

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591441

研究課題名(和文)葉酸リセプターベータ発現活性化マクロファージを標的とした慢性炎症の治療薬の開発

研究課題名(英文)Therapy targeting folate receptor beta expressing macrophages in chronic inflammation

研究代表者

松山 隆美(Matsuyama, Takami)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30145479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：抗葉酸リセプター イムノトキシン関節内投与によるメチル化BSA誘発関節炎の治療効果を示した。さらに静脈注射によるブレオマイシン誘発強皮症の線維化抑制を皮膚の肥厚、ヒドロキシプロリン量の減少により明らかにした。また、皮膚線維化部位に早期に浸潤するマクロファージは葉酸リセプター 発現、TGF β 1 産生細胞であり、イムノトキシンの投与はこれらのマクロファージ数を減少させた。このモデルでの線維化抑制の機構としてイムノトキシンによるCTGF産生の抑制は早期では明らかでないことから、TGF β 1 産生マクロファージの減少の結果、CTGF産生を産生する線維芽細胞が減少することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We assessed the antiarthrogenic and the antifibrotic effects of depletion of FRbeta-expressing macrophages in methylated BSA induced arthritis and bleomycin induced skin fibrosis models using a recombinant immunotoxin to FRbeta, respectively. Skin fibrosis was evaluated by the change of skin thickness and hydroxyproline content on Day 29. The TGFbeta1 mRNA levels in the treated skin were assessed by quantitative real-time RT-PCR on Day 9. Anti-FRbeta-PE38 treatment led to a dramatic reduction in the number of FRbeta-expressing macrophages. Additionally, skin thickness and hydroxyproline content, were markedly reduced. TGFbeta1 mRNA levels were also down-regulated after the treatment. TGFbeta1 expression was enriched in FRbeta-expressing macrophages compared with FRbeta-negative macrophages. Anti-FRbeta-PE38 treatment efficiently depleted FRbeta-expressing macrophages and consequently alleviated BLM-induced skin fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病

キーワード：葉酸リセプター イムノトキシン

1 研究開始当初の背景

葉酸リセプターには、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタがあり、アルファは主に上皮性腫瘍膜表面に、ベータは主に炎症組織マクロファージ膜表面に存在する。ガンマには膜型はなく、骨髄系細胞から分泌される。デルタは制御性CD4細胞膜に発現する。葉酸リセプターベータ(FR-B)のリガンドである葉酸は増殖のない炎症マクロファージに取り込まれた後、RNA合成や蛋白合成に利用されることから、FR-B発現マクロファージは活性化マクロファージと考えられる。FR-Bのリサイクリングは活発であり、高濃度の葉酸がエンドソームに集積する。葉酸は生理的代謝経路で利用されるため、FR-Bを介した葉酸・薬剤の輸送経路においても薬剤が傷害されることは少ないと考えられ、FR-Bを介した多くのドラッグデリバリーシステムが試みられている。これらの研究のほとんどは葉酸に種々の薬剤を結合させた葉酸誘導体を用いており、これらの葉酸誘導体はインビトロの系やモデル動物において炎症抑制効果を示した。また、葉酸・アイソトープを用いた炎症部位の診断法も開発されている。葉酸誘導体使用の欠点として、生体内の葉酸濃度に左右されることや使用される葉酸誘導体はFR-Bに低親和性のため、高濃度の投与が必要になり、他の細胞による非特異な取り込みがみられることが挙げられる。われわれはこれまで、マウス、ラット、ヒトFR-Bに対する単クローン抗体を作成し、末梢血単球や常在組織マクロファージにはFR-Bの発現はみられないが、各種炎症部位やがん組織に浸潤したマクロファージにFR-B発現がみられることを示したこれまでの炎症性マクロファージに対する治療戦略の多くは産生される個々の炎症物質を標的としたものであったが、われわれ

はFR-B発現マクロファージにアポトーシス誘導をおこすイムノトキシンを開発し、このイムノトキシンが種々の炎症モデルやがん移植モデルに治療効果があることを報告した。これらの成績はこのイムノトキシンが慢性炎症活動期におけるM1マクロファージ、線維化が臓器障害をおこすM2マクロファージ、がん浸潤マクロファージを標的とした治療薬になり得ることを示している。関節リウマチ治療は生物製剤により、劇的な治療効果が示されたが、治療効果の見られない例やいくつかの関節の炎症が残る場合がある。既に関節リウマチ患者においてFR-B発現マクロファージが存在することを示したが、抗FR-Bイムノトキシンの関節注射による治療効果は示されていない。強皮症は、膠原病の一つで、線維化を特徴とする皮膚と身体のいろいろな部分に病変を発症する原因不明の慢性疾患である。強皮症の病態としては、線維芽細胞の活性化(コラーゲン等の細胞外基質の蓄積)、血管障害及び免疫異常(自己抗体)が挙げられる。強皮症の発病機序の一つとして、マクロファージの早期浸潤と浸潤した当該マクロファージからの分泌によるTGFの上昇が注目されている。活性化マクロファージは線維化の早期に最初に浸潤する細胞であり、TGF, CTGF, PDGF等の因子を分泌して強皮症の線維化過程において重要な働きをすると推測されている。強皮症の治療の現状においては、早期の患者に対しては副腎皮質ステロイド薬が一般的に使用され、また肺の症状に対しては免疫抑制剤が一般的に使用される。しかしながら、従来において、強皮症の進行を完全に根治させる治療は確立していない。

