

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19904

研究課題名(和文) 超分子による炎症シグナル伝達に関わるコレステロールの阻害と致死性肝炎治療への応用

研究課題名(英文) Inhibitory effects of supramolecular polyrotaxanes in inflammatory signaling and the application to the treatment of fulminant hepatitis

研究代表者

田村 篤志(Tamura, Atsushi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：80631150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、コレステロールやその生合成中間体・代謝物などが炎症応答に関与することが報告されており、ステロール類と免疫系のクロストークが注目されている。本研究では、 β -シクロデキストリン含有ポリロタキサンによるコレステロールへの作用が炎症応答に及ぼす影響を評価した。ポリロタキサンを作用させた細胞をリポ多糖で刺激すると、細胞内のコレステロール含量が低下するとともに、炎症応答が抑制されることを見出した。このようなポリロタキサンの作用は、リポ多糖を腹腔内投与した劇症肝炎モデルマウスでも確認された。以上より、ポリロタキサンによる細胞内コレステロールへの作用は、炎症に関連する疾患の治療に応用できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに β -シクロデキストリン含有ポリロタキサンによるコレステロール低下作用はニーマンピック病C型などのコレステロールの輸送障害が生じる疾患に対して有効であることが明らかとなっているが、本研究ではポリロタキサンによるコレステロールへの作用が細胞の炎症応答を抑制するという新たな知見を得た。また、急性炎症を引き起こしたマウスモデルでもポリロタキサンによる炎症応答抑制作用が確かめられた。詳細な作用機序についてはさらなる研究が必要であるが、炎症が原因となる疾患の治療に役立てることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：It is reported that cholesterol and its metabolites are involved in the inflammatory responses, and the cross-talk between sterols and immunological system has received increasing attention. In this study, the effects of β -cyclodextrin-threaded acid-degradable polyrotaxanes, which directly interact with intracellular cholesterols, on the inflammatory responses were explored. When the polyrotaxane-treated cells were stimulated with lipopolysaccharide, the inflammatory responses were remarkably inhibited accompanied by the reduction of intracellular free cholesterol content. Additionally, the polyrotaxanes suppressed the inflammatory responses in a mouse model of lipopolysaccharide-induced fulminant hepatitis. According to these results, it is expected that the polyrotaxanes would be applied for the treatment of various inflammatory diseases.

研究分野：生体材料学

キーワード：ポリロタキサン シクロデキストリン コレステロール 炎症 Toll-like receptor

1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞膜の成分として重要であるだけでなく、ホルモンやビタミンの原料としても利用されるため生命維持に必須の化合物である。近年、コレステロールやその生合成中間体、オキシステロールなどの代謝物が炎症応答に関与することが報告されており、ステロール類と免疫系のクロストークが注目されている。例えば、リポ多糖 (LPS) など Toll-like receptor (TLR) を介して炎症を惹起すると、細胞内のコレステロール排泄が抑制され、結果として細胞内や、細胞膜中のコレステロール含量が一過的に増加することが知られている。このようなコレステロールの蓄積は、慢性炎症や自己免疫疾患でも生じていることが明らかにされており、疾患との関わりが注目されている。また、TLR を介した刺激の伝達には細胞膜中のコレステロールに富んだ脂質ラフトへの局在が生じることも知られており、コレステロールは炎症応答の制御において重要な役割を担っているとと言える。そこで、細胞内、あるいは細胞膜へのコレステロールへ介入することが疾患の発症抑制や治療の標的となると考えた。

2. 研究の目的

細胞内のコレステロールを調節する薬剤として、スタチン (HMGCR 阻害剤) やエゼチミブ (NPC1L1 阻害剤) などが知られているが、これらは直接コレステロールに作用はしない。コレステロールに直接作用する化合物として β -シクロデキストリン (β -CD) が知られており、近年では Niemann-Pick 病 C 型 (NPC 病) や動脈硬化症に対する医薬としての応用が検討されている。 β -CD は親水性のオリゴ糖であるため細胞への取り込み効率が低く、細胞膜中のコレステロールと特に作用することが知られている。一方、研究代表者は細胞内のコレステロールに作用するための方法として、 β -CD の空洞部にポリマー鎖が貫通した超分子ポリロタキサン (PRX) の利用を提唱している (図 1)。PRX 上の β -CD 空洞部はポリマー鎖で占有されているため、PRX は細胞膜中のコレステロールへの作用は β -CD と比較して大幅に低い。PRX はエンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれるが、軸ポリマー中にリソソームの酸性 pH で分解する化学結合を導入することで細胞内到達後に PRX が分解し、 β -CD が細胞内でリリースされ細胞内のコレステロールへの作用が可能となる。本研究課題では、マクロファージなどの炎症を司る細胞に対して、 β -CD、及び PRX によるコレステロールへの作用が炎症応答に及ぼす影響を検討する。さらにリポ多糖 (LPS) を用いて急性肝炎を生じさせたモデルマウスに対する治療効果に関して評価を行い、急性の炎症モデルに対する効果を明らかにする。

