

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460496

研究課題名(和文) 膠原病疾患モデル組換え近交系マウスを用いた膠原病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy by using recombinant-inbred model mouse strains of collagen disease

研究代表者

宮崎 龍彦 (Miyazaki, Tatsuhiko)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80239384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膠原病疾患群ポリジーン系モデルであるMXH/lprを用いて、これまで萌芽的に開発してきたOpn結合サイトをブロックする蛋白アナログ、自己抗原エピトープ蛋白アナログをコムギ胚芽無細胞蛋白合成系で作製して投与することによる膠原病治療戦略を確立することを企図して、1. 膠原病モデル組換え近交系マウスMXH/lpr全系統の確立と臓器病変の解析、2. 自己抗原のエピトープとなる蛋白アナログのスクリーニング、3. 蛋白アナログによる免疫細胞のmodulationの解析、4. Span80ナノベシクルを用いた蛋白アナログDDSの予備的実験、5. 膠原病マウスモデルへの蛋白アナログの投与実験を行った。

研究成果の概要(英文)：We have developed the polygene model murine strains of collagen diseases MXH/lpr. By using these strains, we aimed to evolve a new therapeutic strategy employing amino-acid analogue which might block the functional binding site of Opn AND/OR might work as a decoy of autoantigens. First, we established 23 strains of MXH/lpr recombinant inbred mice (among created 106 strains). Next, we screened the epitope of autoantigen of glomerulonephritis. Modulation of immune function by protein analogue administration was analyzed. Regarding the new drug delivery system, preliminary study of a novel DDS by Span 80 nano-vesicles were executed. Finally, the administration of amino-acid analogues to the collagen model mice strains were carried out.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症 膠原病脂環モデルマウス 組換え近交系 蛋白アナログ

1. 研究開始当初の背景

従来、申請者らは、同一個体に腎炎、血管炎、関節炎、唾液腺炎などを発症し、膠原病疾患群のモデルとなる MRL/Mp-*Fas*^{lpr/lpr} (MRL/lpr)マウスのゲノミクス解析を通じて、各臓器病変の疾患感受性遺伝子座をマッピングし、各々の疾患感受性責任遺伝子を解析すると共に、これらの膠原病疾患群が Mather K (1949)の提唱したポリジーン遺伝形式をとることを示してきた。

さらに、これらの研究成果に立脚して個々の病変の病理発生機序および環境要因について解析をすすめるため、MRL/lpr と膠原病兼発系 C3H/HeJ-*Fas*^{lpr/lpr} の兄妹交配系から、世界で初めての膠原病モデル組換え近交系マウス MXH/lpr を 15 系統余樹立し、膠原病の複合病態が遺伝的に分離しうること、そしてそれがゲノム多型に基づくポリジーン系遺伝形式に支配されていること、さらに特定の環境要因により修飾されることを再現可能な近交系レベルで明らかにし、これらの系統に於ける系統間分布表 (strain distribution pattern table: SDP 表)、病理組織学的表現型、自己抗体、サイトカインプロファイルのデータベースを確立した。一方、申請者らは、MRL/lpr マウスのゲノミクス解析から 5 番染色体に位置する**オステオポンチン(OPN)**を自己免疫性糸球体腎炎の疾患感受性候補遺伝子として見出し、OPN の構造遺伝子多型に基づく蛋白多型が、糸球体腎炎の疾患感受性を規定すること、その多型によりインテグリン結合能が修飾されて機能的差異が誘導されること、その機能的差異を規定するアミノ酸多型を明らかにしてきた⁽⁴⁾。その結果を受け、多型サイトの立体構造の違いを解析し、この結合サイトを阻害する新規アナログ作製し、膠原病治療の萌芽的実験を施行してきた。さらに、連携研究者の長谷川らと共に G-protein-coupled receptor を介した炎症性疾患治療応用を企図し、

CXCL10 decoy トランスフェクト細胞移入による自己免疫性肺臓炎や唾液腺炎の治療、Treg 移入による GVHD 治療モデルの作出、CXCL アンタゴニスト移入による血管炎治療モデルの開発を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、再現性のある膠原病疾患群ポリジーン系モデルである MXH/lpr の他、MRL/lpr, 血管炎好発系 McH5/lpr および糸球体腎炎感受性遺伝子座 (OPN 遺伝子座) 特異的コンジェニックマウス McH/lpr-*Agnm3* を対象に、これまで萌芽的に開発してきた OPN インテグリン結合サイトをブロックする蛋白アナログ、MXH/lpr 各系統の解析で明らかになった自己抗原エピトープ蛋白アナログをコムギ胚芽無細胞蛋白合成系で作製して decoy として投与することによる新たな膠原病治療戦略を確立することを企図した。

