

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

協力研究者 佐伯 久美子 国立国際医療センター研究所室長

協力研究者 小柳 真 国立国際医療センター研究所研究生

研究要旨 受容体ナノテクノロジーは、ナノメディスン分野における重要な研究分野である。従来より我々は白血球の走化性因子受容体（7回膜貫通型G蛋白共役受容体）の機能を研究してきたが、今回の研究では、マウスマクロファージ特異的表面抗原 F4/80 という7回膜貫通型受容体（その細胞外領域がEGF繰り返し配列を有する特異な分子）に焦点を当て、そのヒトでの相当分子であるEMR1の遺伝子単離、抗原蛋白作成、モノクローナル抗体の作成を行い、この分子のヒトでの機能や細胞分布を明らかにしようとした。EMR1cDNAをヒト単球細胞株 Mono Mac 6 より RT-PCRにて取得した後に、ヒトEMR1とヒトIgG1定常部との遺伝子融合によりヒトEMR1可溶化蛋白を作製し、免疫原とした。免疫マウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞との細胞融合を経て最終的に二つのハイブリドーマクローン3H2、4A7を取得した。これらが産生するモノクローナルは、ヒト末梢血単球、リンパ球、顆粒球の他に様々なヒト細胞（株）と有意に結合した。マウスマクロファージ細胞株(F4/80陽性)でも、同様にこの抗体での染色が認められたが、マウスミエローマ細胞株(F4/80陰性)に対しては、3H2、4A7は反応しなかった。以上より、得られた2種類の抗ヒトEMR1モノクローナル抗体の特異性は問題なく、ヒトEMR1は、厳密なマクロファージ特異的発現を示すマウスF4/80とは大きく異なり、幅広く種々の細胞に発現し、その機能も、マウスの場合よりはるかに多彩である事が示唆された。

A. 研究目的

受容体ナノテクノロジーは、ナノメディスン分野における重要な研究分野である。従来より、分担研究者のグループにおいては、白血球の機能性受容体とそれから発せられる細胞内シグナル、並びに機能活性化に関して研究を進めてきた。とりわけ、走化性因子と呼ばれる一群の刺激物質は好中球、単球・マクロファージにおいて重要な役割を担っていることがよく知られている。走化性因子に属するケモカインや菌体成分由来低分子ペプチド因子の受容体は、7回膜貫通型のG蛋白共役受容体であり、その機能は遊走に止まらず、接着、活性酸素産生など多彩であり、これまでに集中的に研究されてきた。

一方、マウスにおいてマクロファージ特異的表面抗原として発見され、マクロファージマーカーとして広く用いられている膜蛋白 F4/80 は、同じ7回膜貫通型受容体であるが、その細胞外領域はEGF繰り返し配列を有する特異な分子である。この分子は、感染防御においてNK細胞と相互作用を有することが知られ、NK細胞にそのリンガンドが存在することが示唆されているが、研究は進んでいない。ヒトでのF4/80に相当する分子はEMR1と呼ばれ、ファミリーを形成しているが、ヒトでの分布や役割は不明で、モノクローナル抗体もなく、研究対象として極めて重要である。

本研究においては、この分子を単離して、それに対するモノクローナル抗体を作成してその機能や細胞分布を明らかにして、リガンドの同定につなげる研究を進める。

B. 研究方法

ヒト末梢血からの単核球と好中球分離は通常の比重遠心法（好中球の場合は、デキストラン沈降後の比重遠心と低調溶血）により行い、ヒト細胞は、臍帯静脈内皮細胞 HUVEC、正常線維芽細胞 HDFa、CD34陽性造血幹細胞、白血病細胞株（HL-60, U937, THP1, K562, Mono Mac 6, Jurkat）、骨髓腫細胞株（ARH77, Hs-Sultan）を用いた。細胞のフローサイトメトリーは、BD社製 FACSCalibur を用いて行った。

EMR1cDNAはヒト単球細胞株 Mono Mac 6 より RT-PCRにて取得した。免疫原としてヒトEMR1とヒトIgG1定常部との遺伝子融合によりヒトEMR1可溶化蛋白を作製した。発現ベクターには、pBOS-H2BGFPのインサートであるH2B-GFPを除去して用いた。EMR1発現は、マウス線維芽細胞株 Balb/3T3 を用いて行った。薬剤選択は、Blasticidine Sも用いた。抗原発現細胞は、無血清培地に馴化させて大量培養し、培養上清を限外濾過濃縮、精製して免疫原とした。免疫は6週齢雌性のBalb/cマウスにGERBUアジュバントと共に初回のみ100 μ g、2回目以降は50 μ gで施行した。免疫は合計5回実施し、最終免疫の三日後に採血し、血清中の抗体価をフローサイトメーターでのMono Mac 6細胞への染色の強度で判定した。モノクローナル抗体の作成は、マウスミエローマ細胞との細胞融合、スクリーニング、選択し限界希釈法でのクローニング、など、標準的な手法により行った。

C. 研究結果

EMR1cDNA をヒト単球細胞株 Mono Mac 6 より RT-PCR にて取得した後に、免疫原としてヒト EMR1 とヒト IgG1 定常部との遺伝子融合によりヒト EMR1 可溶化蛋白を作製した。

ヒト EMR1 分子は膜表面局在分子であり、更に細胞膜直上に GPS ドメインと呼ばれる蛋白質切断酵素の認識部位を持つため、そのままでは融合蛋白質として発現出来ないため、膜直上の cDNA 配列に PCR にてアミノ酸のアラニンに相当する配列を付与してから発現ベクター構築に用いた。

可溶化ヒト EMR1 発現ベクターをマウス線維芽細胞株 Balb/3T3 へ遺伝子導入し、薬剤選択の後、安定発現細胞を取得した。無血清培地に馴化させ、大量培養した培養上清を限外濾過濃縮し、Protein G カラムで精製を行い、免疫原とした。

免疫は合計 5 回実施し、血清中の抗体価を Mono Mac 6 細胞への染色の強度で判定し、抗体価が最大であった一匹について追加免疫を行い、3 日後にポリエチレングリコールを用いてマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。

細胞融合してから 14 日後にスクリーニングを行い、癒合細胞の増殖があり、抗体価が高く、Mono Mac 6 細胞及び可溶化ヒト EMR1 蛋白に対して有意に反応するクローンを選択し限界希釈法でクローニングを行い、最終的に二つのクローン 3H2、4A7 を取得した。二つのクローン 3H2、4A7 は、共にマウス IgG1 であった。

これらは、ヒト末梢血単球、リンパ球、顆粒球の他に様々なヒト細胞 (株) (血管内皮細胞 HUVEC、線維芽細胞 HDFa、CD34 陽性造血幹細胞、白血病細胞株 (HL-60, U937, THP1, K562, Mono Mac 6, Jurkat)、骨髓腫細胞株 (ARH77, Hs-Sultan)) と有意に結合した。マウスマクロファージ細胞株 (F4/80 陽性) でも、同様にこの抗体での染色が認められた。

既存のマウス EMR1 に対する抗体との比較では、エピトープの交差は見られなかった。マウスミエローマ細胞株 (F4/80 陰性) に対しては、3H2、4A7 は反応しなかった。