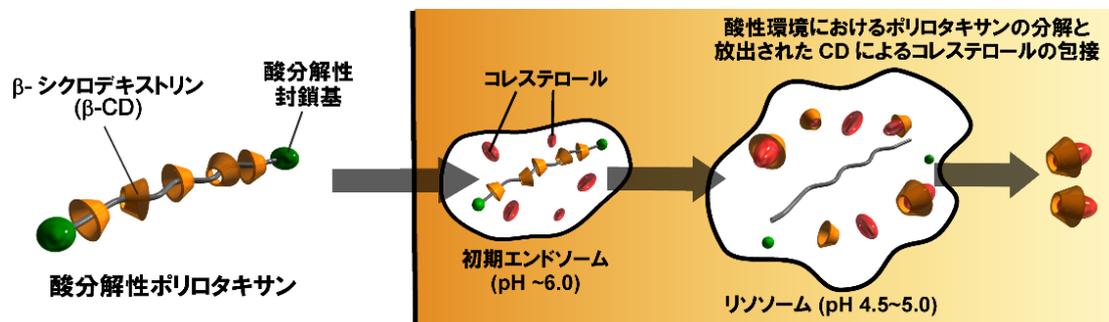


図 1. 細胞内分解性ポリロタキサンによる細胞内環境での β -CD 放出と細胞内コレステロールへの作用

3. 研究の方法

酸分解性ポリロタキサンの設計

環状分子として 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl carbamate (HEE) 基修飾 β -CD、軸ポリマーとして PEG-*b*-PPG-*b*-PEG (Pluronic P123)、酸分解性のキャッピング分子として *N*-triphenylmethyl 基からなる酸性 pH 分解性 PRX (HEE-PRX) を合成した (A. Tamura et al. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2016**, *17*, 361.). 酸分解性のキャッピングを使用することで、細胞内に取り込まれた後に、リソソームの pH 低下に応じてキャッピング分子が解離し、PRX 構造の崩壊と β -CD の細胞内特異的なリリースが可能である。また、比較対象として高水溶性の β -CD 誘導体として広く利用されている 2-hydroxypropyl β -CD (HP- β -CD) を使用した。

マクロファージ様細胞の炎症応答に対する効果

マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW 264.7 細胞に対し、HEE-PRX または HP- β -CD を β -CD 濃度が 1 mM となるように培養液に添加し、24 時間培養した。その後、LPS (10 ng/mL) を培養液に添加した。24 時間培養後、total RNA を抽出し、炎症性サイトカイン遺伝子の発現を real time RT-PCR で評価した。同様に、LPS を添加して 24 時間培養後の細胞からコレステロール類を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 測定によって遊離コレステロール量を定量した。細胞中のコレステ

ール量は、タンパク質量で規格化した。さらに、LPS を添加して 24 時間培養後の細胞中の NF- κ B p65 の局在を免疫染色で評価した。また、LPS と同様に CpG オリゴ DNA (500 ng/mL)、poly(I:C) (5 μ g/mL) を用いて同様の実験を行った。

LPS 誘導性劇症肝炎モデルに対する効果

BALB/c マウス (6 週齢、オス) に HEE-PRX、または HP- β -CD を β -CD 濃度換算で 200 mg/kg となるように腹腔内投与した。1 時間経過後、LPS (100 μ g/kg)、ならびに D-galactosamine (800 mg/kg) を腹腔内投与することで LPS 誘導性肝炎を生じさせた。LPS 投与後の生存率を評価するとともに、LPS 投与 6 時間後の血液、肝臓を回収して、血液中の肝逸脱酵素 (AST、ALT) 量、肝臓中の炎症性サイトカイン遺伝子の発現を real time RT-PCR で評価した。

