

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08901

研究課題名（和文）単量体CRPの検出及び単量体CRP制御による新規抗炎症剤の開発

研究課題名（英文）The regulation and the detection of monomeric CRP

研究代表者

藤田 昌昭（FUJITA, MASAOKI）

公益財団法人田附興風会・医学研究所 腫瘍研究部・研究員

研究者番号：60421377

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）：変性CRP特異的な中和抗体が、関節炎の発症及び腎炎の発症を抑制することが可能であると示唆された。したがって、我々が開発したヒト変性CRP特異的な中和抗体は、関節リウマチや全身性エリテマトーデスの治療剤として使用できる可能性が示唆された。また、変性CRPを特異的に認識するELISA系を構築し、自己免疫疾患における変性CRPの濃度を測定したところ、成人スチル病で有意に上昇していた。変性CRPは成人スチル病のマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト変性CRPを制御することにより関節炎や腎炎の発症を抑制することが可能となることが示唆された。関節リウマチや全身性エリテマトーデスは、依然、難治性の疾患であり、様々な治療薬の開発が望まれる。ヒト変性CRPの制御は、関節リウマチや全身性エリテマトーデスの新たな治療法となる可能性があり、今後の発展が期待される。また、ヒト変性CRPの測定が成人スチル病の診断に役立つ可能性があり、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Conformation-specific Ags are ideal targets for mAb-based immunotherapy. Here, we demonstrate that the monomeric form of C-reactive protein (mCRP) is a specific therapeutic target for arthritis and nephritis in a murine model. We also developed a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure plasma levels of mCRP. We demonstrated that mCRP is elevated in some inflammatory autoimmune diseases, particularly adult-onset Still's disease (AOSD). These data suggest that the anti-mCRP mAb has therapeutic potential against rheumatoid arthritis and lupus nephritis and the plasma mCRP levels may therefore be a potentially useful biomarker for AOSD.

研究分野：免疫学

キーワード：CRP

1. 研究開始当初の背景

C reactive protein(CRP)は感染症や炎症性疾患のマーカーとして古くから広く臨床応用されているが、近年、**CRP** には従来知られている 5 量体 **CRP (pentameric CRP: pCRP)**だけでなく単量体が存在することが判明し注目を集めている。単量体 **CRP (monomeric CRP: mCRP)**は、自己免疫疾患、動脈硬化性疾患、間質性腎炎、アルツハイマー病との関連が指摘されている。全身性エリテマトーデスや関節リウマチ患者では **mCRP** に対する抗体価が上昇していることが知られており、動脈硬化性疾患、間質性腎炎、アルツハイマー病では各組織中に **mCRP** が検出される。一方で、**mCRP** は現在の技術では血清中では検出することができないため、**mCRP** の産生機序やこれらの疾患にどのように関与しているかの詳細は解明されておらず、**mCRP** の研究が進まないのが現状である。近年では **mCRP** と相互作用する分子が同定されつつあり、我々のグループは **mCRP** が接着因子であるインテグリンと直接結合し、この相互作用が白血球の活性化(炎症反応)に必要であることを世界に先駆けて明らかにした(**mCRP** はインテグリンに結合するが、**pCRP** はインテグリンに結合できない)。また、他のグループらは、**mCRP** が、**Lipoprotein :ApoB**、**Complement:C1q**、**Extracellular matrix: fibronectin, collagen, fibrinogen**、**Membrane lipid: cholesterol** に結合することを明らかにしているが、これら分子との相互作用の病的意義や生理的役割についての詳細は解明されていない。従来より、臨床現場において、**CRP** は高値であるが感染症や炎症性疾患では説明がつかない状況になることが少なくないことは問題となっていた。**mCRP**こそが、この解離を埋める重要な因子と考えている。

