

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K07478
 研究課題名(和文) リコンビナント・インブレット系マウスを用いた膠原病治療モデルのゲノム病理学的解析

研究課題名(英文) Pathogenomic analyses of the collagen disease therapeutic model using recombinant inbred mice.

研究代表者
 宮崎 龍彦 (Miyazaki, Tatsuhiko)
 岐阜大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80239384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、世界で唯一の組換え近交系膠原病モデルマウスを用いて、膠原病疾患の感受性および治療反応性・抵抗性を規定する因子の解析を行ってきた。
 Opn-インテグリン結合阻害蛋白による膠原病治療モデルの実施と、治療反応性の解析を目的として、4ヶ月齢～6ヶ月齢のMHX各系統マウスを使用し、シクロフォスファミド、陰性コントロールとして生理食塩水を経左鼠径部リンパ節的に投与した。治療反応性・抵抗性に関する各種パラメーターを解析し、治療反応性ストレインと治療抵抗性ストレインを見だし、さらに、linkage studyを行い、第2、第4、第7、第9、第11およびX染色体上に治療抵抗性遺伝子座を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規分子標的治療における「治療反応性を規定する遺伝因子は何か」を膠原病モデル組換え近交系マウスを用いて明らかにすることを目的として行われた。
 膠原病疾患ポリジーン系モデルMXH/lpr系を治療モデルとして用いることにより、個体ごとに異なる反応の多様性を、再現性を持って解析し、治療反応性を規定する遺伝因子を解明する本研究は非常に独創的であったと言える。さらに、リンパ系への投与という新たなドラッグデリバリーシステムの開発も独創性をもち、それによる治療モデルが確立できたこと、治療感受性、治療抵抗性を規定する遺伝子座がマッピングされたことは、膠原病治療戦略にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：The applicant used the world's only recombinant inbred collagen disease model mouse to analyze factors that determine susceptibility to collagen disease and therapeutic response/resistance.

For the purpose of carrying out the collagen disease treatment model using Opn-integrin binding inhibitor protein and analyzing the therapeutic response, MHX strain mice from 4 to 6 months of age were used and received cyclophosphamide and saline as a negative control through the left inguinal lymph node. Various parameters related to therapeutic response and resistance were analyzed to find therapeutic response strain and therapeutic resistance strain, and a linkage study was conducted to find therapeutic resistance loci on chromosomes 2, 4, 7, 9, 11, and X.

研究分野：実験病理学

キーワード：実験病理学 膠原病モデルマウス リコンビナント・インブレット系 ゲノム解析 治療反応性 遺伝子多型

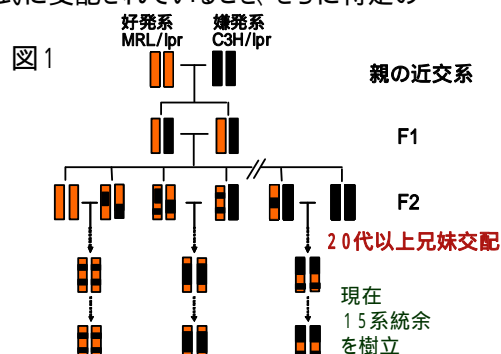
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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)マウスのゲノム解析を通じて、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(図 1)。(文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B)組換え近交系マウスを用いた膠原病のポリジーンネットワークの解析 H18-H19 年度 代表 能勢真人)



一方、申請者らは、MRL/lpr マウスのゲノム解析から 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。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(文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(C) 膠原病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)。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、CD72 遺伝子移入による血管炎治療モデル(図 2)の開発を行ってきた。さらに糸球体腎炎の新たな自己抗原エピトープを見いだした。また、最近、腫瘍の治療抵抗性に関係する survivin (BIRC5)が少なくとも関節炎(RA)および全身性硬化症(SS)の病態に重要な役目を果たすことを明らかにした。さらに、申請者らはリンパ系を介したドラッグデリバリーシステムについて、プレリミナリーな実験を行い、これが膠原病モデルの治療に有効であることを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究では、新規分子標的治療における「治療反応性を規定する遺伝因子は何か」を膠原病モデル組換え近交系マウスを用いて明らかにすることを目的として行われる。膠原病疾患ポリジーン系モデル MXH/lpr 系を治療モデルとして用いることにより、個体ごとに異なる反応の多様性を、再現性を持って解析し、治療反応性を規定する遺伝因子を解明する。

