

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590885

研究課題名（和文）

患者血清を用いた免疫複合体疾患動物実験モデルの樹立

研究課題名（英文）

Establishment of immune complex-mediated disease models by human patient sera.

研究代表者

坪井 直毅 (TSUBOI NAOTAKE)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50566958

研究成果の概要（和文）：ヒトFc・受容体トランスジェニックマウス(hFc・RTg)への全身性エリテマトーデス(SLE)患者血清移入による誘導性ループス腎炎マウスモデルの樹立により、疾患発症はhFcγRIIA依存적であり、さらにはMac-1の保護的役割が明らかとなった。Pristane誘導性SLEモデルの解析では、Mac-1の肺出血に対する促進的役割、ループス腎炎に対する保護的役割という多面的機能が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In newly established animal model of lupus nephritis induced by passive transfer of human systemic lupus erythematosus (SLE) sera, essential role of human FcγRIIA and protective role of Mac-1 for disease induction were elucidated. The Pristine-induced SLE model demonstrated dual roles of Mac-1 as promoting pulmonary hemorrhage and as protective against lupus nephritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：好中球・全身性ループスエリテマトーデス・インテグリン・Fc受容体

1. 研究開始当初の背景

全身性ループスエリテマトーデス(SLE)や慢性関節リウマチ(RA)等の自己免疫疾患では、組織における免疫複合体(抗原-抗体複合体:IC)あるいは細胞障害性IgGの沈着が特徴的であるが、疾患発症機構については今なお不明な点が多い。近年IC認識に携わるFc受容体が、白血球などエフェクター細胞の活性化や抑制を介して疾患発症を制御していることが、各種Fc受容体欠損マウスによる解析によって明らかになってきている。しかしながらマウス-ヒト間にはFc受容体の種類、発現様式に大きな差がある。マウス好中球では単量体IgGに高い親和性をもつFcγRI、

IgGクラスの免疫複合体に親和性の高いFcγRIII, IVが活性型受容体として発現しており、シグナル伝達モチーフとしてITAM(immunotyrosine activating motif)を細胞内にもつか、あるいはITAMを有するFcγchainと関連し、IgG認識後の細胞活性化に関与している。またFcγRIIBはITIM(immunotyrosine inhibitory motif)を有し、細胞活性の抑制機能を担っている。一方ヒト好中球では、FcγRI、FcγRIIBの発現はマウスと共通であると考えられているが、ITAMを有するFcγRIIAとGPI結合型でシグナル伝達部位を持たないFcγRIIBが発現している点でマウスとは大きな相違がある。従っ

て、動物実験により得られた結果および結論を直接ヒト疾患に応用することは困難である。

研究代表者は米国 Brigham&Women's Hospital、Dr.Tanya Mayadas 研究室留学中、活性型 Fc・受容体欠損マウスに、ヒト MRP-8 プロモーター発現制御下に、ヒト FcγRIIA (hFcγRIIA) および FcγRIIIB (hFcγRIIIB) を遺伝子導入することにより、好中球特異的ヒト化 FcγR トランスジェニックマウス (hFcγRTg マウス) を作成した。hFcγRTg マウスはマクロファージ、リンパ球、肥満細胞等の白血球分画においては Fcγ受容体を欠損していたが、90%以上の好中球で hFcγ受容体を発現していた。ウサギ由来 nephrotoxic serum を投与で惹起した抗 GBM 抗体腎炎モデルによる in vivo での解析では、hFcγRIIATg マウス (IIA⁺γ^{-/-}) においてのみ腎障害が誘導されたが、興味深いことに hFcγRIIIBTg マウス (IIIB⁺γ^{-/-}) では疾患発症は認められなかったものの、好中球の糸球体へのリクルートが認められた。以上の結果から免疫複合体疾患における組織障害には好中球上の hFcγRIIA が、IC 沈着組織への好中球のリクルートには hFcγRIIIB が重要であるとともに (Tsuboi, N., et al: *Immunity* 2008 Jun;28 (6) :833-46.), 当トランスジェニックマウスはヒト自己免疫疾患発症機構を理解し、将来的な治療ターゲットを選定する上で有用なツールと考えられる。

