

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15231

研究課題名(和文) 他者融解による病態の解明とMRIを用いた可視化技術の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathology caused by heterolysis and development of its visualization method using MRI

研究代表者

華山 力成 (HANAYAMA, Rikinari)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40403191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージや好中球によるリソソーム酵素の放出は他者融解と呼ばれているが、未だにどのような生理現象や病態発症に關与するのは分かっていない。私達はこの過程を制御する候補分子を同定し、実際にこの分子が他者融解を促進することを見出した。次に、この分子の欠損マウスに心血管炎症を誘発する刺激を与えたところ、野生型マウスに比べ心血管炎症の発症が軽減していることが明らかとなった。更に私達は、生体内で実際にどのようなリソソーム酵素が放出され、臓器・組織障害を引き起こしているのかをMRIを用いて明らかにするため、<sup>19</sup>Fナノ粒子とガドリニウム錯体を用いた新規スマートプローブを開発した。

研究成果の概要(英文)：Secretion of lysosomal enzymes from macrophages or neutrophils is called heterolysis, but what kind of physiological phenomena or pathological condition can be induced by heterolysis remains elusive. We recently identified a candidate molecule that regulates this process and confirmed that this molecule actually promotes heterolysis. When cardiovascular inflammation was induced in mice deficient in this molecule, the onset of cardiovascular inflammation was reduced as compared with the wild type mice. Furthermore, in order to clarify what type of lysosomal enzyme is actually released to cause organ and tissue damage in vivo by using MRI, we developed a new smart probe using <sup>19</sup>F nanoparticles and a gadolinium complex.

研究分野：免疫学

キーワード：他者融解 リソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

リソソームは小胞膜の内側に様々な加水分解酵素を保有する細胞内小器官である。リソソームの一部は分泌型リソソームとして細胞膜と融合し、リソソーム内の加水分解酵素や内容物を細胞外へと開口放出することが知られている。これまでリソソームの開口放出は、リソソームで消化しきれなかった残渣を細胞外へと放出する機構として考えられており、ほとんど注目されていなかった。一方、マクロファージや好中球などの炎症性細胞によるリソソーム酵素の放出は他者融解 (heterolysis) と呼ばれ、腫瘍細胞や細菌を融解して死滅させる生体防御機構の一つとして古くから報告されている (Science, 184, 468 (1974))。ところが、リソソーム酵素の放出が過剰になると、周囲の健全細胞までも融解・死滅させ、様々な病態を引き起こすと考えられる。特に、動脈硬化などの慢性炎症性疾患や心筋梗塞など虚血後の再灌流障害を引き起こす主要原因としてリソソームの開口放出が最近注目されており、放出されたリソソーム酵素が臓器・組織の障害を引き起こす重要な要因として考えられつつある。

### 2. 研究の目的

リソソームの開口放出を制御する分子機構はこれまで明らかになっておらず、生体内でどのような生理的・病理的現象に関与するのかが不明であった。しかしながら私達は最近、リソソームの開口放出を促進する候補分子を同定した。私達はこの分子がマクロファージや好中球のリソソームと細胞膜に特異的に局在しているおり、カルシウム依存的に膜のリン脂質ホスファチジルセリンと結合し、リソソームと細胞膜の融合によるリソソーム酵素の放出を促進することを見出した。また、実際にこの分子を欠損させた KO マウスから樹立したマクロファージや好中球では、リソソーム酵素の放出と、それに伴う他者融解が阻害されていることが明らかとなった。そこで本研究では、(I) この KO マウスを用いて、他者融解がどのような病態の発症に関与するか、特に心血管系傷害を中心に組織学的に解析し、(II) MRI を用いて他者融解を生体内で可視化する技術 (スマートプローブ) の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (I) 他者融解による心血管系傷害の発症機序の解明

我々が最近樹立した KO マウスにおいて、炎症性マクロファージや好中球によるリソソーム酵素の放出が強く阻害されていることを利用して、他者融解を介した心血管炎症の発症機序を明らかにする。すなわち、この KO マウスに、動脈硬化や虚血再灌流障害、動脈瘤など心血管炎症を誘発する刺激を与え、WT マウスと比較することにより、リソソーム酵素の放出が病態発症に及ぼす影響

を調べる。本研究により、炎症性マクロファージや好中球によるリソソーム酵素の放出が、心血管炎症の引き金になることを明らかにできたならば、この分子を標的にした心血管炎症の治療法を開発することが可能となり、現在世界中で多くの人々が罹患している虚血性心疾患や脳梗塞の治療に大きなインパクトを与えることができると期待される。

#### (II) 他者融解を生体内で可視化する技術の開発

マクロファージや好中球が放出するリソソーム酵素は多様であり、例えば蛋白質分解酵素に限ってもコラゲナーゼやエラスターゼなどのマトリックス・メタロプロテアーゼは23種類、カテプシンは15種類も存在する。よって、生体内で実際にどのような酵素が放出され、心血管炎症を引き起こしているのかは、ほとんど明らかになっていない。そこで私達は、生体内で放出されたプロテアーゼを可視化する画期的な技術の開発を行う。 $^{19}\text{F}$  ナノ粒子は、高感度な MRI プローブであるが、ガドリニウム錯体 ( $\text{Gd}^{3+}$ ) で周囲を覆うと MRI で検出することができなくなる。このことを用いて、 $^{19}\text{F}$  ナノ粒子と  $\text{Gd}^{3+}$  をカテプシン K の酵素認識配列ペプチドで繋ぎ、カテプシン K による切断で活性化可能な MRI プローブを開発する (図1)。種々の改良を加えてプローブの感度と特異性を向上させ、改良型プローブを用いた MRI により心血管系傷害の発生過程が生体内で可視化できるかを検討する。このプローブは、酵素認識配列を変えるだけで容易に各種プロテアーゼに対応可能である。成功した場合には他のカテプシンに対する特異的 MRI プローブの作製も行い、その実用性を検討する。このような MRI プローブはこれまで世界でも例がなく、画期的な技術進展をもたらすと考えられる。また、この可視化技術を用いることにより、様々な心血管炎症疾患のモデル動物で、どのようなプロテアーゼが、どの部位で、どの時期に放出されているのかを明らかにし、病態の理解を深めることができるだけでなく、将来、臨床の場においても、心血管炎症疾患の診断や治療効果の判定に大きく役立つと期待される。

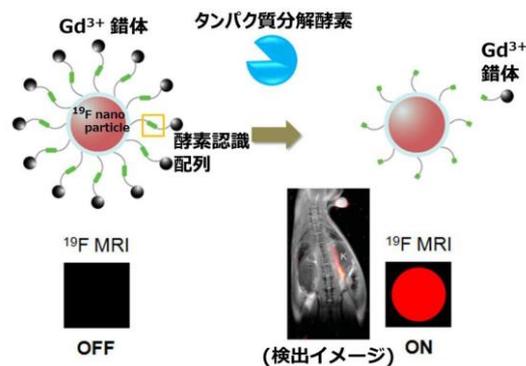


図1. MRI 用スマートプローブの原理



〔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

<http://immunology.w3.kanazawa-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

華山 力成 (HANAYAMA, Rikinari)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40403191

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

宮竹 佑治 (MIYATAKE, Yuji)

大阪大学・医学系・大学院生