2. 研究の目的

本研究では、**mCRP** に対するモノクローナル抗体作製を糸口にして、①**mCRP** の検出系の確立、②**mCRP** 制御による新規抗炎症剤・抗リウマチ剤の開発を目標とした。現在、**pCRP** を認識する抗体は多数あるが、**mCRP** を認識する抗体は **commercially** には **CRP-8(Sigma)**のみである(ただし、**pCRP** とも反応する)。現時点では、**Potempa** らのグループが作製した抗体 (**M8C10, 9C9**)が **mCRP** 選択的に反応するが、1975年頃に作製された抗体であり、阻害活性や中和活性は有していない。このため、新規に **mCRP** に対するモノクローナル抗体作製することにより、**mCRP** の検出系の確立だけでなく、**mCRP** 制御による新規抗炎症剤・抗リウマチ剤の開発への応用が期待される。

3. 研究の方法

3-1 monomeric CRP に対するモノクローナル抗体作製及びサンドイッチ **ELISA** の構築 5 量体の **CRP** からウレア/EDTA 法により **mCRP** を作成した。**mCRP** 作製は **Native** 電気泳動にて確認した。作製した **mCRP** でマウス及びラットを免疫し、ウエス

タンブロットにて血清中での抗体産生を確認した。反応性は、**mCRP** を抗原とした固相 **ELISA** 法だけでなく、**Cell ELISA (mCRP-U937 cells)** 法、可溶性 **mCRP** を抗原とした系にでも確認した。マウス及び ラットのリンパ節を回収し、ミエローマ細胞と細胞融合させ、融合細胞は単一クローンになるように **96** ウェルのプレートで培養し (**100** プレートx**96** ウェル)、得られた細胞培養液から反応性の高いもの (高力価) の抗体を再度スクリーニングした。スクリーニング結果から **mCRP** に反応する抗体を産生する融合細胞を **36** 種取得した。これらの細胞は **Mab- mCRP** の産生細胞としてストックし、後の研究に利用することとした。上記 **36** 種のうち **7** 種についてはクローニングが終了した。さらに、**pCRP** には反応せず **mCRP** を特異的に検出するサンドイッチ **ELISA** の構築を行った。組み合わせ試験を行い、最適な組み合わせの抗体を同定した。

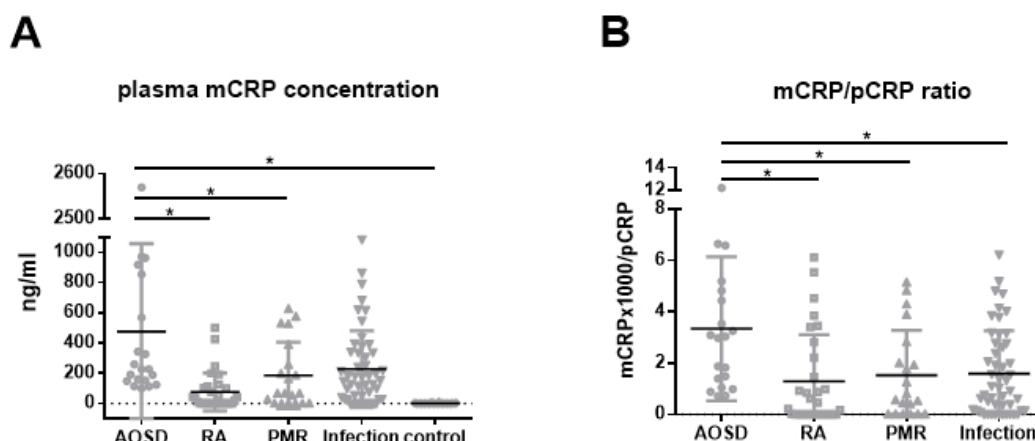
3-2 自己免疫疾患 (関節リウマチ・全身性エリテマトーデス・リウマチ性多発筋痛症、成人スチル病) 及び感染症患者における **mCRP** の役割を検討した。作製したサンドイッチ **ELISA** を利用し関節リウマチ・全身性エリテマトーデス・リウマチ性多発筋痛症、成人スチル病の患者由来の血漿中での **mCRP** 濃度を測定した。治療開始前に **mCRP** が高濃度で検出された群では、治療開始後も **mCRP** の測定を行った。

3-3 関節リウマチモデルマウスを用いて、**mCRP** の役割を検討した。関節炎モデルマウスとしてはコラーゲン誘導関節炎モデルである **DBA/1J** マウスを用いた。このモデルでは **Type II** コラーゲンの2回投与 (皮下注射) にて関節炎を誘導できる。通常、**4** 週目から関節炎が顕在化する。作製した抗 **mCRP** 抗体が関節炎を抑制するかどうかを、関節組織への炎症細胞浸潤を病理組織学的に解析した。関節炎発症率、関節スコア (足趾の腫脹、足趾及び足裏の腫脹、足全体の腫脹などをスコア化) も検討する。

3-4 ループス腎炎モデルマウスを用いて、**mCRP** の役割を検討した。ループス腎炎モデルマウスとしては **MRL/lpr** モデルマウスを用いた。作製した抗 **mCRP** 抗体が、腎炎を抑制するかどうかを、尿蛋白定量、抗DNA抗体価測定、腎組織への炎症細胞浸潤の病理組織学的解析により評価した。

4. 研究成果

自己免疫疾患における mCRP 濃度



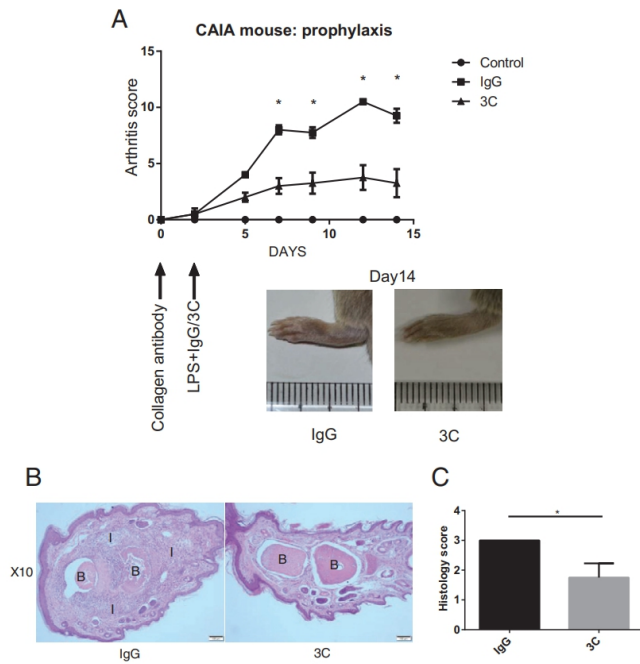
mCRP 濃度は、血液中の濃度 (ng/ml)を示す。

濃度比は、mCRP 濃度 (ng/ml) x 1000 / pCRP 値 (μg/ml) の比率を示す。

mCRP は、AOSSD 群において、RA、PMR、群と比べ統計学的に優位に上昇していた ($P < 0.05$) Infection 群と比較しても上昇を認めたが、統計学的な有意差は認めなかった。mCRP/pCRP 比は AOSSD 群において、RA、PMR、Infection 群と比べ統計学的に優位に上昇していた ($P < 0.05$)。統計解析は Kruskal-Wallis test 及び Dunn's post-test comparison にて行った。