一方、細胞表面上に発現しているインテグリンは、細胞と細胞外基質との接着、加えてその後細胞活性化に不可欠な分子である。インテグリンはα鎖とβ鎖からなるヘテロ二量体であり、α鎖、β鎖の組み合わせにより、多種の二量体、すなわちインテグリンファミリーを形成しているが、白血球の血管内皮への接着や炎症組織への遊走過程においては、Mac-1 (CD11b/CD18), LFA-1 (CD11a/CD18) が重要な役割を担うことが、遺伝子欠損動物や機能阻害抗体を用いた長年の研究により明らかになってきている。近年ヒト SLE 患者において、Mac-1 のα鎖である CD11b の点変異と疾患発症頻度に相関があるとする報告が相次いでいるが (Nat Genet. 2008 Feb;40 (2) :152-4., Nat Genet. 2008 Feb;40 (2) :204-10., N Engl J Med. 2008 Feb 28;358 (9) :900-9.), その病因学的意義については明らかになっていない。抗 GBM 抗体腎炎や慢性関節リウマチの動物実験モデルにおいても、Mac-1 欠損マウス (Mac-1^{-/-}) は野生型に比して有意に疾患活動性が亢進しているため (J. Immunol. 2005 Mar 15;174 (6) :3668-75. and unpublished data by Tsuboi and Mayadas), Mac-1 は自己免疫疾患の発症を負に制御している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

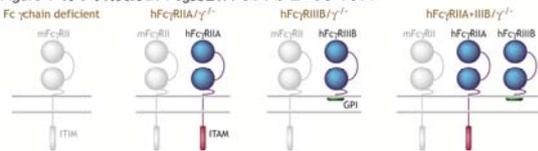
(1) Mac-1 欠損条件下に hFcγR を発現したマウスに SLE 患者血清を投与し、ループス腎炎を惹起し、ヒト自己免疫疾患患者血清中の pathogenic IgG と好中球 Fc・受容体および Mac-1 の役割を in vivo で解明する。

(2) Mac-1 欠損マウスに Pristane 誘導性 SLE を惹起し Mac-1 の自己免疫疾患発症、進展における役割を in vivo で解明する。

3. 研究の方法

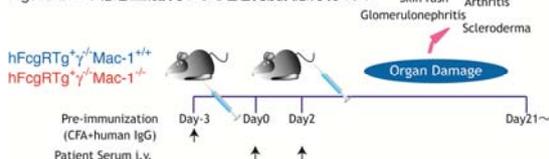
(1) ヒト患者血清誘導性ループス腎炎モデル作成: hFcγRIIATg マウス (IIA⁺γ^{-/-})、hFcγRIIIB (IIIB⁺γ^{-/-}) (Figure 1) をそれぞれ Mac-1 欠損マウスと交配し、IIA⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}、IIIB⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}を、さらに IIA⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}と IIIB⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}を交配することにより IIA⁺IIIB⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}を作成した。

Figure 1 好中球特異的ヒトFcγ受容体トランスジェニックマウス



野生型、Mac-1^{-/-}、IIA⁺IIIB⁺γ^{-/-}、IIA⁺γ^{-/-}、IIA⁺IIIB⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}、IIA⁺γ^{-/-}Mac-1^{-/-}、γ^{-/-}Mac-1^{-/-}の各マウスを 2.5μg のヒト IgG と CFA で Day-3 に前免疫し、200μl ヒト患者 (ACR の SLE 活動性クライテリア 6 以上を満たす) 血清を Day0、2 に投与。疾患惹起後 Day7、14 に採尿し、尿アルブミン/尿クレアチニン比を算出、Day21 にマウスを屠殺し、組織学的検討を行った (Figure 2)。

