

令和元年6月18日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01402

研究課題名(和文) アポトーシス細胞の抗炎症メカニズムに着目した新たな炎症治療用材料の開発

研究課題名(英文) Development of apoptotic cell membrane mimetic polymers for anti-inflammatory therapy

研究代表者

荏原 充宏 (Ebara, Mitsuhiro)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号：10452393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本提案課題では、アポトーシスを起こした細胞が細胞膜表面に露出するフォスファチジルセリン(PS)を介して免疫反応を抑制することに注目し、PSと類似構造を有するアポトーシス模倣新規合成ポリマーの合成およびその炎症治療への応用、特にアルツハイマー病への応用を目指して研究を行った。具体的には、PSの活性部位を有する新規モノマー(PSモノマー)および重合体(PSポリマー)の分子設計・合成、マクロファージを用いた抗炎症効果の検討と、脳免疫細胞を用いた抗アルツハイマー性評価を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の進展に伴って近年増加しているがん・動脈硬化性疾患・変性疾患・自己免疫疾患等の原因は炎症とされており、世界的には、2005年頃から炎症関連疾患の治療技術開発に向けた研究開発が盛んに行われている。現在、炎症治療に用いられている薬として、分子標的薬などの抗体医薬に期待が高まっており、アルツハイマー病の初期に、炎症に関与する抗体を投与することで症状が緩和し、認知課題において記憶が改善することが報告されている。しかし、抗体医薬は非常に高価であり、低分子薬の数倍から数十倍もする薬価がその普及を妨げている。こうした背景のもと新たな炎症治療用材料の設計の学術的・社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Apoptotic cells are known to suppress microglial inflammation in the brain by presenting phosphatidylserine. In this study, we newly designed polymeric particles that expose the anti-inflammatory site of phosphatidylserine to serve as an apoptotic cell-mimetic anti-inflammatory platform. The prepared anti-inflammatory particles showed no cytotoxicity and significantly inhibited the production of the inflammatory cytokine interleukin-6 against lipopolysaccharide stimulation in the microglia cell line MG6. This novel polymeric particle has potential for establishing a "cell-free" apoptotic cell-mimetic treatment for intracerebral inflammation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：抗炎症 アポトーシス フォスファチジルセリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

炎症は、古くから熱・痛みを伴う赤みや腫れと広く理解され、感染や組織傷害に対して生体が発動する組織修復機構とされてきた。しかし、近年、この炎症が消散せず慢性化した状態が、数々の疾患の要因となっていることが示唆されている。これらの疾患には、高齢化社会の進展に伴って近年増加しているがん・動脈硬化性疾患（心筋梗塞・脳血管障害等）・変性疾患（アルツハイマー病等）・自己免疫疾患等が含まれる。世界的には、2005年頃から炎症研究が盛んになり、ヨーロッパでは欧州委員会と欧州製薬団体連合会がそれぞれ10億ユーロを出資した Innovative Medicine Initiative (IMI) プログラムの戦略的研究課題の一つとして「炎症」を掲げているほか、米国では、NIHにより炎症関連疾患の治療技術開発に向けた研究開発課題として2008年には約800件が採択されている。現在、炎症治療に用いられている薬として、分子標的薬などの抗体医薬に期待が高まっており、最近の研究においても、アルツハイマー病の初期あるいは病気の確定後に、炎症に関与する抗体を投与することで症状が緩和し、認知課題において記憶が改善することが報告されている。しかし、抗体医薬は非常に高価であり、低分子薬の数倍から数十倍もする薬価がその普及を妨げている。こうした背景のもと、新たな炎症治療用材料の設計が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞のアポトーシスという現象に着目した新たな炎症治療用材料の設計を行う。一般的に、細胞の死亡形態は、“ネクローシス”的細胞死と、“アポトーシス”的細胞死に分類される。最近の研究から、生体の炎症反応に対して、アポトーシスを起こした細胞が、細胞膜表面に露出するフォスファチジルセリン(PS)を介して免疫反応を抑制するという報告がなされている。具体的には、PSは正常細胞では細胞膜の内側に局在するのに対し(OFF状態)、アポトーシスを起こすと細胞膜の外へと局在を変え(ON状態)、マクロファージなどによる炎症を回避する。そこで本提案課題では、PSと類似構造を有するアポトーシス模倣新規合成ポリマーの合成およびその炎症治療への応用、特にアルツハイマー病への応用を目指す。

