

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07047

研究課題名(和文)新しいANCA関連血管炎動物モデルを用いて同定した血管保護遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analysis of the vascular protective genes identified by a newly established animal model of ANCA associated vasculitis.

研究代表者

濱野 慶朋 (Hamano, Yoshitomo)

順天堂大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10281354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗好中球細胞質自己抗体(ANCA)の持続的産生がANCA関連血管炎(AAV)の原因である。我々はANCA産生機構解明のため、AAV自然発症モデルマウスSCG/Kj由来のANCA産生感受性遺伝子座Scg-2/Man-1の導入実験(Autoimmunity 52:208, 2019)、エクソーム解析により見出されたMan-spa遺伝子変異の機能解析、当該区域の網羅的発現解析を行い、野生型・変異型タンパクの合成、遺伝子欠損マウスの解析、ヒトAAVに関連する候補遺伝子を得た。これらを、個体への投与実験、ヒト症例におけるPBMCの表面形質・機能解析へ発展させ、治療薬開発のシーズとしていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得たタンパク、遺伝子欠損マウスを用いて、活性化顆粒球やNETsによる細胞傷害試験への影響、AAVモデルマウスへの治療的投与実験が可能となった。

折しも、新型コロナウイルス感染がパンデミックとなっており、感染者の急速かつ重篤な全身炎症が広く報告されている。この遺伝子が持つタンパク分解酵素阻害活性は、治療薬開発の糸口となる可能性がある。これらを発展させ、リード薬作製へつなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Aberrant production of the anti-neutrophil cytosolic autoantibody (ANCA) causes the ANCA related vasculitis (AAV). To analyze the previously identified QTL on chromosome 1 for production of ANCA, we introduced the QTL to B6/lpr and proved the pathogenic function of the QTL (Autoimmunity 52:208, 2019). We identified two candidate genes for abnormal production of ANCA using the next generation sequencer. One was the structural gene for a proteinase inhibitor and it had non-synonymous polymorphisms. We produced recombinant proteins of wild and variant types to analyze their functional changes. Another one was the gene coding membrane surface protein on peripheral blood mononuclear cells.

We are going to develop these items into the medication experiment to animal individuals, and the surface character analysis of PBMC in a human AAV case. The results can possibly be the seeds for the development of therapeutic medicines.

研究分野：免疫病理学

キーワード：MPO-ANCA ANCA関連血管炎 SCG/Kjマウス NETs Man-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質自己抗体(ANCA)の持続的産生が原因となり ANCA 関連血管炎「AAV」が発病する。この因果関係は明白だが、肝心の「ANCA がなぜ産生されるのか」にまだ答えがない。その中で申請者は、ヒト血管炎に酷似したモデル動物 SCG/Kj マウスにおいて、ANCA 産生遺伝子と血管炎発症遺伝子が両方ともマウス第 1 染色体に存在していることを発見した。これを契機に、その第 1 染色体部分を B6 マウスに導入した新しいモデル動物 SICM で血管炎を再現し、その染色体部分と病態との関連を証明した。更に導入部分のエクソーム解析を行い、ANCA 産生に関わるプロテアーゼ阻害遺伝子のアミノ酸変異「Man-Spa 変異」を発見するまでに至った。

そこでこの研究は、先行研究で独自に作成した SICM を用いて、血管炎発症機構の解析、および Man-Spa 変異によるプロテアーゼの失調と ANCA 産生との関連を調べ、AAV をはじめ、広く炎症性疾患や血管病の治療薬開発の知見を得ることを目的とする。