マウスに於いて、EMR1 (F4/80) の発現はマクロファージに限定されており、その発現と 3H2、4A7 との反応性は相関しているものと思われた。

D. 考察

マウスマクロファージマーカーである F4/80 のヒトカウンターパート EMR1 に対するモノクローナル抗体を作成して、ヒト末梢血単球、リンパ球、顆粒球、血液細胞系の様々な細胞株について、その分布を検討したところ、予想に反して正常血液細胞はもちろん、白血病細胞株、骨髓腫細胞株、血管内皮細胞、線維芽細胞にも発現していることが判明した。ただし、この結

果が、今回作成した抗体の非特異的な反応による結果である事が除外できていないので、現在、ウエスタンブロット用のポリクローナル抗体を作成して、ヒトでの広範な細胞での EMR1 の発現が再現出来るかどうかを検討中である。現時点では、今回作成した抗ヒト EMR1 抗体がマウス F4/80 も認識し、しかも、F4/80 を発現していないマウスミエローマ細胞株には結合しなかったことから、作成した抗体の特異性は問題ないと推定される。

ヒト EMR1 が広く様々な細胞に発現しているとする、マウスでの状況とは大きく異なるということになる。従って、マウスでの NK 細胞のみとの相互作用や、KO マウスでの表現型の乏しさなどは、ヒトでは当てはまらないかもしれない。受容体発現細胞が多彩であるならば、しかも、マウスの状況と異なるならば、ヒトでのリガンドを同定して、リガンド刺激による受容体細胞の生物学的な変化を詳細に検討する必要がある。

E. 結論

マウスマクロファージ特異的分子で、しかも細胞外構造が特異な 7 回膜貫通型受容体である F4/80 のヒトカウンターパート EMR1 の遺伝子を単離し、抗原蛋白を作成して、モノクローナル抗体も調整して、ヒト細胞における分布などを検討した。その結果、ヒトにおいてはマクロファージ特異的発現を示さず、幅広い細胞に検出された。今後は、ヒトでのリガンド同定と作用の解明が重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. Dev Growth Differ 48:177-188,2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特願 2006-303929

QDを用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

分担研究者 土肥多恵子 国立国際医療センター 研究所・研究部長

協力研究者 河村 由紀 国立国際医療センター研究所・協力研究員

協力研究者 川島 麗 国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者 水谷紀子 国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員

研究要旨

本研究の目的は、半導体ナノ粒子(QD)を用いて、消化管炎症における消化管と他の臓器との細胞交通を解析し、診断・治療のターゲットを探索することである。我々は腹腔由来マクロファージが炎症後及び外科侵襲後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行ってきた。その結果、腹腔マクロファージは炎症刺激により局所に遊走すると同時にケモカイン CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現するようになるため局所にとどまって細胞塊を形成するというメカニズムが明らかになった。本年度は 大腸炎に伴う腹膜癒着マウスモデル、外科ストレスによる腹膜癒着のマウスモデルを用いて、CCL1作用の阻害及び CCR8 分子欠損マウスでの解析を行い、CCL1/CCR8 相互作用が腹膜癒着のトリガーとして中心的役割を果たしていること、CCL1/CCR8 相互作用の阻害により、腹膜癒着を防止できることを明らかにした。

A. 研究目的

消化管疾患における腹腔内の免疫応答の研究はほとんど行われていないが、消化管の漿膜病変は、全層性潰瘍や外科的侵襲による癒着等、QOL には大きな影響をもたらす。本研究では腸管免疫の特徴に加えて消化管炎症時の腹腔内の免疫応答を解明し、局所の漿膜側の免疫応答を明らかにすることを目的として、消化管と腹腔内との細胞交通を解析した。ラベルに用いる半導体ナノ粒子(QD)は蛍光が明るく、褪色が少ないという特色があり、これを利用して腹腔内及び骨髄マクロファージをラベルし腸を含む腹腔内臓器との交通を解析する。昨年度までに、炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊を形成するのは腹腔由来マクロファージであり、この部位には特異なケモカイン受容体 CCR8 を発現していることを見いだした。さらに CCL1 の添加のみで、中皮細胞とマクロファージの細胞凝集を *in vitro* で再現することに成功した。このため本年度は、*in vivo* モデルでの腹膜癒着阻害を試みた。

B. 研究方法

1. 大腸炎に伴う腹膜癒着マウスモデルの作成

C57BL/6 マウスに、2%トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS):エタノール=1:1 溶液を TNBS 100 μ g/g weight として注腸投与し、急性大腸炎を誘導した。3日後に開腹し、大腸への周辺臓器の癒着を以下のようにスコア化した。0, no adhesion; 1, one thin filmy adhesion; 2, more than one thin adhesions; 3, thin adhesion with focal point; 4, thick adhesion with plantar attachment or more than one thick adhesion with focal point; 5, very thick vascularized adhesions of more than one plantar adhesion. 一部の実験においては QD ラベルしたマクロファージを大腸炎誘導前に腹腔内に移植しておき、大腸への集積を経口イメージング装置により解析した。抗-CCL1 中和抗体あるいは control rat IgG (150 μ g) は大腸炎誘導1時間前に腹腔内投与した。

2. 外科ストレスによる術後癒着マウスモデルの作成

Wild type (WT)または CCR8 欠損 C57BL/6 マ

ウスを麻酔下に正中切開により開腹し、左右の壁側腹膜を止血鉗子でつまみ絹糸で結紮する”ischemic button”を作製した。6日後、開腹してそれぞれの ischemic button への臓器癒着観察し、次のようにスコア化した： 0, no adhesion; 1, thin filmy adhesion; and 2, thick planter adhesion. 抗-CCL1 中和抗体あるいは control rat IgG (150 µg) は手術操作の直後と3日後に腹腔内投与した。

C. 研究結果

抗マウス CCL-1 中和抗体の腹腔内投与により、炎症に伴う癒着及び外科ストレスに伴う腹膜癒着は顕著に阻害された(表1)。また、炎症誘導後の大腸漿膜面及び穿孔性潰瘍部への QD ラベルマクロファージの集積にも明らかな阻害効果が見られた。

表1.CCL1/CCR8 相互作用阻害による腹膜癒着の阻害

	Score
炎症に伴う癒着	
抗 CCL-1 投与群 (N=6)	1.00 ± 0.89
Control IgG 投与群 (N=5)	4.75 ± 0.50
	P<0.0001
外科ストレスによる癒着	
抗 CCL-1 投与群 (N=9)	0.39 ± 0.16
Control IgG 投与群 (N=9)	1.56 ± 0.17
	P<0.0001
Wt(無処理)投与群 (N=9)	1.44 ± 0.18
CCR8 欠損マウス (N=10)	0.50 ± 0.76
	P=0.0006

