

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19890040
 研究課題名（和文） 量子ドットを用いた好中球自己抗体による血管内皮細胞傷害機構のイメージング解析
 研究課題名（英文） Imaging analysis of endothelial injury induced by anti-neutrophil cytoplasmic antibody using quantum dots
 研究代表者
 氏 名（ローマ字）：長尾 朋和（Nagao Tomokazu）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・特任教員
 研究者番号：90451757

研究成果の概要：

本研究は、MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎の発症における糸球体血管内皮細胞の役割について明らかにすることを目的とした。本研究の成果としては、1）MPO-ANCA による糸球体血管内皮細胞の活性化に関わるターゲット分子を特定することに成功し、加えて活性化に伴う炎症性分子の発現を詳細に明らかにした。さらに、2）量子ドットを MPO-ANCA に結合させることに成功し、その生体内分布を明らかにするための基礎検討を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
19 年度	1,320,000	0	1,320,000
20 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：免疫学、量子ドット、糸球体腎炎、自己抗体、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

急速に進行し腎不全に至る極めて予後不良な MPO-ANCA（Myeloperoxidase-specific Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies）関連急速進行性糸球体腎炎は、好中球自己抗体である MPO-ANCA の上昇を臨床的特徴とする自己免疫疾患の 1 つである。感染などにより活性化された好中球がその細胞表面に顆粒中の MPO を発現し、血液中の MPO-ANCA と反応して好中球の脱顆粒や活性酸素の放出をきたし、これらが糸球体血管内皮細胞や糸球体基底膜を傷害し、最終的には糸球体内に

増殖した上皮細胞による半月体形成を引き起こすと考えられてきた。MPO-ANCA が腎炎の発症自体に必要なのか、もしくは単に発症後に抗体価が上昇しているのにすぎないのかは不明であったが、近年マウスへの anti-MPO 抗体単独投与によって同様の特徴をもった半月体形成性腎炎が形成されることが明らかとなり、腎炎発症における anti-MPO 抗体の重要性が示された。しかしながら、anti-MPO 抗体によって糸球体腎炎が引き起こされる過程は未だ詳細に解析されていない。これまでの好中球と anti-MPO 抗体の相

相互作用を検討した多くの報告から、糸球体血管内皮細胞を傷害するのは好中球であることに疑いはない。この前段階の炎症初期において好中球が血管内皮細胞に接着するためには、血管内皮細胞側にも接着分子の発現が必須であることから、申請者は anti-MPO 抗体が糸球体血管内皮細胞にも直接作用して、好中球の接着・脱顆粒・活性酸素発生が起こりやすい環境を作っているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、「MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎の発症における糸球体血管内皮細胞の役割について明らかにする」ことを目的とした。具体的な目標としては、

(1) 糸球体血管内皮細胞における anti-MPO 抗体のターゲット分子に関する検討

これまでにマウス糸球体血管内皮細胞 (mouse Glomerular Endothelial Cells: mGEC) の単離初代培養法を確立し、anti-MPO 抗体の mGEC に対する影響を検討したところ、anti-MPO 抗体が直接、接着分子 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin) の発現を増加させることが分かっている。しかし、mGEC は全く MPO を発現していないことから、mGEC における anti-MPO 抗体のターゲット分子は MPO 以外であることが予測される。そこで、その分子を特定し、anti-MPO 抗体の結合を起点とする接着分子発現までのシグナリングカスケードを解明することを目標とした。

(2) 糸球体腎炎モデルマウス発症における糸球体血管内皮細胞の役割に関する in vivo 解析

申請者はすでに anti-MPO 抗体をマウスに投与することで糸球体腎炎を発症させるモデルを構築しており、このモデルマウスを利用して糸球体腎炎発症を誘導する糸球体血管内皮細胞活性化の役割を明らかにする。まず、anti-MPO 抗体の生体内分布を観察する。申請者は蛍光強度が高く安定性に優れた量子ドット (Quantum Dot: QD) を anti-MPO 抗体に結合させた anti-MPO-QD を利用して、詳細な anti-MPO 抗体の糸球体内での分布を観察する。また、このときの好中球の動態についても同時に観察し、anti-MPO 抗体の結合と接着分子発現量の上昇が、糸球体内への好中球の接着・遊走に関わっていることを証明する。