3. 研究の方法

(1)モデル組換え近交系マウス MXH/lpr 全系統の確立と臓器病変の解析

MXH/lpr 系のサブストレインを確立した。当初 106 系統を作出し、各系統を 4 ~ 5 ヶ月齢および 2 ヶ月齢で harvest し、全臓器の組織標本を作製し、それぞれ光学顕微鏡レベルで比較解析した。また、尿蛋白をスクリーニングするとともに、各系統の血清サイトカイン、イムノグロブリン濃度を定量した。マウスの尻尾から DNA を抽出し、全染色体を 10 ~ 20cM までカバーする多型マイクロサテライトマーカーで各染色体領域の遺伝子型を決定し、SDP 表を作製した。そのなかで、染色体領域分布、疾患感受性に余り差異が見られない系統については淘汰を行い、最終的に確立する系統を選別した。

なお、これらのマウスストレインの約半数に原虫(蟻虫)感染が見つかり、クリーンアップを行ったため(クリーンアップは

完了) 研究の進捗にやや遅れが出た。

(2) エピトープとなる蛋白アナログのスクリーニング

自己抗原のエピトープとなる蛋白アナログのスクリーニング: これまでに MXH/lpr を用いてスクリーニングされた蛋白を中心に約 200 種類の蛋白をコムギ胚芽無細胞系で合成し、Alpha 法を用いて、上記 1. で確立したうち数系統の血清に存在する糸球体腎炎感受性に関わると目される自己抗体のエピトープをスクリーニングした。

(3) の免疫細胞を用いた蛋白アナログに対する反応の解析

蛋白アナログによる各近郊系マウス由来免疫細胞の免疫機能 modulation の解析: MXH/lpr 各系統および MRL/lpr と McH/lpr-Angm3 から腹腔マクロファージおよび脾細胞を採取し、そこに蛋白アナログを加えて、マクロファージ活性化および T 細胞活性化について解析を行った。さらに (2) で糸球体腎炎に関する自己抗体と目された蛋白アナログを投与することによる病態の修飾につき解析した。

(4) Span80 ナノベシクルを用いた蛋白アナログ drug delivery system の開発

界面活性剤 Span80 を用いた脂質二重膜ベシクルによる DDS を用いて、ベシクルの内水相に蛋白アナログを内包させ、尾静脈に投与し、臓器病変に送達する系の開発を行った。このモデルとして、抗腫瘍剤を内包させたベシクルを用いた DDS を用いた腫瘍治療モデルも解析した。さらにベシクルの表面を抗体やレクチンで修飾することにより特異性を持たせる予備実験を行った。

図 3 . Span80 ベシクルによる

(5) モデルマウスへの蛋白アナログ投与実験

糸球体腎炎感受性因子 OPN のインテグリン結合サイトを阻害する蛋白アナログを見出し、少なくとも蛋白 E****, D***, S***** の 3 種類の蛋白について臓器病変抑制の萌芽的実験を行い、少なくとも S***** を腹腔内投与することにより、糸球体腎炎が軽減することを見いだしている。そこで、各臓器病変が分離した近交系マウスを選択してこれを投与し、各臓器病変に対する治療効果を解析した。具体的には、静脈内投与、Span80 ベシクルに内包させて静脈投与、ベシクルに内包させて腹腔内投与し、実際の膠原病抑制が得られるか病理組織学的にスコアリングして比較解析した。また、この系における有害事象の解析を行った。