CCL/CCR8 相互作用の阻害による腹膜癒着を防止できることが明らかになった。

D. 考察

1. 達成度について

本年度は、CCL1/CCR8 の役割りについて *in vivo* レベルでの実験でも証明することができた。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は、外科手術後や、炎症による侵襲に伴って起こる腹膜癒着の新しいメカニズムを明らかにしたものである。特に本年度の成果により *in vivo* でも CCL1/CCR8 が重要な働きをしていることが明らかになった。潰瘍面を漿膜側から塞ぐ機構としてのマクロファージ凝集は、自然免疫応答の発見という意味でも学術的意義が高い。更に、この成果をもとに CCR8 をターゲットとした腹膜癒着の予防が可能である。腹膜癒着防止剤のマーケットは非常に大きく、医療サービス面からのニーズも高い。また、腹膜癒着の防止により再手術が減少し、術後の症状が緩和されれば、医療経済的な貢献も期待される。

3) 今後の展望について

ヒトで術中の洗浄液の細胞成分、可溶性成分を用いて検証を行うとともに、CCL1/CCR8 阻害剤のスクリーニングを行い、腹膜癒着の防止法を開発する。

E. 結論

QD を用いた *in vivo*, *in vitro* 細胞トラフィックの研究から癒着性腹膜炎のメカニズムを明らかにし、治療法開発につながる成果を得た。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) (欧文)

1. A Hoshino, Y-I Kawamura, M Yasuhara, N Toyama-Sorimachi, K Yamamoto, A Matsukawa, S A. Lira, T Dohi. Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. *J. Immunol.* 2007 In press.

総説

1) 欧文

1. Dohi T, Fujihashi K: Type 1 and 2 T helper cell-mediated colitis. *Corrent Opinion in Gastroenterology* 22: 651-657, 2006

2) 和文

1. 土肥多恵子: 粘膜再生誘導による IBD 治療の可能性. *分子消化器病* 3: 32-37, 2006
2. 土肥多恵子: 消化管における粘膜免疫システム-最近の話題. *炎症と免疫*

14: 451-457, 2006

学会発表

(国内学会)

1. 土肥多恵子: Aggregation of peritoneal macrophages via a chemokine triggers innate immunity and adhesion in the peritoneal cavity, 第92回日本消化器病学会総会シンポジウム7「消化器と自然免疫」, 小倉, 2006, 4月22日

(国際学会)

1. Dohi T, Hoshino A, Kawamura YI, Kawashima R, Yamamoto K: Chemokine-induced aggregation of peritoneal macrophages triggers peritoneal adhesion, Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006, May 21

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

出願中 1件

「CCR8阻害剤を用いる癒着の診断、予防および治療剤」2005年9月12日特願2004-345267、2005-264160、2005年11月30日PCT/JP2005/21980

2) その他なし

マラリアワクチンDDSに向けての基礎研究

分担研究者 狩野繁之 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・部長
協力研究者 奥 浩之 群馬大学工学部材料工学科・助教授
協力研究者 矢野和彦 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・流動研究員

研究要旨

原虫解糖系の酵素であるエノラーゼに対する特異抗体による増殖阻害の機構を形態的、経時的に解析するために、新たな蛍光プローブである量子ドット(半導体ナノ粒子)の導入を試みた。リング期に同調させた熱帯熱マラリア原虫の培養上清に、同特異抗体を加えて培養を行い、経時的に赤血球を回収し、量子ドット標識二次抗体(ヤギ、抗ラビットIgG抗体標識Q-dot™, Invitrogen)、Alexa568標識二次抗体(Invitrogen)を用いて抗エノラーゼ抗体の局在の検出を行った。培養開始後32時間後の成熟シズント形成率は33%であり(増殖阻害率67%)、抗エノラーゼに対する特異抗体が原虫の増殖阻害を示すことが判ったが、共焦点レーザー走査顕微鏡検査では、赤血球表面、原虫内部のいずれも特異蛍光は検出されなかった。量子ドットの応用は、エノラーゼ抗体を用いたマラリアワクチンDDSの開発に向けて有望なツールであると考えられるが、本研究では、おそらく原虫内のHemeの存在による量子ドットの励起波長の吸収等によりQDの発光できない可能性も考えられた。今後量子ドットの種類、検出方法等、さらなる条件検討が必要と考えられる。

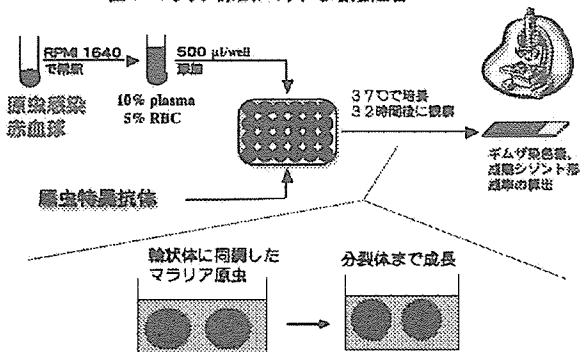
A. 研究目的

マラリア原虫抗原に対するある種の特異抗体は、原虫の増殖を選択的に阻害することが知られている。この特異抗体による増殖阻害の機構を形態的、経時的に解析するために、新たな蛍光プローブである量子ドット(半導体ナノ粒子)の導入を試みた。

B. 研究方法

リング期に同調させた熱帯熱マラリア原虫の培養上清に、原虫解糖系の酵素であるエノラーゼに対する特異抗体を加えて(6.3 μg/100 μl)培養を行い、培養開始後32時間後の成熟シズント形成率を顕微鏡下に観察・計算した(図1)。また、培養開始後経時的に赤血球を回収し、3%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒドで固定後、量子ドット標識二次抗体(ヤギ、抗ラビットIgG抗体標識Q-dot™, Invitrogen)、Alexa568標識二次抗体(Invitrogen)を用いて抗エノラーゼ抗体の検出を行った。対照として同量の熱帯熱マラリア原虫抗酸化酵素ペルオキシレドキシニンに対する特異抗体、並びにPBSを加えた。観察は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて行った。

図1: マラリア原虫に対する増殖阻害



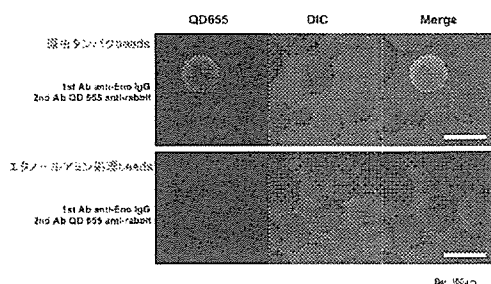
C. 研究結果

培養開始後32時間後の成熟シズント形成率は、PBSを加えた培養系を100%とした場合、抗エノラーゼ抗体を加えた培養系では33%であった(増殖阻害率67%)。このことから抗エノラーゼに対する特異抗体が原虫の増殖阻害を示すことが判った。また抗ペルオキシレドキシニン抗体を加えた培養系の成熟シズント形成率は88%(増殖阻害率12%)であった。

