

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19650

研究課題名（和文）組織線維化の非侵襲的診断法の開発

研究課題名（英文）Development of non-invasive imaging of tissue fibrosis

研究代表者

間賀田 泰寛（Magata, Yasuhiro）

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：組織線維化部位のターゲット分子としてTissue factor（TF）に着目し、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）により線維化した肝臓の検出を試みた。ICG標識Fab化抗TF抗体を調製し、NASHマウスに投与後に全身蛍光イメージングを行なったところ、投与72時間後の肝臓においてICG由来の強い蛍光を確認した。一方、コントロール抗体を投与したNASHマウスや、通常食を摂食したマウスにおいては、肝臓における蛍光はほとんど確認されなかった。NASHマウスの肝臓や活性化肝星細胞においてTFの発現が確認されたことから、Fab化抗TF抗体は線維化組織検出のためのツールとして有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織の線維化ならびにそれに続く慢性的な炎症は、がんやアルツハイマー病といった様々な難治性疾患の発症や症状悪化の原因であり、患者の予後を決める重要な因子である。本研究において、Fab化抗TF抗体をイメージング診断用の分子ツールとして用いることにより、NASHにより引き起こされた線維化した肝臓の検出に成功した。NASHは肝硬変や肝がんへ進行し予後不良となるため、肝疾患の進行予防に大きく貢献できるものと考えられる。これまでに組織線維化を簡便に検出するイメージング診断法は開発されていないため、本研究にて得られた成果は、線維化組織を検出する新たな手法として学術的、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We focused on tissue factor as a target molecule of tissue fibrosis and tried to detect NASH-induced liver fibrosis by using anti-TF antibody. In the experiment, ICG-labeled Fab fragment of anti-TF antibody was prepared and fluorescence imaging of NASH mouse after the systemic injection was carried out. As a result, ICG fluorescence could be strongly observed in the liver of NASH mouse at 72 h after the injection, but little in the livers of NASH mouse injected with Fab fragment of control antibody and of normal diet-feeding mice injected with each antibody. Additionally, TF expression was observed in NASH-induced fibrotic liver and activated hepatic stellate cells. In conclusion, we demonstrated that Fab fragment of anti-TF antibody could be applicable as an imaging tool for detection of tissue fibrosis including liver fibrosis induced by NASH.

研究分野：核医学・分子イメージング学

キーワード：分子イメージング 組織線維化 NASH TissueFactor 抗体 肝臓 Fab 肝星細胞

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化ならびにそれに続く慢性的な炎症は、突発性肺線維症、肝硬変、がん、アルツハイマー病といった様々な難治性疾患の発症や症状悪化の原因であり、患者の予後を決める重要な因子である。このため、組織の線維化を早期に発見でき、その進行を診断する方法論を確立することができれば、疾患の発症・進行予防や治療計画を立てるための非常に重要かつ有用な情報となる。しかし現状、組織の線維化の診断は、術中に生体試料を取り出した後、組織染色等により病理学的に判断される侵襲的な生検が一般的であり、未然に発見することを目的には行われてはいない。よって、組織線維化の非侵襲的な診断法の確立は、様々な疾患の発症を早期に予測できる診断法となり得る。

2. 研究の目的

本研究は、組織線維化部位を非侵襲的に特定できる診断技術の開発を目的として、組織線維化に関与することが予想される TF 分子に着目し、抗 TF 抗体を用いて NASH により惹起される肝臓の線維化の検出を行い、組織線維化の早期診断のためのイメージングツールとしての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NASH マウスの作製と肝臓の病理学的解析

