

機関番号：12602  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591166  
 研究課題名（和文） フラクタルカイン阻害による血管炎症候群に対する新規治療法の開発  
 研究課題名（英文） Effect of fractalkine blockade on vasculitis syndrome  
 研究代表者  
 南木 敏宏（NANKI TOSHIHIRO）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員  
 研究者番号：00282749

研究成果の概要（和文）：血管炎症候群におけるフラクタルカイン(FKN)の阻害による血管炎抑制効果を検討した。カンジダ培養液可溶性分画(CAWS)をマウスに投与し、冠動脈に血管炎を惹起した。FKN欠損マウスにおいてもCAWS誘導血管炎の程度には変化が見られなかった。また抗FKN抗体の投与によっても血管炎抑制効果は認めなかった。一方、レチノイドの投与により血管炎抑制がみられた。

研究成果の概要（英文）：Candida albicans water-soluble fraction induced mouse vasculitis on coronary artery. The vasculitis was not changed on fraktalkine (FKN)-deficient mice compare to wild-type mice. Treatment with anti-FKN mAb also did not inhibit the vasculitis. On the other hand, retinoid ameliorated the vasculitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：フラクタルカイン、ケモカイン、血管炎

#### 1. 研究開始当初の背景

血管炎症候群は、顕微鏡的多発血管炎、結節性多発動脈炎など全身性の血管炎を起こす疾患の総称である。一般に、副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制薬などが治療に用いられているが、治療抵抗例が多数見られ、また免疫抑制に伴う易感染状態が問題となる。そのため、血管炎症候群に対する新たな治療法の開発が期待されている。

血管炎の炎症局所では、炎症細胞の浸潤が著明に見られるが、その細胞浸潤には細胞遊走を促進するケモカインが関与していると考えられている。ケモカインの中で、フラク

タルカイン(fraktalkine: FKN)は活性化血管内皮細胞より発現がみられることより、血管炎局所で発現亢進していると考えられる。また血管炎患者の末梢血中のFKN濃度の上昇が示されており、FKNは血管炎病態形成に深く関与していると示唆された。

#### 2. 研究の目的

そこで、血管炎症候群の新規治療法の開発を目的に、FKNに焦点を当て、FKN阻害による血管炎モデル動物の治療効果を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管炎モデルマウスの作成

BALB/c マウスに *Candida albicans* water-soluble fraction (CAWS) を 1 mg/day/匹、day 1-day 5 に毎日腹腔内投与し、血管炎を誘発した。Day 35 に心臓を摘出し、液体窒素で凍結包埋し、ミクロトームで厚さ 6 μm の切片を作成した。

HE 染色にて冠動脈周囲における血管炎の状態を観察した。次に、抗 Ly-6G 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体による免疫染色で病変部への浸潤細胞を同定した。免疫染色では、凍結切片を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 15 分間インキュベートした後、10% 正常ヤギ血清で 40 分間ブロッキングした。1 次抗体として、anti-mouse Ly-6G mAb (ebioscience)、anti-mouse F4/80 mAb (Serotec)、anti-mouse CD4 mAb (Cymbus Biotechnology)、anti-mouse CD8 mAb (ebioscience) で 2 時間室温でインキュベートした後、2 次抗体として biotin-conjugated rabbit anti-rat IgG (DAKO) で 30 分間室温でインキュベートした。次に、streptavidin-horseradish peroxidase

(DAKO) を 30 分間室温でインキュベートし、DAB で発色させた後へマトキシリン染色を行い、脱水・封入した。

#### (2) FKN 欠損マウスにおける血管炎の解析

FKN 欠損マウス (n=10、BALB/c バックグラウンド)、及びワイルドタイプマウス (n=10、BALB/c マウス) に、CAWS を 1 mg/匹 day 1-day 5 に腹腔内投与し、血管炎を誘発した。day 35 に心臓を摘出し、血管炎の程度を評価した。