加えた抗エノラーゼ抗体の感染赤血球での局在を、量子ドット標識二次抗体、Alexa568標

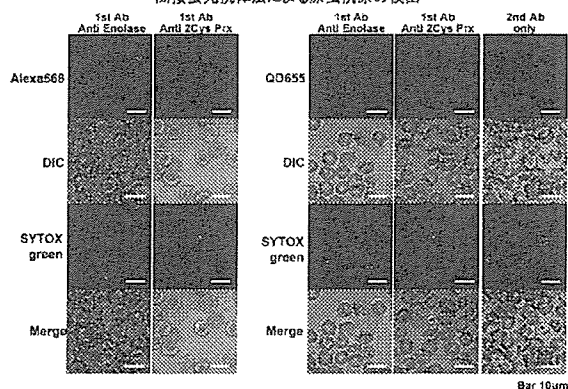
識二次抗体で検出を試みたが、赤血球表面、原虫内部のいずれも特異蛍光は検出されなかった。対照として原虫タンパクをカップリングさせたビーズに対する抗エノラーゼ抗体、量子ドット標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法では、ビーズの表面が蛍光表示された (図2)。

図2 原虫タンパクをカップリングさせたビーズとの反応(間接法)



さらに、非同調原虫を、通常のアセトン/パラホルムアルデヒドで固定してトライトン処理した後に、間接蛍光抗体法による原虫内部のエノラーゼの検出を試みたが、Alexa568 標識二次抗体では細胞質中に蛍光を発するタンパクの局在を検出できたが、量子ドット標識二次抗体を用いた場合には発光しないことが判明した (図3)。

図3 感染赤血球固定後トライトン処理した材料を用いた間接蛍光抗体法による原虫抗原の検出



D. 考察

マラリア原虫タンパクに対する抗体は、赤血球や原虫の表面タンパクに対する抗体のみでなく、細胞質中に局在すると考えられるタンパクに対する抗体によっても原虫の増殖を阻害することが認められている。しかしながら、それらの抗体が反応する局在やその機能が不明であることが多く、適切な検出系によって原虫

増殖阻害の機序が明らかにされることが望まれている。量子ドットの応用は、このマラリアワクチン DDS の開発に向けて有望なツールであると考えられるが、本研究では、おそらく原虫内の Heme の存在による量子ドットの励起波長の吸収等により QD の発光できない可能性も考えられた。今後量子ドットの種類、検出方法等、さらなる条件検討が必要と考えられる。

E. 結論

以上のように、半導体ナノ粒子によって、抗マラリア原虫抗原タンパク抗体の局在を明らかにし、液性免疫を中心としたマラリアワクチン開発における DDS の基盤的研究成果を得る試みを行ったが、抗体の機能に直結する結果は得ることができなかった。しかしながら、今後量子ドットの種類、検出方法等、さらなる条件検討を整えることで、未だに世界で開発の成功を見ていないマラリアワクチンの創出に、大いに貢献できると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表 無し
総説 無し
2. 著書 無し
3. 学会発表
 - 1) 清野宏、狩野繁之：新世代ワクチン・ストラテジー、第80回記念企画2 “感染症学の Break-Through を目指して”、第80回日本感染症学会学術講演会、ホテル日航東京、2006.4.20-21.
 4. 知的所有権の出願・取得状況
 - 1) 特許
奥浩之、小見和人、栗山佳祐、山本隼也、山田圭一、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、河津信一郎、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法、国際特許公開W02006/035815 (平成18年4月6日)
 - 2) その他 無し

腎疾患治療に向けた DDS

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター・部長

尿細管間質病変の進展は糸球体疾患の増悪に重要な役割を果たす。我々は進行性糸球体疾患の尿細管間質病変の治療における新たな標的分子の探索を行い、細胞性フィブロネクチンとオステオポンチンが様々な腎糸球体疾患における尿細管上皮及びボーマン嚢上皮の標的分子として、選択的 DDS に有用である可能性を示した。

A. 研究目的

我が国における慢性腎不全の主な原疾患は慢性糸球体腎炎と糖尿病性腎症である。これまでの本研究で我々は、ラット糸球体腎炎モデルにおいて、糸球体に指向性のあるリポソームに封入したステロイド剤が、フリーのステロイド剤より優れた治療効果を有して腎機能低下を阻止し得ることを示し、糸球体選択的な DDS として有用であることを報告した。

一方、糸球体腎炎の進展には尿細管上皮細胞を介した間質の病変が深く関与すると考えられており、尿細管間質病変の進展抑制も慢性糸球体疾患における腎不全阻止に

となる可能性があると考えられる。一方、オステオポンチンは単球/マクロファージに対する遊走及び接着性を有するタンパク質であり、腎疾患においては間質の線維化に伴って尿細管上皮細胞に発現することが知られている。オステオポンチンは遊離型となって単球遊走活性を示すだけでなく、細胞膜に留まって接着因子としても作用することから、標的分子となる可能性がある。そこで本研究で我々は細胞性フィブロネクチン及びオステオポンチンに特異的な抗体を用いて、糖尿病性腎症、半月体性糸球体腎炎及び微小変化型ネフローゼの動物モデルを用いて、これらのタンパク質の発現時期及び発現部位を免疫組織学的に調べた。

B. 研究方法

動物モデルとして以下の3種類のラットの腎症モデルを用いた。

半月体性糸球体腎炎：Wistar Kyoto 系ラット（雄5週齢）にウサギ抗ラット糸球体基底膜抗血清（50 μ L/100 g 体重）を尾静脈投与して作製した。このモデルでは、腎炎惹起後7日目までに尿蛋白の上昇が見られ、組織学的には単球やリンパ球の糸球体への浸潤も顕著であり、多くの糸球体に細胞性半月体が形成される。腎機能も次第に低下してくる。すなわち炎症が激しく、進行の速い腎炎の動物モデルである。

糖尿病性腎症：2型糖尿病を自然発症する Zucker Diabetic Fatty ラットを用いた。本モデルでは5-6週令から血糖値が上昇し、10週令には400-500 mg/dL に達する。その頃には尿中アルブミン値も上昇し、糖尿病性腎症を発症する。その後、数ヶ月にわたって尿蛋白が増加し、慢性の経過をとるが腎機能の低下までには至らない。炎症細

有効な手段となることが示唆されている。従って尿細管上皮細胞を標的とした DDS は腎疾患治療に有用と考えられるが、同細胞への選択的 DDS は未だ開発されておらず、適切な標的分子も同定されていない。我々は以前に、尿細管上皮細胞への選択的 DDS の標的分子の候補としてフラクタルカイン（FKN）が有望であることを示した。本研究では、3種の腎症動物モデルを用いて、尿細管間質病変における新たな標的分子の同定を試みた。

フィブロネクチンは血漿に多く含まれる細胞接着性タンパク質であるが、これと一部構造が異なる細胞性フィブロネクチンは組織の線維化において種々の細胞が産生することが知られている。産生された細胞性フィブロネクチンは産生細胞周囲の細胞外基質に沈着することから、DDS の標的分子

胞の浸潤は軽微であり、上記のモデルに比べて進展が遅い腎症タイプの動物モデルと言える。

微小変化型ネフローゼ：Wistar 系ラット（雄6週齢）の尾静脈より 150 mg/kg 体重のピューロマイシンアミノヌクレオシドを投与して作製した。本モデルでは5日目頃から蛋白尿が出現し、7日目頃からネフローゼを呈するようになる。腎機能の低下は見られず、数週間後に尿蛋白は正常に戻る。組織学的に間質への白血球浸潤が顕著であるが、光顕レベルでは糸球体にほとんど変化が見られない（従って微小変化型）タイプのネフローゼモデルである。