C57BL/6J 雄性マウス(日本 SLC)に、コリン欠乏、メチオニン減量(0.1%)高脂肪飼料(CDAHFD、リサーチダイエット)を5週齢より自由摂食させ、NASHを誘導した。摂食開始から1~14週間後にマウスより肝臓を摘出し、ホルマリンに固定後、パラフィン切片(3 μ m)を作製した。作製した切片については脱パラフィン処理した後、組織学的解析のためのヘマトキシリン&エオジン(HE)染色および組織線維化の検出のためのAzan染色を行った。また、TFの発現を調べるために、一次抗体としてAnti-tissue factor rabbit monoclonal antibody(Abcam)、二次抗体としてGoat anti-rabbit IgG antibody-HRP(ThermoFisher Scientific)、発色試薬としてDAB(ニチレイバイオサイエンス)を用いて染色した。その他脂肪の蓄積を観察するために、肝臓の凍結切片(10 μ m)を作製後、Oil Red O染色を行なった。

(2) 肝星細胞におけるTFの発現観察

ヒト肝星細胞株LX-2(Merk Millipore)を8ウェルチャンバースライドに2 x 10⁴ cells播種し、一晚培養した。リコンビナントヒトTGF- β (5 ng/mL, R&D Systems)およびリポポリサッカライド(LPS, 100 ng/mL, Merk)またはその両方を細胞に添加し、48時間培養後、PBSにて洗浄し、4%パラホルムアルデヒドにて細胞を固定した。3%BSA-PBSにてブロッキングを行なった後、Anti-TF rabbit monoclonal antibodyおよびAnti- α -smooth muscle actin antibody-Cy3(Sigma-Aldrich)を添加し、室温にて1時間インキュベートした。PBSにて細胞を洗浄後、Anti-rabbit IgG antibody-Alexa488(ThermoFisher Scientific)を添加し、30分間室温にてインキュベートした。PBSにて洗浄後、DAPI(10 μ g/mL)にて30分間染色し、蛍光顕微鏡(オリンパス)を用いて観察を行なった。

(3) 抗体の精製、断片化と蛍光標識

抗体の精製

Crlj:CD-1-Foxn1tm(ICR-nu, Charles River)雌性マウスにプリスタン(和光純薬)0.3 mLを腹腔内投与し、その後抗マウスTFラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(松村保広分野長(国立がん研究センター)より提供)の細胞懸濁液(1 \times 10⁷ cells/mL)をマウスの腹腔内に投与した。一定期間経過後、腹水を採取し、遠心(680 x g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)により腹水上清液を回収した。0.45 μ mおよび0.22 μ mフィルターでろ過し、Protein G Sepharose Fast Flow(GE Healthcare)を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

抗体の断片化

抗体の断片化は、図1に示す方法により行なった。

全抗体(IgG)に、最終濃度10 mMとなるようにシステアミン(Sigma-Aldrich)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートした後、限外ろ過により精製した抗体を還元抗体(rIgG)とした。またIgG抗体に4%(w/w)となるようにペプシン(Pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma-Aldrich)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした後、限外ろ過により精製した抗体断片をF(ab')₂とした。さらにF(ab')₂をシステアミン処理して精製した抗体断片をFab'とした。またIgGに0.1 mg/mLとなるようにパパイン(Papain from Carica papaya, Sigma-Aldrich)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、プロテインGカラム(HiTrapTM Protein G HP, GE Healthcare)を用いてFab領域、Fc領域を分離し、Fab断片を精製した。

抗体の近赤外蛍光標識

IgG抗体、F(ab')₂断片、Fab断片については、Indocyanine Green-NHS(五稜化薬)を用いてインドシアニングリーン(ICG)標識を行なった。またrIgG抗体、Fab'断片については、ICG-maleimide(五稜化薬)を用いて標識した。得られた標識抗体について、280 nmおよび800 nmにおける吸光度を測定することにより、抗体濃度およびICG濃度を決定した。また抗体の断

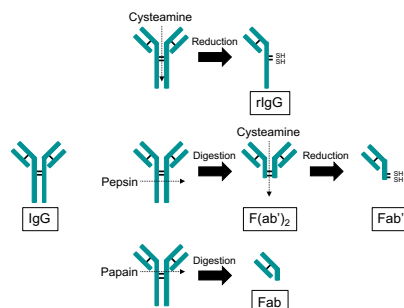


図1 抗体の断片化

抗体の断片化は、図1に示す方法により行なった。

片化については、還元下または非還元下にて10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行なった後、ゲルをCBB染色することにより確認した。さらに各 ICG 標識抗体の励起波長 750 nm における蛍光スペクトルを、蛍光光度計 (LS45, PerkinElmer) にて測定した。