そのために、膠原病モデル組換え近交系マウス MXH/lpr 系を用いて、これまで萌芽的に行ってきた 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、自己抗原エピトープ阻害蛋白アナログ、および BIRC5 阻害剤である YM-155 を用いた治療モデルにおける治療反応性を規定する遺伝因子を明らかにすることを目的として、以下の項目を令和 1 年度から令和 3 年度の研究期間に行う。

3. 研究の方法

Opn-インテグリン結合阻害蛋白の確立：すでにこれまでの研究で Opn の蛋白多型が自己免疫

性糸球体腎炎感受性を規定すること、それをブロックする蛋白アナログを明らかにしており、さらに低分子化をはかったアミノ酸をデザインし、コムギ胚芽を用いた無細胞蛋白合成システムを用いて合成し、in vitroでOpn-インテグリン結合阻害効果を検証した。in vitro実験で効果の見られた数種類の蛋白アナログについて、in vivoで最も効果が高いものを絞り込む。(R4年まで継続)

膠原病治療モデルの実施と、治療反応性の解析：4ヶ月齢～6ヶ月齢の腎炎発症した個体を使用する。シクロフォスファミドおよび、Opn-インテグリン結合阻害蛋白、自己抗原デコイ蛋白またはYM-155を経尾静脈的に、もしくは経左鼠径部リンパ節的に投与した。図2に示すとおり、投与開始から週2回薬剤を投与し、11回投与した後、投与期間中の尿蛋白、体重を経時的に測定した。投与開始後38日にharvestし、速やかに剖検して腎臓および、血管、関節、唾液腺、涙腺の各臓器病変について組織学的に評価した。さらに、剖検時に血清を採取し、腎機能、炎症マーカーを定量した。

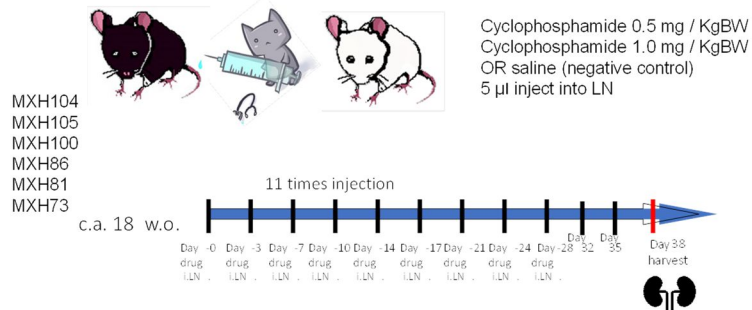


図2 投与プロトコル

治療反応性の差異を規定する遺伝子座のマッピング：各系統の未治療時の組織学的スコアから投与群の組織学的スコアを減算することにより治療スコアを求める。また、血清学的マーカー、免疫グロブリン、補体に関しても同様に治療群と未治療群の差異を求め、スコアとする。これらのスコアと、既存のマイクロサテライトマーカー多型データを用いてQTL解析を行い、治療反応性を規定する染色体領域をマップする。

マッピングされた遺伝子領域の詳細な多型解析：上記でマッピングされた遺伝子領域について、その遺伝子領域に存在する候補遺伝子をピックアップする。

4. 研究成果

Opn-インテグリン結合阻害蛋白につき、3つの候補蛋白の中からアフィニティーの高いものとして一種類を選別し、N末側、C末側、全長の各蛋白をコムギ胚芽系による無細胞蛋白合成系で作製し、Opnとの結合アフィニティーにつき解析を行った。その結果、N末側に阻害効果があることが明らかとなった(図3)。さらに低分子化することを考慮し、実験を進めている。

