The inhibition by anti-CTGF antibody produced by the DNA immunization method in the cytokine induced skin fibrosis model mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-05-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Takehara, Kazuhiko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00050696

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ＤＮＡ免疫法による抗ＣＴＧＦ抗体のサイトカイン誘導性皮膚線維化マウスモデルの抑制

１８５９１２４０

平成１８年度～平成１９年度科学研究費補助金
（基盤研究（C））研究成果報告書

平成２０年３月

研究代表者　竹原　和彦
学大学院医学系研究科教授）

金沢大学附属図書館
1300-04693-7

【はしがき】

我々は、過去に全身性強皮症のモデルマウスとして新生マウス項部皮下に TGF-β（transforming growth factor）や CTGF（connective tissue growth factor）を注入することにより、線維化の誘導に成功した。従って、TGF-βや CTGF の阻害により繊維化の誘導に成功した。従って TGF-βや CTGF の阻害により繊維化が抑制されることが期待される。しかしながら、TGF-βは多様な生物活性を有するサイトカインであり、その阻害は重篤な副作用を誘発することが危惧される。そのため、より下流のサイトカインである CTGF を阻害することが安全かつ有効な線維化の抑制となると考えられる。

我々は、中和活性の高い抗ヒトCDGFモノクロナール抗体を樹立し、抗ヒトCTGF抗体が我々のサイトカイン注入強皮症モデルマウスの線維化を抑制するかを本研究で検討した。

【研究組織】

研究代表者：竹原和彦（金沢大学大学院医学系研究科教授）

研究分担者：藤本　学（金沢大学大学院医学系研究科准教授）

中條園子（金沢大学医学部附属病院助教）

【交付決定額（配分額）】

	直接経費	関節経費	合　計
平成 18 年度	2,200,000 円	0 円	2,200,000 円
平成 19 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
総　計	3,500,000 円	390,000 円	3,890,000 円

【研究発表】

(1) 学会誌等

Ikawa Y, POH-SING NG, Endo K, Kondo M, Chujo S, Ishida W, Shirasaki F, Fujimoto M, Takehara K: Neutralizing monoclonal antibody to human connective tissue growth factor ameliorates transforming growth factor-β-induced mouse fibrosis. J Cellular Physiol (in print)

(2) 口頭発表

Ikawa Y, Kondo M, Chujo S, Shirasaki F, Fujimoto M, Ng Poh-Sing, Takehara K : Neutralizing antibody to human connective tissue growth factor ameliorates transforming growth factor-β induced mouse fibrosis model. Professor E. Carwaile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma, 2007.5

伊川友香，松下幸世，近藤美幾，藤本晃英，長谷川稔，竹原和彦，刀祢裕美，和田泰三，谷内江昭宏 ：TGF-βで誘導されるモデルマウスの線維化が抗 CTGF 抗体で抑制された。第1回日本 CCN ファミリー研究会. 2007.10

(3) 出 版 物 なし

【研究成果による工業所有権の出願・取得状況】 なし

【研究方法】

1)抗 CTGF 抗体の精製

DNA 免疫法を用いてヒト CTGF に対する抗体の精製を試みた。マウス皮膚にヒト CTGF の全長または各 module の遺伝子を組み込んだ DNA プラスミドを導入し、約 4 週間後に各抗血清が産生されることを、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット法で確認した。

2) 線維化モデルマウスにおける抗 CTGF 抗体の効果

新生 C57BL/6 マウスの項部に TGF-β 800 ng と抗 CTGF 抗体 2 μg あるいはコントロールとしてマウス IgG を 2 μg を混合して、3 日間連続で皮下投与した。4 日目に組織を採取し、HE 染色切片で肉芽の程度を 3 人の観察者が評価、スコア化した。

3) コラーゲンタンパク量定量

ホルマリン固定したパラフィン切片を脱パラフィ

ンし、肉芽部分を削り取り、チューブに入れ、0.1 %のFast greenと0.1 % sirius red F3BAの染色液を加え反応させた。Fast greenは非コラーゲン組織、Sirius red F3BAはコラーゲン組織に吸着する。反応液に0.1 N NaOH:メタノール液を加え染み出てきた抽出液の上清の吸光度を540 nmと605 nmで測定し、肉芽組織内のコラーゲン量を計算した(3)。