(4) 正常マウスにおける抗体の蛍光イメージング

各 ICG 標識抗体の蛍光強度が同一となるように希釈し、投与溶液とした (抗体濃度として 170 ~ 650 μ g/mL)。BALB/c 雄性マウスに 100 μ L 投与し、その 1、3、6、24、48、72 時間後にマエストロ (CRi) を用いてイソフルラン麻酔下全身蛍光イメージングを行なった。また投与 72 時間後にマウスを解剖し、血液および各臓器 (心、肺、肝、脾、腎、消化管) における蛍光について *Ex vivo* イメージングを行なった。

(5) NASH マウスにおける Fab 化抗 TF 抗体の蛍光イメージング

12 週間通常食または CDAHFD を摂食させた C57BL/6J マウス (事前に除毛クリームにより胸部を除毛) に、ICG 標識 Fab 化コントロール抗体および ICG 標識 Fab 化抗 TF 抗体を、抗体投与量として 20 μ g となるように尾静脈内に投与し、その 3、24、72 時間後にマエストロにより全身蛍光イメージングを行なった。また投与 72 時間後には血液および各臓器を摘出し、*Ex vivo* イメージングを行なった。6 週間 CDAHFD を摂食させた C57BL/6J マウスについても同様の検討を行い (抗体投与量としては 10 μ g)、投与から 72 時間後における肝臓の蛍光についてマエストロにより解析した。

4. 研究成果

(1) NASH マウスの作製と肝臓の病理学的解析

NASH 誘導に用いられている CDAHFD をマウスに摂食させ、NASH モデルマウスを作製した。摂食させたマウスの体重は、通常食摂食マウスとほぼ同程度であったが、肝重量については、摂食 2 週間で既に CDAHFD 摂食マウスで有意に増加しており、6 週間摂食でさらに増加した (図 2)。各摂食期間経過後の肝臓の病理学的解析を行なったところ、摂食 1 週間から徐々に組織変化が観察され始め、摂食 2 週間で脂肪肝様の変化が確認