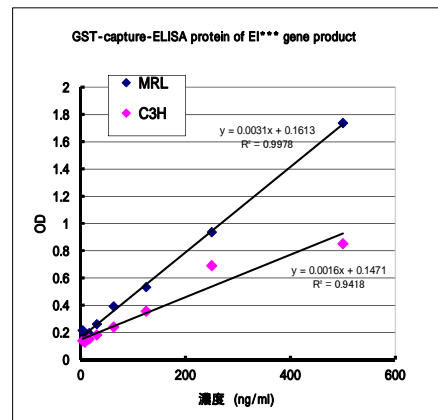


図3 Opn結合阻害蛋白のELISA解析

膠原病治療モデルを用いた治療抵抗性ストレインの発見：糸球体腎炎好発系であるMXH73, MXH81, MXH86, MXH100, MXH104, MXH105、各群6匹以上に、まず治療の要請コントロールとしてシクロフォスファミドを0.5 mg/KgBW, 1.0 mg/KgBW投与する群と陰性コントロールとして生理食塩水を、それぞれ50 µl左鼠径リンパ節に35日間で11回投与して、投与中の尿蛋白、体重変化を記録するとともに、投与開始38日後にharvestして、尿蛋白、血清BUN, クレアチンを測定するとともに全身解剖を行って、特に腎糸球体の病変について、評価を行った。組織学的変化については、各個体20個の糸球体をGrade 0(正常)～Grade 3の4段階にスコアし、糸球体20個のGradeの和/20×100として求めたGlomerular indexで評価した。その結果、脾臓の体重に対する比率重量は全ての系統で有意に低下した。さらに6系統中5系統ではリンパ節および脾臓の腫大消退と比例して体重減少を認めた。血清BUNはMXH104以外の系統では有意に低下、もしくは低下傾向にあった(図4)。

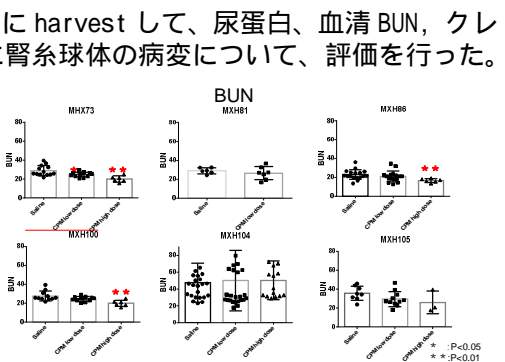


図4 投与によるBUNの変化

Glomerular indexにおいても、6系統中4系統では有意に抑制され、もう1系統でも抑制傾向が見られたが、MXH104ではまったく差を認めなかった(図5)。これらの結果から、MXH104を治療抵抗性ストレインとして見いだした。

治療抵抗性を規定する遺伝子座の探索

ここまでの研究で、治療抵抗性ストレインが見いだされたことから、その治療抵抗性を規定する遺伝子座を明らかにするため、血清 BUN 値および Glomerular index の変化をパラメータとし、これまでに保有している各ストレインのマイクロサテライトマーカー多型データとの間で、WinQTL Cartographer V2.5 を用いて linkage study を行った。その結果、BUN 値

において治療抵抗性を規定している遺伝子座を第 2, 第 4, 第 7, 第 9, 第 11 および X 染色体上に、Glomerular index において治療抵抗性を規定している遺伝子座を第 2, 第 4, 第 9 染色体上に見いだした (図 6, 図 7)。