2. 研究の目的

炎症マクロファージに対する治療戦略には、個々の炎症物質を標的にしたものが多いが、本研究では炎症やがん組織に浸潤している葉酸リセプターベータ(FR-B)発現マク

ロファージを標的とした治療法の開発を目的とした。既に作成している抗FR-B抗体イムノトキシンを用いて、関節炎モデルラットの関節注における効果、全身性硬化症(強皮症)モデルマウスでの線維化抑制効果を明らかにした。また、炎症組織に浸潤したマクロファージ活性化の指標として、関節リウマチ患者血清中で可溶性FR-Bの測定をおこない、関節リウマチ生物製剤の治療効果の指標になるか検討した。さらに、炎症部位において新たな葉酸化化合物が作成されることについても検討した。

3. 研究の方法

ラット関節炎局所注による抗FR-Bイムノトキシンの抗炎症効果

Lewisラット背部にメチル化BSAとフロインドアジュバント懸濁液を1W間隔で皮下注射した。その2W後に膝にメチル化BSAを関節内注射して、メチル化BSAによる免疫複合体ラット関節炎を誘導した。メチル化BSA膝関節注の後に抗マウスFR-Bリコンビナントイムノトキシン(ラット抗マウスFR-B抗体のVL, VH領域遺伝子をクローニングし、VHと膜結合部分欠如緑膿菌毒素遺伝子と結合させ、それぞれの遺伝子を大腸菌に導入させ、得られた蛋白をS-S結合させることにより2本鎖Fvイムノトキシンを作成した)を投与し、14日間にわたって関節腫脹をキャリパーにて測定した。また、関節組織の病理学的検討をおこなった。

炎症モデル動物における抗FR-B抗体イムノトキシンの線維化抑制効果

線維化が病態の主体であるプレオマイシン皮内注強皮症モデル(C57/BL6マウス)において、イムノトキシンの投与はプレオマイシン投与後(4週間継続)1週目から、週2回3週間静脈投与した。強皮症皮膚の線維化は、皮膚の厚さ、ハイドロキシプロリン量で、また、FB-B陽性マ

クロファージ数、TGF, CTGFの測定はRT-PCR法を用いた。

血清可溶性葉酸リセプターベータの測定
葉酸リセプターアルファ、ガンマには反応しない2種の抗ヒトFR-B抗体の組み合わせを用いて、可溶性FR-Bの測定系を確立し、関節リウマチ患者血清中の可溶性FR-Bを測定した。膜部分を欠損させたFR-B遺伝子をバキュロビルス発現システムにて、ウイルスDNAを作成し、sf-21細胞に感染させた。培養上清から、抗葉酸リセプターベータ抗体結合カラムにて可溶性FR-Bを生成した。関節リウマチについては、活動性(DAS28, CRP)と可溶性FR-B値の相関や生物製剤の治療前後における可溶性FR-Bを測定し、可溶性FR-Bの治療効果の判定における有用性を検討した。

FR-Bに高親和性な葉酸誘導体の開発
関節リウマチ関節液あるいはがん性腹水にクエン酸を添加し、アルゴンガスにて密封保存した。3日以内にアセトニトリルにて、蛋白部分を沈殿させ、葉酸誘導体を含む上清をえた。上清を乾燥させ、アセトニトリル/酢酸アンモニウム液に溶かし、親水性カラム(C18)カラムにて分画し、既知の葉酸誘導体(葉酸、5-メチルテトラヒドロ葉酸、テトラ葉酸、5-フォルミルテトラ葉酸)と異なるものがあるかを検索した。また、可溶性葉酸リセプターベータを固層化したカラムを用い、結合物質を検討した。

4. 研究成果

メチル化BSA投与ラット関節炎において、抗FR-Bイムノトキシンの関節内投与は関節の腫脹を軽減させ、病理組織学的にも滑膜の肥厚、炎症細胞数の減少、カテプシンK陽性破骨細胞数の減少がみられた。また、軟骨骨破壊を抑制し、臨床応用への可能性が示された。抗FR-Bイムノトキシン静脈注射によるプレオマイシン誘発強皮症の線維化抑制を皮膚の肥厚、ハイドロキシプロリン量の