大動脈と冠動脈起始部の変化を詳細に解析するために、大動脈の上部から 20 μm おきに冠状断の HE 染色標本を作成し、病変部の位置をスクリーニングした。病変部では 4 μm の厚さの連続標本を作成し、観察した。血管炎の程度を定量するために、大動脈と冠動脈起始部を 5 つのセグメントに分け (図 1、×40 倍)、各セグメントの血管炎の程度を点数化し (3 点: 全層性血管炎、2 点: 血管内膜および外膜に炎症細胞浸潤、1 点: 血管内膜に炎症細胞が限局、0 点: 血管壁への炎症細胞浸潤なし)、各セグメントの合計点 (最高 15 点) の平均値 (血管炎スコア) と血管炎の発症率を算出し、FKN 欠損マウスとワイルドタイプマウスで比較した。

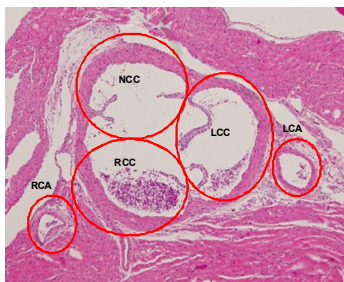


図 1

LCA: left coronary artery  
RCA: right coronary artery  
LCC: left coronary cusp  
NCC: noncoronary cusp  
RCC: right coronary cusp

#### (3) 抗 FKN 抗体による血管炎抑制効果

BALB/c マウスに CAWS を 4 mg/匹 day 1-day 5 に同様に腹腔内投与し、血管炎を誘発した。Day 1-day 21 まで、抗 FKN 抗体投与群 (n=22) に抗 FKN 抗体を週 2 回 500 μg/匹ずつ腹腔内投与した。コントロール抗体投与群 (n=26) には、day 1-day 21 まで、ハムスターコントロール IgG を週 2 回 500 μg/匹ずつ腹腔内投与した。Day 21 に心臓を摘出し、(2) と同様の方法で HE 染色標本を作成し、血管炎スコアと発症率を比較した。

#### (4) Am80 投与による血管炎抑制効果

BALB/c マウスに CAWS を 1 mg/匹 day 1-day 5 に腹腔内投与し、血管炎を誘発した。Day 1-day 34 (血管炎発症前から) もしくは Day 8-day 34 (血管炎発症後より) に、レチノイドの一つである Am80 を 4 mg/kg、1 mg/kg、vehicle を連日経口投与を行った。Day 35 に心臓を摘出し、HE 染色標本を作成し、血管炎の発症率と血管炎スコアを算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) CAWS 誘導血管炎マウスでの組織浸潤細胞の同定

<HE 染色>

大動脈起始部血管壁に多核白血球を中心としたびまん性の細胞浸潤を認めた (図 2)。また、比較的少数の単核球の浸潤も認められた。

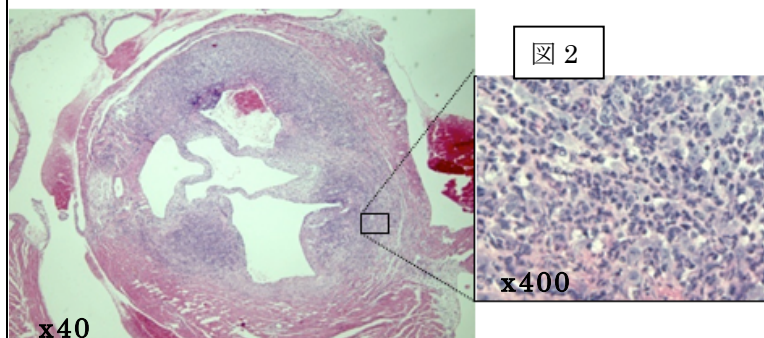
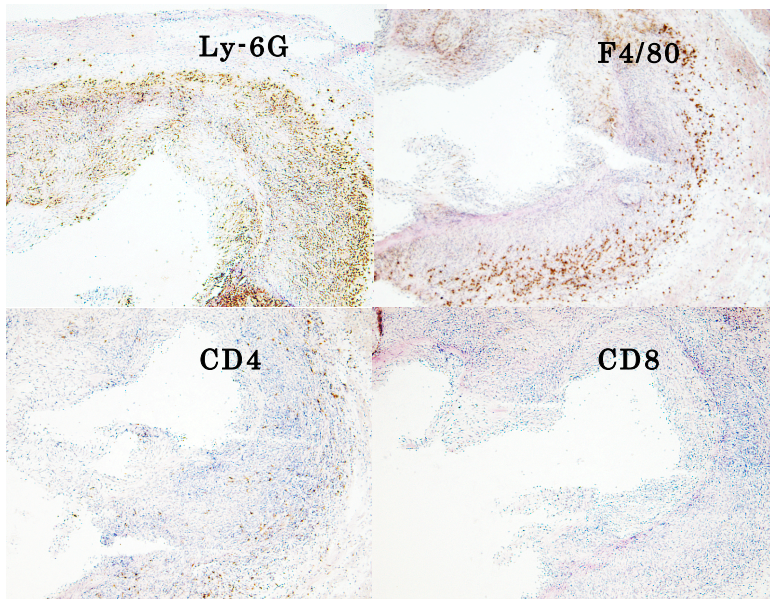