4) 肉芽組織でのCOL1A2 mRNAの発現

凍結切片からRNAを抽出し、cDNAを合成した後に、real-time PCR法にてType 1 Collagen α2 chainのmRNAを定量した。

【研究結果】

1)抗 CTGF 抗体の精製

ヒト CTGF の各 module 抗体を認識する 7 つのモノクローナル抗体を精製した（module 1 に対して 2 つ、module 2 に対して 1 つ、module 3 に対して 3 つ、module 4 に対して 1 つ)。各抗体はフローサイトメトリーでそれぞれの module に特異的に結合する事が(図１)、ウエスタンブロット法で熱処理された抗体を認識しない事が示された(図２)。SPR 解析では抗 CTGF module 2 抗体の結合力が最も強く、抗 CTGF module 3 抗体の結合力が弱かった（表１)。

２）線維化モデルマウスにおける抗 CTGF 抗体の効果

HE 染色切片では、抗体投与群における肉芽形成の程度がコントロール群に比べて抑制された。中でも、抗 CTGF module 2 抗体投与群が最も肉芽形成を抑制した（図３)。

3）コラーゲンタンパク量定量

抗 CTGF module 2 抗体投与群では、コントロール群に比べてコラーゲンタンパク量が有意に抑制された(図 4)。

4) COL1A2 mRNA の発現

抗 CTGF module 2 抗体投与群では、コントロール群に比べて肉芽組織における Type 1 Collagen α2 chain mRNA の発現が有意に抑制された(図 5)。

【考　案】

近年、線維化に関連しているサイトカインを標的とした抗線維化療法が注目されているが、未だ確立された治療法はない。強皮症において、TGF-βと CTGF が線維化の中心的役割を担っていると考えられているが、前述のように TGF-βを阻害することは、その多彩な作用から個体にとって有害であると考えた。そこで我々は、下流遺伝子である CTGF をターゲットとする抗体の産生を試みた。

通常の抗体作製はペプチドや精製されたタンパク質を用いて動物に免疫して作製されるが、今回我々が用いた DNA 免疫法は目的タンパク質の遺伝子を発現ベクターの形で動物に導入して動物の体内で発現した目的タンパク質に対する抗体を回収する技術である。通常法と比較して、

1. ペプチドや精製抗原を準備する必要が無い

2. ペプチドや精製抗原で再現できない立体構造を認識する抗体を作製する事が可能

3. 中和・阻害活性のある抗体作製が可能

4. 抗複数貫通膜タンパク質や抗レセプター抗体の作製が可能

等の、通常法で作製できない抗体を作製できるという特徴がある。この方法を用いて、今回 7 つのモノクローナル抗 CTGF 抗体の精製に成功した。

CTGF は TGF-βの刺激により選択的に線維芽細胞に発現する。強皮症の皮膚では皮膚硬化の程度に一致して CTGF の mRNA が発現しており、萎縮期になるとその発現が見られなくなる(4)。また、強皮症患者血清中の CTGF 濃度が SLE、皮膚筋炎、健常人に比べて高値で、皮膚硬化の範囲や肺線維症の重症度をよく反映し、さらにこの血清 CTGF の上昇は強皮症において一般に硬化が進行するとされる発症 1ー3 年の時期

に特に観察されている(5)。

我々のこれまでの線維化モデルマウスを使用した実験でも、項部皮下に TGF-βを 3 日間投与して誘導された肉芽組織では CTGF mRNA が強く発現することが認められている (1)。これらの結果をふまえ、今回 TGF-β 投与によって誘導される内因性 CTGF を抗 CTGF 抗体が阻害するかどうかを検討し、内因性 CTGF の作用を抗 CTGF 抗体が実際に抑制することが推測された。

今後は、TGF-βを 3 日間投与後、CTGF を４日間投与し生じる持続性の線維化が抗 CTGF 抗体で抑制されるか、また、皮膚線維化モデルである tight-skin (TSK)マウスに抗 CTGF 抗体を投与して皮膚硬化が改善されるか、などを検討する予定である。

