

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893027

研究課題名(和文) 肥満細胞の機能制御による血管炎治療法の探索

研究課題名(英文) Functional analyses of mast cells in ANCA associated vasculitis

研究代表者

永井 恵 (NAGAI, Kei)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00734352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管の周囲に存在する肥満細胞の機能制御を介した血管炎治療法開発を目的とし、本研究ではマウス腎血管炎モデルにおける肥満細胞の機能解析を実施した。血管炎の誘導に抗好中球細胞質抗体(ANCA)が必要であるが、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)遺伝子欠損マウスにMPO抗原を免疫することにより作成した。これを受動免疫する方法では、血管炎を誘導することができず、また、腎細胞を単離することにより肥満細胞の同定を試みるも検出することが困難であった。本研究では、細胞質蛋白を直接的に精製する方法(原法)とは異なり、リコンビナントMPOを免疫源に用いたことが、血管炎を誘導できない一因と考えた。

研究成果の概要(英文)：The goal of our study is establishment of a novel therapy for systemic vasculitis by regulating function of mast cells. First, for preparing anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) to induce mouse vasculitis models, myeloperoxidase (MPO)-deficient was immunized with murine MPO. We tried to induce mouse vasculitis by passive immunization of MPO-ANCA to wild type mice, and then to identify mast cells in injured kidneys. However, it was difficult to obtain renal vasculitis and to detect any mast cells by this immunization model. In this study, recombinant MPO, but not protein purified from myeloid cell lines, was used. Therefore, the result implies recombinant MPO don't have potential to be antigen for pathogenic MPO-ANCA.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓内科 血管炎 抗好中球細胞質抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) ANCA 関連血管炎 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis; AAV) は、日本人に圧倒的に多い Myeloperoxidase (MPO)-ANCA 陽性血管炎は、従来からステロイド薬と免疫抑制薬の併用が治療の基本だが、日和見感染の合併が問題であり、その解決のために新規治療法の開発が望まれている。

(2) 肥満細胞は免疫反応の司令塔のひとつであり、主に血管周囲に存在し、生体の恒常性を維持すると同時に、あらゆる自己免疫疾患の発症に関わる。肥満細胞欠損マウスを用いた研究から、肥満細胞は腎系球体の AAV の病態形成に抑制的に働く事が示唆された (Gan PY et al. 2012. J Am Soc Nephrol)。他の検討結果からも、AAV の病態を肥満細胞が制御していると考えられる。そして、肥満細胞の機能を、正にあるいは負に人為的に制御することができれば、AAV への治療応用の可能性が見出せる。

(3) 肥満細胞の機能は、その細胞上に発現する複数の種類の免疫受容体により調節されているが、申請者は、これらの免疫受容体の研究を行ってきた (Nagai K, et al. 2013. PLoS One)。その中でも、本学が世界に先駆けて同定した CD300 ファミリーは、肥満細胞に強く発現する免疫受容体である (永井ら. 2010. 臨床免疫・アレルギー科)。遺伝子欠損マウスを用いた研究から、CD300 ファミリーの一つである CD300a は生体内で肥満細胞の機能を負に制御する (Oda-Nakahashi C, et al. 2012. J Exp Med)。また、AAV において、免疫受容体に着目した肥満細胞の機能制御の解析および治療応用への検討はなされていない。

2. 研究の目的

AAV モデルは、ANCA 関連血管炎のうち、日本で比較的有病率の高い MPO-ANCA 陽性血管炎の病態を表していると考えられている。(1) AAV モデルにおいて血管炎の局所に集簇した細胞が、免疫受容体を介して肥満細胞の機能を抑制するか、(2) AAV モデルに肥満細胞上に発現する免疫受容体に対する抗体を投与することで治療は可能か、について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスリコンビナント MPO を用いた MPO-ANCA の作成