3. 研究の方法

(1) 糸球体血管内皮細胞における anti-MPO 抗体のターゲット分子に関する検討

当初の計画では免疫沈降法を用いて、mGEC に発現する anti-MPO 抗体のターゲット分子

を単離する予定であったが、非特異的な結合が多数見られたため、シンプルに mGEC のタンパク抽出液を 2 次元電気泳動で分離し anti-MPO 抗体を用いたウェスタンブロットで検出されるスポットを解析の対象とした。検出されたスポットと同様の泳動距離にあるタンパクスポットを CBB 染色したゲルから切り出し、マスペクトロスコピーによってスポットタンパクを特定した。

特定したタンパクに対する抗体を購入し、その mGEC に対する活性化作用を ICAM-1 cell ELISA を用いて評価した。

また、そのタンパクの発現を siRNA を用いてノックダウンすることにより、anti-MPO 抗体による mGEC の接着分子発現におけるそのタンパクの役割も加えて解析した。

(2) 糸球体腎炎モデルマウスにおける anti-MPO 抗体による接着分子発現量の変化

C57BL/6 マウスに anti-MPO 抗体を投与し、6 時間後に腎臓を摘出後、メッシュを用いて糸球体のみを単離した。単離した糸球体に発現する接着分子 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin) の mRNA 量を RT-PCR を用いて解析した。

(3) QD を用いた anti-MPO 抗体の生体内動態の解析

末梢血より単離したマウス及びヒト好中球をスライドガラス上に接着させ、fMLP、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 で刺激した後、固定した。QD 標識した Anti-MPO 抗体を用いて、細胞膜表面に表出した MPO を検出した。

さらに、カンジダ由来多糖画分 (CAWS)、fMLP を anti-MPO 抗体と組み合わせて投与することによって腎炎を発症させるモデルマウスにおいて、この QD 標識 anti-MPO 抗体を C57BL/6 マウスに投与した後、各組織 (肺、脾臓、肝臓、腎臓) の凍結切片を作製し、anti-MPO 抗体の生体内分布を解析した。

(4) 糸球体血管内皮細胞における接着分子の発現量増加と好中球の接着・遊走に關与するサイトカイン・ケモカインおよび炎症性分子の解析

Anti-MPO 抗体による mGEC の活性化をより詳細に解析するために、anti-MPO 抗体存在下で 6 時間培養した mGEC の培養上清を回収し、Bio-plex system を用いて 32 種類のサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。

さらに、この培養上清の好中球に対する活性を MPO 放出、O₂-産生、走化性の 3 点から解析した。

4. 研究成果

(1) 糸球体血管内皮細胞における anti-MPO 抗体のターゲット分子に関する検討

まず、mGEC のタンパク抽出液を二次元電気泳動で展開し、ウェスタンブロットによって anti-MPO 抗体と反応する分子を CBB 染色で検出し、単独のスポットを得た (図 1)。そのスポットタンパクを PMF 解析することにより、タンパク M (特許申請のためタンパク名は伏せる) が候補として挙げた。

次にタンパク M が anti-MPO 抗体の標的となっていることを確認するために、anti-MPO 抗体と同様に、anti-M 抗体で mGEC を刺激した時に、ICAM-1 が発現するかを解析した。その結果、有意な ICAM-1 発現の上昇が見られた。以上から、anti-MPO 抗体が mGEC のタンパク M に作用して細胞を活性化し、炎症を誘導する可能性が示唆された。このタンパク M に関する報告は世界的にも全くなく、新規マーカータンパクとして今後診断に応用可能であると考えられる。