Figure 2 ヒト患者血清投与による自己免疫疾患再現モデル



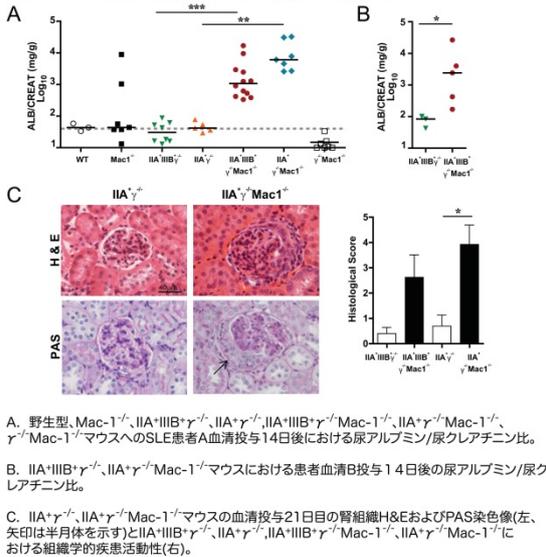
(2) Pristane 誘導性 SLE モデル作成

8~10 週齢の C57BL/6 背景 Mac-1^{-/-}、野生型マウスに Pristane 0.5ml を腹腔内投与。肺、腹腔内炎症細胞を Pristane 処置後 Day5、10、14 に採取し、肉眼的肺出血、組織学的検討、FACS による腹腔内白血球分画解析を行った。単球/マクロファージ、免疫調整 M2 マクロファージ、好中球、好酸球は、それぞれ F4/80、MMR、Ly6G、siglec-F に対する各モノクローナル抗体を用い同定した。IL-4、IL-6、IL-13、TNFα の各種サイトカインは ELISA で測定した。Pristane 投与 3 ヶ月から毎月採尿を行い、尿タンパク、尿クレアチニンを測定し、6 ヶ月目には実験動物を屠殺、腎切片を作成し PAS、H&E 染色を行い、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト患者血清誘導性ループス腎炎モデル SLE 患者 A 血清投与 Day14 の腎障害を尿タンパク/尿クレアチン比で検討したところ、 $IIA^{\gamma^{-}}/Mac-1^{-}$ 、 $IIA^{\gamma^{-}}/IIIIB^{\gamma^{-}}/Mac-1^{-}$ マウスで有意な蛋白尿増加を認めた(A)。SLE 患者 B においても同様の結果であった(B)。血清投与 21 日後の腎組織所見では $IIA^{\gamma^{-}}/Mac-1^{-}$ マウスで糸球体内細胞増殖、半月体を認め、組織学的活動性評価においても Mac-1 欠損条件下でのみ活動性の上昇が認められた。以上から SLE 患者血清による腎障害には hFcγIIA が必須であり、かつ Mac-1 欠損条件が必要であると考えられた。

Figure 3 ヒト患者血清誘導性ループス腎炎による腎障害



(2) Pristane 誘導性 SLE モデル

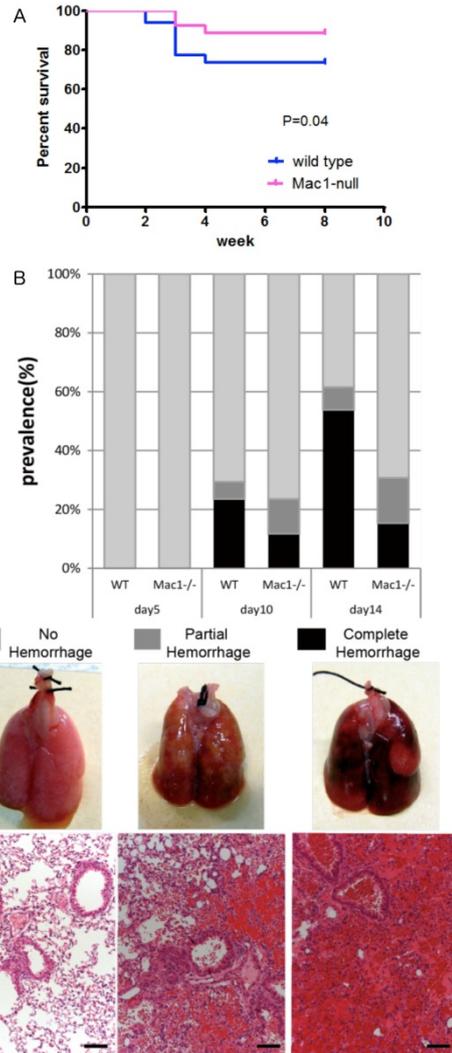
① Pristane 誘導性肺出血 (Figure 4)

Pristane 投与 8 週間以内の死亡率は Mac-1^{-/-} マウスで有意に低下していた(A)。外観上肺出血は Complete, Partial そして肺出血なしに区分したが、Mac-1^{-/-} マウスでは肺出血の程度が野生型に比し有意に軽度であった。肉眼的肺出血を呈した組織所見では、肺胞内に RBC を著明に認めた(B)。以上より、Mac-1 は Pristane 誘導性の肺出血を促進する因子であると考えられた。

② Pristane 誘導性ループス腎炎 (Figure 5)

Pristane 投与後 3 ヶ月以降、野生型マウスでは蛋白尿は減少に転じたが、Mac-1^{-/-} マウスではその後も増加傾向を示した(A)。6 ヶ月後の PAS および H&E 染色腎組織を検討したところ、Mac-1^{-/-} マウスでは糸球体内半月体、PAS 陽性 deposition、糸球体好中球浸潤や核崩壊像を顕著に認め(B)、活動性も野生型に比し有意