AAV の研究において既に確立された MPO 免疫モデルが考慮された (*J Clin Invest. 2002;110: 955-63)。通常、骨髓球系細胞株から蛋白精製した MPO を MPO 遺伝子欠損マウスに免疫して MPO-ANCA を誘導する。しかしながら、MPO を単離・精製する手技は困難であるがゆえに、十分な MPO-ANCA 産生を得られず、これまで血管炎研究の障壁の一つとされてきた。本研究では、8 週齢の MPO 遺伝子

欠損マウス (横浜市立大学・荒谷研究室) に対して、遺伝工学的に作成されたリコンビナント MPO (rMPO) 10mg (Sigma-Aldrich) とフロイントアジュバント (FA) を混和して、Day 0、Day 21、Day 35 で腹腔内投与した。さらに、Day 49 で rMPO 10 µg を静脈内投与してブーストしたのちに、Day 52 で血漿を採取し、カラム精製法で IgG 分画を得た。精製された抗体が MPO-ANCA であることは、ELISA 法を樹立し、確認した。マウスのコントロールには、同じ遺伝子背景の野生型 B6J を用い、免疫原のコントロールには、ウシ血清アルブミン (BSA) 10 µg を用いた。

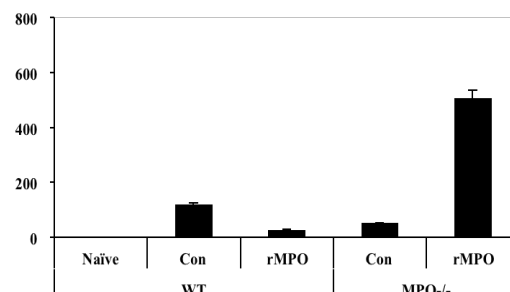
(2) 精製 MPO-ANCA を用いた AAV の誘導と血管炎腎の肥満細胞の単離・同定

先行研究によれば、精製 MPO-ANCA を経静脈的にすると 1 週間で、5% 程度の糸球体に半月体形成を伴う腎炎が誘導される (*)。方法 (1) で得られた精製 MPO-ANCA を B6J 野生型マウスに 10 µg/匹で静脈投与した 1 週間後、絶食環境の代謝ケージで蓄尿を行い、血尿・蛋白尿を試験紙で評価した。また、腎を採取して組織を HE 染色および PAS 染色で観察し、糸球体病変の有無を評価した。実験のコントロールとして、BSA を投与して同様に精製したマウス血清を静脈投与した B6J 野生型マウスを用意した。さらに、肥満細胞の機能を制御する免疫受容体を探索するため、採取した腎を酵素処理後、研究者が過去に樹立したフローサイトメトリー法を用いた方法で肥満細胞を高純度を得る手法 (Nagai K et al. 2013. PLoS One) の応用を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス MPO-ANCA の作成

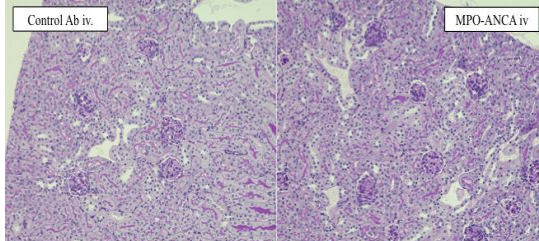
MPO 遺伝子欠損マウスに rMPO を免疫した抗体価 (506.4 ± 28.6 ng/mL [平均 ± 標準誤差]) は、コントロールマウスに BSA を免疫した場合 (119.5 ± 7.4 ng/mL)、rMPO を免疫した場合 (28.3 ± 1.9 ng/mL) あるいは、MPO 遺伝子欠損マウスに BSA を免疫した場合 (28.3 ± 1.9 ng/mL) のそれぞれに対して、有意に高値であった (図 1)。従って rMPO でも、細胞質蛋白からアフィニティー精製した既報 (*) の実験系同様に、効率良く MPO-ANCA が精製可能であることが見出された (学会報告 2)。



(図 1: 精製 MPO-ANCA 力価)

