

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07194

研究課題名（和文）全身性エリテマトーデスにおけるマイクロパーティクルの生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Investigation on the role of microparticles on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

研究代表者

清水 太郎（SHIMIZU, Taro）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・特任助教

研究者番号：30749388

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞外小胞の1つであるマイクロパーティクルが全身性エリテマトーデス（SLE）の病態に与える影響について研究を行った。健常時と比較して、SLEモデルマウスでは免疫細胞によるマイクロパーティクルの取り込みが減少し、血中のマイクロパーティクル数が増加することが明らかになった。またSLE病態時のマイクロパーティクルは免疫原性を示し、抗DNA抗体を誘導した。SLE病態時のマイクロパーティクルが免疫原性を示す原因を明らかにすべく、プロテオーム解析を行ったところ様々な自己抗原が含まれていることが明らかになり、自己抗原に対する自己抗体の結合も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞は、疾患の診断や薬物送達担体として注目されているが、自己免疫応答に及ぼす影響については明らかではなかった。本研究では、細胞外小胞の1つであるマイクロパーティクルが自己免疫応答を惹起することを明らかにした。またSLE病態時においてマイクロパーティクルの免疫細胞により取り込みが低下することが明らかになった。このような異常な免疫応答はSLE病態の増悪に寄与している可能性がある。未だSLEを根治させることのできる治療法は開発されておらず、新規の有効かつ安全な治療法が望まれている。マイクロパーティクルの除去を促進することができれば、新たなSLE治療に繋がるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of microparticle, one of extracellular vesicles, on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). In SLE model mice, the uptake of microparticles by immune cells were decreased and the number of microparticles were increased in blood. In addition, microparticles derived from SLE model mice showed immunogenicity and induced anti-DNA antibody production. Proteome analysis demonstrated that microparticles derived from SLE model mice contains various autoantigens and autoantibodies.

研究分野：医療薬学

キーワード：全身性エリテマトーデス 自己免疫疾患 マイクロパーティクル 自己抗原

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は、DNAをはじめとする自身の核成分に対する自己抗体の産生が特徴的な自己免疫疾患である。その病態では、皮膚や臓器、神経など全身性の慢性炎症が生じる。特に SLE における腎障害はループス腎炎と呼ばれ、SLE で特徴的な症状の 1 つである。SLE は厚生労働省により指定難病に指定されており、本邦では約 6 万人の患者が登録されている。しかし、未だ SLE を根治させることのできる治療法は開発されておらず、現在は副作用の大きい免疫抑制剤を用いるのが主流となっており、新規の有効かつ安全な治療法が望まれている。

カチオン性リポソームは核酸の輸送担体として用いられているが、以前我々は、核酸を搭載したカチオン性リポソームを健常マウスに投与することで、自己抗体である抗核酸抗体が誘導されることを見出した。また、SLE モデルマウスにこのリポソームを投与したところ、自己抗体と免疫複合体を形成して腎臓に沈着し、腎障害の増悪を引き起こすことを明らかにし、核酸搭載リポソームが SLE 症状の増悪を引き起こすことを報告した。

この知見を基に、我々は生体内に存在する核酸を搭載した細胞外小胞であるマイクロパーティクルに着目し、マイクロパーティクルが核酸搭載リポソームと同様に SLE 症状の増悪をもたらしているのではないかと考えた。マイクロパーティクルはアポトーシス細胞由来の物質であり、SLE で生じている炎症部位からマイクロパーティクルの放出が促進されていると考えられる。すなわち、SLE においてマイクロパーティクルが自己抗体の産生や組織傷害を惹起し、さらなるマイクロパーティクルの放出を引き起こすという負のサイクルを形成していると予想した (図 1)。

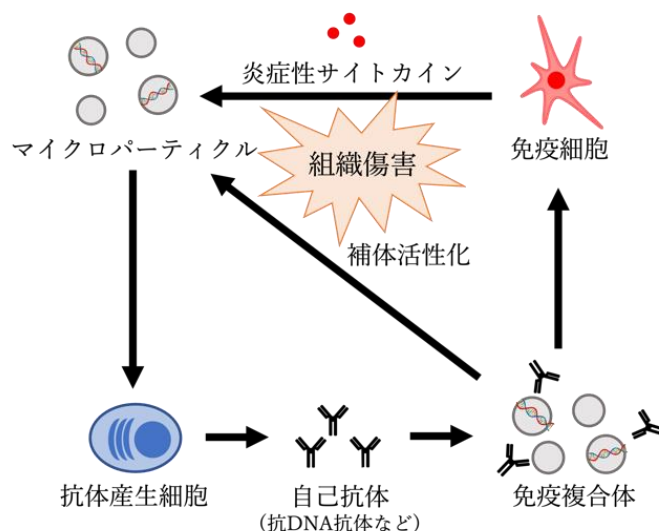


図 1. 想定される SLE の増悪サイクル

2. 研究の目的

本研究では、核酸搭載リポソームが SLE 症状を増悪させるということから、このリポソームと構造的に類似している内因性物質であるマイクロパーティクルを SLE の増悪に関与する因子として着目し、SLE におけるマイクロパーティクルの動態や構成分子の変化などを探索した。本研究は SLE 病態のメカニズム解明を志向しており、本研究を通して新たな SLE の病態メカニズムを提唱し、最終的には安全かつ有効性の高い新規の SLE 治療法の開発を目指している。