2. 研究の目的

・ANCA 関連血管炎(AAV)自然発症モデルマウス SCG/Kj を用いたヒト AAV 関連遺伝子の同定と

・当該遺伝子産物の作製・個体への投与による AAV の治療効果の解析。

3. 研究の方法

これまでの成果として、マウス第 1 染色体上に SCG/Kj 由来の MPO-ANCA 産生感受性遺伝子座をすでに同定している。

退交配による MPO-ANCA 産生感受性遺伝子座の正常マウスへの導入。

次世代シーケンサーによるエクソーム解析・RNA シークエンス。

CRISPR/Cas9 を用いた候補遺伝子欠損マウス

正常型および変異型候補遺伝子のクローニングと組換えタンパクの作成、およびそれらの個体投与による効果の解析

4. 研究成果

抗好中球細胞質自己抗体(ANCA)の持続的産生が ANCA 関連血管炎(AAV)の原因である。我々は ANCA 産生機構の解明のため、AAV 自然発症モデルマウス SCG/Kj 由来の ANCA 産生感受性遺伝子座 Scg-2/Man-1 の導入実験、Scg-2/Man-1 領域のエクソーム解析により見出された Man-spa 遺伝子変異の機能解析、Man-1 支持区域の網羅的発現解析を行い、以下の結果を得た。

(1) Scg-2/Man-1 を B6.lpr マウスに導入した SICM マウスの解析により、この遺伝子座が MPO-ANCA 産生・半月体形成性腎炎・血管炎の発症をもたらすことを証明し報告した (Autoimmunity 52:208,2019)。

(2) Man-spa 遺伝子変異の機能解析 Man-spa 遺伝子は、プロテアーゼを抑制して細胞を保護する遺伝子群である。

A. リコンビナントマウス(rm)Man-spa を合成した。

B. ゲノム編集・交配を用いて B6 ベースおよび B6/lpr ベースの Man-spa 欠損マウスを作製し自己抗体・糸球体腎炎への影響を解析し、以下の結果を得た。

1. ホモ Man-spa 欠損マウスは生まれて来ず、個体発生に対する影響が示唆された。

2. ヘテロ Man-spa 欠損マウスは、野生型と比較し、血中 MPO-ANCA レベル・抗 dsDNA 抗体レベルに有意差はなかったが、それらの平均値は野生型より低かった。

3. タンパク尿は、ヘテロ Man-spa 欠損マウスは週齢により野生型より有意に低かった。

4. 以上より、各形質に対する Man-spa 欠損の影響は多面的と考えられる。

(3) NGS を用いて高 ANCA・低 ANCA と関連して発現レベルの異なる遺伝子を同定した。

A: 背景と目的

Man-1 の遺伝子本体は、タンパクのアミノ酸配列に多型がなくとも、遺伝子の発現レベルに差があれば、候補遺伝子たりうる。そこで、マッピングで同定した Man-1 領域を考慮しながら、NGS を用いて遺伝子発現解析 (RNA-sequence) を行い、この領域に存在する遺伝子の発現較差を解析した。

B: 検体と方法

・検体: マウス脾細胞から total RNA を抽出した。

雌 B6/lpr.C1scg マウス 高 ANCA 産生群 (AF-hi 群) 5 検体

雌 B6/lpr.C1scg マウス 低 ANCA 産生群 (AF-lo 群) 5 検体

雌 B6/lpr マウス (正常対照) (LF 群) 4 検体

・比較の組合せ:

- 群間比較 1 : 疾患モデルマウスと正常マウスの比較
- 群間比較 2 : 疾患モデルマウスの中で、ANCA の高い群と低い群の比較
- 群間比較 3 : 高 ANCA 群と正常マウスとの比較
- 群間比較 4 : 低 ANCA 群と正常マウスとの比較

・遺伝子座領域と統計 :

Man-1 領域に存在する遺伝子のうち、顆粒球機能に関する遺伝子群に注目した。
有意差のある遺伝子に偽陽性が含まれる確率(q)を 5%未満とし ($q < 0.05$)、群間の発現量 (fpm) 差が 1.5 倍以上あれば有意とした。

・遺伝子発現解析 :

Maser パイプライン TopHat2, CuffLinks2 and CummeRbund + GE (SE) および Cuffdiff and CummeRbund (SE) により解析を行った。

