

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670408

研究課題名(和文)抗体結合型バイオナノカプセルを応用した炎症白血球特異的新規腎障害治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy for kidney injury by leukocyte targeting antibody-fused Bionanocapsules

研究代表者

松尾 清一 (Matsuo, Seiichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオナノカプセル(BNC)を応用したドラッグデリバリーシステム(DDS)により、マクロファージ(M $\phi$ )を選択的かつ炎症部位特異的に機能抑制することで、抗炎症・免疫抑制効果と副作用の軽減を両立させた革新的な治療法開発を目指した。蛍光標識BNCに、M $\phi$  標的抗体を結合させたBNCを作成、マウスM $\phi$  細胞株に添加し、その局在を顕微鏡下で確認した。同BNCのマウスへの経静脈投与では障害腎のみに蛍光陽性細胞を認めたため、障害特異的なBNCデリバリーが示唆された。遺伝子封入BNC添加によるM $\phi$  細胞での有意な発現はみなかったものの、BNCを用いた白血球特異的DDS開発に関する基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed the development of evolutionary therapy to reconcile both anti-inflammatory/immune suppressive effects and extenuate adverse effects. We applied bionanocapsule-based drug delivery system (DDS) to inhibit immune activation specific for macrophages and selectively at inflammatory sites. We generated fluorescent-conjugated BNC fused with antibody targeting macrophages, and confirmed the BNC distribution on mouse macrophage cell line. Intravenous administration of the BNC into mouse demonstrated fluorescent cells only on injured kidney indicating specific BNC delivery for inflammatory sites. Significant expression of gene enclosed in BNC was not demonstrated, but this study provided fundamental data for the development for leukocyte specific DDS using BNC.

研究分野：腎臓学、免疫学

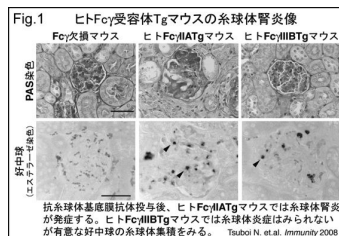
キーワード：マクロファージ バイオナノカプセル 腎虚血再灌流障害 ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

炎症機転はCKDの主要原因である糸球体腎炎や糖尿病性腎症の発症および進展に重要な役割を演ずることが近年の研究で明らかにされている。

『好中球、M<sub>1</sub>の腎炎への関与』教室の坪井らは、腎炎患者糸球体に沈着した免疫グロブリンや免疫複合体を認識するヒトFc<sub>γ</sub>受容体(hFc<sub>γ</sub>R)を好中球のみに発現させた遺伝子改変マウス(Fig.1)を作成し、腎炎ではhFc<sub>γ</sub>Rを介した好中球による糸球体炎症を起点に、M<sub>1</sub>、リンパ球の順に組織炎症が拡大することを世界に先駆けて報告した(Immunity 2008)。近年M<sub>1</sub>には炎症性M1型M<sub>1</sub>以外に、炎症を抑制する免疫調節性M2型M<sub>1</sub>の存在が新たに定義され、当教室の丸山らは脂肪由来幹細胞(ASC)のM2型M<sub>1</sub>への形質転換誘導作用から腎炎治療の可能性を提示した(JASN 現在投稿中)。さらに動物モデルでの好中球、M<sub>1</sub>除去の腎炎改善効果や、腎炎患者腎生検組織での糸球体への好中球、M<sub>1</sub>集積も報告されている(Segeer S, Kidney Int. 2006)。

『着想に至った経緯』上記好中球、M<sub>1</sub>の疾患への関与を示す実験的



事実および臨床研究結果と、薬剤投与による全身的副作用を考慮し、リンパ球免疫抑制を主体とした従来の腎炎治療戦略に加え、「好中球、M<sub>1</sub>選択的なDDSを用いた、好中球細胞活性化阻害や、M2型M<sub>1</sub>形質転換を介した免疫調整誘導技術の確立」により腎炎患者の予後を大幅に向上させるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

今回の研究ではバイオナノカプセル(BNC)を応用したドラッグデリバリーシステム(DDS)により、CKDにおいて腎組織障害の中心的役割を担う好中球・マクロファージ(M<sub>1</sub>)