現在、タンパク M を介したシグナリングカスケードの解析に加え、患者血清中にタンパク M に対する抗体が含まれているか検討するための準備を進めている。また、当該部分に関する論文投稿の準備を進めているが、タンパク M に関する特許申請の関係上、学会発表を含め、外部への発表は現段階では行っていない。

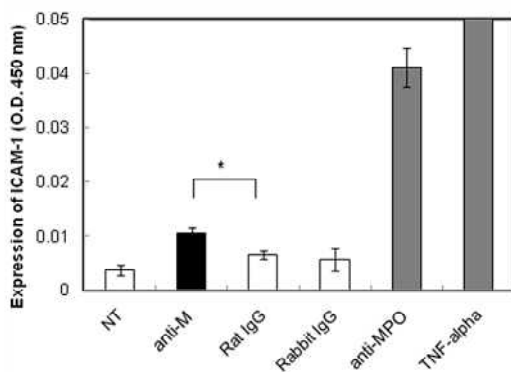
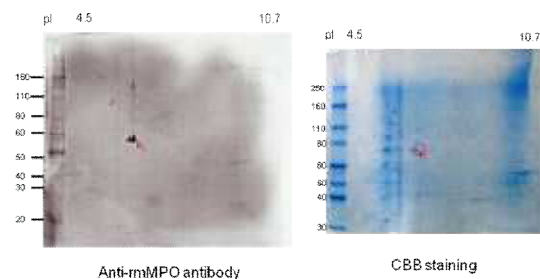


図 1 anti-MPO 抗体で検出されるスポットと、検出されたタンパク M に対する抗体による mGEC の活性化作用

(2) 糸球体腎炎モデルマウスにおける anti-MPO 抗体による接着分子発現量の変化

Anti-MPO 抗体を投与した C57BL/6 マウスから腎臓、腎糸球体、肝臓、肺、胸部大動脈を摘出・調製し、接着分子の発現を検討したが、

コントロールとして用意したウサギ IgG 投与群と有意な差は見られなかった。特に糸球体の単離のみでは、血管内皮細胞以外のメサンギウム細胞や上皮細胞の混入があるため、有意な差が見られなかったものと推察される。今後、同様の方法で腎臓の凍結切片を作製し、糸球体血管内皮細胞における接着分子の発現を検討する必要がある。

(3) QD を用いた anti-MPO 抗体の生体内動態の解析

Anti-MPO 抗体を QD で標識することに成功し、これを用いて炎症性サイトカインで刺激した好中球の MPO の細胞膜への表出を検出することができた。さらに、この QD 標識 anti-MPO 抗体を C57BL/6 マウスに投与したところ、肺、脾臓、肝臓によく集積するものの、腎糸球体への集積も確認することができた (図 2)。今後、この QD 標識 anti-MPO 抗体を用いた in vivo イメージングが可能になるものと考えられ、これまで分からなかった anti-MPO の生体内動態が明らかになるものと考えられる。

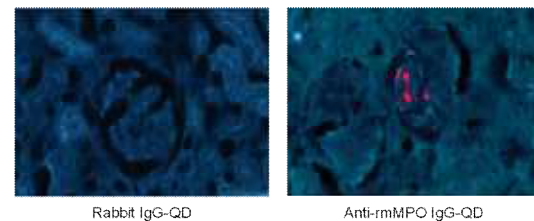


図 2 QD-標識 anti-MPO 抗体の腎臓における分布

(4) 糸球体血管内皮細胞における接着分子の発現量増加と好中球の接着・遊走に関するサイトカイン・ケモカインおよび炎症性分子の解析。

mGEC に対して anti-MPO 抗体を 6 時間処理し、培養上清を回収した。まず、この培養上清に含まれるサイトカインなどを同定するために Bio-Plex を用いて解析したところ、anti-MPO 抗体処理によって培養上清中の KC、MIP-2、MCP-1 濃度に有意な増加傾向が見られた。このうち KC、MIP-2 は好中球走化性因子としてこれまで多数報告されていることから、この培養上清に対する好中球の走化性を Transwell migration assay を用いて検討したところ、培養上清は好中球走化性を有することが明らかとなった (図 3)。さらに、KC、MIP-2 それぞれの中和抗体を用いて走化性の阻害効果について検討した結果、それぞれの中和抗体単独では 30-40% 程度の有意な阻害効果が見られ、両方の中和抗体を添加した場合には、約 45% の阻害効果を得た。しかしながら、100% の阻害効果は得られなかったことから、KC、MIP-2 以外にも走化性を有する分

