

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591105

研究課題名(和文)活性化マクロファージを標的とした不安定プラークの分子イメージングと治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the molecular imaging and the therapy of the unstable plaque targeting activated macrophages

研究代表者

宮田 昌明(MIYATA, MASAOKI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00347113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：葉酸レセプター (FR) は活性化マクロファージ(M) のマーカーとして注目されている。我々は、FR を発現する活性化M が動脈硬化モデルマウスの動脈硬化病変部位に存在することを発見し、抗FRモノクローナル抗体に緑膿菌毒素を結合させたりコンビナントイムノトキシンを動脈硬化モデルマウスに投与し、活性化M のみを選択的に死滅させ、動脈硬化を抑制することを示した。また、抗FRモノクローナル抗体を用いサンドイッチELISAにてヒト血清可溶性FR濃度の測定系を確立し、正常コントロールと比較し大動脈瘤患者では血清FR濃度の高い症例を認め、動脈硬化の新しい診断方法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The folic acid receptor beta (FR-beta) attracts attention as a marker of activated macrophages. We found that the activated macrophage which expressed FR-beta was present in the arteriosclerosis lesion of the arteriosclerosis model mouse. We administrated the recombinant immunotoxin which coupled Pseudomonas aeruginosa toxin to anti-FR-beta monoclonal antibody into the arteriosclerosis model mice, selectively killed the activated macrophages, and demonstrated that it reduced arteriosclerotic lesion. In addition, we established a sandwich ELISA assay using anti-FR-beta monoclonal antibody and measured the soluble FR-beta concentration of human serum. The patients with aortic aneurysms showed a higher serum FR-beta level compared with the normal control. The measurement of the soluble FR-beta concentration is suggested to be useful for the diagnosis of atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科

キーワード：動脈硬化 葉酸レセプター マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化形成において、血中の単球が血管壁に侵入しマクロファージとなり、このマクロファージは活性化され、スキャベンジャー受容体を介して酸化 LDL を取り込み、泡沫化する。また、この活性化マクロファージは TNF- α などの多くのサイトカインを分泌するため動脈硬化プラーク病変形成を促進し、さらにプラークを不安定化させプラークの破綻にも関与している。

一方、分担研究者である免疫学講座の松山隆美教授は、健常者と関節リウマチ患者の関節滑膜組織内マクロファージから抽出した遺伝子ライブラリーのサブトラクションにより、葉酸レセプター (FR) 遺伝子がリウマチ患者の滑膜マクロファージに特異的に発現することを見出した (Arthritis Rheum. 1999;42:1609-16)。さらに、FR 発現は単球や生理的組織マクロファージには見られず、TNF- α や活性酸素を産生する活性化マクロファージのみに発現していることが示され (Blood. 2009;113:438-46)、活性化マクロファージの新しいマーカーとして注目されている。さらに、松山教授らは、抗 FR モノクローナルに緑膿菌毒素を結合させた FR イムノトキシンが、SCID マウスに移植した関節リウマチ滑膜の活動を減少させること (Arthritis Rheum. 2006;54:3126-34)、脳腫瘍モデルマウスの腫瘍を縮小させること (Cancer Immunol Immunother. 2009;58:1577-86)、肺線維症モデルマウスの病変を抑制させること (Clin Exp Immunol. 2010;161:348-56) をそれぞれ報告した。

動脈硬化病変に FR を発現する活性化マクロファージが存在するかは不明であり、もし、存在が確認できれば FR を発現する活性化マクロファージを標的とした新たな動脈硬化の診断や治療に繋げることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、葉酸レセプター (FR) を発現する活性化マクロファージを標的とした不安定プラークの新規診断法と治療法を開発することである。そのために、以下の3点を検討する。