Figure 4 Pristane投与後の生存曲線と肺出血



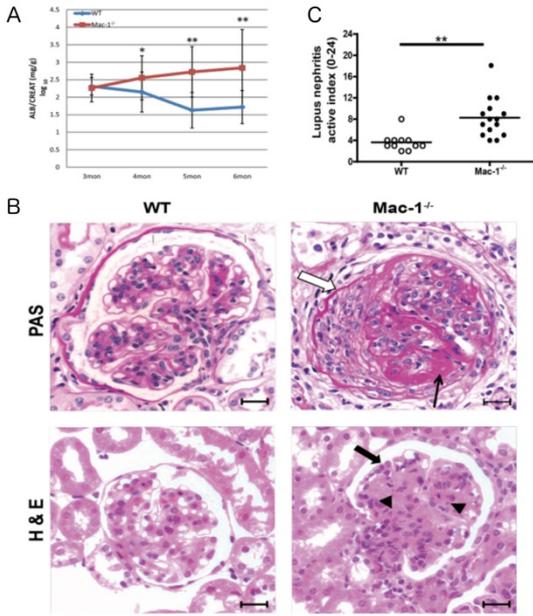
A. 野生型(Wild type)とMac-1^{-/-}マウスでのPristane投与後の生存曲線。
B. 野生型(Wild type)とMac-1^{-/-}マウスにおけるPristane誘導性肺出血
上段: 肺出血出現程度
中段: 肺出血の肉眼的重症度
下段: 組織学的所見(H&E染色)

に増加していた(C)。以上から、肺出血で示したのと反対に、Mac-1 は Pristane 誘導性ループス腎炎発症・進展に対する抑制因子であることが示唆された。

③ 腹腔内サイトカイン解析 (Figure 6)

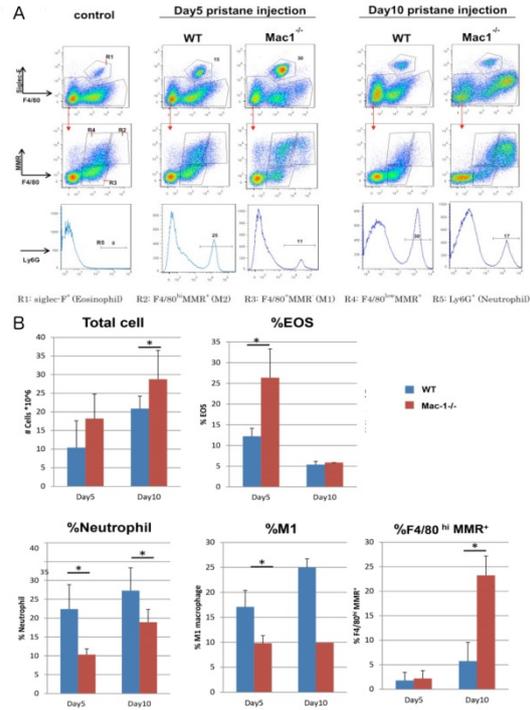
Pristane 投与 10 日後の腹腔内炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法で検討した。IL-6 と TNFα濃度は野生型で高く炎症が Mac-1^{-/-} マウスでは抑制されていると考えられた。一方 5 日目の IL-4 と IL-13 濃度は Mac-1^{-/-} マウスで有意に増加しており、同サイトカインの上昇が Mac-1^{-/-} マウスにおける炎症低下に関わっていることが示唆された。以上から Pristane 投与初期の腹腔内炎症に対し Mac-1 は促進的に働いていると考えられた。

Figure 5 Pristane誘導性ループス腎炎



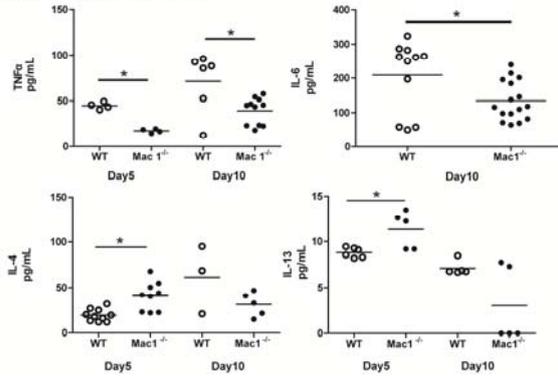
A. 野生型(WT)とMac-1^{-/-}マウスにおけるPristane投与3ヶ月以降の尿アルブミン/尿クレアチニンの推移。
 B. Pristane誘導性ループス腎炎の野生型(WT)とMac-1^{-/-}マウスにおける組織所見(↑半月体、↑PAS陽性沈着物、↑好中球、▶核崩壊像)
 C. 組織学的活動性評価。