3. 研究の方法

(1) マイクロパーティクルの回収・評価

マウスの血液をクエン酸ナトリウム水溶液と混合し、段階的な遠心によって、マイクロパーティクルをペレットとして沈殿させ回収した。このペレットを PBS で懸濁し、各種検討に用いた。回収したマイクロパーティクルをフローサイトメトリー解析し、数および大きさを評価した。

(2) マイクロパーティクルによる抗 DNA 抗体の誘導の評価

マウスの脾臓から細胞を単離し、そこにマイクロパーティクル懸濁液を添加して共培養した。その後、培養上清中の抗 DNA 抗体を ELISA 法により測定した。

(3) 脾臓免疫細胞によるマイクロパーティクルの取り込みの評価

マウスの脾臓細胞に蛍光標識したマイクロパーティクルを添加してインキュベーションした。蛍光標識抗体を用いてB細胞、マクロファージ、および樹状細胞を染色し、それぞれの細胞によるマイクロパーティクルの取り込みをフローサイトメトリーによって評価した。

(4) マイクロパーティクル中タンパク質のプロテオミクス解析

回収したマイクロパーティクル中タンパク質について、LC-MS/MSによるプロテオミクス解析を行った。

(5) マウス血漿中の抗マイクロパーティクル抗体の検出

回収したマイクロパーティクル中タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ウエスタンブロット解析を行った。ニトロセルロース膜へタンパク質を転写した後、マウスの血漿を添加してインキュベーションし、その後マウスの抗体に対する二次抗体を用いて検出した。この検討法では、元来マイクロパーティクルに結合していた抗体と、後から添加した血漿に含まれる抗体が同様に検出されてしまうが、血漿を添加しないメンブレンをさらに作製し、これをバックグラウンドとして比較した。

4. 研究成果

(1) マイクロパーティクルのフローサイトメトリー解析

SLEモデルマウスより回収したマイクロパーティクルは、健常マウス由来のものと比較して数が増加しており、また同時にサイズも大きいものの割合が増加していた。これは、全身炎症による組織のアポトーシスの増加に伴うマイクロパーティクルの放出の亢進と、自己抗体との免疫複合体の形成によるものと考えられる。

(2) マイクロパーティクルによる抗DNA抗体の誘導の評価

マウスの脾臓細胞に、マイクロパーティクルを添加することで、*in vitro*における抗体誘導量の評価した。その結果、健常マウス由来のマイクロパーティクルと比較して、SLEモデルマウス由来のマイクロパーティクルはより多くの抗DNA抗体を誘導した。このことからSLEモデルマウスにおいて、血中のマイクロパーティクルが高い免疫原性を有するように変化していることが示唆された。また、SLEモデルマウス由来のマイクロパーティクルは、どちらの脾臓に対しても同様に抗体を誘導した。すなわち、このマイクロパーティクルは、健常マウスにおいてはSLE症状の発症、SLEモデルマウスにおいては症状の進行に関与していることが示唆された。

(3) 脾臓免疫細胞によるマイクロパーティクルの取り込みの評価

マイクロパーティクルを蛍光標識し、脾臓免疫細胞による取り込みを*in vitro*において評価した。B細胞、マクロファージ、樹状細胞による取り込みを評価したところ、これらの細胞は、SLEモデルマウス由来のマイクロパーティクルの取り込み量が小さい傾向にあることが明らかとなった。さらに、SLEモデルマウスにおけるマイクロパーティクルの取り込みは、健常マウスと比較して小さい傾向にあることも示された。しかし、その中で、辺縁帯マクロファージによる取り込みが、SLEモデルマウスにおいて増加していることを見出した。以上より、SLEにおけるマイクロパーティクルには、免疫細胞による取り込みを回避するような変化が生じている可能性が示唆された。また、辺縁帯マクロファージによる取り込みの違いについては、SLE病態に特異的な代償的機構が働いた結果ではないかと予想される。

(4) マイクロパーティクル中タンパク質のプロテオミクス解析

各マウスより回収したマイクロパーティクル中のタンパク質を解析したところ、SLEモデルマウス由来のマイクロパーティクルでは、SLEにおける自己抗原として報告のあるヒストンやリボソームタンパク質が増加していることが明らかとなった。また、免疫グロブリンタンパク質も多く検出され、自己抗体が多く結合していることも示された。さらに、補体タンパク質も全体として増加傾向にあり、補体活性化も高いレベルで起こっていることが示唆された。興味深いことに、SLEにおいて脾臓免疫細胞によるマイクロパーティクルの取り込みが減少していたのにも関わらず、IgMを始めとする貪食を促進する分子が多く検出された。また、SLEモデルマウス由来のマイクロパーティクルからは貪食受容体の減少が確認され、貪食細胞における発現が減少している可能性が示された。