- (1) FR イムノトキシンを用い FR を発現する活性化マクロファージを標的とし、動脈硬化モデルマウスの動脈硬化病変を縮小あるいは安定化できるか検討する。
- (2) 抗 FR モノクローナル抗体にマイクロバブルを結合させた造影剤により、活性化マクロファージが存在する不安定プラークを認識する超音波による分子イメージングを開発する。
- (3) 血中の可溶性 FR 濃度を測定する ELISA 法を確立し、動脈硬化症の診断や重症度評価に有用であるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗 FR 抗体を用いた動脈硬化の新規治療法の前臨床研究

実験動物

実験動物として、アポリポタンパク質 E 欠損マウス (ApoE KO マウス) を使用した。実験には、15 週齢または 35 週齢のオス ApoE KO マウスを用い、これらのマウスに正常食を投与した。

抗 FR 抗体の作成

BALB/c マウスの肝臓より FR cDNA を準備した。このマウス FR 遺伝子を感染させたラット RBL2H3 で Wistar-Kyoto ラットを免疫した。リンパ節から得たリンパ球を、NS-1 ミエロマ細胞と融合させ、作成されたハイブリドーマをフローサイトメトリーとウエスタンブロットでスクリーニングし、FR 感染 RBL2H3 細胞を得た。

抗 FR リコンビナントイムノトキシンの作成

IgV_H-PE38 と IgV_L 遺伝子をエンコードしたプラスミドをそれぞれバクテリアに感染させた後、結合させた。dsF_V 抗 FR -PE38 を、アニオン交換クロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。イムノトキシンの 50% 阻害濃度は、B300-19 細胞で 10 ng/ml、BALB/c または C57BL/6J マウス腹腔内滲出マクロファージで 100 ng/ml であった。組み換えイムノトキシンに含まれるエンドトキシンは 5 units (EU)/mg であった。

イムノトキシン投与プロトコール

ApoE KO マウスにおける組み換えリコンビナントイムノトキシンの効果を検討するために、15 週または 35 週の通常食を与えたオス ApoE KO マウスを 3 グループに分け、それぞれイムノトキシン、トキシン、コントロールグループとした。(15 週齢: n=8/グループ、35 週齢: n=5/グループ)。イムノトキシンググループには生理食塩水 100 μ l に溶解した 0.1 mg/kg のイムノトキシン (dsFV anti-FR -PE38) を、トキシンググループには生理食塩水 100 μ l に溶解した 0.1 mg/kg のトキシン (PE38) を、コントロールグループには 100 μ l の生理食塩水を 3 日おきに 5 回投与した。大動脈基部における動脈硬化病変を 1 週間後および 4 週間後に評価した。

組織学的評価

ペントバルビタールを用いて ApoE KO マウスを安楽死させ、左心室から血液サンプルを得た。Coulter カウンターを用いて白血球数、白血球分類を、カイノスエンザイムキットを用いて血清コレステロール値を測定した。マウスの心臓と大動脈を採取し、液体窒素で凍結保存した。心臓を OCT コンパウンドで包埋し、大動脈基部から 5 μ m で連続的に横断薄

切し、50 μm おきに組織切片をオイルレッド染色し、大動脈径における動脈硬化病変の割合を計測した。また、抗 FR 抗体、抗 CD68 抗体、抗 TNF- α 抗体、抗平滑筋 アクチン抗体、抗増殖細胞核抗原抗体(PCNA)、抗 CD-31 抗体、抗 CD3 抗体を用い動脈硬化病変組織を評価した。

アポトーシス細胞の計測

イムノトキシン、トキシンまたは生理食塩水の投与 1 週間後、5 μm の薄切片組織をアセトン固定し、DeadEndTM Fluorometric TUNEL System を用いて染色し、陽性細胞数を計測した。TUNEL 陽性細胞は、BC-8000 蛍光顕微鏡を用いて検出し、全細胞数におけるアポトーシス細胞数の割合を表示した。