Figure 7 Pristane投与後の腹腔内白血球分画解析



A. FACSによる好酸球(EOS)、好中球(Neutrophil)、炎症性マクロファージ(M1)、免疫調整性マクロファージ(M2)の同定。
 B. 野生型(WT)とMac-1^{-/-}マウスの各白血球分画の定量比較。

Figure 6 腹腔内サイトカイン解析



④Pristane 投与後腹腔内白血球分画の検討 (Figure 7)

Mac-1^{-/-}マウスにおける Pristane による炎症性サイトカイン低下、および IL-4、IL-13 上昇が、腹腔内の炎症細胞数による可能性を考え、白血球分画の解析を FACS により行った。Pristane 投与 5、10 日目の腹腔内好酸球 (F4/80⁺siglec-F⁺) および免疫調整性 M2 マクロファージ (F4/80^{high}MMR⁺) は Mac-1^{-/-}マウスにおいて顕著に増加していたが、好中球 (Ly6G⁺) と炎症性 M1 マクロファージ (F4/80⁺MMR⁺) は野生型で有意に増加していた。以上より Mac-1 欠損条件下では増加した好酸球由来の IL-4、IL-13 により、M2 タイプへのマクロファージ形質転換が促進し Pristane 投与後の腹腔内炎症の軽減に寄与している可能性が示唆された。

ヒト患者血清と Pristane の両実験的誘導性ループス腎炎モデルの結果から、Mac-1 は腎炎発症・進展に対し、保護的に働くと考えられた。野生型と Mac-1^{-/-}マウス両者間でみられた、肺出血に対しては、腹腔内への好酸球誘導による IL-4、IL-13 が、免疫調整 M2 マクロファージの誘導を Mac-1^{-/-}マウスにおいて促進し、結果炎症抑制に働いたと考えられたが、その後のループス腎炎での Mac-1^{-/-}マウスにおける疾患活動性上昇については、炎症改善の遅延、免疫調整性 M2 による抗原提示の促進、Mac-1 陽性 B 細胞の機能低下など様々な要因が考えられる。今後は Pristane 投与後の腹腔内サイトカインや炎症白血球分画の差異が、後のループス腎炎発症へ繋がる分子生物学的メカニズムについてさらに解析を加える予定である。

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 8 件)

- Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by mac-1 deficiency. Rosetti F, Tsuboi N, Chen K, Nishi H, Hernandez T, Sethi S, Tsokos GC, Mayadas TN. (他 6 名, 2 番目) *J Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3714-23.

- 査読有
2. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama s. (他 8 名, 9 番目) *Cell Transplant.* 2012 Sep 7. [Epub ahead of print] 査読有
 3. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by Fc γ RIIIB but induces neutrophil extracellular traps via Fc γ RIIA in vivo. Chen K, Tsuboi N, Mayadas TN. (他 6 名, 4 番目) *Blood.* 2012 Sep 6. [Epub ahead of print] 査読有
 4. Endothelial CD47 Promotes Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation and Participates in T Cell Recruitment at Sites of Inflammation In Vivo. Tsuboi N, Aikawa M, Newton G, Luscinskas FW. (他 5 名, 3 番目) *J Immunol.* 2012 Sep 1;189(5):2553-62. 査読有
 5. Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenoantibody production. Saka Y, Tsuboi N, Maruyama S. *Xenotransplantation.* 2011 May-Jun;18(3):196-208. (他 9 名, 9 番目) 査読有
 6. Regulation of human neutrophil Fc γ receptor IIa by C5a receptor promotes inflammatory arthritis in mice. Tsuboi N, Köhl J, Mayadas TN. (他 7 名, 1 番目) *Arthritis Rheum* 2011 Feb;63(2):467-78. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. 古橋和拓, Serum Starved Adipose-Derived Stromal Cells Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis by Promoting the Generation of M2 Immunoregulatory Macrophages, 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, San Diego, USA, 2012/11/02
2. 坪井直毅, ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎の透析導入後にヘパリン起因性血小板減少症(HIT)を合併した 2 例, 第 57 回日本透析医学会学術集会, 2012/06/24, 札幌
3. 古橋和拓, LOW SERUM CULTURED ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AMELIORATE CRESCENTIC GLOMERULONEPHRITIS BY FUNCTIONAL POLARIZATION OF MACROPHAGES INTO IMMUNOREGULATORY M2 PHENOTYPE, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 横浜, 2012/6/13
4. 丸山彰一, POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS FROM HUMAN/RAT/MOUSE AS A NEW TOOL FOR THE TREATMENT OF SYSTEMIC SCLEROSIS, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 横浜, 2012/6/13
5. 石一沁, Mac-1 deficiency exacerbates glomerulonephritis in experimental model of systemic lupus erythematosus, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/03
6. 坪井直毅, ループス患者血清誘導性腎障害は好中球 Fc γ 受容体 IIA により惹起されインテグリン Mac-1 欠損下で発症する, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/02
7. Shi Yiqin, Mac-1 Deficiency Protects Mouse from Pulmonary Hemorrhage, Whereas Exacerbates Glomerulonephritis in Experimental Model of Systemic Lupus Erythematosus, The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012(AP-VAS), 東京, 2012/03/29
8. 古橋和拓, Low Serum Cultured Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Crescentic Glomerulonephritis by Functional Polarization of Macrophages into Immunoregulatory M2 Phenotype, The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012(AP-VAS), 東京, 2012/03/29
9. 丸山彰一, Association of Adipokines with Cardiovascular Mortality in Patients on Hemodialysis, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, USA, 2011/11/10
10. 古橋和拓, Low Serum Cultured Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, but Not Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis by Functional Polarization of Macrophages into Immunoregulatory Phenotype, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, USA, 2011/11/10
11. 古橋和拓, Low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells, but not bone-marrow derived mesenchymal stem cells, ameliorate