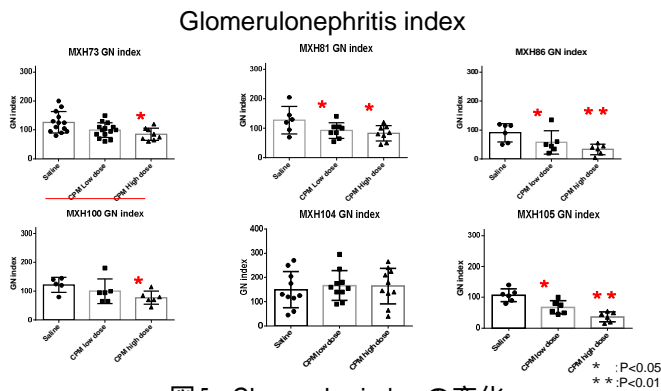


図 5 Glomerular index の変化

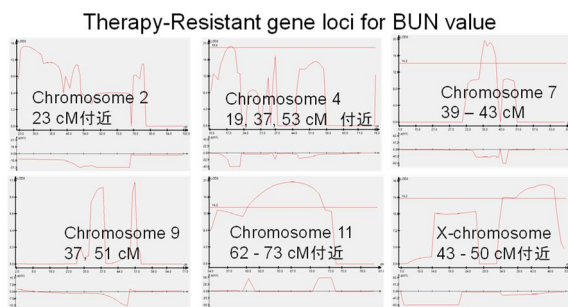


図 6 BUN を指標とした治療抵抗性遺伝子座

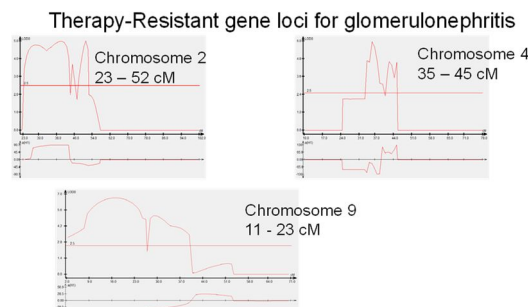


図 7 組織 index を指標とした治療抵抗性遺伝子座

BUN を指標とした場合、Glomerular index を指標にした場合いずれにも含まれる、第 2 染色体 23 cM 付近、第 4 染色体 37 cM 付近および第 9 染色体 23 cM 付近に、治療抵抗性遺伝子座が存在することが示唆された。

第 2 染色体では、Naif1, Urm1, Traf1 等が、第 4 染色体では、Ifna1, Ifna2, Cd4ts2 等が、第 9 染色体では、Adams8, Adams 15, G1b1, Ubash3B 等が候補遺伝子として考えられた。

今回の研究において、組換え近交系マウス MXH 系を用いて膠原病治療モデルを確立し、治療抵抗性遺伝子座を見いだすことができた。今後、MXH 系の whole genome sequence を行って、治療抵抗性感受性遺伝子の同定、感受性遺伝子多型の同定を行うとともに、これまでに同定した疾患感受性遺伝子に関しても責任多型部位を同定して、それをターゲットとした膠原病治療戦略に資する研究を展開していく必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nozawa, A. Ozeki, M. Yasue, S. Endo, S. Ohe, N. Miyazaki, T. Fukao, T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Proinflammatory Cytokine Secretion in a Patient With Recurrent Neuroblastoma Related to the Onset of Malignancy-associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol	6. 最初と最後の頁 e199-e201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001617	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 Aoki, H. Abe, C. Hara, A. Miyazaki, T. Morita, H. Kunisada, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Induced genetic ablation of Rest leads to the alteration of stimulus-induced response of the vagal nerve	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 45-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12819	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 Ohashi, R Schraml, P Angori, S Batavia, Aashil A Rupp, NJ Ohe, C Otsuki, Y Kawasaki, T Kobayashi, K Miyazaki, T Shibuya, H Nagashima, Y, Ajioka, Y, Moch, H et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Classic Chromophobe Renal Cell Carcinoma Incur a Larger Number of Chromosomal Losses Than Seen in the Eosinophilic Subtype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 1492-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11101492.	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 該当する
1. 著者名 Isobe, M. Amano, K. Arimura, Y. Ishizu, A. Ito, S. Kaname, S. Takahashi, K. Tanemoto, K. Hasegawa, H. Harigai, M. Fujimoto, S. Miyazaki, T. et.al.	4. 巻 84
2. 論文標題 JCS 2017 Guideline on Management of Vasculitis Syndrome- Digest Version	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 299-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0773	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 Ohashi, R. Martignoni, G. Hartmann, A. Calio, A. Segala, D. Stohr, C. Wach, S. Erlmeier, F. Weichert, W. Autenrieth, M. Schraml, P. Rupp, N. J. Ohe, C. Otsuki, Y. Kawasaki, T. Kobayashi, H. Kobayashi, K. Miyazaki, T. Shibuya, H. Tsuzuki, T. Nagashima, Y. Ajioka, Y. Moch, H. et al.	4. 巻 476
2. 論文標題 Multi-institutional re-evaluation of prognostic factors in chromophobe renal cell carcinoma: proposal of a novel two-tiered grading	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Arch	6. 最初と最後の頁 409-418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02710-w	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 該当する