抗 FR イムノトキシンにおける *in vitro* 効果

12 週齢のオス ApoE KO マウス 3 匹に、3% thioglycollate を腹腔投与し、4 日後に腹腔マクロファージを回収した。回収した細胞を 10% ウシ血清を含む Iscove's modified Dulbecco medium に懸濁した。非接着細胞を除去した後、腹腔マクロファージを dsFV-FR イムノトキシンまたはトキシンとともに 72 時間及び 96 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 下で培養した。培養後、細胞を 0.1% Triton X-100 で処理した後、propidium iodide で染色し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて計測した。

定量的リアルタイム PCR

TaqMan プローブ法を用い定量的リアルタイム PCR により FR と TNF- α の mRNA を測定した。RiboPure Kit で、上行大動脈から RNA を抽出し、high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を作成した。ABI PRISM 7300 を用いて RT-PCR を行い、GAPDH に対する FR と TNF- α mRNA の相対定量を行った。

統計解析

データは mean \pm SE で表し、グループ間の検定には Kruskal-Wallis test、Holm's pairwise comparison を使用した。腹腔マクロファージを用いた *in vitro* 実験には、paired t test を使用した。P<0.05 を有意差ありとした。

(2)抗 FR モノクローナル抗体を用いた超音波分子イメージングの開発

istearoylphosphatidylethanolamine-PEG (2000)biotin と distearoylphosphatidylcholine と polyoxyethylene-40-stearate とを超音波処理してビオチン化されたマイクロバブル (MB) を作成した。3 \times 10⁸ の MB と streptavidin (90 μg) を 30 分間インキュベーションし結合させた。その中の 1 \times 10⁸ を取り出し、EZ-Link (Pierce 社) を用い、ビオ

チン化した抗マウス IgG1 抗体と抗 FR モノクローナル抗体を 30 分間結合させて、FR を認識する MB を作成した。この FR を認識する MB を ApoE KO マウスの尾静脈から注射して、小動物用超音波高解像度イメージングシステムを用いて画像解析した。

コントロールとしては、抗 FR モノクローナル抗体の代わりに非特異的の一次抗体を結合させたものを用い、画像を比較する。また、画像解析後にマウスの大動脈を取り出し、oil red O 染色し動脈硬化病変を染色し、超音波画像と対比させた。

(3)可溶性FR 測定系の確立と動脈硬化性疾患患者での測定

ヒト FR 発現 B300-19 (マウス B 細胞株) をラットに免疫した腹腔内リンパ節を用い、細胞融合法にて抗葉酸 FR 抗体を得た。この抗体を用い、サンドイッチ ELISA 測定法を確立し、血清の FR 濃度を大動脈瘤患者と正常コントロールで測定した。

4. 研究成果

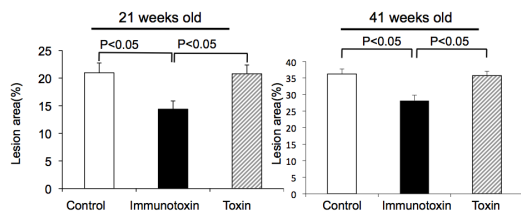
(1)抗 FR 抗体を用いた動脈硬化の新規治療法の前臨床研究

動脈硬化病変における FR の発現

はじめに、21 週齢 ApoE KO マウスにおける FR 発現細胞の存在とその分布を検討した。連続切片を用いて、オイルレッド染色と抗 FR 抗体染色を行い、泡沫細胞と FR 発現細胞の分布を比較した。泡沫細胞のうち、FR 陽性細胞の割合は 91.2 \pm 2.4% であった。ほとんどの FR 発現細胞は、内臓側に認められた。抗 FR 抗体と抗 CD68 抗体による二重染色では、FR と CD68 の共局在が認められた。FR は、抗平滑筋 アクチン抗体、CD31 抗体、CD3 抗体との共局在は認められなかった。21 週齢において、FR を発現しているマクロファージは 57.2 \pm 2.9%、35 週齢においては 69.7% \pm 3.0% であった。