C. 研究結果

細胞性フィブロネクチンは正常ラットの腎皮質にはほとんど検出されなかった。半月体性腎炎モデルにおいては発症初期の7日目にはほとんどの糸球体のメサンギウム領域やボーマン嚢上皮に検出され、尿細管上皮細胞の周囲にも沈着が見られた。14日目になるとメサンギウム領域にはほとんど見られなくなり、代わってボーマン嚢上皮や尿細管周囲の沈着がより強くなった。その後、間質の線維化が進むに連れ、これらの沈着も強くなった。糖尿病性腎症でも尿中アルブミンが増加し始めた時期に糸球体メサンギウム領域にわずかに細胞性フィブロネクチンの沈着が見られたが尿細管上皮の周囲にはほとんど認められなかった。尿蛋白が上昇するに連れて一部のボーマン嚢上皮及び尿細管上皮の周囲が陽性になり、病態の進行とともに強くなったが、半月体性腎炎モデルと比べるとその強度は遙かに弱かった。微小変化型ネフローゼモデルでは糸球体の病変がほとんど見られないと言われていたが、蛋白尿が顕著になる7日目にはボーマン嚢上皮で細胞性フィブロネクチンの強い染色があり、特に皮質の深い部分にある糸球体ではその沈着が顕著であった。メサンギウム領域にも弱い染色が見られ、またボーマン嚢上皮の染色の強い糸球体近傍の尿細管上皮の周囲にも強い反応が見られた。単球/マクロファージの糸球体や間質への浸潤は軽微であり、また皮質の浅い部分と深い部分にも差は見られなかったことから、炎症の程度と細胞性フィブロネクチンの沈着とは相関しないと考えられた。

オステオポンチンについては正常ラット

のボーマン嚢上皮及び尿細管上皮の一部に弱い反応が認められた。半月体性腎炎モデルでは、尿細管上皮における発現が非常に強くなり、ほとんどの尿細管で陽性所見が見られた。また一部のボーマン嚢上皮にもオステオポンチンの染色像が観察された。微小変化型ネフローゼモデルで蛋白尿が顕著になる7日目に、皮質の全層にわたるほとんどの尿細管上皮にオステオポンチンの強い染色が見られ、その分布は細胞性フィブロネクチンのよりも広がった。しかし尿蛋白が依然として高値を示す14日目になると一部の尿細管上皮のオステオポンチン発現は減弱し、個体によっては大半の尿細管上皮で陰性になった。

D. 考察

進行性の経過をたどる糸球体疾患は一般に、その糸球体障害の原因は異なるものの、腎機能低下への至る尿細管間質病変の機序は共通しており、蛋白尿や毛細血管の血流障害などによって尿細管間質に炎症性変化が起きて次第にそれが線維化へと進むと考えられている。本研究の結果から、細胞性フィブロネクチンとオステオポンチンの尿細管上皮やボーマン嚢上皮における発現は、半月体性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、微小変化型ネフローゼにおいて様々なパターンを示し、両者を組み合わせることで様々な時期の尿細管間質病変抑制の治療のためのDDSに用いられると考えられた。

E. 結論

様々なタイプの進行性の腎炎において尿細管上皮細胞やボーマン嚢上皮に発現する細胞性フィブロネクチンとオステオポンチンは、DDSの効果的な標的分子となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

投稿準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質 室長

研究協力者 星野昭芳 国立国際医療センター研究所 流動研究員

山本健二 国立国際医療センター・治療センター センター長

研究要旨 量子ドット(QD)を用いて、好中球および腎系球体内皮細胞への Myeloperoxidase 抗体(MPO-ANCA)の作用を検討した。QD は、FMLP、TNF- α 、IL-1 β および IL-8 の刺激によって好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出し、好中球活性化を判定する指標としての有益性を示した。また、QD 標識 MPO 抗体は、内皮細胞に特異的に結合し、内皮細胞の ICAM-1 の発現が上昇した。血中のサイトカイン・ケモカインの上昇も認められた。これらの結果から、MPO-ANCA は、サイトカインと連動して局所で活性化好中球の表面に出る MPO と反応し、好中球をさらに活性化して活性酸素などの放出をするとともに、内皮細胞にも直接結合して内皮細胞に作用して ICAM-1 の発現を上昇させ、内皮細胞障害を引き起こし、血管炎の誘発を惹起すると考えられる。

A. 研究目的

これまで、われわれは活性化した好中球が関与する myeloperoxidase 自己抗体 (MPO-ANCA) 動態の解析と血管炎の DDS の治療法開発に不可欠であった量子ドット (Qdot) 標識抗 MPO 抗体の作製に成功し報告してきた。

活性化した好中球は、血管炎の発症の要因となっていることが報告されており (Arimura, Y., et al. *Clinical Nephrology* 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. *Arthritis Rheumatism* 44:921-930, 2001)、特に、急速進行性糸球体腎炎の発症には、活性化好中球とともに好中球自己抗体 (MPO-ANCA) が関与している。MPO-ANCA 抗体は、好中球の活性化や血管内皮細胞の活性化および傷害性に関与しているためと考えられている。しかし、

MPO-ANCA がどのように好中球を活性化し内皮細胞の傷害を誘導しているかは不明である。

一方、血管炎の発症には、血液力学的因子も関与していることから、*in vivo* のイメージング技術も含めた総合的な検討が欠かせない。われわれが提唱した *in vivo imaging* は、バイオイメージングによる生体内の動態を解析することに利用され、常套手段として行われるようになってきている。本法は、種々の生体機能に欠かせない方法として急速に定着しつつある。この *in vivo imaging* には、ナノプローブの利用が必須である。

そこで、これまで、QDot を用いた血管

炎の発症要因の解析と DDS 治療への応用について検討してきた。具体的には、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、MPO 抗体を投与して血管炎発症過程をしらべ、糸球体から単離したプライマリー培養の糸球体血管内皮細胞に QD で標識した MPO 抗体を(QD-antiMPO)を加え、*in vitro* での QD-antiMPO の糸球体血管内皮細胞への結合と作用について解析したてきた。

本年度は、QDot を用いた血管炎の発症要因の解析と DDS 治療への応用についてさらに生体動態も含めて検討した。

本結果より、組織に侵入した活性化好中球を標的とするイメージングによる抗体の動態の解析が可能となり、MPO 抗体の病因的側面を解析し、糸球体血管内皮細胞への作用も明らかにすることができた。

B. 研究方法

1) QD-antiMPO の作製

QD-antiMPO は、QD で蛍光標識した抗 MPO 抗体を作製した。抗 MPO 抗体の QD 標識は、セレン化カドミウム QD の表面にチオプロピオン酸を配位させ、システインで被覆した。次いで、QD 表面に抗 MPO 抗体をアミノ酸カップリングにより結合させた(A. Hoshino, *et al.* Nanolett. 4:2163-2169, 2004)。