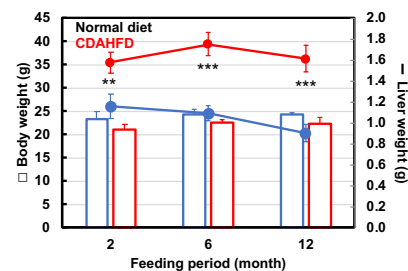


図 2 NASH マウスの体重、肝重量変化

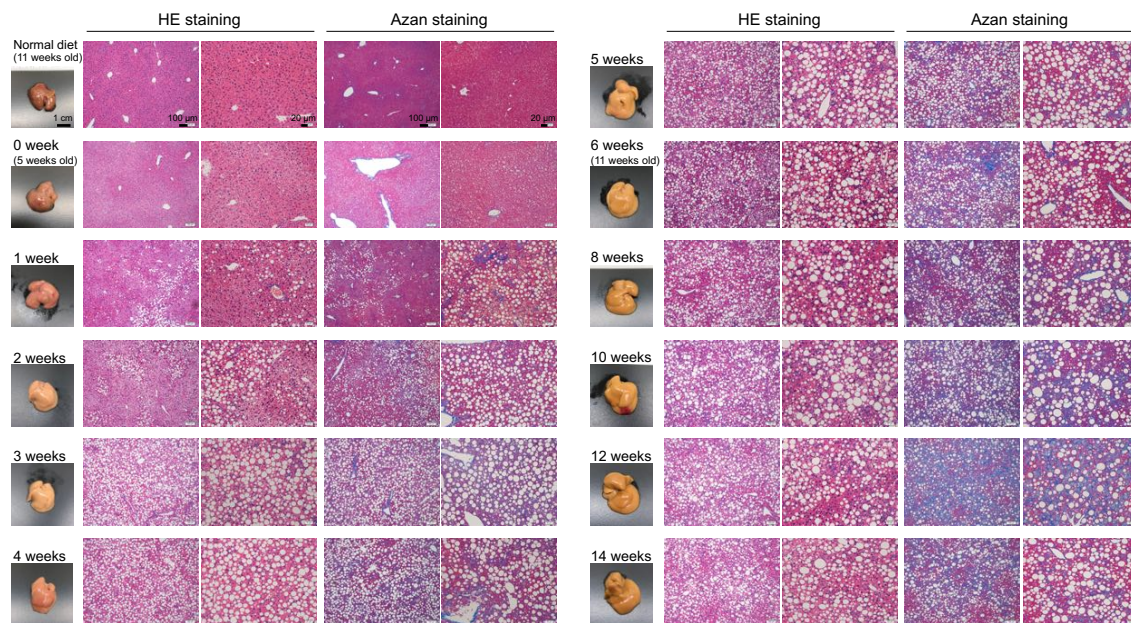


図 3 NASH の誘導と肝臓の病理学的解析

された。組織線維化を表す Azan 染色の結果、摂食 2 週間あたりから染色が確認され始め、摂食 12 週間では組織全体が線維化している状態となった (図 3)。さらに肝臓における TF の発現を調べたところ、通常食摂食においても肝臓全体で TF の発現が見られたが、NASH マウスの肝臓においては TF の発現の分布が変化しており、局所的に発現が高くなっている様子が確認された (図 4)。また Oil Red O 染色の結果、摂食 1 週間で脂肪の蓄積が確認された。これらの結果より、マウスに CDAHFD を摂食させることで、NASH が誘導され、肝臓の線維化が引き起こされることが示された。

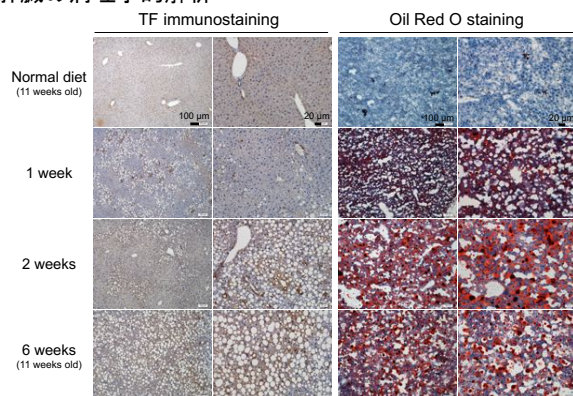


図 4 NASH の肝臓における TF の発現と脂肪蓄積

また摂食期間が長期になるにつれ、組織線維化も進行することも確認された。

(2) 肝星細胞における TF の発現

肝臓内に存在し、肝線維化の責任細胞として知られる肝星細胞における TF の発現変化を調べるために、活性化 LX-2 細胞における TF の発現を、蛍光免疫染色により観察した。線維化を誘導するサイトカインである TGF- β や炎症を引き起こす LPS にて LX-2 細胞を 48 時間刺激したところ、細胞の構造に変化が生じ、活性化肝星細胞マーカーである α -SMA の発現が上昇した。この細胞における TF の発現について確認