1. 著者名 Kawamura Miho, Mizutani Yuki, Mizutani Yoko, Matsuyama Kanako, Shu En, Miyazaki Tatsuhiko, Seishima Mariko	4. 巻 4
2. 論文標題 Clinical and pathological differences between skin limited IgM/IgG vasculitis and skin limited IgA vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cutaneous Immunology and Allergy	6. 最初と最後の頁 28 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cia2.12156	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 Kawakami Kyojiro, Fujita Yasunori, Kato Taku, Horie Kengo, Koie Takuya, Umezawa Keitaro, Tsumoto Hiroki, Miura Yuri, Katagiri Yasuo, Miyazaki Tatsuhiko, Ohsawa Ikuroh, Mizutani Kosuke, Ito Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15000 - 15000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94603-9	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 Kanamori Hiromitsu, Naruse Genki, Yoshida Akihiro, Minatoguchi Shingo, Watanabe Takatomo, Kawaguchi Tomonori, Tanaka Toshiki, Yamada Yoshihisa, Takasugi Hironobu, Mikami Atsushi, Minatoguchi Shinya, Miyazaki Tatsuhiko, Okura Hiroyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 Morphological characteristics in diabetic cardiomyopathy associated with autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 30 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2020.05.009	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎, 龍彦 小林, 一博 酒々井, 夏子 松本, 宗和 新居, 俊典
2. 発表標題 リンパ系ドラッグデリバリーによる腎炎・腎血管炎治療モデルの開発
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村, 美保 水谷, 陽子 松山, かなこ 周, 円 宮崎, 龍彦 清島, 真理子
2. 発表標題 IgG/IgM血管炎とIgA血管炎の臨床的および病理組織学的所見の比較検討
3. 学会等名 第130回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎, 龍彦 小林, 一博 久松, 憲治 酒々井, 夏子 松本, 宗和 武曾, 恵理 小川, 弥生 中沢, 大悟 石津, 明洋 原淵, 保明 岸部, 幹
2. 発表標題 OMAAVの上気道生検組織の組織学的パラメーターの解析
3. 学会等名 第25回日本血管病理研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎, 龍彦, 小林 一博, 久松 憲治, 酒々井 夏子, 松本 宗和, 武曾 恵理, 小川 弥生, 中沢 大悟, 石津 明洋
2. 発表標題 OMAAVの上気道生検組織の組織学的パラメーターの萌芽的解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 一博, 酒々井 夏子, 浅野 奈美, 久松 憲治, 松本 宗和, 宮崎 龍彦
2. 発表標題 組み換え近交系膠原病マウスを用いた新規ドラッグデリバリーモデル治療モデル
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 龍彦, 小林 一博, 酒々井 夏子, 松本 宗和, 新居 俊典
2. 発表標題 リンパ系ドラッグデリバリーによる腎炎・腎血管炎治療モデルの開発
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 龍彦, 小林 一博, 新居 俊典, 酒々井 夏子, 松本 宗和
2. 発表標題 組換え近交系マウス腎炎・腎血管炎治療モデルを用いた治療抵抗性遺伝子座の解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 龍彦, 小林 一博, 新居 俊典, 酒々井 夏子, 石津 明洋, 武曾 理恵, 小川 弥生, 中沢 大悟, 黒川 真奈絵
2. 発表標題 OMAAVの上気道生検組織の病理学的特徴
3. 学会等名 第26回日本血管病理研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 龍彦, 新居俊典, 小林一博, 酒々井夏子, 松本宗和
2. 発表標題 組換え近交系マウス腎炎・腎血管炎治療モデルを用いた治療抵抗性遺伝子座の解析
3. 学会等名 第3回血管炎病因病態研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 宮崎龍彦 他（日本組織細胞化学会 編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学際企画	5. 総ページ数 232
3. 書名 組織細胞化学2019	

1. 著者名 宮崎龍彦 他（先端モデル動物支援プラットフォーム（AdAMS）編）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔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
研究協力者	グレーネ ヘルマン・ヨーゼフ (Groene Hermann Josef)		

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
研究協力者	小林 一博 (Kobayashi Kazuhiro)		
研究協力者	野田 塔子 (Noda Toko)		

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		
ドイツ	Phillips University Marburg		