減少により明らかにした。また、皮膚線維化部位に早期に浸潤するマクロファージは F R - B 発現、TGF ベータ産生細胞であり、イムノトキシンの投与はこれらのマクロファージ数や TGF ベータ産生を抑制した。このモデルでの線維化抑制の機構としてイムノトキシンのによる C T G F 産生の抑制は早期では明らかでないことから、T G F ベータ産生マクロファージの減少の結果、C T G F 産生を産生する線維芽細胞が減少することが示唆された。

エピトープの異なる抗 F R - B 抗体の組み合わせによる可溶性 F R - B の測定系を確立した。さらにリコンビナント可溶性 F R - B を作成し、スタンダードとした。関節リウマチ患者の生物学製剤投与の前後において血清の可溶性 F R - B を測定した。可溶性 F R - B 値が高値なほど生物製剤の効果がみられる傾向にあった。関節リウマチ関節液中に新規の葉酸化合物が存在するか検討したが、上記の方法では発見できなかった。

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 6 件)

(1) Hua Li, Taku Nagai, Kazuhisa Hasui, Takami Matsuyama
Depletion of folate receptor β -expressing macrophages alleviates bleomycin-induced experimental skin fibrosis Modern Rheumatology 2014年印刷中 査読有り

(2) Rafael Samaniego, Blanca Soler Palacios, Angeles Dominguez-Soto, Carlos Vidal, Azucena Salas, Takami Matsuyama, Carmen Sanchez-Torres, Inmaculada de la Torre, Maria Eugenia Miranda-Carus, Paloma

Sanchez-Mateos, and Amaya Puig-Kruger
Macrophage uptake and accumulation of folates is polarization-dependent in vitro and in vivo, and is regulated by activin A" Journal of Leukocyte Biology

2014 年印刷中 査読有り

(3) Tsuneyoshi Y, Tanaka M, Nagai T, Sunahara N, Matsuda T, Sonoda T, Ijiri K, Komiya S, Matsuyama T. Functional folate receptor beta-expressing macrophages in osteoarthritis synovium and their M1/M2 expression profiles. Scand J Rheumatol. 2012;41(2):132-40 査読有り

(4) Nagai T, Kyo A, Hasui K, Takao S, Matsuyama T. Efficacy of an immunotoxin to folate receptor beta in the intra-articular treatment of antigen-induced arthritis Arthritis research & therapy 2012 May 2;14(3):R106. 査読有り

(5) Furusho Y, Miyata M, Matsuyama T, Nagai T, Akasaki Y, Hamada N, Miyauchi T, Ikeda Y, Shirasawa T, Ide K, Tei C.

Novel Therapy for Atherosclerosis Using Recombinant Immunotoxin Against Folate Receptor β -expressing Macrophages. Journal of the American Heart Association 2012 Aug;1(4):e003079. 査読有り

(6) Mar'ia M. Escribese, Elena Sierra-Filardi, Concha Nieto, Rafa Samaniego,†Carmen Sa'nchez-Torres,‡Takami Matsuyama, Elisabeth Calderon-Go'mez, Miguel A. Vega, Azucena Salas, Paloma Sa'nchez-Mateos, and Angel L. Corbi

The Prolyl Hydroxylase PHD3 Identifies Q:1; 2; 3 Proinflammatory Macrophages and its Expression Is Regulated by Activin A J Immunol. 2012 Aug

15;189(4):1946-54. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 李花、永井拓、松山隆美

葉酸リセプターβ 発現マクロファージを標的とした 強皮症モデルの治療に関する研究 第57回日本リウマチ学会 平成25年4月19日横浜

(2) 永井拓、大坪秀雄、李花、松田剛正、松山隆美

The detection of a soluble folate receptor beta in rheumatoid arthritis under anti-TNF therapy

第57回日本リウマチ学会平成25年4月19日横浜

(3) 松山隆美 Targeting FR-b-expressing macrophages in inflammatory diseases 第4回葉酸リセプターとトランスポーターシンポジウム平成24年10月9日 メキシコ

(4)Taku Nagai, Nobuhiko Sunahara, Takemasa Matsuda, Takami Matsuyama Immunotherapy of antigen-induced rat arthritis with an anti-folate receptor beta Recombinant immunotoxin

第56回日本リウマチ学会平成24年4月27日京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

1、名称：軟骨又は骨の破壊の診断薬

発明者：松山隆美、永井拓

権利者：鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2012-241968

出願年月日：平成24年11月01日

国内外の別：国内

2、名称：葉酸リセプター 及び を認識する抗体

発明者：松山隆美、永井拓、蓮井和久、高尾尊身

権利者：鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2012-281525

出願日：平成24年12月25日

国内外の別：国内

3、名称 強皮症治療剤

発明者 松山隆美、李花、永井拓

権利者 鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2013-54090

出願日：平成25年3月15日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

松山隆美 (MATSUYAMA TAKAMI)

研究者番号：30145479

鹿児島大学医歯学総合研究科・教授

(2)研究分担者

永井拓 (NAGAI TAKU)

研究者番号：90363647

鹿児島大学医歯学総合研究科・講師

(3)連携研究者

なし

研究者番号：