【結　論】

確立された治療法がない強皮症などの皮膚線維化疾患において今後、抗 CTGF 抗体が有効な治療法となることが期待された。

ー図表の説明ー

図１：各抗体がそれぞれの module に特異的に結合した。

図２：Westernblott 法で熱処理された抗体は認識されない。自然な状態の CTGF のみを認識する。

図３：コントロール群に比べて抗 CTGF module 2 抗体投与群で肉芽形成が抑制された。

図４：肉芽組織内のコラーゲン量は、コントロール群に比べて抗 CTGF module 2 抗体投与群で抑制された。

図５：肉芽組織内の COL1A2 mRNA 発現は、コントロール群に比べて抗 CTGF module 2 抗体投与群で抑制された。

表１：SPR 解析では、抗 CTGF module2 抗体の結合力が最も強く、抗 CTGF module 3 抗体の結合力が最も弱かった。(KD 値)

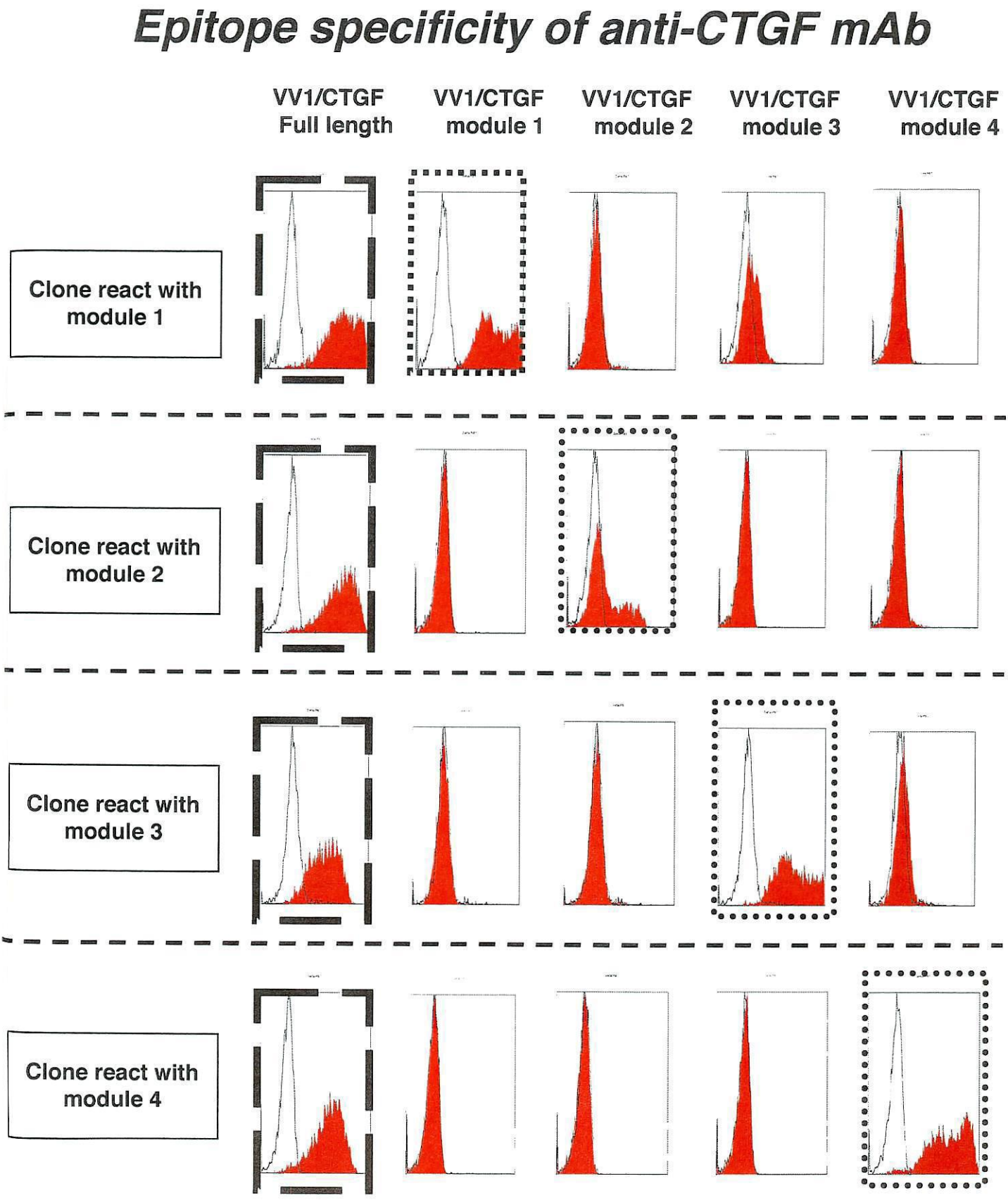


図１：フローサイトメトリーによる抗体特異性の評価

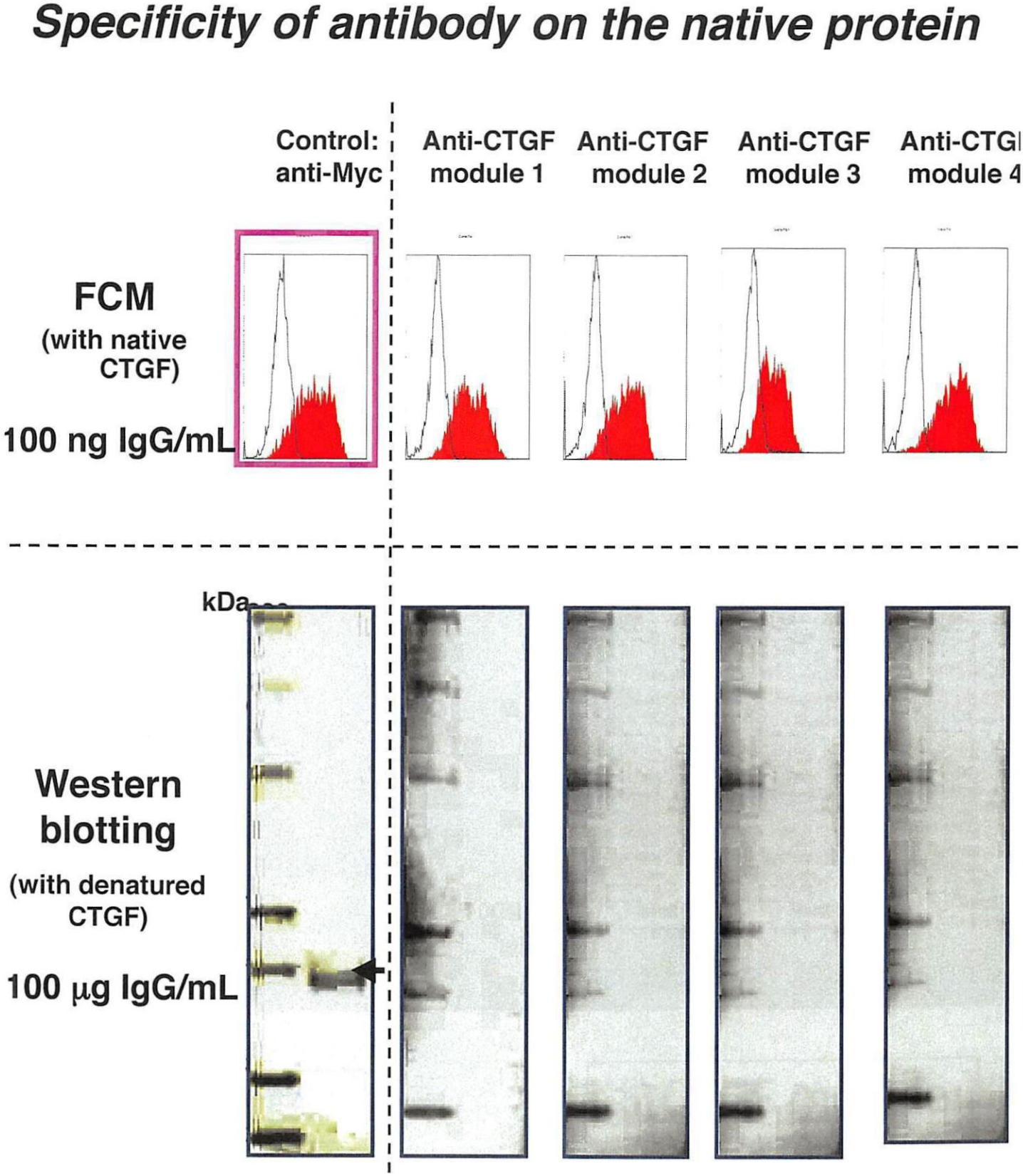
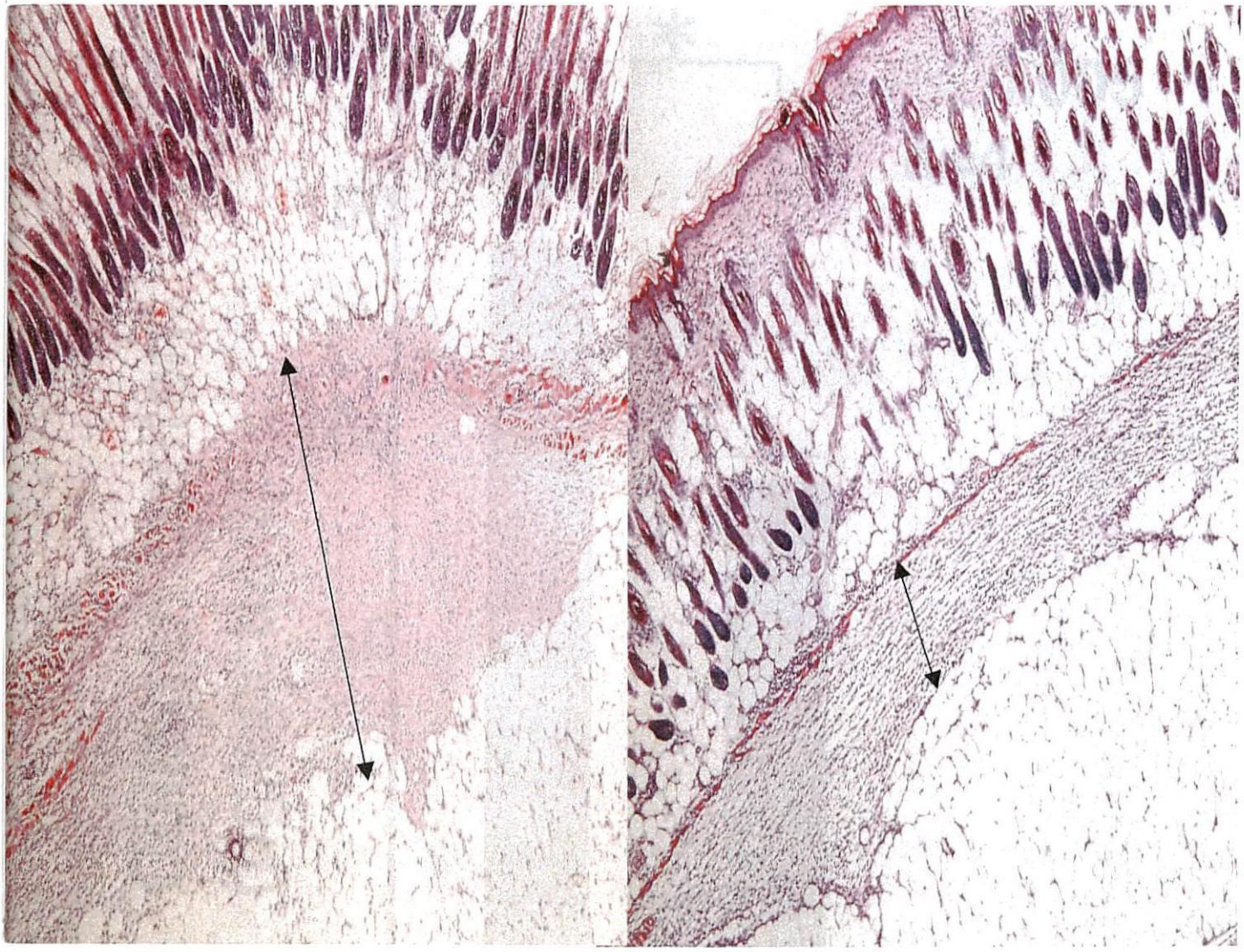