FR イムノトキシン投与による動脈硬化集縮小効果

15 週齢及び 35 週齢の ApoE KO マウスを用い、FR イムノトキシン投与による動脈硬化集縮小効果を検討した。15 週齢および 35 週齢マウスを 3 グループに分け、それぞれイムノトキシン、トキシン、生理食塩水を 3 日毎に計 5 回投与した。投与終了 4 週間後に動脈硬化病変を評価した。各年齢群において、イムノトキシン群は 31%、22% の動脈硬化集縮小効果 を 認 め た 。 (21 weeks: control=20.9 \pm 1.7%, immunotoxin=14.4 \pm 1.4%, toxin=20.8 \pm 1.5%, P=0.03, n=8; 41 weeks: control=36.2 \pm 1.5%, immunotoxin=28.1 \pm 5.6%, toxin=35.7 \pm 1.3%, P=0.02, n=5)。一方、トキシン投与による動脈硬化集縮小効果は認められなかった。各群で体重、血清コレステロール値、白血球分画に有意差は認めなかった。



FR イムノトキシン投与後の組織学的変化

FR イムノトキシン投与により、各年齢群において CD68、FR、TNF- α 発現細胞数は有意に減少した。抗平滑筋 α アクチン抗体も減少したが、統計学的に有意差は認められなかった。CD3 発現細胞は減少しなかった。さらに、FR イムノトキシン投与 1 週間後に PCNA 及び TUNEL 染色を行い、FR イムノトキシンが細胞増殖及びアポトーシスに及ぼす影響を検討し、その結果、イムノトキシン群におけるアポトーシス細胞の割合は、コントロール群と比較し有意に上昇していた。

抗 FR イムノトキシンにおける *in vitro* 効果

滲出性腹膜マクロファージを、抗 FR 抗体、抗 F4/80 抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いてマクロファージにおける FR 発現細胞の割合を検討した。滲出性腹膜マクロファージにおける FR 発現細胞の割合は、 $95.4 \pm 1.3\%$ であった。

また、FR イムノトキシンがアポトーシスに及ぼす影響を検討するため、滲出性腹膜マクロファージを FR イムノトキシンまたはトキシンとともに培養し、プロピジウムイオジン染色を行った。FR イムノトキシン 1000 ng/ml におけるアポトーシス細胞の割合は、培養 72 時間後で $67.4 \pm 6.3\%$ 、96 時間後で $77.4 \pm 3.3\%$ であった。

定量的リアルタイム PCR による FR 及び TNF- α mRNA の測定

FR イムノトキシン投与後、定量的リアルタイム PCR を用いて FR 及び TNF- α mRNA の測定を行った。各年齢群において FR mRNA はトキシン群やコントロール群と比較し有意に減少していた。(21 weeks: control= 3.8 ± 0.2 , immunotoxin= 1.8 ± 0.2 , toxin= 3.2 ± 0.5 arbitrary units, $P=0.001$, $n=8$; 41 weeks: control= 2.5 ± 0.3 , immunotoxin= 1.0 ± 0.1 , toxin= 2.1 ± 0.3 arbitrary units, $P=0.02$, $n=5$)。また、TNF- α mRNA もトキシン群やコントロール群と比較し有意に減少した。(21 weeks: control= 4.5 ± 0.5 , immunotoxin= 2.2 ± 0.4 , toxin= 4.1 ± 0.6 arbitrary units, $P=0.01$, $n=8$; 41 weeks: control= 2.9 ± 0.2 , immunotoxin= 1.2 ± 0.1 , toxin= 2.6 ± 0.6 arbitrary units, $P=0.005$, arbitrary units, $n=5$)。

以上の結果から FR イムノトキシンにより、活性化したマクロファージのみを選択的にターゲットとすることで、炎症に関わっているマクロファージのみを死滅させ、動脈硬化を抑制することが示唆された。本研究において、FR イムノトキシンが動脈硬化巣を抑制することが示されたが、トキシンによる非特異的な肝毒性や免疫原性の問題もあり、臨床応用に向けて今後さらなる検証が必要である。