2) MPO 抗体の内皮細胞への結合

内皮細胞障害は、MPO-ANCA の結合により誘導されると想定されることから、MPO 抗体の血管内皮細胞への結合を可視化した。

3) QD-antiMPO の生体内動態解析

CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction, 100 µg/ml) および anti-rmMPO 抗体を C57BL/6 に iv 投与した。5 日後に、再度 CAWS と QD-antiMPO を iv 投与し、腎、肺、脾、肝の各組織標本の QDots の蛍光により MPO 抗体の動態を解析した。

4) antiMPO 抗体投与による血中サイトカインの動態解析

18 種サイトカインの同時定量した。マウスから採血して得られた 50 µL の血漿を用い、Bio-Plex (BioRad 社)により、個々の血漿中の 18 種サイトカインを同時に定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

QD 標識の MPO 抗体を作製し、好中球および腎糸球体内皮細胞への MPO 抗体の作用を検討した。MPO は、ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子で、急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) 症候群の病態と相関関

係を示し、RPGN などの血管炎のマーカとなっている。MPO-ANCA による好中球の活性化と内皮細胞の傷害の誘導への関与を調べた。

すでに、好中球表面あるいは顆粒内部に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出するために、MPO に対する抗体を作成し、蛍光ナノ粒子 QD で標識した。粒子表面への抗体の結合を電子顕微鏡で、また抗体機能については蛍光抗体を用いた Western Blotting でそれぞれ確認し、報告した (Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Kazuhiro Tokunaka, Shiro Naoe, Hiroshi Hashimoto, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki. Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice. Microbiol. Immunol. in press)。

さらに、好中球を好中球の走化因子の FMLP ペプチドで刺激することで、MPO の細胞外へ表出が観察された。また、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β および IL-8 の刺激によっても同様に MPO の表出が確認された (図1)。

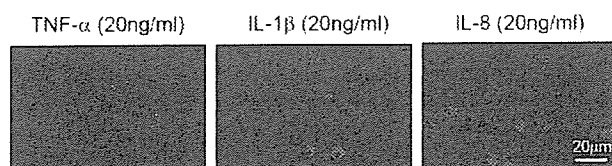


図1. TNF- α 、IL-1 β および IL-8 刺激による好中球細胞膜への MPO 表出。

活性化好中球が細菌感染や炎症性サイトカインの産生に伴って、細胞質顆粒の MPO 分子を細胞表面へと表出することが判明した。したがって、活性化好中球の細胞表面に出た MPO と MPO 抗体が結合して糸球体の機能に影響を与えることは十分考えられた。そこで、実際 MPO 抗体投与による糸球体の機能の影響について QD 標識 MPO 抗体を投与して、尿タンパクを検出した。図2に見られるように、QD 標識 MPO 抗体12時間後に、尿タンパクの一過的上昇が見られた。

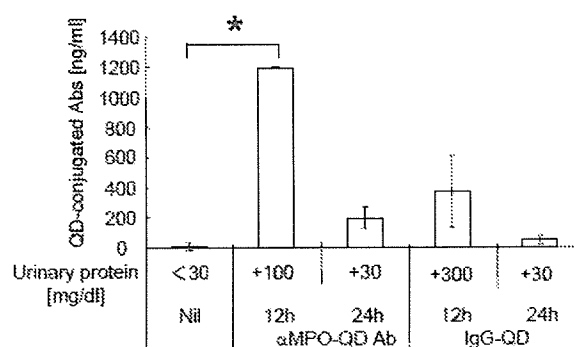
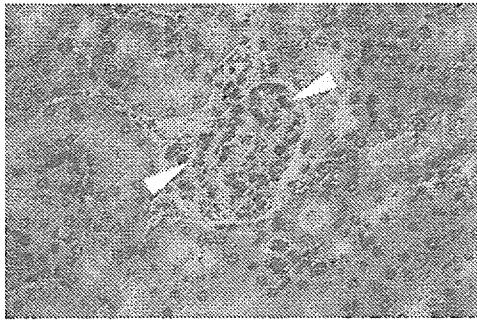


図2. antiMPO-QD 抗体投与による尿タンパクの排泄。

糸球体の機能の変化が確認できたので、
ついで、糸球体への好中球の浸潤度合いを
検討した。好中球の浸潤は、MPO 抗体と
CAWS の投与で有意に増加した(図3)。

A



B

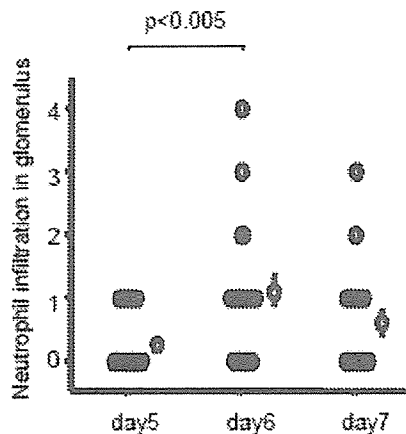


図3. antiMPO-QD 抗体および CAWS 投与
による糸球体への好中球の浸潤。

A: HE 像、B: 糸球体1個あたりに浸潤した好
中球数

一方、MPO 抗体と CAWS 投与によって糸
球体に好中球が浸潤することから、炎症性
サイトカイン・ケモカインの変動が予想された。
そこで、MPO 抗体と CAWS 投与後の血中サ
イトカインの変動を解析した。IL-1 β , TNF- α ,
IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, G-CSF, KC,

RANTES が上昇していた(図4)。

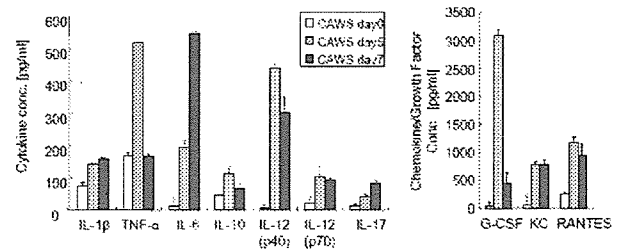


図4. antiMPO 抗体および CAWS 投与によ
る各種サイトカインの変動。

また、これまでに引き続き、ANCA 誘導型
血管炎の発症初期の機構について、血管
内皮細胞への anti-MPO 抗体の「直接」作用
を検討した。マウスの腎臓から糸球体を採取
し、選択的に糸球体血管内皮細胞を培養し、
MPO-ANCA と活性化好中球による糸球体
内皮障害を検討した。QD 標識 MPO 抗体は、
内皮細胞に特異的に結合した。また、MPO
抗体を内皮細胞に直接作用・刺激させること
により、内皮細胞の ICAM-1 の発現が上昇
した。以上の結果から、MPO-ANCA は、局
所で活性化に関与していることが示唆され
た。

D. 考察

QD 用いて、好中球および腎糸球体内皮
細胞への MPO-ANCA の作用を検討した。
FMLP、TNF- α 、IL-1 β および IL-8 の刺激に
よって好中球表面に存在する MPO を高感
度かつ迅速に検出し、好中球活性化を判定