図２：Western blott法による抗体の検出

Inhibitory effects of anti-human CTGF antibody (1 mg/kg body weight)



Control群

抗CTGF module
2抗体投与群

図３：４日目の病理組織

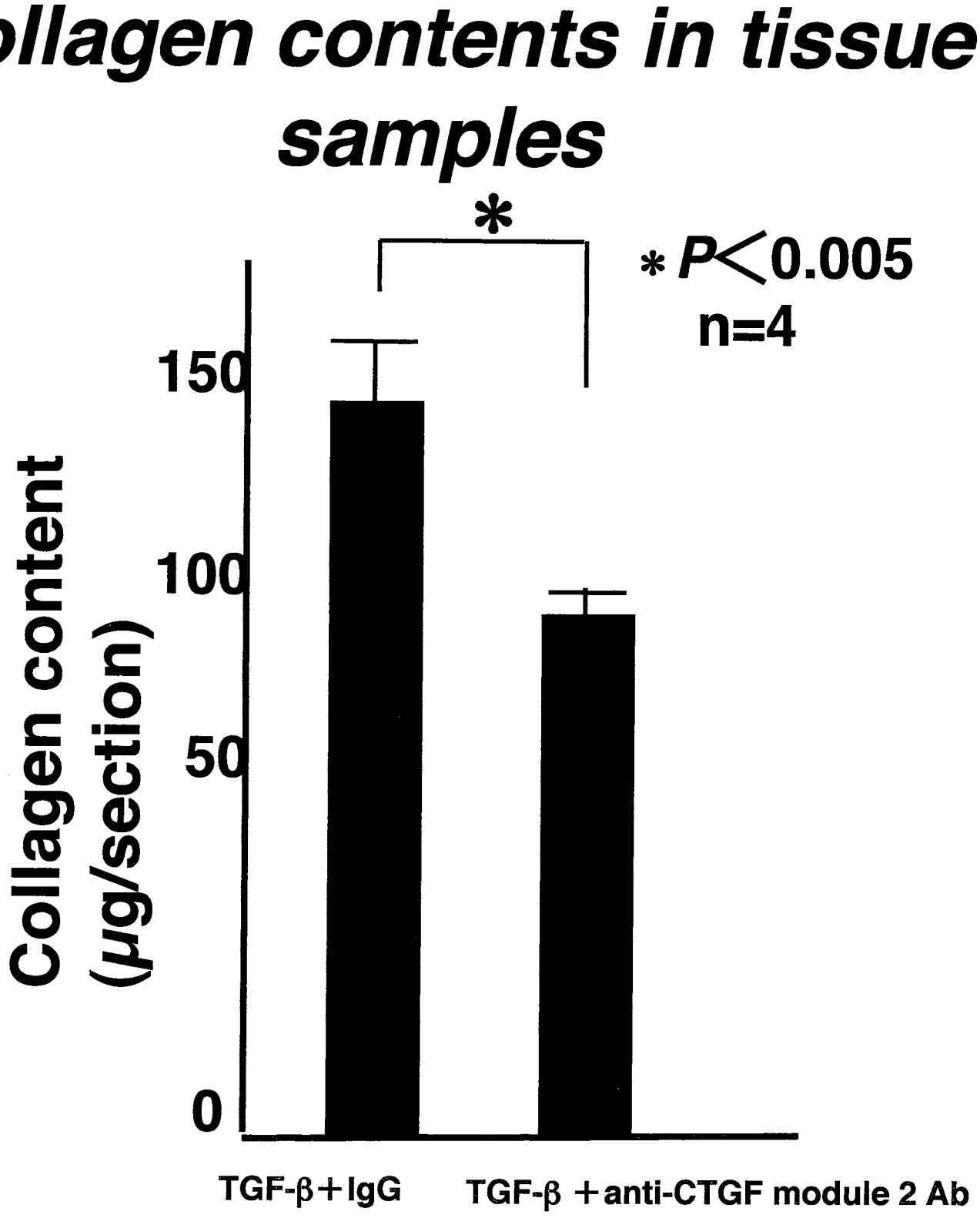


図４：肉芽組織内のコラーゲン量

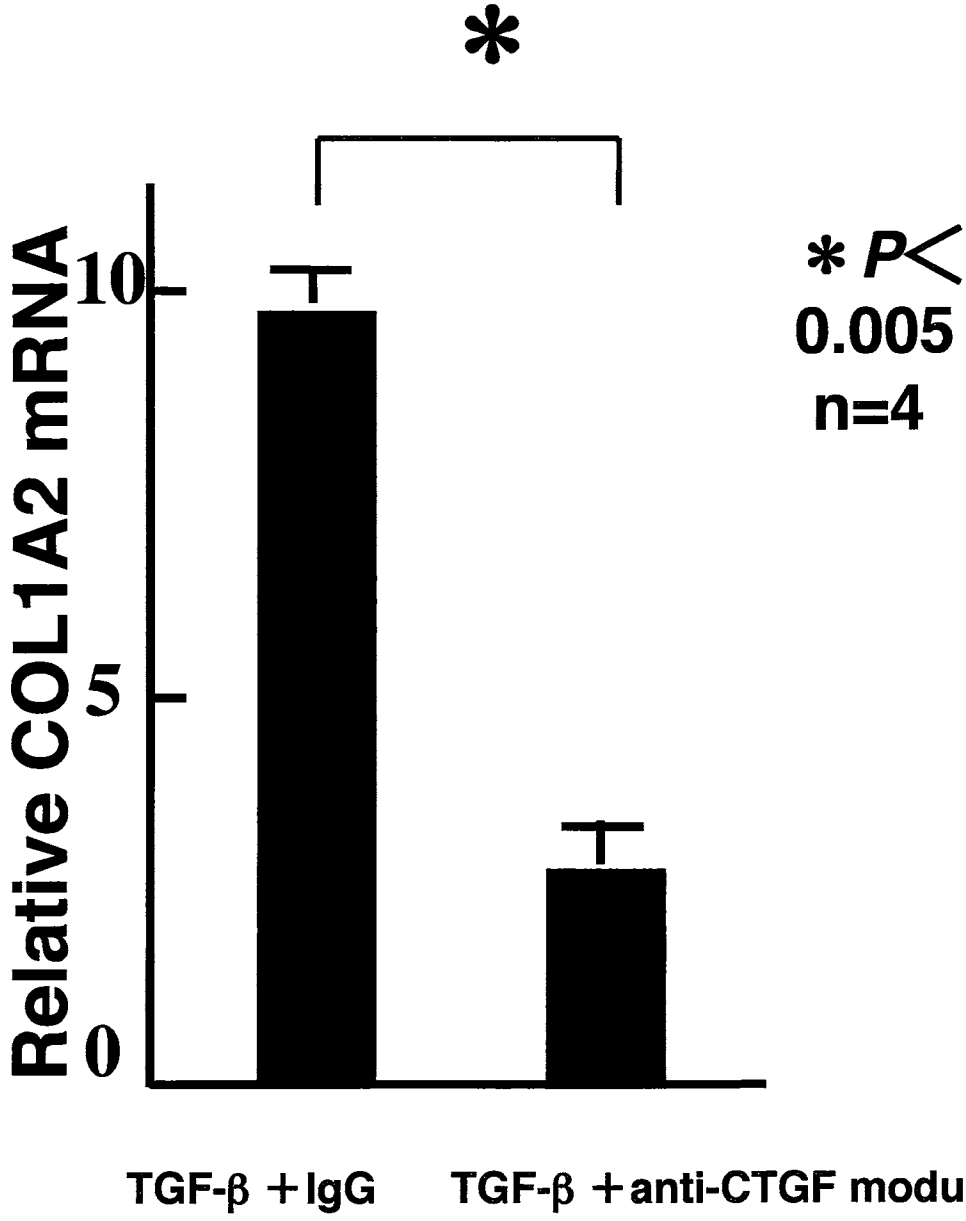


図５：肉芽組織におけるCOL1A2 mRNA発現

Surface Plasmon Resonance (SPR)分析

Epitope	Clone	K_A(1/M)	K_D(M)	Subtype
Module 1	30E9	3.22×10^{8}	3.11×10^{-9}	IgG2a
	30D2	5.33×10^{8}	1.88×10^{-9}	IgG1
Module 2	1A1	1.81×10^{8}	5.51×10^{-9}	IgG1
Module 3	21C12	*1	*2	IgG1
	21H12	*1	*2	IgG1
	22D10	*1	*2	IgG1
Module 4	8E7	3.48×10^{8}	3.11×10^{-9}	IgG1

- Sensor Chip CM5 by amine coupling
- Purified human CTGF (28nM) was injected over the surface of each monoclonal antibody, respectively.
- *1: The K_A value could only be determined within the range of 3.16 - 8.21×10^{7}
- *2: The K_D value could only be determined within the range of 1.22 - 3.16×10^{-8}

→ when applied analyte concentration was raised to 2145nM (76 times higher than other analysis)

表１：SPR分析による抗体乖離度の測定