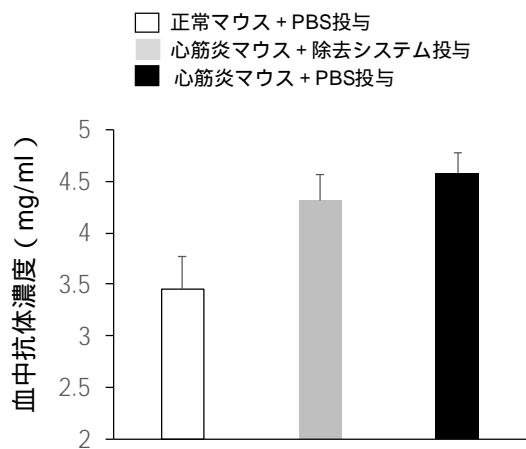


図 1. 除去システムの投与による血中抗体 (IgG) 濃度の変化。

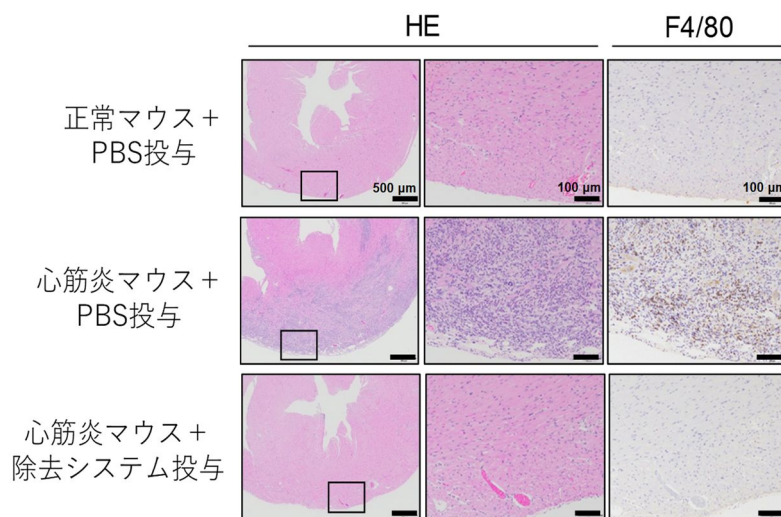


図 2. 除去システムの投与による心筋炎の改善。

以上の結果から、抗体と結合できるタンパク質量やシステムの投与量などの検討を行うことで簡易除去システムの創製が可能であることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Riki Toita, Daisuke Asai, Kentaro Otani, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang	4. 巻 54
2. 論文標題 Suppression of lysophosphatidylcholine-induced human aortic smooth muscle cell calcification by protein kinase A inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 465 - 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daisuke Asai, Masaharu Murata, Riki Toita, Takahito Kawano, Hideki Nakashima, Jeong-Hun Kang	4. 巻 51
2. 論文標題 A high-affinity peptide substrate for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amino acids	6. 最初と最後の頁 973 - 976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02735-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Riki Toita, Satoshi Fujita, Jeong-Hun Kang	4. 巻 67
2. 論文標題 Anti-inflammatory response and macrophage uptake of bovine brain- or soybean-derived phosphatidylserine liposomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1131-1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess18097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Riki Toita, Kentaro Otani, Takahito Kawano, Satoshi Fujita, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang	4. 巻 209
2. 論文標題 Protein kinase A (PKA) inhibition reduces human aortic smooth muscle cell calcification stimulated by inflammatory response and inorganic phosphate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 466-471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2018.08.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Riki Toita, Takahito Kawano, Satoshi Fujita, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang	4. 巻 31
2. 論文標題 Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 43-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2017-0038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Asai, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Hideki Nakashima, Riki Toita, Jeong-Hun Kang	4. 巻 69
2. 論文標題 Effect of fetal bovine serum concentration on lysophosphatidylcholine-mediated proliferation and apoptosis of human aortic smooth muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 255-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Riki Toita, Eiko Shimizu, Jeong-Hun Kang	4. 巻 56
2. 論文標題 Unique cellular interaction of macrophage-targeted liposomes potentiates anti-inflammatory activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 8253-8256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc03320k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Riki Toita, Eiko Shimizu, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang 330	4. 巻 330
2. 論文標題 Protective and healing effects of apoptotic mimic-induced M2-like macrophage polarization on pressure ulcers in young and middle-aged mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 705-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 姜貞勲、戸井田力
2. 発表標題 炎症性細胞の機能変換能を有するナノ分子による心筋炎の治療
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸井田力、姜貞勲
2. 発表標題 マクロファージ表現型に着目した癒着治療
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姜貞勲、戸井田力
2. 発表標題 マクロファージ標的型ナノメディシンによる自己免疫性心筋炎の治療
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸井田力、藤田聡史、姜貞勲
2. 発表標題 NAFLD治療を旨としたマクロファージ指向性ナノメディシン
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姜貞勲、河野喬仁、村田正治、戸井田力
2. 発表標題 マクロファージを標的とするIL-10修飾リポソーム
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸井田 力 (Toita Riki) (40611554)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------