(5) マウス血漿中の抗マイクロパーティクル抗体の検出

マウスの血中に存在する自己抗体がマイクロパーティクル中のどのようなタンパク質に結合しているのか検討するため、各マウスより回収したマイクロパーティクルおよび血漿を用いて、その自己抗体の反応性の評価を行った。その結果、全体として、IgMやIgG、さらにはアルブミンに対する自己抗体がバンドとして検出された。健常マウスのマイクロパーティクルに対しては抗アルブミンIgMが強く検出された。しかし、その他に顕著なバンドは確認できず、また、IgG型自己抗体はほとんど検出されなかった。一方で、SLEモデルマウスのマイクロパーティクルに

においては、健常マウスと同様に抗アルブミン IgM が強く検出されたのに加えて、抗アルブミン IgG も同様に濃く検出された。さらには、抗体の軽鎖に対する自己抗体も高いレベルで検出された。また、健常マウスでは検出されなかった約 60 kDa 付近を示す位置に、SLE モデルマウス特異的にバンドが検出された。健常マウスにおいて検出されたバンドは、自然抗体として常に産生されている自己抗体であると推測できる。しかし、SLE モデルマウスにおいては自然抗体がクラススイッチを起こして、より病態の増悪に寄与しやすく変化している可能性が示唆された。SLE モデルマウスにおいて特異的に検出されたタンパク質については、プロテオミクス解析の結果と照会してタンパク質をいくつか候補として挙げ、同定に向けて検討中である。

以上の結果より、SLE においてマイクロパーティクルの数や大きさが増加し、マイクロパーティクルが抗 DNA 抗体を誘導することが明らかになった。また SLE においてマイクロパーティクルの数が増加する原因としては、免疫細胞によるマイクロパーティクルの除去が低下しているためであることが示唆された。さらにマイクロパーティクルには様々な自己タンパク質が組み込まれており、自己抗体の結合も確認された。本研究結果より、SLE においてマイクロパーティクルは疾患の増悪に関与することが示唆され、マイクロパーティクルの質・量の制御は新たな SLE 疾患治療戦略となるかもしれない。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Haruka Takata, Taro Shimizu, Yoshino Kawaguchi, Hiro Ueda, Nehal E. Elsadek, Hidenori Ando, Yu Ishima, Tatsuhiro Ishida	4. 巻 -
2. 論文標題 Nucleic acids delivered by PEGylated cationic liposomes in systemic lupus erythematosus-prone mice: a possible exacerbation of lupus nephritis in the presence of pre-existing anti-nucleic acid antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 120529 ~ 120529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2021.120529	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 Milad Reda Qelliny, Taro Shimizu, Nehal E. Elsadek, Sherif E. Emam, Haruka Takata, Zeinab M. A. Fathalla, Amal K. Hussein, Khaled A. Khaled, Hidenori Ando, Yu Ishima, Tatsuhiro Ishida	4. 巻 18
2. 論文標題 Incorporating Gangliosides into PEGylated Cationic Liposomes that Complexed DNA Attenuates Anti-PEG Antibody Production but Not Anti-DNA Antibody Production in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2406-2415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00255	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 Marwa M. El Sayed, Taro Shimizu, Amr S. Abu Lila, Nehal E. Elsadek, Sherif E. Emam, Eman Alaaeldin, Amal Kamal, Hatem A. Sarhan, Hidenori Ando, Yu Ishima, Tatsuhiro Ishida	4. 巻 615
2. 論文標題 A mouse model for studying the effect of blood anti-PEG IgMs levels on the in vivo fate of PEGylated liposomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 121539-121539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2022.121539	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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上田 大, 高田 春風, 清水 太郎, 安藤 英紀, 異島 優, 石田 竜弘
2. 発表標題 全身性エリテマトーデス病態時の脾臓免疫細胞によるマイクロパーティクルの取り込み変化の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 大, 高田 春風, 清水 太郎, 安藤 英紀, 異島 優, 石田 竜弘
2. 発表標題 マイクロパーティクルによる抗体産生誘導は全身性エリテマトーデスの症状進行に関与する
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 高田 春風, 清水 太郎, 安藤 英紀, 異島 優, 石田 竜弘
2. 発表標題 核酸搭載PEG修飾リポソームが全身性エリテマトーデスの発症時期, 増悪に与える影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 大, 高田 春風, 清水 太郎, 安藤 英紀, 異島 優, 石田 竜弘
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスモデルマウス由来マイクロパーティクルにおけるプロテオーム解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 太郎, Qelliny Milad, 高田 春風, 上田 大, 安藤 英紀, 異島 優, 石田 竜弘
2. 発表標題 核酸搭載PEG修飾カチオン性リポソームによる抗PEG抗体および抗核酸抗体誘導に及ぼすガングリオシド修飾の影響
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Shimizu, Haruka Takata, Milad Reda Qelliny, Tatsuhiro Ishida
2. 発表標題 Evaluation of immunogenicity and adverse effects of nucleic acid-loaded nanoparticles
3. 学会等名 14th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------