- rat crescentic glomerulonephritis by functional polarization of macrophages into immunoregulatory M2 phenotype, 5th International Conference on Autoimmunity: Mechanisms and Novel Treatments, ギリシャ, 2011/9/23
12. 古橋和拓, 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた壊死性半月体形成腎炎への新たな治療法の確立～骨髄由来間葉系細胞ではなく塩脂肪由来幹細胞がもつ Macrophage への unique character～, 第三回 腎疾患と高血圧研究会, 大阪, 2011/06/27
 13. 古橋和拓, 脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) を用いた難治性腎疾患・自己免疫疾患に対する新たな治療戦略, 再生医療学会, 東京, 2011/03/02
 14. 古橋和拓, Therapeutic Potential of Adipose-Derived Stem Cells for Anti-GBM Glomerulonephritis, 43rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Denver, CO, USA, 2010/11/20
 15. 丸山 彰一, Association of CD34+ Circulating Progenitor Cells and C-Reactive Protein with Cardiovascular and All-Cause Mortality in Hemodialysis Patients, 43rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Denver, CO, USA, 2010/11/18
 16. 坪井 直毅, Primary roles of human neutrophil Fc gamma receptors in vivo, 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会, 広島, 2010/08/09
 17. 丸山 彰一, 低血清培養法による脂肪組織由来間葉系細胞を用いた骨粗鬆症モデルマウスに対する治療効果, 第 31 回日本炎症・再生学会, 東京, 2010/08/05
 18. 坪井直毅, Primary role for human neutrophil FcγRIIA and C5aR in the development of inflammatory rheumatoid arthritis, 7th International Conference on Innate Immunity, ギリシャ, 2010/7/4
 19. 古橋和拓, Therapeutic potential of adipose-derived stem cells for anti-GBM glomerulonephritis, 7th International Conference on Innate Immunity, ギリシャ, 2010/7/4
 20. 古橋 和拓, 脂肪由来間葉系幹細胞による Goodpasture disease モデルへの治療効果の検討, 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 神戸, 2010/06/17
 21. 坪井直毅, Primary role for human neutrophil Fcγ [gamma] RIIA and C5aR

in the development of inflammatory rheumatoid arthritis, Experimental Biology 2010, California, USA, 2010/4/27

○取得状況 (計 1 件)

名称: 脂肪組織由来間葉系肝細胞を含有する免疫抑制剤及びその用途

発明者: 丸山彰一、尾崎武徳、坂洋祐、古橋和拓、坪井直毅

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2011-535314

取得年月日: 平成 24 年 2 月 17 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 直毅 (TSUBOI NAOTAKE)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50566958

(2) 研究分担者

湯澤 由紀夫 (YUZAWA YUKIO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 00191479

丸山 彰一 (MARUYAMA SHOICHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10362253

(3) 連携研究者

なし