C : 結果

・群間比較 (雌 B6/lpr.C1scg マウス 対 雌 B6/lpr マウス) では、明確な遺伝子発現差が認められた。

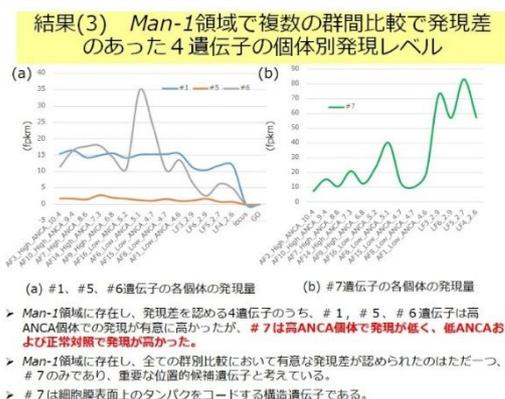
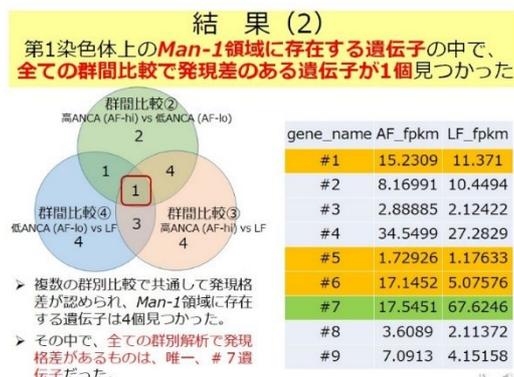
・群間比較 ~ において、共通して遺伝子発現差が認められる遺伝子は、全染色体に 56 個、第 1 染色体上に存在する遺伝子は 10 個 (DEG # 1 ~ DEG#10) だった。(図 結果(1))

・第 1 染色体上の Man-1 領域に存在する遺伝子の中で、全ての群間比較で発現差のある遺伝子が唯一見つかった (DEG # 7、図 結果(2))。DEG # 7 は高 ANCA 個体で発現が低く、低 ANCA および正常対照で発現が高かった (図 結果(3))。DEG # 7 は細胞膜表面上のタンパクをコードする構造遺伝子であり、候補遺伝子として解析予定である。

D : 今後の計画 :

・Man-spa 欠損マウスおよび SICM を用いて、Man-spa の ANCA 産生を含む自己免疫への影響、および rmMan-spa の補填による形質の変化を解析して AAV における Man-spa の役割を明らかにしていく。