図 2

<免疫染色>

血管壁に浸潤する細胞は、Ly-6G 陽性の好中球が多数を占め、一部血管外膜周辺に F4/80 陽性マクロファージの浸潤がみられた。また、ごく少数の CD4 陽性 T 細胞も認めた。CD8 陽性 T 細胞はほとんど認めなかった (図 3、×100 倍)。

図 3

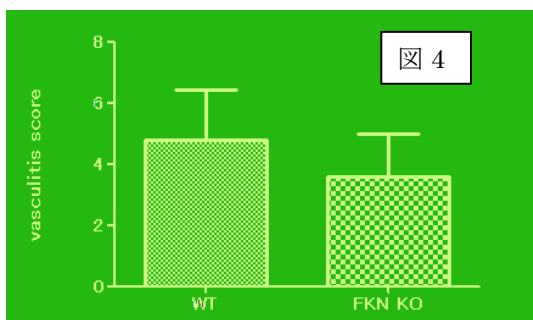


免疫染色の結果より、CAWS 誘導マウス血管炎モデルにおいては、血管炎の病変部に主に浸潤する細胞は好中球であると考えられた。一部マクロファージの浸潤も認められた。

### (2) FKN 欠損マウスにおける CAWS 誘導マウス血管炎モデルの解析

FKN 欠損マウス、および、ワイルドタイプマウスに CAWS 誘導血管炎を発症させ、血管炎の程度を比較した。血管炎の発症率は、ワイルドタイプマウス群で 10 匹中 4 匹(40%)、FKN 欠損マウス群で 10 匹中 5 匹(50%)であり、有意な差は認めなかった。

血管炎の程度を HE 染色後、スコア化することにより比較した。血管炎スコアは、ワイルドタイプマウス群で平均 4.8 点、FKN 欠損マウス群で平均 3.6 点であり、統計学的有意差はみられなかった (図 4)。

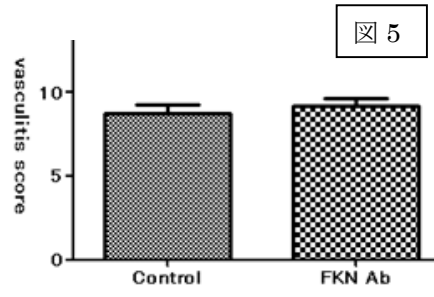


### (3) 抗 FKN 抗体による CAWS 誘導血管炎抑制効果の解析

Balb/c マウスに CAWS を投与し、冠動脈に

血管炎を発症させた。Day 1 より抗 FKN 抗体、またはコントロール抗体を投与し、血管炎の程度を比較した。血管炎の発症率は、コントロール抗体投与群で 26 匹中 25 匹(96%)、抗 FKN 抗体投与群で 22 匹中 22 匹(100%)であり、有意な違いは認められなかった。

HE 染色による血管炎スコアは、コントロール抗体投与群で平均 8.7 点、抗 FKN 抗体投与群で平均 9.2 点であり、統計学的有意差はみられなかった (図 5)。



以上の結果より、CAWS 誘導血管炎マウスにおいては、FKN は病態形成において重要な分子ではないことが示唆され、また治療標的分子とはならないと考えられた。CAWS 誘導血管炎の局所に浸潤している細胞の多くは好中球であったため、好中球が病態に深く関わっている可能性がある。FKN 受容体は好中球には発現がみられないため、FKN 阻害では好中球浸潤には影響が少なかったと考えられた。一方、FKN 受容体はマクロファージに強く発現がみられるため、マクロファージ浸潤が主体の病態であれば、その効果がみられることが期待できる。実際の血管炎患者では、好中球とともに、マクロファージの浸潤も強く見られるため、その場合、FKN 阻害はなお有用である可能性はあると考えられる。

### (4) Am80 投与による CAWS 誘導血管炎抑制効果の解析

同様に、CAWS 誘導血管炎を発症させ、day 1 からレチノイドの一つである Am80 を経口投与し、血管炎の発症率、血管炎の程度を観察した。血管炎発症率は Am80 4 mg/kg 投与群で 10 匹中 4 匹(40%)、1 mg/kg 投与群で 10 匹中 6 匹(60%)、vehicle 投与群で 9 匹中 7 匹(78%)であった。血管炎スコアは、Am80 4 mg/kg 投与群で平均 0.5 点、1 mg/kg 投与群で平均 1.2 点、vehicle 投与群は平均 2.8 点であり、Am80 4 mg/kg の投与により、統計学的に有意な血管炎の抑制効果が認められた。

次に、血管炎の発症後より Am80 を投与し (day 8 より Am80 を投与)、血管炎の治療効果を解析した。血管炎発症率は Am80 4

mg/kg 投与群で 24 匹中 6 匹 (25%)、vehicle 投与群で 24 匹中 9 匹 (38%) であった。血管炎スコアは、Am80 4 mg/kg 投与群で平均 1.0 点、vehicle 投与群で平均 2.9 点であり、Am80 の投与により、血管炎スコアは有意に低値となった。

レチノイドは、ビタミン A の誘導体であるが、免疫、炎症反応などへの影響も報告されている。本研究結果より、レチノイドが血管炎に対する新たな治療となることが示唆された。

#### 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 7 件)

- 1) Watanabe K, Penfold MET, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall TJ, Miyasaka N, Nanki T. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62: 3211, 2010.
- 2) Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, Nanki T. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. *Mod. Rheumatol.* 20: 244, 2010.
- 3) Nanki T, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: Implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11: R149, 2009.
- 4) Ohyanagi N, Ishido M, Suzuki F, Kaneko K, Kubota T, Miyasaka N, Nanki T. Retinoid ameliorates experimental autoimmune myositis, with modulation of Th cell differentiation and antibody production in vivo. *Arthritis Rheum.* 60: 3118, 2009.
- 5) Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, Kanda T, Suzuki H, Okamura Y, Nanki T, Miyasaka N, Umezawa K. Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome: an attractive target for the NF- $\kappa$ B-specific inhibitor DHMEQ. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1173: 137-145, 2009.

- 6) Souto-Carneiro MM, Mahadevan V, Takada K, Fritsch-Stork R, Nanki T, Brown M, Fleisher TA, Wilson M, Goldbach-Mansky R, Lipsky PE.

Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor. *Arthritis Res. Ther.* 11: R84, 2009.

- 7) Nonomura Y, Mizoguchi F, Suzuki A, Nanki T, Kato H, Miyasaka N, Kohsaka H. Hypoxia-induced abrogation of contact-dependent inhibition of rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation. *J. Rheumatol.* 36: 698, 2009.

[学会発表] (計 16 件)

- 1) Kaneko K, Watanabe K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin and ChemR23 Expression in Rheumatoid Arthritis: The Therapeutic Implication of the Pathway. 第 14 回国際免疫学会。2010.
- 2) 南木敏宏。シンポジウム 1「膠原病の新展開」PM/DM。第 20 回日本リウマチ学会関東支部学術集会。2009.
- 3) Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Miyasaka N, Nanki T. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. 第 39 回日本免疫学会総会。2009.
- 4) Kaneko K, Watanabe K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin and ChemR23 expression in rheumatoid arthritis: the therapeutic implication of the pathway. 第 39 回日本免疫学会総会。2009.
- 5) 駒野有希子、八木信宏、尾上育美、金子佳代子、宮坂信之、南木敏宏。siRNA/Wrapsome<sup>R</sup>を用いた関節リウマチに対する新規治療法の開発。第 37 回日本臨床免疫学会。2009.
- 6) Komano Y, Yagi N, Onoue I, Kaneko K, Miyasaka N, Nanki T. Arthritic

Joint-Targeting siRNA/Wrapsome® as a Treatment Strategy for Rheumatoid Arthritis. 第73回アメリカリウマチ学会。2009.

7) Nanki T, Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N The Effect of Synthetic Retinoid, Am80, On T Helper Cell Development and Antibody Production in Murine Collagen-Induced Arthritis. 第73回アメリカリウマチ学会。2009.

8) Watanabe K, Nanki T, Kaneko K, Schall TJ, Miyasaka N. Pathogenic Role of CXCR7 in Rheumatoid Arthritis. 第9回国際炎症学会。2009.

9) 駒野有希子、南木敏宏、八木信宏、尾上育美、金子佳代子、宮坂信之。siRNA/wrapped liposome複合体を用いた関節リウマチに対する新規治療法の開発。第53回日本リウマチ学会総会。2009.

10) 鈴木文仁、南木敏宏、今井俊夫、廣畑俊成、宮坂信之。多発性筋炎/皮膚筋炎におけるCX3CL1 (fractalkine) 発現の解析。第53回日本リウマチ学会総会。2009.

11) 渡部香織、南木敏宏、金子佳代子、宮坂信之。関節リウマチの病態形成におけるCXCR7の役割について。第53回日本リウマチ学会総会。2009.

12) Nanki T, Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Ishido M, Miyasaka N. Retinoid ameliorates collagen-induced arthritis with modulating Th cell development and antibody production. Keystone symposia, TH17 Cells in Health and Disease. 2009.

13) Watanabe K, Nanki T, Penfold ME, Kaneko K, Matsuda A, Matsumoto K, Miyasaka N. Pathogenic Role of CXCR7 in Rheumatoid Arthritis. 第38回日本免疫学会総会。2008.

14) Watanabe K, Nanki T, Penfold ME, Ohyanagi N, Kaneko K, Matsuda A, Matsumoto K, Miyasaka N. Pathogenic Role of CXCR7 in Rheumatoid Arthritis. 第72回アメリカリウマチ学会。2008.

15) 窪田哲朗、福谷泰子、南木敏宏、宮坂信之。

抗リン脂質抗体症候群の向血栓傾向におけるケモカインの作用に関する検討。第52回日本リウマチ学会総会。2008.

16) 南木敏宏、大柳菜歩、石堂美和子、窪田哲朗、宮坂信之。実験的多発性筋炎に対するレチノイド、Am80の効果の検討。第52回日本リウマチ学会総会。2008.

#### 〔図書〕(計3件)

1) 南木敏宏。製剤ごとの感染症とその頻度について教えてください。ファーマナビゲーターリウマチ～生物学的製剤編～。竹内勤編。p128-131。2010。メディカル・レビュー社。

2) 南木敏宏。アレルギー・膠原病系症状と検査異常。症状・所見。筋肉痛。チャート内科診断学。富野康日己編。p519-521。2009。中外医学社。

3) 南木敏宏。非ステロイド性抗炎症薬の適応と副作用。よくわかる関節リウマチのすべて。宮坂信之編。p151-157、2009。永井書店。

#### 〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

#### 〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

南木敏宏 (TOSHIHIRO NANKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：00282749

##### (2) 研究分担者

宮坂信之 (MIYASAKA NOBUYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 30157622