3. 研究の方法

まず、PSの活性部位を側鎖に有する新規PS誘導体モノマーの分子設計を行う。合成方法としては、DNAの固相合成に用いられるホスホロアミダイト試薬を転用する手法を試みる。本反応を第一選択肢として採用する理由として、本反応能の中核を担うホスホロアミダイト試薬の高い反応制御性があげられる。本試薬は、中心のリン原子が3つの保護基によって保護されており、脱保護後にアミダイト試薬のリン原子が水酸基と結合し、垂リン酸エステルを形成することが知られている。すなわち、水酸基を有するモノマーを出発物質とすることで、モノマー由来の水酸基とセリン誘導体由来の水酸基の間にリン酸エステルを形成することが可能であると考えた。得られたPSポリマーを用いて抗炎症評価を行う。マウス由来マクロファージであるRAW264.7およびグリア細胞MG6を用い、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子である核内因子-kB(NF-kB)の活性を測定することで、PS含有ポリマーの抗炎症活性を評価する。

4. 研究成果

(1) BOC保護のセリンとホスホロアミダイト試薬を混和し、imidazole hydrochloride存在下で、2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA)を加えることでBOC保護PSモノマーを得た。合成したBOC保護PSモノマーをラジカル重合によって重合し、tert-butyl hydroperoxide、trifluoro acetic acidを加えることでBOC基の脱保護反応を行った。得られたPSポリマーの構造解析を¹H NMRおよびGPCを用いて行ったところ、目的のポリマーの合成が確認された。

(2) マクロファージとPSポリマーを24時間共培養した後、炎症性刺激としてlipopolysaccharide(LPS)を加え、24時間後にNF-kB活性を測定した。同様に、炎症性サイトカイン(TNF-β, IL-6, IL-1β etc.)および抗炎症性サイトカイン(IL-10, TGF-β etc.)のレベルをEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)および電気泳動により測定した。その結果、PSポリマーの添加濃度にしたがって炎症活性が大幅に低下し、抗炎症性サイトカインが優位に発現することが明らかとなった。また同様の結果は脳内グリア細胞MG6を用いた実験でも明らかとなった。さらに分子構造と抗炎症メカニズムを解明するため、フォスファチジルコリン類似モノマーとの共重合体を合成したところ、アポトーシス細胞膜の組成と最も類似した共重合体においてもっとも高い抗炎症性を示した。さらに、細胞により取り込まれやすい形状の粒子を作製した際に、その活性は最大限になった。

<引用文献>

- ① Bergら, Nat Med 18, 1812, 2012
- ② Thum Tら, J Am Coll Cardiol 46, 1799, 2005
- ③ Nielsen Jら, Nuc Acid Res 14, 7391, 1986

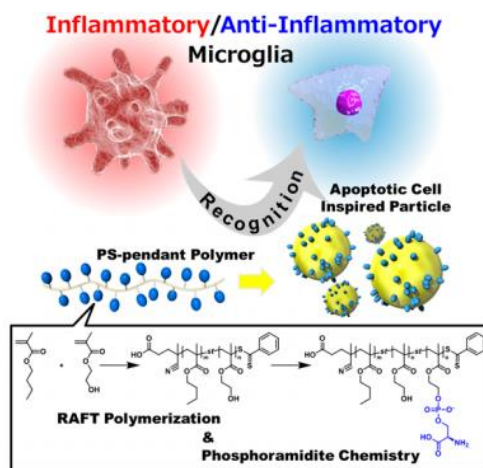


Fig.1 Design of an anti-inflammatory polymeric particles.