4. 研究成果

(1) モデル組換え近交系マウス MXH/lpr 全系統の確立と臓器病変の解析

MXH/lpr 系のサブストレイン 23 系統を確立した。当初 106 系統を作出し、各系統を 4 ~ 5 ヶ月齢および 2 ヶ月齢で harvest し、全臓器の組織標本を作製し、それぞれ光学顕微鏡レベルで比較解析した。また、尿蛋白をスクリーニングするとともに、各系統の血清サイトカイン、イムノグロブリン濃度を定量した。マウスの尻尾から DNA を抽出し、全染色体を 10 ~ 20cM までカバーする多型マイクロサテライトマーカーで各染色体領域の遺伝子型を決定し、SDP 表をほぼ完成させた。そのなかで、遺伝子系分布、疾患感受性にあまり差異が見られない系統については淘汰を行い、最終的に 23 系統を確立した。その中でも、特に皮膚炎および糸球体腎炎必発型 MXH100 に関し、詳細な解析を行った。

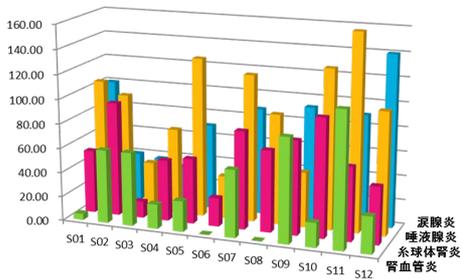


図1 . MXH/lpr における臓器病変の分離

(2) エピトープとなる蛋白アナログのスクリーニング

糸球体腎炎に関連する自己抗原蛋白として TNP-1, RRP8 を見いだした。コムギ胚芽無細胞蛋白合成系で作製し、C57BL/6 マウスに投与したところ、腎糸球体への免疫複合体沈着が明らかに認められた。これらのことから、血中の自己抗原蛋白は免疫複合体を形成して糸球体局所に沈着し、糸球体腎炎の端緒となる可能性が示唆された。

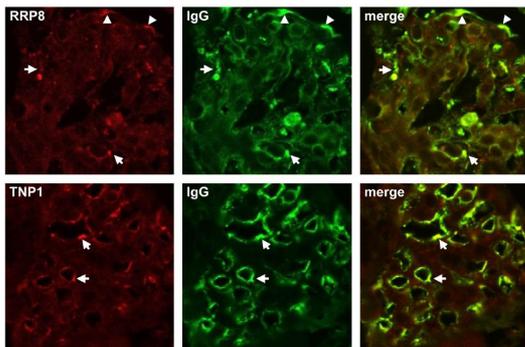


図2 . RRP8, TNP1 投与による腎糸球体への免疫複合体沈着

(3) の免疫細胞を用いた蛋白アナログに対する反応の解析

MXH/lpr 各系統および MRL/lpr と McH/lpr-Angm3 から腹腔マクロファージおよび脾細胞を採取し、そこに Opn 結合部位阻害蛋白アナログを加えて、マクロファージ活性化およびT細胞活性化について解析を行った。これまでに Opn は in vitro においてマクロファージの活性化や樹状細胞

の抗原提示をアップレギュレートすることが明らかとなっているが、少なくとも S*****蛋白はマクロファージの Opn による活性化を阻害することが明らかになった。さらに(2)で糸球体腎炎に関する自己抗体と目された蛋白アナログを投与することによる病態の修飾につき解析したところ、少なくともこれら蛋白を投与するとむしろ糸球体腎炎を誘導する可能性があることが明らかとなった。

(4) Span80 ナノベシクルを用いた蛋白アナログ drug delivery system の開発

界面活性剤 Span80 を用いた脂質二重膜ベシクルによる DDS を用いて、ベシクルの内水相に蛋白アナログを内包させ、尾静脈に投与し、臓器病変に送達する系を確立した。このモデルとして、抗腫瘍剤を内包させたベシクルを用いた DDS を用いた腫瘍治療モデルも解析し、Span80 ナノベシクルを用いた系では有意に薬剤の局所への送達、治療効果が高いことを明らかにした。さらにベシクルの表面を抗体やレクチンで修飾することにより特異性を持たせる予備実験を行い、技術的にベシクル表面に抗体を付加できることを明らかにした。