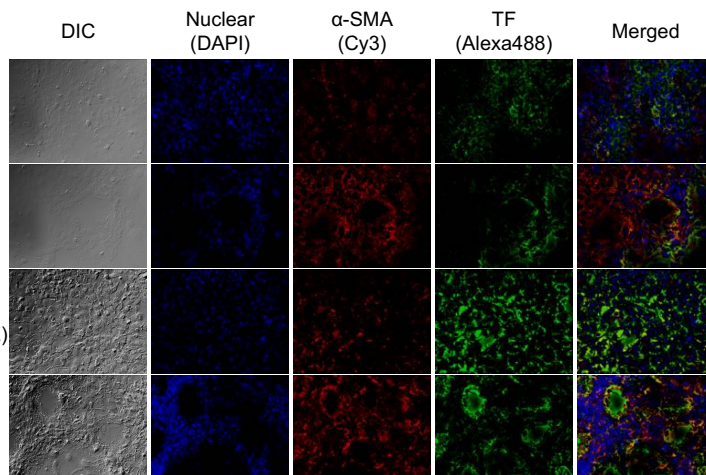


図5 活性化ヒト肝星細胞株 LX-2 における TF の発現

したところ、未刺激の状態においても TF の発現は確認されたが、TGF- β や LPS の刺激によって、その発現がさらに高まることが確認された (図 5)。NASH マウスの肝臓における TF の発現と本実験の結果を総合すると、NASH が誘導された肝臓において肝星細胞における TF の発現が高まっていることが示唆された。

(3) 抗体の断片化と近赤外蛍光標識

抗体を用いて肝疾患部位をイメージング検出するにあたり、肝臓への抗体の非特異的な集積を回避した上で実施する必要がある。抗体の断片化と肝臓への集積との関係を明らかにするため、コントロール IgG 抗体を rIgG、F(ab')₂、Fab'、Fab へと断片化し、それぞれの ICG 標識体を調製した。得られた抗体の断片化を CBB 染色により確認したところ、非還元状態で IgG および rIgG 抗体は 200 kDa 付近に、F(ab')₂ は 150 kDa 付近、Fab' および Fab については 40 kDa 付近にバンドが見られ、断片化で想定される分子量付近に見られたため、しっかりと断片化ができていることを確認した (図 6A)。また、得られた抗体断片の ICG 標識効率を算出したところ、rIgG や Fab' に対して行なったマレイミド基を用いた標識法については標識効率が低く、抗体 5 分子あたり約 1 分子の ICG が標識される程度であった。また NHS 基を利用した Fab への標識効率も、同様の方法を用いた IgG や F(ab')₂ に比べ低かった (図 6B)。一方、ICG 標識した各抗体の蛍光スペクトルを測定したところ (抗体濃度は任意)、全ての抗体において、810 nm 付近に極大ピークを示す ICG 由来の蛍光が得られ、ICG 標識されていることを確認した (図 6C)。