子が mGEC から分泌されていることが考えられる。以上の結果より、anti-MPO 抗体は mGEC に直接作用して接着分子の発現を誘導するほかに、活性化した mGEC は好中球走化性因子を放出することで、好中球が遊走しやすい環境を作っていることが示された。

これまで、Anti-MPO 抗体によって好中球の活性化が引き起こされることは数多く報告されてきたが、糸球体血管内皮細胞に対する直接的な活性化作用は世界的に見ても全く報告がなかった。本研究課題で新たに明らかとなった anti-MPO 抗体で刺激した糸球体血管内皮細胞からの好中球走化性因子の産生は、これまで不明であった糸球体への好中球の遊走機構を説明する新しい知見と考えることができる。現在、当該部分に関する論文投稿の準備を進めている。

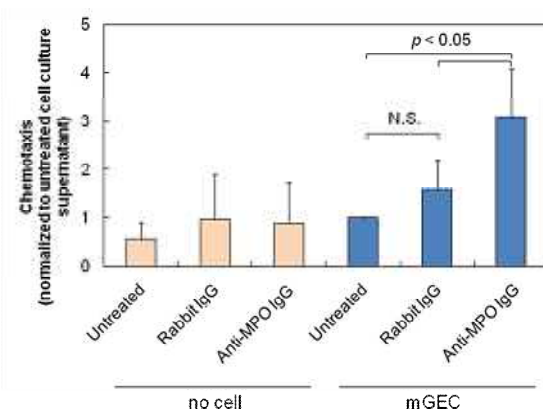


図3 anti-MPO 抗体で刺激した mGEC の培養上清による好中球走化作用

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7件)

長尾朋和、鈴木和男、「好中球機能異常による血管炎・腎炎」、細胞、41、pp.60-63、2009。(総説、査読無)

Hoshino A, Nagao T, Nagi-Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Nakayama T, and Suzuki K, "MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner," J Autoimmun., 31, pp.79-89, 2008。(査読有)

Adachi S, Nagao T, To S, Joe AK, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Moriwaki H, Maxfield FR, and Weinstein IB, "(-)-Epigallocatechin gallate causes internalization of the epidermal growth factor receptor in human colon cancer cells," Carcinogenesis, 29, pp.1986-1993, 2008。(査読有)

Mabuchi A, Nagao T, Koshio O, Ishiwata T, Yano A, Suzuki K, Yokomuro K, and Wheatley AM, "Role of F4/80Mac-1 adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice," Hepatol Res., 38, pp.1040-1049, 2008。(査読有)

長尾朋和、鈴木和男、「ANCA をめぐる基礎的研究の進歩」、呼吸器科、14、pp.348-354、2008。(総説、査読無)

Hoshino A, Nagao T, Nakasuga A, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K, "Nanocrystal quantum dot-conjugated anti-myeloperoxidase antibody as the detector of activated neutrophils," IEEE Trans Nanobioscience, 6, pp.341-345, 2007。(査読有)

Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, Yamamoto K, and Suzuki K, "Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in murine systemic vasculitis and glomerulonephritis model mice," Microbiol Immunol., 51, pp.551-566, 2007。(査読有)

〔学会発表〕(計21件)

Nagao T, 他3名、「Secretion of neutrophil chemotactic factors from glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody」, 第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月3日、京都

Kusunoki R, Nagao T, 他2名、「Reduction of CD3+B220+CD69+ cell population by treatment with 15-deoxyspergualin in SCG/Kj mice」, 第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月3日、京都