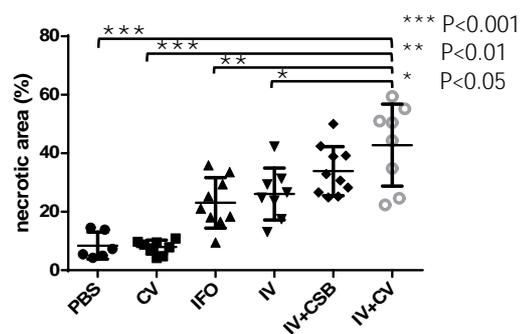


図3 . Span80 ベシクル DDS の効果

(5) モデルマウスへの蛋白アナログ投与実験

上記(3)で in vitro での効果が明らかとなった S*****蛋白アナログを、糸球体腎炎好発ストレイン、腎血管炎好発ストレイン

ンを選択して、 静脈内投与、 Span80 ベシクルに内包させて静脈投与、 ベシクルに内包させて腹腔内投与し、実際の膠原病抑制が得られるか病理組織学的に解析した。その結果少なくともベシクルに内包させて腹腔内投与、もしくは腹腔内投与することにより糸球体腎炎のスコアが低くなることを見いだした。さらに投与方法の最適化を図る必要があるが、蛋白アナログによる治療戦略の開発をさらに継続する必要性があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)(うち査読付11件)

Hisamatsu K, Niwa M, Kobayashi K, Miyazaki T, Hirata A, Hatano Y, et al. (8人中4番目) Galectin-3 expression in hippocampal CA2 following transient forebrain ischemia and its inhibition by hypothermia or antiapoptotic agents. Neuroreport. 査読有 2016;27(5):311-7. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000538

宮崎 龍彦. 血管炎症候群の形態学的診断 tips. 診断病理. 査読有 2016;33(1):19-37. <http://www.sasappa.co.jp/online/abstract/jjdp/1/033/html/0910330105.html>

Mokuda S, Miyazaki T, Ito Y, Yamasaki S, Inoue H, Guo Y, Masumoto J, et al. (11人中2番目) The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Scientific reports. 査読有 2015;5:9795. DOI: 10.1038/srep09795

Mokuda S, Miyazaki T, Ubara Y, Kanno M, Sugiyama E, Takasugi K, Masumoto J, et al. (7人中2番目) CD1a(+) survivin(+) dendritic cell infiltration in dermal lesions of systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 査読有 2015;17:275. DOI: 10.1186/s13075-015-0785-0

Onishi S, Adnan E, Ishizaki J, Miyazaki T, Tanaka Y, Matsumoto T, Hasegawa H, et al. (13人中4番目) Novel Autoantigens Associated with Lupus Nephritis. PLoS One. 査読有 2015;10(6):e0126564. DOI: 10.1371/journal.pone.0126564

Miyazaki N, Murata I, Takemura G, Okada H, Kanamori H, Matsumoto-Miyazaki J, Yoshida G, Izumi K, Kashi H, Niimi K, Nishiwaki A,

Miyazaki T, Ohno M, Ohashi H, Suzuki F, Minatoguchi S. Expression of prorenin receptor in renal biopsies from patients with IgA nephropathy. International journal of clinical and experimental pathology. 査読有 2014;7(11):7485-96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270520/>

Nakata H, Miyazaki T, Iwasaki T, Nakamura A, Kidani T, Sakayama K, et al. Development of tumor-specific caffeine-potentiated chemotherapy using a novel drug delivery system with Span 80 nano-vesicles. Oncology reports. 査読有 2015;33(4):1593-1598. DOI: 10.3892/or.2015.3761

Kobayashi K, Niwa M, Hoshi M, Saito K, Hisamatsu K, Hatano Y, Hatano Y, Tomita H, Miyazaki T, Hara A. Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation. Neuroscience letters. 査読有 2015;592:107-112. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.02.061

Mokuda S, Miyazaki T, Saeki Y, Masumoto J, Kanno M, Takasugi K. Epstein-Barr virus-related MTX-LPD in rheumatoid arthritis patients exhibits a viral pattern of the CD64 and CD35 expression on neutrophils: three case reports. Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association. 査読有 2015;25(1):166-168. DOI: 10.3109/14397595.2013.875641

宮崎 龍彦. 【血管炎】血管炎症候群の疾患感受性. 日本腎臓学会誌. 査読無 2014;56(2):124-130.