を選択的かつ炎症部位特異的に機能抑制することで、抗炎症・免疫抑制効果と副作用の軽減を両立させた革新的な治療法開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1).平成25年度

Cy3 蛍光標識 BNC- IgG 作成 (連携研究者 黒田俊一研究室)

Cy3 標識した ZZ-tag 提示型 BNC に、モノクローナル抗 CD11b 抗体(cloneM1/70)を結合させ細胞分子特異的 BNC を作成した(BNC-IgG)。

### BNC(BNC- IgG)の in vitro 局在解析

蛍光標識 BNC- IgG の標的細胞内取り込みを確認した。細胞の共焦点レーザー顕微鏡下での陽性蛍光シグナル確認をもって取り込み達成と判断した。マウスマクロファージ細胞株(RAW264.7)に、BNC- IgG を添加し、BNC 局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 全身投与 BNC- IgG の in vivo 追跡

Cy3 蛍光減弱に対する懸念のため、動物モデルとして短期間に炎症が生じる腎虚血再還流モデル(Ischemia reperfusion injury; IRI)を作成。経静脈的投与された Cy3 蛍光標識 BNC- IgG は、疾患腎の糸球体および間質内の好中球、M<sub>1</sub>表面上で発現増強した CD11b にそれぞれ結合すると考えた。BNC- IgG 経静脈的投与後に標的臓器病理切片を作成、標識蛍光輝度を蛍光顕微鏡により確認した。

### (2).平成26年度

BNC による好中球、M<sub>1</sub>特異的 DDS 開発と評価  
治療薬剤非封入下での BNC- IgG 腎毒性と治療効果

IRI モデルを用い、薬剤非封入 BNC- IgG 投与群、BNC 投与群、非投与群間で疾患程度評価を、腎機能(血清 Cr 値および尿素窒素値、蛋白尿)、腎病理で評価した。

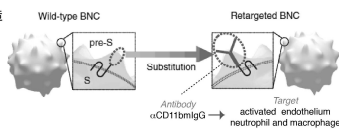
### GFP 発現プラスミド封入 BNC- IgG 作成

リボソーム法(黒田ら, J Control Release. 2008)を用い、GFP発現コンストラクトを封入したBNC- IgGを作成。In vitroで RAW264.7細胞での発現確認を行った。

## 4. 研究成果

平成 25 年度は Cy3 標識した ZZ-tag 提示型 BNC に、CD11b 抗体(cloneM1/70)を結合させ細胞分子特異的 BNC を作成(BNC-IgG)した (Fig.2)。さらに Cy3 標識した ZZ-tag 提示型

Fig.2 細胞分子特異的BNCの構造  
標的B型肝炎ウイルス外皮類似構造  
からなるBNCにCD11bに  
対する特異的抗体を結合させた。



BNC に、抗 CD11b 抗体を結合させ、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に添加したところ、BNC の局在を共焦点レーザー顕微鏡で確認することができた。次に蛍光標識した抗 CD11b 抗体接合 BNC をマウスに経静脈投与したところ IRI 作成腎皮髄境界部優位な Cy3 陽性細胞を認めたが、非虚血腎には所見をみなかった (Fig.3)。

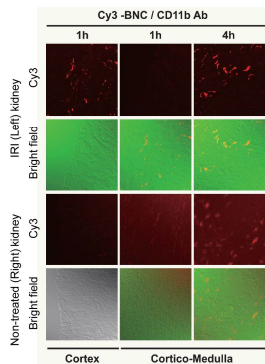


Fig.3 経静脈の投与されたモノクローナル抗体接合BNCの虚血再還流腎(IRI)における局在腎虚血再還流障害を左腎に作成したマウスに、Cy3標識されたBNC-α CD11b mIgG (Cy3-BNC/CD11b)を系静脈的投与し、蛍光顕微鏡下に腎切片の観察を行った。Cy3陽性部位は、IRIを惹起した皮髄境界部位(Cortico-Medulla)の間質に有意に認められた。一方右健側腎では尿管管間質内の集積が有意であった。