・DEG#7 については、リンパ球細胞株を用いた強制発現系やノックダウン系を解析すると共に、ヒト AAV 症例の末梢血 PBMC の膜表面における発現レベルを計測し、リンパ球の表面形質や疾患関連形質との関連を解析する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Walsh Michael, Merkel Peter A., Jayne David R.W. | 4. 巻 382 |
| 2. 論文標題 Plasma Exchange and Glucocorticoids in Severe ANCA-Associated Vasculitis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 New England Journal of Medicine | 6. 最初と最後の頁 622 ~ 631 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa1803537 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Smith Rona M, Jones Rachel Bronwen, Merkel Peter, Jayne David | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Rituximab as therapy to induce remission after relapse in ANCA-associated vasculitis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases | 6. 最初と最後の頁 1243 ~ 1249 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2019-216863 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Yoshitomo Hamano, Fuyu Ito, Osamu Suzuki, Minako Koura, Shuji Matsuoka, Toshiyuki Kobayashi, Yoshinobu Sugitani, Nadila Wali, Ai Koyanagi, Okio Hino, Shoichi Suzuki, Ryuichi Sugamata, Hiromichi Yoshizawa, Wako Yumura, Naoki Maruyama, Yosuke Kameoka, Yoshihiro Noda, Yasuko Hasegawa, Tomio Arai, Kazuo Suzuki | 4. 巻 52 |
| 2. 論文標題 Vasculitis and Crescentic Glomerulonephritis in a Newly Established Congenic Mouse Strain Derived From ANCA-associated Vasculitis-Prone SCG/Kj Mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Autoimmunity | 6. 最初と最後の頁 208-219 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2019.1658191 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fuyu Ito, Minako Koura, Shoichi Suzuki, Toshiko Tsurumi, Fukuko Kishi, Kazuko Uno, Yosuke Kameoka, Osamu Suzuki, Kazuo Suzuki | 4. 巻 58, suppl. 2 |
| 2. 論文標題 MOESIN EXPRESSION LEVEL OF MPO-ANCA ASSOCIATED-VASCULITIS MODEL MICE | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 20-20 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kameoka Y, Kishi F, Koura M, Yamakawa Y, Nagasawa R, Ito F, Matsuda J, Suzuki O, Nakayama T, Suzuki K | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Efficacy of a recombinant single-chain fragment variable region, VasSF, as a new drug for vasculitis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Drug Des Devel Ther. | 6. 最初と最後の頁 555-568 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/DDDT.S188651 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 濱野 慶朋, 梶野 一徳, 林 大久生, 佐伯 春美, 松岡 周二, 小林 敏之, 杉谷 善信, 折茂 彰, 岸川 さつき, 荒川 敦, 樋野 興夫, 八尾 隆史. | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 肺結節性病変の中に小血管炎と著明な好酸球浸潤を認めたPR3-ANCA陽性の一例. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 脈管学 | 6. 最初と最後の頁 36-36 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Yoshitomo Hamano, Fuyu Ito, Osamu Suzuki, Minako Koura, Shuji Matsuoka, Toshiyuki Kobayashi, Yoshinobu Sugitani, Nadila Wali, Okio Hino, Yosuke Kameoka, and Kazuo Suzuki | 4. 巻 58, suppl. 2 |
| 2. 論文標題 Vasculitis and glomerulonephritis in a newly established congenic mice strain derived from ANCA-associated vasculitis-prone SCG/Kj mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 76-76 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshitomo Hamano, Fuyu Ito, Osamu Suzuki, Minako Koura, Shuji Matsuoka, Toshiyuki Kobayashi, Yoshinobu Sugitani, Nadila Wali, Ai Koyanagi, Okio Hino, Shoichi Suzuki, Ryuichi Sugamata, Hiromichi Yoshizawa, Wako Yumura, Naoki Maruyama, Yosuke Kameoka, Yoshihiro Noda, Yasuko Hasegawa, Tomio Arai, Kazuo Suzuki |
| 2. 発表標題 Vasculitis and Crescentic Glomerulonephritis in a Newly Established Congenic Mouse Strain Derived From ANCA-associated Vasculitis-Prone SCG/Kj Mice |
| 3. 学会等名 International Vasculitis and ANCA Workshop (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 濱野慶朋, 伊藤 吹夕, 鈴木章一, 鈴木治, 古浦美奈子, 樋野興夫, 湯村和子, 石神昭人, 亀岡洋祐, 鈴木和男 |
| 2. 発表標題 新しいANCA関連血管炎自然発症モデルSICMの組織学的解析. |
| 3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 濱野慶朋、鈴木和男 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 日本臨床社 | 5. 総ページ数 626 |
| 3. 書名 新領域別症候群シリーズ 血管炎(第2番) | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 小浦 美奈子 (Koura Minako) (10370967) | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・主任研究員 (84420) | |
| 研究分担者 | 伊藤 吹夕 (Ito Fuyu) (20415079) | 帝京大学・公私立大学の部局等・助手 (32643) | |
| 研究分担者 | 鈴木 治 (Suzuki Osamu) (70235935) | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・研究リーダー (84420) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究 分 担 者 | 石神 昭人 (Ishigami Akito) (50270658) | 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長 (82674) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |