

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09529

研究課題名(和文)新規多発血管炎性肉芽腫症モデルマウスの確立

研究課題名(英文)Development of new mouse model of granulomatosis with polyangitis

研究代表者

小野 伸之(Ono, Nobuyuki)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：00336025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに結核類似病変引き起こすモデルにMPO抗体を投与することにより、GPAに類似した病変を誘導できるか検討した。

MPOノックアウトマウスを免疫することにより、抗MPO抗体作製に成功した。過去の報告にしたがって、抗体をB6マウスに投与したが、効率的に腎血管炎の誘導ができなかった。同モデル再現が難しかったとの報告もあり、LPSを加えて抗体を投与したところ、腎炎の誘導に成功した。TDMを抗体とともにB6マウスに投与したところ、肉芽腫病変の増大傾向を示す結果が得られたが、再現性を得るのに困難を要した。現在抗体が肺肉芽腫の修復障害に関わっていると仮定し、肉芽腫回復期を観察する実験を進めている。

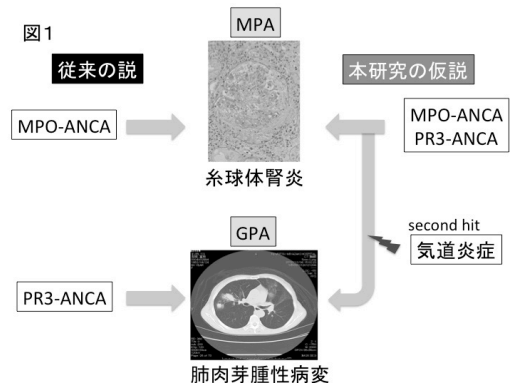
研究成果の概要(英文)：We examined whether induction of lesions similar to GPA could be induced by administering MPO antibody to a model that causes tuberculosis similar lesions in mice. By immunizing MPO knockout mouse, anti - MPO antibody was successfully produced. According to previous reports, the antibodies were administered to B6 mice, but it was not possible to efficiently induce renal vasculitis. There was also report that it was difficult to reproduce the model, and when LPS was added and antibody was administered, it succeeded in inducing nephritis. When TDM was administered to B6 mice with antibodies, results indicating an increase tendency of granulomatous lesions were obtained, but it was difficult to obtain reproducibility. Assuming that the antibody is currently involved in the repairing disorder of pulmonary granulomas, we are conducting experiments to observe the recovery period of granuloma.

研究分野：血管炎

キーワード：血管炎 ANCA 肉芽腫 多発血管炎性肉芽腫症 肺結核 MPO-ANCA

1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎は ANCA を陽性とする血管炎群であり、糸球体腎炎、肺出血を特徴とする顕微鏡的多発血管炎 (MPA) と、血管炎に加えて上気道、下気道に肉芽腫性病変を示す多発血管炎性肉芽腫 (GPA) が代表的である。ANCA には MPO-ANCA および PR3-ANCA の 2 種類あり、これまで欧米の患者分布より MPA は MPO-ANCA 陽性、GPA は PR3-ANCA 陽性を特徴とすると考えられ、実験動物での MPO-ANCA の移入実験でも MPA の特徴とされる糸球体腎炎、肺出血の再現も証明されており、MPO-ANCA は MPA 病態を形成すると考えられている (Xiao H et al. Journal of Clinical Investigation 2002;110:955-63)。一方 PR3-ANCA は GPA 病態を形成すると考えられ、過去に色々な形で PR3-ANCA の移入実験が行われてきたが、GPA 病態の再現はできていない。一方、GPA 病態に上気道の炎症が深く関わっていることが示されており、GPA 病態形成には ANCA による血管炎誘導に加え、上気道のセカンドヒットが必要と。マウスに結核菌の構成成分であるトレハロース・ジミコール酸 (TDM) を投与すると肺肉芽腫を形成することが知られており、血管炎マウスモデルと組み合わせることにより、GPA 病態を表すモデルマウスができると考え実験を計画した。



2. 研究の目的

GPA 病態を再現するマウスモデルを作成する。

3. 研究の方法

先述の MPO-ANCA の移入による MPA マウスモデルに、肺肉芽腫を形成する物質である TDM を投与することにより、肺肉芽腫性血管炎の再現ができるかを検討した。