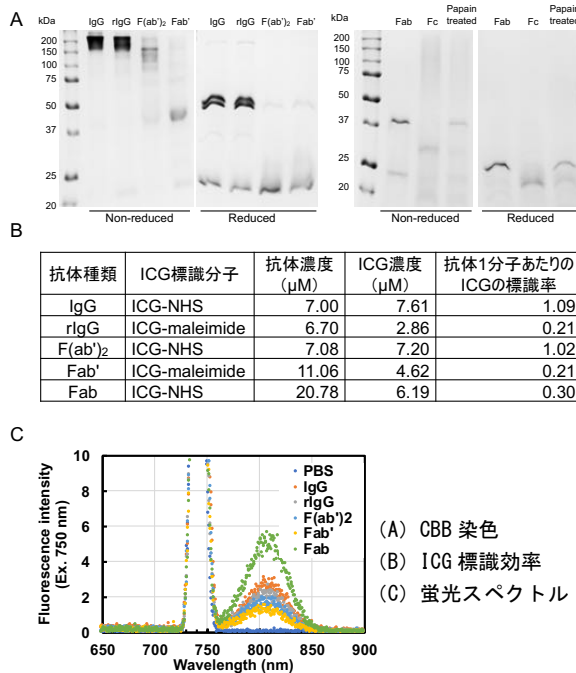


図6 抗体の断片化と ICG 標識抗体の特性

(4) ICG 標識断片化抗体の体内動態蛍光イメージング

ICG 標識した各抗体断片を、通常食摂食マウスに尾静脈内投与し、全身蛍光イメージングを行なった。この結果、全ての抗体において、投与 1 時間後の肝臓付近に蛍光が観察されたが、rIgG および Fab を投与したマウスにおいては、その蛍光は投与 3 時間後から徐々に低下し、投与 72 時間後には、バックグラウンドレベルまで低下した (図 7)。一方で、IgG、F(ab')₂、Fab' を投与したマウスにおいては、投与後 1 時間に比べ 3 時間でさらに蛍光が強くなり、投与 6 時間をピークとして蛍光が低下したが、投与 72 時間後においても蛍光が確認された。実際、投与 72 時間後に臓器を摘出し、肝臓における蛍光を観察したところ、rIgG および Fab を投与したマウスの肝臓においては ICG の蛍光は非常に低く、抗体が肝臓から消失していることが示された一方、IgG、F(ab')₂ および Fab' を投与したマウスの肝臓においては、強い蛍光が観察され、抗体が残存していることが示された。これらの結果より、抗体の断片化の違いにより、生体投与後の肝臓への集積に違いが生じており、肝疾患をイメージング検出する上では、肝臓からのクリアランスが良好な rIgG または Fab の利用が適していることが明らかとなった。本研究においては、Fab 断片をイメージング用ツールとして用いることに決定した。

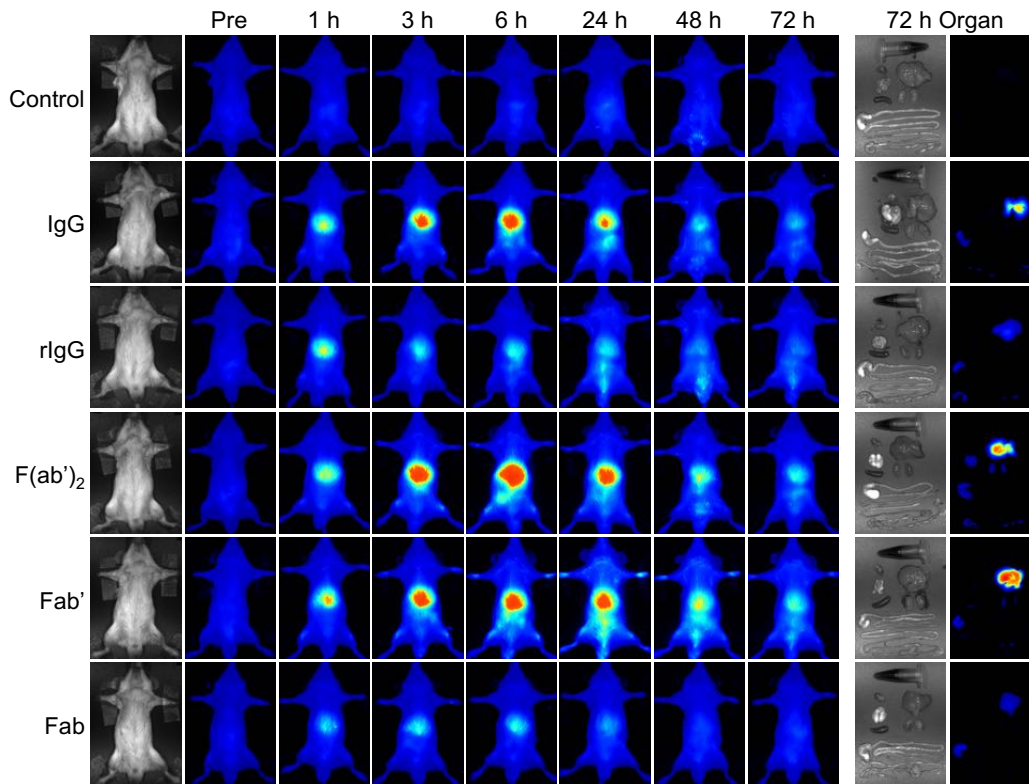


図 7 抗体断片の正常マウスにおける体内動態蛍光イメージング Low High

(5) NASH マウスにおける ICG 標識 Fab 化抗 TF 抗体の近赤外蛍光イメージング

NASH の誘導により肝臓の線維化が惹起されている 12 週間 CDAHFD を摂食させたマウスに、ICG 標識 Fab 化コントロール抗体および ICG 標識 Fab 化抗 TF 抗体を尾静脈内投与し、その後の抗体