する指標としての有益性が示された。MPO は、ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子で、RPGN 症候群の病態と相関関係を示し、RPGN などの血管炎のマーカとなっている。MPO-ANCA による好中球の活性化と内皮細胞の傷害の誘導への関与を調べることにより、治療法などの検討に役立つ。サイトカイン刺激によっても同様に MPO の表出が確認されたことは、活性化好中球が細菌感染や炎症性サイトカインの産生に伴って、細胞質顆粒の MPO 分子を細胞表面へと表出することが判明した。したがって、活性化好中球の細胞表面に出た MPO と MPO 抗体が結合して糸球体の機能に影響を与えることは十分考えられた。

一方、MPO 抗体投与が糸球体の機能の影響することについて、QD 標識 MPO 抗体を投与して、尿タンパクを検出した。QD 標識 MPO 抗体投与12時間後には、尿タンパクの一過的上昇が見られ、糸球体の機能の変化が確認された。さらに、糸球体への好中球の浸潤度合いを検討した。好中球の浸潤は、MPO 抗体と CAWS の投与で有意に増加した。これらの事象と MPO 抗体と CAWS 投与による糸球体への好中球浸潤には、炎症性サイトカイン・ケモカインの変動が関わっていることが判明し、これらサイトカイン・ケモカインが、ICAM-1 の発現上昇を伴う内皮細胞の障害にかかわり、かつ、好中球浸潤および好中球活性化に深く関与していることが示唆された。

以上、本研究で開発した QD 抗体を使うことにより MPO など関連分子や細胞の生体で

の機能を明らかにでき、血管炎の発症機構と治療法の開発に有用であることが示された。

E. 結論

QD 用いて、好中球および腎糸球体内皮細胞への MPO-ANCA の作用を検討した。FMLP、TNF- α 、IL-1 β および IL-8 の刺激によって好中球表面に存在する MPO を高感度かつ迅速に検出し、好中球活性化を判定する指標としての有益性を示した。これら、炎症性サイトカイン刺激によって MPO の表出が確認されたことは、活性化好中球が細菌感染や炎症性サイトカインの産生に伴って、細胞質顆粒の MPO 分子を細胞表面へと表出することが判明した。このことから、活性化好中球の細胞表面に出た MPO と MPO 抗体が結合して糸球体の機能に影響を与えることが十分考えられる。その根拠として、QD 標識 MPO 抗体を投与することで、尿タンパクを検出された。さらに、糸球体への好中球の浸潤は、MPO 抗体と CAWS の投与で有意に増加した。これらの事象と MPO 抗体と CAWS 投与による糸球体への好中球浸潤には、炎症性サイトカイン・ケモカインの変動が関わっていることが強く示唆され、これらサイトカイン・ケモカインが、ICAM-1 の発現が上昇を伴う内皮細胞の障害にかかわり、かつ、好中球浸潤および好中球活性化に深く関与していると推定される。このように、QD 抗体は、生体での機能を明らかにする上で重要でありかつ有用なものであると思われる。

る。

本研究は、大川原明子、松村実美子、野津朋子、太刀川仁、小林美登利（国立感染研・生物活性物質）、長尾朋和（国立感染研・生物活性物質、現コーネル大・医[ニューヨーク]）、三浦典子、大野尚仁（以上東京薬大・薬）、南谷晴之（慶應大・院理工）の先生方の協力によった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagai-Miura, Naohito Ohno, Kazuhiro Tokunaka, Shiro Naoe, Hiroshi Hashimoto, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, **Kazuo Suzuki**. Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice. *Microbiol.Immunol.* in press
2. Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagai-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, **Kazuo Suzuki**. Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS). *Exp. Mol. Pathol.* in press.
3. Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and **Kazuo Suzuki**. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol. Dialysis Transplant.* 22: 77-87, 2007.
4. Shinohara Hiroyasu Nagai-Miura Noriko Ishibashi Ken-ichi, Adachi Yoshiyuki Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, **Kazuo Suzuki**, and Naohito Ohno. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1854-1861, 2006.
5. Shouichi Fujimoto, Shigehiro Uezono, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shigeto Kobayashi, **Kazuo Suzuki**, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nakao, Hiroyuki Nunoi. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. *Clinical Journal of American Society of Nephrology.* 1: 1016-1022, 2006.
6. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Akiko Ishida-Okawara, **Kazuo Suzuki**, Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus*

- neoformans. *J. Med. Microbiol.* 55: 1291-1299, 2006.
7. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, **K. Suzuki**. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* 13: 67-71, 2006.
 8. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, **K. Suzuki** and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal Pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis* 186: 310-320, 2006.
 9. Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K. Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and **K. Suzuki**. Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J. Immunol.*, 176:3662-3673, 2006.
 10. W. Yumura, M. Itabashi, A. Ishida-Okawara, K. Tomizawa, J. Yamashita, Y. Kaneshiro, H. Nihei, and **K. Suzuki**. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* 50: 149-157, 2006.
2. 学会発表
国際会議
 1. Nozu T, Matsumura M, Nagao T, Kobayashi M, Okawara A, Hasegawa A, Nakayama T, Nagai A, Suzuki K Function of the primary pulmonary endothelial cells associated with activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
 2. Kobayashi M, Matumura M, Nagano T, Hoshino A, Okawara A, Aratani Y, Minamitani H, Suzuki K
 3. Glomerular endothelial cell activation in vasculitis Induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
 4. Tachikawa H, Okawara O, Suzuki K. Contribution of the systemic, splenic, and renal Th2 responses to the developing glomerulonephritis in NCA-associated crescent-forming glomerulonephritis mice. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
 5. Tomizawa K, Suzuki R, Tanokura M, Suzuki K. Analysis of MPO-ANCA Binding Site of MPO Molecule Surface Regions. June 18-23, 2006
 6. Hoshino A, Nagao T, Tokunaka K, Okawara A, Ihara T, Uno K, Muso E, Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K Myeloperoxidase (MPO) on Activation Neutrophils and anti-MPO Antibody involve the Initiation of Glomerulonephritis and

Vasculitis induced by *Candida albicans*
Glycoprotein. 20th Int. Cong. Biochem. and
Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

7. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Okawara A, Suzuki K, Maeda N, and Koyama H. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

国内会議

1. 永井厚志、近藤光子、野津朋子、鈴木和男
間質性肺炎における ANCA 陽性例の
Prevalence と病態 第 103 回日本内科学会
総会・年次講演会(横浜)4月14-16日
2. 太刀川仁、Mahmoud Ramadan、小玉 誠、
大川原明子、三間 渉、伊藤正洋、柏村 健、
広野 暁、鈴木和男、相澤義房 冠動脈疾
患患者における MPO-ANCA の挙動 第 103
回日本内科学会総会・年次講演会(横浜)4
月14-16日
3. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、
大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプト
コッカス感染防御におけるミエロペルオキシ
ダーゼの関与 第 27 回関東医真菌懇話会
(東京)5月27日
4. 鈴木和男 活性化好中球と MPO-ANCA
による糸球体内皮細胞傷害 第49回日本腎
臓学会学術総会 シンポジウム「ANCA関
連血管炎の病理と臨床」(東京)6月14-16
日、
5. 小林美登里、松村実実子、長尾朋和、荒谷
康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、
南谷晴之、鈴木和男 血管炎発症に関わる