1) ANCA 関連血管炎患者における背景の比較

上気道炎症が GPA 誘導に重要な役割を果たしているという仮説の証明するため、ヒトにおけるセカンドヒットとして背景因子と病型の関係について比較検討する。具体的には、我々が行っている ANCA 関連血管炎コホート研究を用いて、MPO-ANCA 陽性血管炎患者において、背景因子が、MPA 型、GPA 型の違いを形成しているかを調べた。

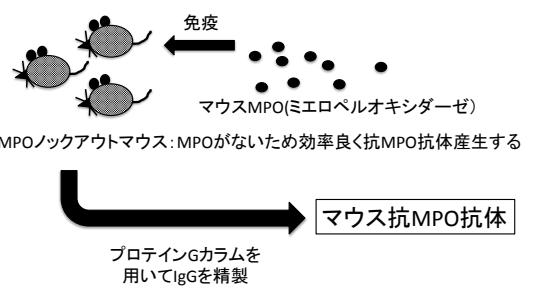
2) マウス免疫

既報の方法に従い、MPO ノックアウトマウスにリコンビナント MPO と CFA による免疫を行った。より有用かつ多くの抗体を得るため市販のアジュバントである Gold Max アジュバントも試した。

3) 抗 MPO 抗体作製

抗体の精製はカプリル酸沈殿後、PBS で透析し、Protein G カラムによるアフィニティ精製を行った。抗体産生は MPO を抗原とした ELISA 測定にて行った。

1 マウス抗MPO抗体の作製

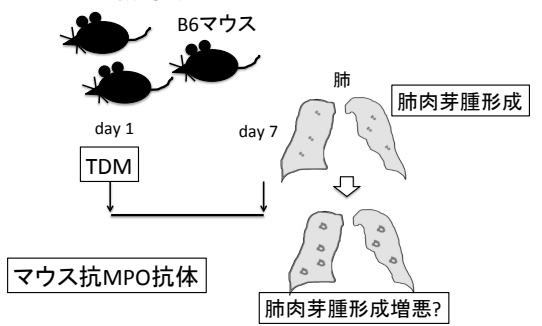


4) 血管炎の誘導

既報の報告に従い作成された抗 MPO 抗体を 8 週齢の B6 マウスに静脈内投与した。さらに血管炎誘導を増強するため、LPS を同時に投与する実験も行った。

5) 肺肉芽腫病変の誘導

2-3 TDM誘導肺肉芽腫モデル



共同研究者の原らの指導の下、B6 マウスに TDM を静脈内投与する。投与 7 日後の肺を採取し、病理標本を作製し評価を行う。

6) 肺肉芽腫性血管炎の誘導

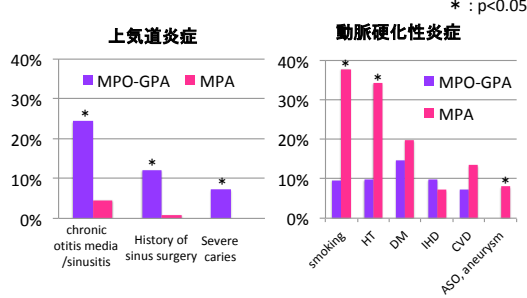
肺肉芽腫病変形成に対する抗体の増強効果を観察する実験であるため、TDM を減量し、抗 MPO 抗体を同時に投与した(上図)。肺病理標本を用いて、形成された肺肉芽腫のサイズ、数の比較検討を行う。腎血管炎の出現も確認する。

4. 研究成果

1) ANCA 関連血管炎患者における背景の比較

我々は ANCA 関連血管炎患者 227 名のデータ解析を行い、MPO-ANCA 陽性多発血管炎肉芽腫症 (GPA) 患者の背景に上気道炎症を多く認め、気道病変、結節性病変を多く認めることを示した。この結果は MPO-ANCA 陽性 GPA の肺病変が、ANCA だけではなく、局所の炎症の影響を強く受けることを示しており、我々の仮説を支持する結果であった。