(2) MPO-ANCA 受動免疫法による AAV 誘導効果の評価

MPO-ANCA を静脈投与(受動免疫)したマウスは、軽度の血尿と蛋白尿を呈することが期待されたが、いずれも陰性の結果であった。また、糸球体をランダムに 100 個観察したが、尿検査の結果に矛盾せず、明確な半月体を観察することはなかった(図 2)。



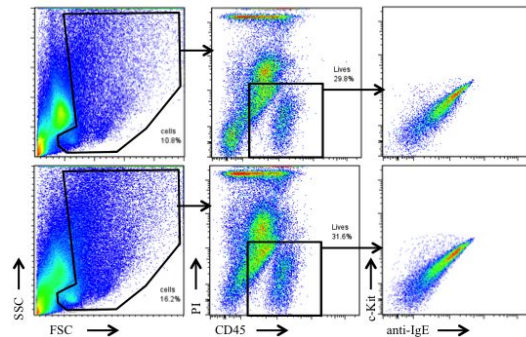
(図 2: MPO-ANCA 免疫後 1 週間後の腎組織)

以上の結果から、本研究で樹立した rMPO に由来する MPO-ANCA が、AAV の病因となる可能性は低いと判断した。しかしながら、従来の MPO 精製法を用いた MPO-ANCA (ポジティブコントロール) が研究期間内に入手できず、結論ができなかった。AAV を発症しない原因として、MPO に病原性を持つエピトープがあることが近年明らかにされ(Gan PY et al. J Am Soc Nephrol, 2016) 本研究の MPO-ANCA がそのエピトープ認識能が高くなかった可能性が考えられる。また、細胞株から蛋白精製する場合に MPO 以外の蛋白の混入を完全に否定することは難しいと考えられ、rMPO とは異なる蛋白(免疫抗原)の組成であることが想定される。原法(*)の受動免疫 AAV モデルも前述の通り腎炎の誘導効率は悪く、腎糸球体に対する抗体を追加投与するなどの改良が近年加えられている(Gan PY et al. 2012. J Am Soc Nephrol)。本研究に引き継ぎ AAV モデルの作成のために、rMPO 免疫による精製 MPO-ANCA に加えて、Toll 様受容体(TLR)リガンドの追加投与での腎炎誘発系の樹立に着手している。

(3) マウス腎プライマリ肥満細胞の単離同定の試み

Naive 腎あるいは AAV 誘導腎(結果(2))を処理し細胞レベルに分離した後、死細胞染色(PI)、血球マーカー(CD45)、肥満細胞マーカー(c-Kit および IgE)に対する標識モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリ(LSR Fortessa, BD Biosciences)で解析した結果、Naive 腎および AAV 誘導腎ともに肥満細胞(PI⁻CD45⁺c-Kit⁺IgE⁺)の細胞分画を観察することはできなかった(図 3)。肥満細胞は、存在する臓器ごとに多彩な分子発現や機能を有しており、in vitro で誘導・培養した肥満細胞では、in vivo における機能を完全に再現する事はできない(Bischoff SC. 2007. Nat Rev Immunol)したがって、プライマリ肥満細胞を直接的に機能解析することは重要であり、それにはフローサイトメトリ解析は極めて有用である。しかしながら、

肥満細胞を同定することができなかったため、肥満細胞上に発現する免疫受容体の探索は本研究で実施することができなかった。



(図 3: 腎単離細胞のフローサイトメトリ解析、上段: Naive 腎、下段: AAV 誘導腎)

本研究では、腎臓の肥満細胞の検出系のポジティブコントロールがないため結論ができないものの、1) 腎炎の誘導が適切ではなく腎局所に遊走・浸潤あるいは増殖する肥満細胞が存在しない、2) フローサイトメトリ法が適切でない、可能性が考えられる。今後は、結果(2)に対する展開とともに適切な AAV 腎炎の誘導系を樹立したのちに、肥満細胞上に発現する免疫受容体を同定し、抗体あるいはリガンド刺激を行った場合の機能変化をフローサイトメトリ法で解析する予定である。