平成 26 年度は治療薬剤非封入下での BNC-IgG 腎毒性と治療効果を検討した (Fig.4)。

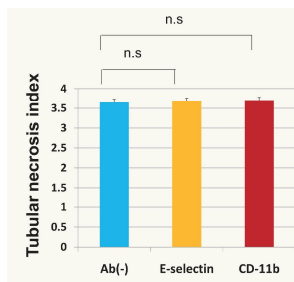


Fig.4 モノクローナル抗体接合BNCの虚血再還流腎障害に及ぼす影響腎摘出を施したマウスにIRIを作成し、BNC-α CD62EmIgG(Cy3-BNC/E-selectin)、BNC-α CD11bmIgG(Cy3-BNC/CD11b)を経静脈的投与。4時間後にマウスを屠殺し、組織学的変化を尿管管障害Scoreを用い、半定量的に評価した。全群間で有意差を認めなかった。

BNC 投与群ではコントロール群に比し IRI の疾患強度に差は認められず、薬剤非封入 BNC、あるいは BNC に結合したモノクローナル抗体自体は治療効果も、障害悪化作用も有さないことが示唆された。しかしながら GFP 発現コンストラクトを封入した BNC-IgG を作成し、in vitro で RAW264.7 細胞での発現確認を行ったが有意な GFP 発現をみなかった (Fig.5)。今後さらに遺伝子発現を実現できる条件設

定が整った場合には、治療薬剤封入 BNC-IgG の in vitro での抗炎症・免疫抑制効果判定、治療薬剤封入 BNC-IgG の in vivo 治療効果判定、他の腎疾患への応用研究の実現が必要であると考えられた。

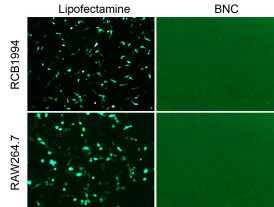


Fig.5 抗CD11bモノクローナル抗体接合BNCのIn vitroでの発現検討  
BNC-α CD62EmIgG-GFP、α CD11bmIgG-GFPをマウス血管内皮細胞株(RCB1994)、マウスマクロファージ細胞株(RAW264.7)とそれぞれincubationしGFP発現を検討した。  
発現ポジティブコントロールとしてLipofectamineを用いたGFP発現プラスミドの系を用いた。

## 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 17 件)

全て査読有り

1. Akiyama S, Akiyama M, Imai E, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy. Clin Exp Nephrol. 2014 Nov 21. Epub
2. Sato Y, Sato W, Maruyama S, Wilcox CS, Falck JR, Masuda T, Kosugi T, Kojima H, Maeda K, Furuhashi K, Ando M, Imai E, Matsuo S, Kadomatsu K. Midkine Regulates BP through Cytochrome P450-Derived Eicosanoids. J Am Soc Nephrol. 2014 Nov 5. Epub
3. Abe T, Kato S, Tsuruta Y, Sugiura S, Katsuno T, Kosugi T, Tsuboi N, Matsuo S, Maruyama S. Neutrophil/lymphocyte ratio as a predictor of cardiovascular events in incident dialysis patients: a Japanese prospective cohort study. Clin Exp Nephrol. 2014 Oct 28. Epub
4. Yamaguchi M, Ando M, Yamamoto R, Akiyama S, Kato S, Katsuno T, Kosugi T, Sato W, Tsuboi N, Yasuda Y, Mizuno M, Ito Y, Matsuo S, Maruyama S. Patient age and the prognosis of idiopathic membranous nephropathy. PLoS One. 2014 Oct 20;9(10):e110376.
5. Shi Y, Tsuboi N, Furuhashi K, Du Q, Horinouchi A, Maeda K, Kosugi T, Matsuo S, Maruyama S. Pristane-induced granulocyte recruitment promotes phenotypic conversion of macrophages and protects against diffuse pulmonary hemorrhage in Mac-1 deficiency. J Immunol. 2014 Nov 15;193(10):5129-39.
6. Yamaguchi M, Ando M, Yamamoto R, Akiyama S, Kato S, Katsuno T, Kosugi

T, Sato W, Tsuboi N, Yasuda Y, Mizuno M, Ito Y, Matsuo S, Maruyama S. Smoking is a risk factor for the progression of idiopathic membranous nephropathy. PLoS One. 2014 Jun 25;9(6):e100835.