の体内分布について蛍光イメージングにより比較を行なった。この結果、投与 3 時間後ではどちらの抗体を投与したマウスにおいても肝臓での強い蛍光が観察され、投与から 72 時間後においてはコントロール抗体投与マウスではその蛍光が急激に低下した一方、抗 TF 抗体を投与したマウスにおいては、肝臓における高い蛍光を維持していた (図 8)。また通常食を摂食させた正常マウスにおいては、抗体投与 72 時間において蛍光は確認されなかった。実際、投与 72 時間後の肝臓における蛍光を確認したところ、抗 TF 抗体を投与した NASH マウスの肝臓において、ICG の蛍光が最も高いことが示された。さらに CDAHFD を 6 週間摂食させた NASH マウスを用いて同様の検討を行なったところ、Fab 化コントロール抗体に比べ Fab 化抗 TF 抗体を投与したマウスの肝臓にて強い蛍光が確認された (図 9)。

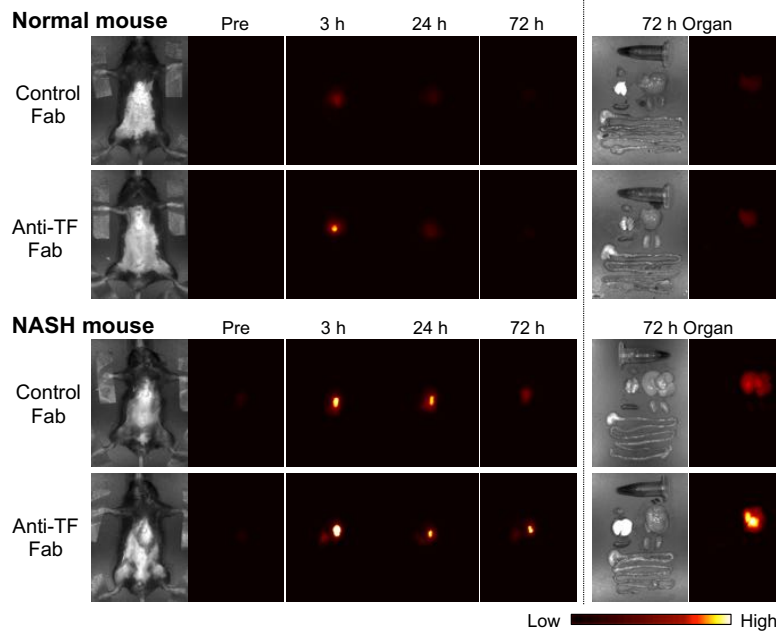


図 8 NASH マウスにおける Fab 化抗 TF 抗体の体内動態蛍光イメージング

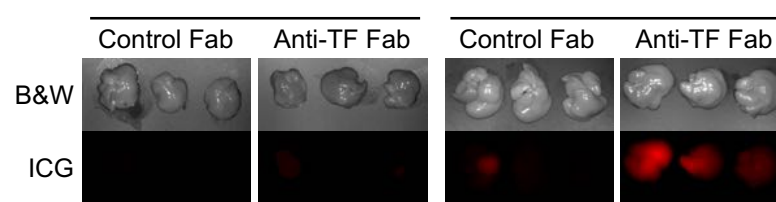


図 9 Fab 化抗 TF 抗体の NASH マウス肝臓への集積

以上の結果から、Fab 化抗 TF 抗体は NASH により線維化した肝臓に多く集積することを明らかとし、線維化組織検出のためのツールとして有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水広介、松村保広、間賀田泰寛
2. 発表標題 抗組織因子抗体を用いたNASHにおける肝組織線維化イメージング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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	阪原 晴海 (Sakahara Harumi) (10187031)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	鈴木 千恵 (Suzuki Chie) (20637285)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教 (13802)	
研究分担者	清水 広介 (Shimizu Kosuke) (30423841)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授 (13802)	