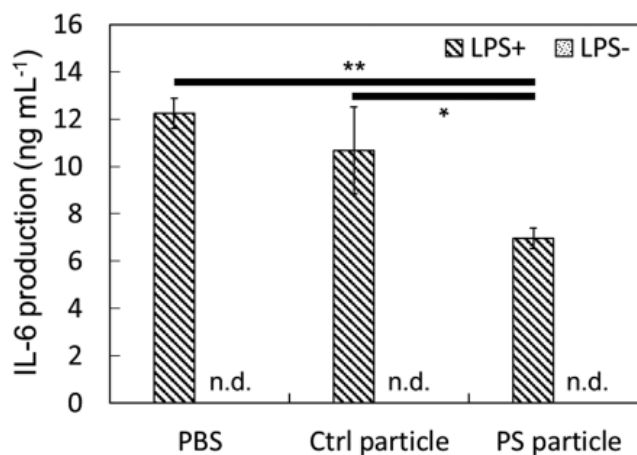


Fig.2 IL-6 production levels by MG6 cells treated with different particles.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① Yasuhiro Nakagawa, Yuto Yano, Jeonggyu Lee, Yasutaka Anraku, Makoto Nakakido, Kouhei Tsumoto, Horacio Cabral, Mitsuhiro Ebara, Apoptotic Cell-Inspired Polymeric Particles for Controlling Microglial Inflammation toward Neurodegenerative Disease Treatment, ACS Biomater. Sci. Eng., in press (2019). (査読有)
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01510>
- ② Yasuhiro Nakagawa, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, Rational Design of Anti-inflammatory Polymers Inspired by Apoptotic Cell Death using Phosphoramidite Chemistry, Polymer, 134, 85 (2018). (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.11.031>
- ③ Yasuhiro Nakagawa, Hiroaki Tateno, Mitsuhiro Ebara, Selective Recognition of Sugars Using Lectin-inspired Temperature-responsive Polymers, Chemistry Letters, 47, 134 (2018). (査読有)
10.1246/cl.170967
- ④ Yasuhiro Nakagawa, Atsuhiko Saitou, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, Apoptotic Cell Membrane-Inspired Polymer for Immunosuppression, ACS Macro Letter, 6, 1020 (2017). (査読有)
10.1021/acsmacrolett.7b00592

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Mazaya Najmina, Sharmy Mano, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Material-induced Senescence (MIS), 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2019
- ② Yasuhiro Nakagawa, Yuto Yano, Jeonggyu Lee, Mitsuhiro Ebara, Apoptotic Cell-inspired Polymers For Controlling Inflammation Toward Neurodegenerative Disease Treatment, CSIRO Symposium on Materials and Technologies for Life Science Applications, 2019
- ③ Mitsuhiro Ebara, Photo-induced pH Jump Reactions for Biomedical Systems, The 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology (招待講演), 2018
- ④ Mitsuhiro Ebara, Apoptotic Cell-inspired Polymers for Anti-inflammatory Therapy, The Polymer Society of Korea 2018 (招待講演), 2018
- ⑤ Mitsuhiro Ebara, Basics of Smart Polymers, 1st GLowing Polymer Symposium in KANTO (招待講演), 2018

〔図書〕(計 1 件)

- ① Katsuhiko Ariga, Mitsuhiro Ebara 編集, Materials Nanoarchitectonics (総ページ 336), Wiley, 2018

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：産生信号誘発ポリマーの合成方法、産生信号誘発モノマー前駆体及び産生信号誘発ポリマー前駆体

発明者：荏原充宏、青柳隆夫

権利者：国立研究開発法人物質・材料研究機構

種類：特許

番号：6465464

取得年：2019
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.nims.go.jp/bmc/group/smartbiomaterials/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：齋藤 充弘

ローマ字氏名：Saitou Atsuhiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。