7. Yamaguchi M, Yoshioka T, Yamakawa T, Maeda M, Shimizu H, Fujita Y, Maruyama S, Ito Y, Matsuo S. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis associated with infectious mononucleosis due to primary Epstein-Barr virus infection: report of three cases. Clin Kidney J. 2014 Feb;7(1):45-8.

8. Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, Katsuno T, Ozaki T, Yasuda K, Tsuboi N, Sato W, Suzuki Y, Matsuo S, Ito Y, Maruyama S. Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. Cytotherapy. 2014 Mar;16(3):357-68.

9. Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Tamai H, Hiramatsu T, Ohashi H, Ito I, Kasuga H, Horie M, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsubara T, Matsuo S; Nagoya Spiro Study Group. Long-term effects of spironolactone in peritoneal dialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2014 May;25(5):1094-102.

10. Nagaya H, Kosugi T, Maeda-Hori M, Maeda K, Sato Y, Kojima H, Hayashi H, Kato N, Ishimoto T, Sato W, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Maruyama S. CD147/basigin reflects renal dysfunction in patients with acute kidney injury. Clin Exp Nephrol. 2014 Oct;18(5):746-54.

11. Shinjo H, Sato W, Imai E, Kosugi T, Hayashi H, Nishimura K, Nishiwaki K, Yuzawa Y, Matsuo S, Maruyama S. Comparison of kidney disease: improving global outcomes and acute kidney injury network criteria for assessing patients in intensive care units. Clin Exp Nephrol. 2014 Oct;18(5):737-45.

12. Tsuboi N, Maruyama S, Matsuo S, Imai E. A ray of light in the dark: alternative approaches to the assessment and treatment of ischemic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2014 Feb;29(2):228-31.

13. Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Terabayashi T, Nagura F, Hattori R, Matsukawa Y, Mizuno T, Noda Y, Nishimura H, Nishio R, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. TGF- 1

promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2013 Oct;24(10):1627-42.

14. Mizuno M, Suzuki Y, Nonaka K, Sei Y, Maruyama S, Matsuo S, Ito Y. Perforative peritonitis caused by appendicitis in a patient on peritoneal dialysis. Intern Med. 2013;52(11):1177-81.

15. Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, Katsuno T, Kim H, Saka Y, Ozaki T, Sado Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate crescentic GN by promoting immunoregulatory macrophages. J Am Soc Nephrol. 2013 Mar;24(4):587-603.

16. Kojima H, Kosugi T, Sato W, Sato Y, Maeda K, Kato N, Kato K, Inaba S, Ishimoto T, Tsuboi N, Matsuo S, Maruyama S, Yuzawa Y, Kadomatsu K. Deficiency of growth factor midkine exacerbates necrotizing glomerular injuries in progressive glomerulonephritis. Am J Pathol. 2013 Feb;182(2):410-9.

17. Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Kojima H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yuzawa Y, Niki I. Distribution of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-producing enzymes and the roles of the H<sub>2</sub>S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol. 2013 Feb;17(1):32-40.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. DuQiuna、坪井直毅、石一沁、松尾清二、丸山彰一。第 57 回日本腎臓学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県横浜市。2014/7/4
2. N. Endo, N. Tsuboi, K. Furuhashi, S. Matsuo, S. Maruyama. ASSOCIATION OF GLOMERULAR MACROPHAGE PHENOTYPES AND URINE SOLUBLE CD163 WITH DISEASE ACTIVITY IN HUMAN LUPUS NEPHRITIS. 9th International Congress on Autoimmunity. Nice.France.2014/3/29
3. Nobuhide Endo, DrMed, Naotake Tsuboi, MD, PhD, Kazuhiro Furuhashi, MD, PhD, Shoichi Maruyama, MD, Seiichi Matsuo. Association of Glomerular Macrophage Phenotypes and Urinary Soluble CD163 with Disease Activity in Human Lupus Nephritis. Kidney Week 2014. フィラデルフィア.アメリカ。2014/11/15
4. 古橋 和弘、坪井直毅、清水 明日花、金 恒秀、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、佐藤 和一、松尾清二、丸山 彰一。ラット anti-GBM 腎炎に対する脂肪由来間葉系幹細胞治療で誘導されるマ