(2) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた超音波分子イメージングの開発

抗 FR モノクローナル抗体を用い FR を認識するマイクロバブルを作成し、動脈硬化モデルである ApoE KO マウスに投与し、小動物用超音波高解像度イメージングシステムを用いて画像解析したが、安定的な動脈硬化病変描出は困難であった。抗体と結合したマイクロバブルは分子量が大きく、動脈硬化病巣内部に存在する FR 発現マクロファージを認識するために組織内に浸潤することが出来ない可能性が示唆された。

(3) 可溶性 FR 測定系の確立と動脈硬化性疾患患者での測定

ヒト FR 発現 B300-19 (マウス B 細胞株) をラットに免疫した腹腔内リンパ節を用い、細胞融合法にて抗 FR 抗体を作成し、サンドイッチ ELISA 測定法を用い、ヒト血清の可溶性 FR を測定する方法を開発した。

血清 FR 濃度を大動脈瘤患者と動脈硬化の既往の無い正常コントロールで測定し、その結果、正常コントロールと比較し、大動脈瘤患者では FR 濃度の高い症例を認めた。

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 1 件)

1. Furusho Y, Miyata M, Matsuyama T, Nagai T, Li H, Akasaki Y, Hamada N, Miyauchi T, Ikeda Y, Shirasawa T, Ide K, Tei C: Novel therapy for atherosclerosis using recombinant immunotoxin against folate receptor β -expressing macrophages. *J Am Heart Assoc*, 1: e003079, 2012, 査読あり DOI: 10.1161/JAHA.112.003079.

〔学会発表〕(計 4 件)

宮田昌明: 高血圧と動脈硬化: その接点を探り、治療する. 第 60 回日本心臓病学会学術集会, 金沢, 2012 年 9 月

Miyata M, Furusho Y, Tei C: Topic 10 「動脈硬化治療の最前線」 Novel therapy for atherosclerosis targeting folate receptor β -expressing

activated macrophages. 第 76 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 2012 年 3 月

Furusho Y, Miyata M, Akasaki Y, Hamada N, Miyauchi T, Ikeda Y, Hamasaki S, Tei C : New therapy for atherosclerosis targeting FR -expressing macrophages. European Society of Cardiology Congress 2011, Paris, 2011 年 8 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤、及び動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬

発明者: 宮田昌明、古庄優子、鄭 忠和、永井 拓、松山隆美

権利者: 宮田昌明、古庄優子、鄭 忠和、永井 拓、松山隆美、鹿児島大学

種類: 特許出願

番号: 2011-153862

出願年月日: 2011 年 7 月 12 日

国内外の別: 国内

名称: 動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤、及び動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬

発明者: 宮田昌明、古庄優子、鄭 忠和、永井 拓、松山隆美

権利者: 宮田昌明、古庄優子、鄭 忠和、永井 拓、松山隆美、鹿児島大学

種類: 特許公開

番号: W02012/063955

出願年月日: 2011 年 11 月 8 日

国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

(1) 鹿児島大学産学官連携推進センター、研究シーズ集

活性化マクロファージを標的とした動脈硬化の新規診断・治療法の開発 【動脈硬化】

<http://www.rdc.kagoshima-u.ac.jp/rdc/search/upload/miyata-med.pdf>

(2) 鹿児島大学研究者総覧、宮田昌明

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/407594.html>

(3) 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 心臓血管・高血圧内科学ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~intmed1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 昌明 (MIYATA Masaaki)

鹿児島大学 医歯学総合研究科 准教授

研究者番号: 00347113

(2) 研究分担者

松山 隆美 (MATSUYAMA Takami)

鹿児島大学 医歯学総合研究科 教授

研究者番号: 30145479

(3) 連携研究者

古庄 優子 (FURUSHO Yuko)

鹿児島大学 医歯学総合研究科 助教

研究者番号: 00632514