MPO-GPAとMPAの背景比較



上気道の炎症がMPO-ANCA陽性GPAを誘導し、動脈硬化性病変がMPAを誘導する

2) マウス免疫

3) 抗 MPO 抗体作製

2種類のアジュバントを用いて MPO ノックアウトマウスを免疫した。いずれの免疫方法でも抗体産生は ELISA 法によって十分量確認できた。精製し回収された抗体量はマウス 5 匹から 15~25mg の IgG が回収可能であった。

3) 血管炎の誘導

(1)抗体投与：精製した抗体をマウスに 500 μ g 静脈内に投与し、5日後に腎臓を回収したが、病理学的に血管炎の確認ができなかった。

(2)抗体の増量：抗体の量、1mg に増量したが、尿蛋白、潜血が 1+~2+ 程度の誘導ができたが、病理学的変化は得られなかった。

(3)LPS 投与：既報では、LPS 同時投与で糸球体腎炎の増強が見られることが報告されている。同方法を試みたが、尿蛋白、潜血が 1+~2+ 程度の誘導ができたが、病理学的変化は得られなかった。

(考察)腎血管炎誘導には高結合性抗体が必要とされ、免疫方法に問題があると考えられた。今後免疫する場合は、MPO の量を増やすなどの改善が必要と考える。

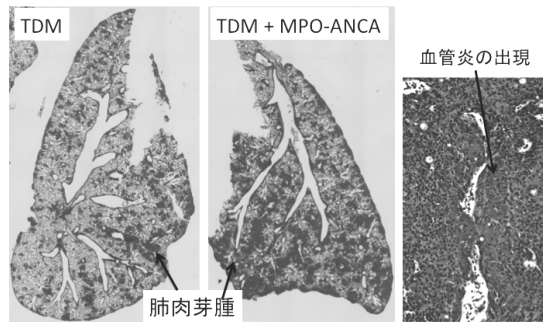
4) 肺肉芽腫病変の誘導

既報通りの TDM 量をマウスに投与したところ効率的な肺肉芽腫形成を得た。抗体の影響を観察するためには、より少ない TDM 量の設定を試みた。しかし、減量することより、肉芽腫形成にマウス間で大きなばらつきを認め、安定した系にすることができなかった

5) 肺肉芽腫性血管炎の誘導

良い質の抗 MPO 抗体は得られなかったが、何度か TDM と同時に投与することにより、TDM 単独より大きな肉芽腫形成が得られたため (右上図)、実験をすすめた。しかし、TDM 併

図2 TDM投与7日目のマウス肺組織 (HE染色)



用した場合も腎血管炎の病理学的変化は確認されなかった。また肺肉芽腫形成誘導については、再現性のある結果が得られず、種々の方法を試みたが有意な実験結果は得られなかった。

(考察) TDM は肺肉芽腫形成を誘導する強力なアジュバントであることが知られているが、報告されている TDM 量を減量することにより、マウス間のばらつきが大きくなることが分かった。MPO-ANCA が活性化した好中球に結合し、消化に対して抑制的に働き、炎症を遷延させていることが報告されている。すなわち、気道炎症により形成された肉芽腫の修復において ANCA が作用し、肉芽腫の遷延を誘導していると仮説した。TDM をマウスに投与すると、1週間で肉芽腫を形成するが、その後2週間かけて肺肉芽腫は縮小し、消失する。そこで、抗 MPO 抗体を投与することにより肺肉芽腫縮小の抑制を観察できるか現在実験準備している。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1) Ono N et al.

Characteristics of MPO-ANCA positive GPA comparing to PR3-ANCA positive GPA and MPA 第 18 回国際血管炎・ANCA 学会(国際学会, 2017 年)

2) 小野伸之、多田芳史など

MPO-ANCA 陽性多発血管炎性肉芽腫症の特徴

第 61 回日本リウマチ学会学術集会(2017 年)

3) 小野伸之、多田芳史など

高齢者 ANCA 関連血管炎に対するリツキシマブ治療

第 53 回九州リウマチ学会 (2017 年)

[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

小野 伸之 (ONO, Nobuyuki)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：00336025

(2) 研究分担者

原 博満 (HARA, Hiromitsu)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：20392079

(3) 研究分担者

小荒田 秀一 (KOARADA, Shuichi)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：50304887

(4) 研究分担者

多田 芳史 (TADA, Yoshifumi)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：70284627