- クロファージフェノタイプの詳細検.  
第56回日本腎臓学会学術総会.東京都千代田区.東京国際フォーラム.  
2013/05/12
5. 三村哲史, 坪井直毅, 橋本直純, 清水明日花, 金恒秀, 古橋和弘, 松尾清一, 丸山彰一. 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた急性呼吸窮迫症候群への治療戦略. 第34回日本炎症再生医学会. 京都市左京区.国立京都国際会館. 2013/7/3
  6. 阿部智子, 尾崎武徳, 堀之内明日花, 金恒秀, 古橋和弘, 秋山真一, 勝野敬之, 安田香, 坪井直毅, 松尾清一, 丸山彰一. 低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の創傷治癒促進効果についての検討. 第34回日本炎症再生医学会. 京都市左京区. 国立京都国際会館. 2013/7/3
  7. 石一沁, 坪井直毅, 古橋和弘, Mayadas Tanya, 丸山彰一, 松尾清一. Mac-1 deficiency protects mouse from pulmonary hemorrhage, whereas exacerbates glomerulonephritis in experimental model of systemic lupus erythematosus. 第34回日本炎症再生医学会. 京都市左京区. 国立京都国際会館. 2013/7/3
  8. Tomoko Abe, Asuka Horinouchi, Hangsoo Kim, Kazuhiro Furuhashi, Shinichi Aiyama, Takayuki Katsuno, Kaoru Yasuda, Takinori Ozaki, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. LOW SERUM CULTURED ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS AMERIORATE RAT MODEL WITH UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION. The World Congress of Nephrology 2013. Hong Kong. 2013/6/1
  9. Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Asuka Shimizu, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. SERUM-STARVED ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS AMELIORATE RENAL INJURY ASSOCIATED WITH RAT CRESCENTIC GLOMERULONEPHRITIS BY PROMOTING THE GENERATION OF IMMUNOREGULATORY MACROPHAGES. The World Congress of Nephrology 2013. Hong Kong. 2013/6/1
  10. Hangsoo Kim, Masashi Mizuno, Kazuhiro Furuhashi, Takayuki Katsuno, Takenori Ozaki, Kaoru Yasuda, Naotake Tsuboi, Yasuhiko Ito, Shoichi Maruyama, Matsuo Seiichi. RAT ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS ATTENUATE PERITONEAL INJURIES IN RAT ZYMOSAN-INDUCED PERITONITIS ACCOMPANIED BY COMPLEMENT ACTIVATION. The World Congress of Nephrology 2013. Hong Kong. 2013/6/1
  11. Yiqin Shi, Naotake Tsuboi, MD, PhD, Kazuhiro Furuhashi, MD, PhD, Shoichi Maruyama, MD, Seiichi Matsuo. Mac-1 Deficiency Protects Mouse from Pulmonary Hemorrhage, whereas Exacerbates Glomerulonephritis in Experimental Model of Systemic Lupus Erythematosus. Kidney Week 2013. Atlanta, USA. 2013/11/8
  12. Naotake Tsuboi, Kazuhiro Furuhashi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Serum-starved Adipose-derived Stromal Cells Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis By Promoting Immunoregulatory Macrophages. Forefronts in Nephrology Florence. Italy. 2013/9/14
  13. Takayuki Katsuno, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Low Serum Cultured Adipose Tissue-derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury In Rats. Forefronts in Nephrology Florence. Italy. 2013/9/14
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
松尾 清一 ( Matsuo Seiichi )  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70190410
  - (2) 研究分担者  
坪井 直毅 ( Tsuboi Naotake )  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50566958
  - (3) 連携研究者  
黒田 俊一 ( Kuroda shunichi )  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号：60263406