常賀、長尾朋和、他3名、「In vitro におけるIVIg治療の作用機序解析と判定法の確立」, 第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月1日、京都

Tomizawa K, Nagao T, 他3名、「MPO-ANCA specific IgG2b subclass decrease by treatment with 15-deoxyspergualin in SCG/Kj mice」, 第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月1日、京都

長尾朋和、「量子ドットを用いた糸球体腎炎のイメージングに向けて」, 第17回バイオイメージング学会、2008年11月1日、千葉

常賀、長尾朋和、他4名、「QD標識TNF-αを使った免疫グロブリン治療の作用解析」, 第17回バイオイメージング学会、2008年10月31日、千葉

長尾朋和、他5名、「MPO-ANCAによる糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現」,

第 14 回 MPO 研究会、2008 年 10 月 24 日、東京

楠怜奈、長尾朋和、他 5 名、「SCG/Kj mice に対する 15-deoxyspergualin 治療による CD3+B220+CD69+細胞の減少」、第 14 回 MPO 研究会、2008 年 10 月 24 日、東京

富澤一夫、長尾朋和、他 6 名、「SCG/Kj マウスにおける MPO-ANCA リスクエピトープと CD24+CD41+の発現について」、第 14 回 MPO 研究会、2008 年 10 月 24 日、東京

常賀、長尾朋和、他 2 名、「In Vitro における IVIg 治療の作用機序解析」、第 14 回 MPO 研究会、2008 年 10 月 24 日、東京

Ohno N, Miura N, Nagao T、他 2 名、
“Analysis of synthetic immunoglobulin by in vivo and in vitro cell culture,”
International Conference Regulation of inflammatory diseases vasculitis and athema- 2008/1/18, Chiba

Nagao T、他 7 名、“Direct activation of glomerular endothelial cells by MPO-ANCA,”
International Conference Regulation of inflammatory diseases vasculitis and athema- 2008/1/18, Chiba

Tomizawa K, Nagao T、他 5 名、「MPO-ANCA 関連腎炎自然発症 SCG/Kj マウスにおける 15-deoxyspergualin による MPO-ANCA および リスクエピトープ治療成績」、第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月 21 日、東京

Hoshino A, Nagao T、他 4 名、“MPO-ANCA induces IL-17A production by activated neutrophils of murine systemic vasculitis,”
第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月 22 日、東京

宇都宮健太郎、大河内美奈、長尾朋和、他 5 名、「腎炎のイメージングのための血管内皮細胞ターゲット」、第 16 回バイオイメージング学会、2007 年 11 月 2 日、野田

長尾朋和、他 7 名、「MPO-ANCA による系球体内皮細胞の活性化」、第 13 回 MPO 研究会、2007 年 10 月 26 日、広島

鈴木和男、長尾朋和、他 6 名、「血管炎の臓器特異性ペプチド候補のスクリーニング」、第 13 回 MPO 研究会、2007 年 10 月 26 日、広島

富澤一夫、長尾朋和、他 5 名、「急速進行性系球体腎炎自然発症 SCG/Kj mouse への 15-Deoxyspergualin の投与は MPO-ANCA および MPO-ANA リスクエピトープの減少を引き起こす」、第 13 回 MPO 研究会、2007 年 10 月 26 日、広島

山西裕司、猪原登志子、長尾朋和、他 5 名、「nMPO-ANCA の臨床的有用性の検討」、第 13 回 MPO 研究会、2007 年 10 月 26 日、広島

長尾朋和、他 7 名、「好中球自己抗体による系球体内皮細胞の直接的活性化」、炎症制御治療フォーラム千葉-2007-、2007 年 7 月

14 日、千葉

山西裕司、小林茂人、長尾朋和、他 2 名、「ウェゲナー肉芽腫症の 4 例」、炎症制御治療フォーラム千葉-2007-、2007 年 7 月 14 日、千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長尾 朋和 (NAGAO TOMOKAZU)

千葉大学大学院医学研究院・特任教員

研究者番号：90451757

(2)研究分担者

(3)連携研究者