MPO-ANCA は直接糸球体内皮細胞へ作用
する 第 17 回日本生体防御学会学術集会
(札幌)7月27-29日

6. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、
高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀
機 クリプトコッカス感染防御における
MPO-H₂O₂-Cl⁻系の関与 第 12 回MPO研
究会(大阪)9月22-23日
7. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、Keiko
Ozato、鈴木和男、大野尚仁 CAWS 血管炎
における IRF-8 の役割 第 12 回MPO研究
会(大阪)9月22-23日
8. 大川原明子、三浦 典子、大原関利章、高橋
啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男 CAWS
培養条件の違いによる好中球活性化への影
響 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23
日
9. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、
大川原明子、鈴木和男、大野尚仁 各種マ
ウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関わ
る遺伝的素因の解析 第 12 回MPO研究会
(大阪)9月22-23日
10. 駒井元彦、高野雄介、三浦典子、安達禎之、
鈴木和男、大野尚仁 CBA/J, CBA/N マウ
スにおける CAWS 血管炎の検討 第 12 回M
PO研究会(大阪)9月22-23日
11. Suzuki K, Nauseef W ミエロペルオキシダー
ゼ(MPO)の生体防御における役割 第 12 回
MPO研究会(大阪)9月22-23日
12. 高橋啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、
大野尚仁、村山研、野津朋子、松村実実子、
大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康
昭 CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成
免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制作用 第

- 12回MPO研究会(大阪)9月22-23日
13. 星野昭芳、猪原登志子、宇野賀津子、武曾恵理、山本健二、鈴木和男 抗MPO抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける活性化好中球からのサイトカイン産生 第12回MPO研究会(大阪)9月22-23日
14. 富澤一夫、大川原明子、雑賀寛、田之倉優、鈴木和男 急性進行性糸球体腎炎モデルSCG/KjマウスのMPO-ANCA病因エピソードは治療により減少する 第12回MPO研究会(大阪)9月22-23日
15. 星野昭芳、山本健二、鈴木和男 抗MPO自己抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける抗体の挙動を蛍光ナノ粒子標識 QD 抗MPO抗体でイメージングする 第15回バイオイメージング学会(盛岡)10月31-11月2日
16. Ishida-Okawara A., Nagi-Miura N., Oharaseki T., Takahashi K., Okada H., Ohno N., and Suzuki K. Neutrophil Activation by CAWS in Different Cultured Condition] (CAWS調整時の異なった菌の培養条件による好中球活性化の相違) 第36回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月11-13日
17. Hoshino, A., Okawara, A., Yamamoto, K., and Suzuki K. 星野昭芳、大川原明子、山本健二、鈴木和男 Activated neutrophils produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA in Candida albicans-derived mannoprotein-induced murine systemic (カンジダ由来マンノプロテイン誘導のマウス全身性血管炎における MPO-ANCA によって活性化された好中球が IL-17 と IL-23 を産生)
- 第36回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月11-13日
18. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男 CAWS 血管炎の発症と重篤かに関わる遺伝的素因の各種マウス系統を用いた解析 第36回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月11-13日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告

量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

分担研究者 山本 悟 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・医長

協力研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長

協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生

協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生

研究要旨

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾したものを透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能なようにするものであり、これによって安全で簡易な硝子体手術も可能となる。これらにより硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することを目指す。

A. 研究目的

近年、多くの眼疾患が硝子体の病理学的及び／又は生理学的変化と関連していることが知られてきている。たとえば、加齢による硝子体の液化融解 (liquefaction) は網膜剥離や網膜裂傷 (retinal tear) を誘導し、また黄斑浮腫 (macular edema) は黄斑 (macula) への硝子体牽引 (traction) に関連し、それぞれを原因として重症例、進行例では失明をもたらす。

そのため、硝子体内の混濁状態や病変の有無を観察することは重要である。しかし、硝子体は透明なゲル上物質から構成されるため、硝子体内の観察は困難であり、日常的な臨床的状況で透明な硝子体を観察するための適切な方法はない。

更に、硝子体の手術においても透明なゲルを対象とするため視認性の高い組織の手術に較べると難しく、また、手術によるリスクも高い。

以上のことから日常的な診断及び／又は手術において、眼の硝子体を簡便に安全に観察し得る手段及び方法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

ナノ粒子を摘出豚眼内に27Gの注射針にて注入し、日常外来で使用する細隙灯顕微鏡で観察する。

他の染色材料も同様に注入して比較検討を行なう。

また、硝子体手術を豚眼にてシュミレーションし、注入したナノ粒子で染色された豚眼と、その他の染料にて染色された豚眼における手術の簡易性・安全性を比較検討する。

C. 研究結果

他の染料に比べ、ナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得る。

また、硝子体手術においても、ナノ粒子で染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高かった。

D. 考察

1. 達成度について

豚眼による実験にて良好な結果を得ているが健康危険対策に更なる改良を試みてゆく方針である。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

1) 学術的意義

硝子体が可視化されることによって眼科学の進歩が期待される。

2) 国際的意義

国際学会にて他国の学者より関心が向けられている。

3) 社会的意義

日々の臨床における診察治療から手術治療に及ぶまで適応範囲は広く、社会的意義は高いと思われる。

3) 今後の展望について

上記達成度にも記してあるが健康危険対策を充実させ、より早く臨床分野への普及を促進させたいと考えている。

E. 結論

ナノ粒子は日常臨床における硝子体観察には有用な染料となり得る。

また、硝子体手術においては、ナノ粒子利用によって、より簡易で安全性の高い手術とすることが可能である。

F. 健康危険情報

本研究で使用している QD に関して更に安全性の高いものを目指して研究中である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 欧文

Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kouki Fujioka, Akiyoshi Hoshino, and Kenji Yamamoto IEEE Transactions on Nanobioscience. Vol. 6, No. 1 March 2007 (in Press)

2. 著書

なし

3. 学会発表

1) 国際学会

- 1) S. Yamamoto, N. Manabe, A. Hoshino, K. Yamamoto, Application of colloidal quantum dots to visualization of transparent vitreous of the eye at clinical situation, Bios 2006 (Photonics West) (January, 2006, San Jose, California, U.S.A.).

(国際シンポジウム)

- 1) Satoru Yamamoto, An application of quantum dots in ophthalmology, International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications and Their Safety (November 2005 Kobe, Hyogo, Japan)

2) 国内学会

- 1) 「量子ドットの一つの医療応用」
山本悟1)、星野昭義2)、真鍋法義2)、
山本健二2)
1) 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院、2) 国立国際医療センター
ナノ学会第4回大会
京都大学百周年時計台記念館
平成18年5月19日
- 2) 「水溶性量子ドットを用いた硝子体病変の視覚化」
真鍋法義、山本悟、藤岡宏樹、
星野昭芳、山本健二
(国立国際医療センター研、
横浜栄共済病院、東京医歯大院)
第15回日本バイオイメーキング
学会学術集会
岩手医科大学60周年記念館