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)

1. Nagai K, Yamagata K: Use of darbepoetin alfa for myelodysplastic syndrome coincident with chronic kidney disease. CEN Case Reports 2015, DOI: 10.1007/s13730-016-0212-7(査読あり)
2. Kanemaru K, Noguchi E, Tokunaga T, Nagai K, Hiroyama T, Nakamura Y, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A: Tie2 Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) through $\alpha 4 \beta 1$ Integrin. PLoS One 2015, 11: e0144436, DOI: 10.1371/journal.pone.0144436(査読あり)
3. Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda SI, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A: Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. Nat Commun, 2014,

- 5:4710, DOI: 10.1038/ncomms5710 (査読あり)
4. **Nagai K**, Ueda A, Saito C, Zempo-Miyaki A, Yamagata K: Annual decline in pentraxin 3 is a risk of vascular access troubles in hemodialysis patients. *Int J Nephrol* 2014, 297945, DOI:10.1155/2014/297954. (査読あり)
 5. **Nagai K**, Yamagata K, Ohkubo R, Saito C, Asahi K, Iseki K, Kimura K, Moriyama T, Narita I, Fujimoto S, Tsuruya K, Konta T, Kondo M, Watanabe T: Annual decline in estimated glomerular filtration rate is a risk factor for cardiovascular events independent of proteinuria. *Nephrology*. 2014,19:574-580. (査読あり)

〔学会発表〕(計 23 件)

1. **永井恵**, 萩原正大、甲斐平康、森戸直記、白井文一、斉藤知栄、山縣邦弘: 当院における腎臓内科コンサルテーションの実態、第 113 回日本内科学会総会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)、2016 年 5 月
2. **永井恵**, 山縣邦弘: 新規マウス MPO-ANCA 産生モデルの樹立、第 4 回東京理科大・筑波大合同リトリート、つくば国際会議場(茨城県つくば市)、2016 年 3 月
3. **Nagai K**, Sairenichi T, Irie F, Watanabe H, Ota H, Yamagata K: The Relationship Between Cardiovascular Mortality and Glomerular Filtration Rate in a Japanese Cohort With Long Term Followup. 53rd ERA-EDTA Congress (Vienna, Austria), 2016 年 5 月
4. **永井恵**: 腎線維化における活性化受容体の機能解明、第 3 回東京未来医療フォーラム、興和株式会社第一ビル(東京都中央区)、2016 年 2 月
5. **Nagai K**, Shiomi K, Saito C, Yamagata K: Body fat mass but not skeletal muscle mass, is negatively related to PTX3 in advanced CKD patients. 5th CKD Frontier Meeting, キャッスルプラザ(愛知県名古屋市)、2016 年 2 月
6. **永井恵**: 肥満細胞の機能制御を介した血管炎治療法確立を目指して、つくば腎セミナー2016、つくば国際会議場(茨城県つくば市)、2016 年 1 月
7. **Nagai K**, Yamagata K, Usui T, Asahi K, Kimura K, Iseki K, Moriyama T, Narita I, Fujimoto S, Tsuruya K, Konta T, Kondo M, Watanabe T. Transient Dipstick-Proteinuria Could Be a Risk of Cardio-Vascular Diseases. *KidneyWeek2015*(SanDiego, USA), 2015 年 11 月
8. Kanemaru K, **Nagai K**, Shibuya A: Tie2

- Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to VCAM-1 through 1 Integrin. 44th Annual meeting of the Japanese society of immunology (Sapporo, Japan), 2015 年 12 月
9. **Nagai K**, Yamagata K, Kondo M, Iseki K, Asahi K, Watanabe T. Prevalence of untreated hypertension in small but has the highest mortality risk of cardiovascular disease among Japanese general population. 52th ERA-EDTA congress (London, UK), 2015 年 5 月

〔その他〕
ホームページ
<http://tsukuba-igaku-kidney.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 恵 (NAGAI, Kei)
筑波大学附属病院・病院講師
研究者番号: 00734352