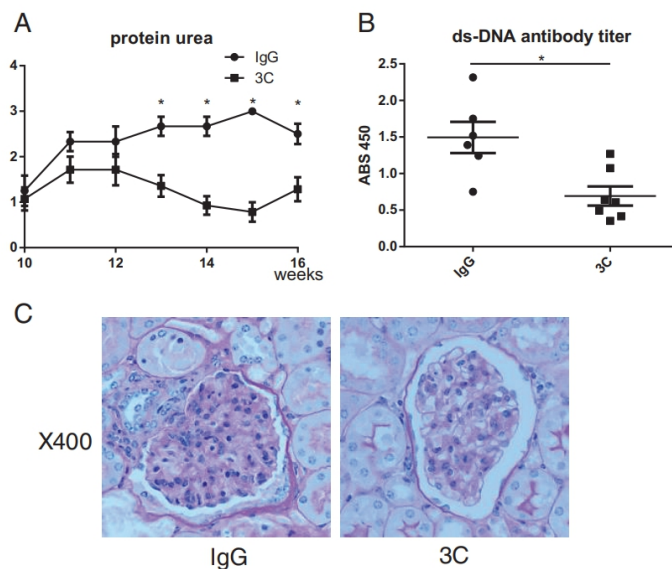
関節炎モデルマウスを用いたヒト変性CRP特異的な中和抗体の有用性の検討

7週齢のDBA/1Jマウス(清水実験材料)をもちいて、II型コラーゲンに対する5種類のモノクローナル抗体カクテル (Arthrogen-CIA: Arthritogenic Monoclonal Antibody) Chondrex, USA) 1. 25mgを0日目に腹腔内投与した ($N=10$)。3日目にLPS (25μg) ($N=10$) 及びヒト変性CRP特異的な中和抗体3C (100μg) ($N=5$)あるいはコントロールIgG (100μg) ($N=5$)を腹腔内投与した。関節スコアは1肢4点の最高16点のスコアリングで評価した。スコアは指、甲、手首の3関節を評価した (0:変化なし; 1:いずれかの関節1つの腫脹; 2:いずれかの関節2つの腫脹; 3:すべての関節の腫脹; 4:すべての関節の腫脹があり肢全体が赤く腫脹)。DAY0からDAY14まで、2~3日毎に測定した。関節炎は4日目より惹起され、10~15日目に最高値に達した。3C抗体を投与した群ではIgG抗体を投与した群と比較し、関節スコアの低下が認められた。さらに、関節組織の病理学的検索を行った。3C投与群では軽度の炎症細胞浸潤が認められたのに対し、IgG投与群では著明な炎症細胞の浸潤、パニヌス形成及び関節軟骨の破壊が認められた。したがって、ヒト変性CRP特異的な中和抗体を関節リウマチの予防剤として使用できることが確認された。



全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスを用いたヒト変性CRP特異的な中和抗体の有用性の検討

作成した抗 CRP 抗体が全身性エリテマトーデスの病態に効果を有するかどうかについて、マウスモデルを用いて検討した。MRL/lpr マウスは 12 週目より SLE の表現型を示す(リンパ節腫脹、腎炎、関節炎、唾液腺炎)。10 週目より、抗 CRP 抗体を腹腔内投与し(週 1 回)、14 週目まで投与を行った。この間、週 1 回で尿蛋白を測定、18 週目にマウスを安楽死させ(中枢破壊)、抗 ds-DNA 抗体価測定(心臓穿刺)を行った(抗 CRP 抗体投与群(N=7)、IgG 投与群(N=7))。さらに、腎臓の組織学的検索を行った。腎組織の HE 染色、PAS 染色標本を作成し、形態学的評価を行った。コントロール群では、糸球体腎炎が著明であった。ループス腎炎を発症したものと考えられる。一方、抗 CRP 抗体投与群では、有意に尿蛋白減少及び抗 ds-DNA 抗体価の低下が認められただけでなく、糸球体腎炎の抑制効果が認められた。したがって、ヒト変性CRP特異的な中和抗体をSLEの治療剤として使用できることが確認された。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 Fujita Chitose、Sakurai Yasuo、Yasuda Yuki、Takada Yoshikazu、Huang Cheng-Long、Fujita Masaaki	4 . 巻 207
2 . 論文標題 Anti-Monomeric C-Reactive Protein Antibody Ameliorates Arthritis and Nephritis in Mice	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 The Journal of Immunology	6 . 最初と最後の頁 1755 ~ 1762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100349	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヒト変性C R P 特異的な中和抗体、並びにそれを含む医薬及び抗炎症剤	発明者 JMT0、CANON	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021 - 021509	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 成人スティル病の検査方法及び検査キット	発明者 JMT0、CANON	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021 - 021500	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------