Oishi H, Tsubaki T, Miyazaki T, Ono M, Nose M, Takahashi S. A bacterial artificial chromosome transgene with polymorphic Cd72 inhibits the development of glomerulonephritis and vasculitis in MRL-Faslpr lupus mice. Journal of immunology. 査読有 2013;190(5):2129-2137. DOI: 10.4049/jimmunol.1202196

Nose M, Komori H, Miyazaki T, Mori S. Genomics of vasculitis: lessons from mouse models. Annals of vascular diseases. 査読有 2013;6(1):16-21. DOI: 10.3400/avd.oa.12.00096

〔学会発表〕(計10件)

宮崎 龍彦, 小林一博, 酒々井夏子, 齊郷智恵美, 能勢真人. A novel model for lupus erythematosus derived from (MRL/lpr x C3H/lpr) recombinant-inbred mouse strain. 第104回日本病理学会総会(招待講演) 2015年4月30日~5月2日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

小林一博, 鬼頭勇輔, 齊郷智恵美, 酒々井夏子, 宮崎龍彦. Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumor in a patient with drug induced immune-suppression. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

大西佐知子, 石崎淳, 宮崎龍彦, 山崎仁志, 末盛浩一郎, 松本卓也, 安川正貴, 長谷川均. 自己抗体ループス腎炎の新たな自己抗原の同定と解析. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム(国際学会). 2015 年 4 月 23 日~25 日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

Miyazaki T, Kobayashi K, Suzui N, Saigo C, Seishima M, Nose M. A novel model for erythematosus derived from (MRL/lpr x C3H/lpr) recombinant-inbred mouse strain. The 11th German-Japan Society of Dermatology. 2014 年 6 月 11 日~6 月 12 日, Heidelberg Marriott Hotel, Heidelberg, Germany.

宮崎龍彦, 坂本明優, 小林一博, 酒々井夏子, 齊郷智恵美, 能勢真人. 組換え近交系モデルマウスを用いた系球体腎炎の責任遺伝因子の解析. 第 103 回日本病理学会総会(招待講演). 2014 年 4 月 24 日~26 日, 広島国際会議場, 広島県広島市

坂本明優, 平松由布季, 岩橋大輔, 伊藤有紀, 増本純也, 能勢真人, 宮崎龍彦. 組換え近交系膠原病モデルマウスを用いた唾液腺炎・涙腺炎の臓器特異的疾患感受性因子の解析. 第 103 回日本病理学会総会. 2014 年 4 月 24 日~26 日, 広島国際会議場, 広島県広島市

大西佐知子, 石崎淳, 松本卓也, 山崎仁志, 末盛浩一郎, 佐田榮司, 安川正貴, 長谷川均, 宮崎龍彦. ループス腎炎コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系技術を利用したループス腎炎の新たな自己抗原の検討. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム, 2014 年 4 月 24 日~26 日, グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区

宮崎龍彦, 坂本明優, 平松由布季, 岩橋大輔, 増本純也, 能勢真人. 血管炎の発症メカニズム 組換え近交系膠原病モデルマウスを用いた全身性血管炎の責任遺伝因子の解析. 第 102 回日本病理学会総会(招待講演). 2013 年 6 月 6 日~8 日, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館, 北海道札幌市

坂本明優, 平松由布季, 岩橋大輔, 伊藤有紀, 能勢真人, 増本純也, 宮崎龍彦. 組換え近交系膠原病モデルマウスを用いた唾液腺炎・涙腺炎の臓器特異的疾患感受性遺伝子座の探索. 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6 日~8 日, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館, 北海道札幌市

阿草哲郎, 小森浩章, 曾我美子, 宮崎龍彦, 能勢真人, 森士朗, 久保田領志,

田辺信介, 岩田久人. 組換え近交系マウスを用いたヒ素感受性遺伝子座の同定. 第 24 回日本微量元素学会学術集会, 2013 年 6 月 29 日~2013 年 6 月 30 日, 関西大学 100 周年記念館, 大阪府吹田市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 龍彦 (MIYAZAKI, Tatsuhiko)
岐阜大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 8 0 2 3 9 3 8 4

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

増本 純也 (MASUMOTO, Junya)
愛媛大学プロテオ医学研究センター・教授
研究者番号: 2 0 3 3 4 9 1 4

能勢 真人 (NOSE, Masato)
愛媛大学医学系研究科・名誉教授
研究者番号: 7 0 0 3 0 9 1 3

長谷川 均 (HASEGAWA, Hitoshi)
愛媛大学医学系研究科・特任教授
研究者番号: 4 0 1 6 4 8 2 6

藤野 貴広 (FUJINO, Takahiro)
愛媛大学学術支援センター・准教授
研究者番号: 4 0 2 9 2 3 1 2