4. 研究成果

マクロファージに対するポリロタキサンの炎症応答抑制作用

RAW264.7 細胞に対して LPS を作用させることで、細胞中の遊離コレステロール含量が 1.2~1.5 倍程度増加した。一方、あらかじめ HEE-PRX を作用させることで LPS によるコレステロールの増加は抑制された。同濃度で HP- β -CD をさせた場合にはコレステロールの増加は抑制されなかったことより、HEE-PRX は HP- β -CD よりも効果的にコレステロールの増加を抑制することが明らかになった。コレステロールの細胞外排泄を司るトランスポーターの阻害剤を添加することで、HEE-PRX によるコレステロール排泄は抑制されたことより、HEE-PRX はトランスポーターを介したコレステロールの排泄を促進していると考えられる。

LPS で刺激した RAW264.7 細胞に対し、HEE-PRX の影響を評価した。その結果、あらかじめ HEE-PRX を作用させることで LPS によって誘導される炎症性サイトカイン遺伝子 (IL-1 β 、IL-6 等) の発現が顕著に抑制された (図 2)。コレステロール排泄トランスポーター阻害剤を添加すると、HEE-PRX による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制が減弱したことより、細胞内のコレステロール量が炎症性サイトカインの発現に関与していると考えられる。

LPS による炎症過程には TLR4 (CD14) による認識を起点に、転写因子 NF- κ B の活性化が生じる。HEE-PRX を作用させたことによる NF- κ B の活性化状態の変化を明らかにするために、NF- κ B p65 の局在を免疫染色によって評価した。LPS を作用させた細胞では NF- κ B p65 が細胞核に集積していたが、HEE-PRX を作用させることで NF- κ B p65 の核移行は抑制されていた。このような作用は HP- β -CD では確認することができなかったことより、細胞内のコレステロールへの作用が LPS による炎症刺激が抑制されていると予想される。

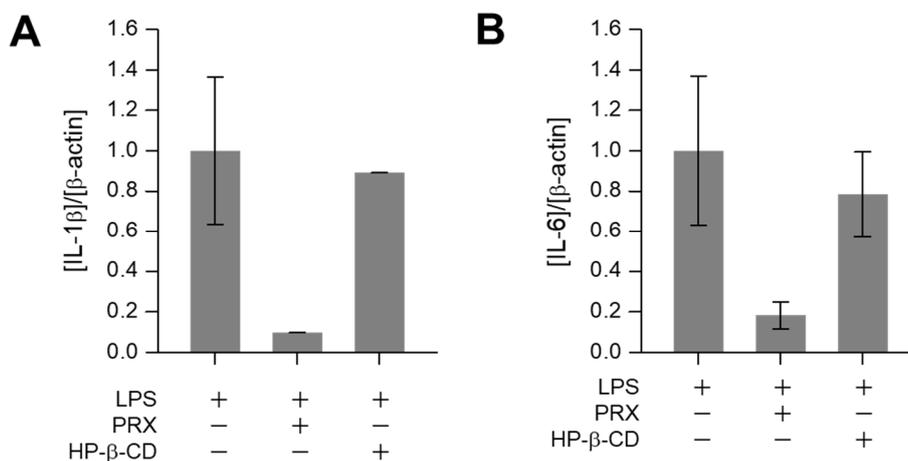


図 2. LPS で刺激したマクロファージ様細胞 (RAW264.7) に対する PRX の作用. PRX (1 mM) と HP- β -CD (1 mM) を 24 時間作用させた RAW264.7 細胞の IL-1 β (A)、IL-6 (B) 遺伝子発現量の比較 (n = 3).

また、他の TLR を介した炎症刺激に対する効果を検証するため、TLR9 によって認識される CpG オリゴ DNA、TLR3 によって認識される poly(I:C) を用いて同様の検討を行った。その結果、CpG オリゴ DNA による刺激に対しては LPS と同様に、あらかじめ HEE-PRX を作用させることで炎症性サイトカイン遺伝子の発現が抑制された。しかしながら、poly(I:C) による刺激に於いては、HEE-PRX や HP- β -CD をあらかじめ作用させても炎症性サイトカイン遺伝子の発現量に変化は認められなかった。これらの結果は、HEE-PRX による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制は LPS 以外の刺激に対しても有効であるものの、すべての TLR を介した刺激に対して作用するわけではないことを示唆している。

ポリロタキサンによる *in vivo* での炎症応答抑制作用

HEE-PRX による炎症刺激の抑制作用を治療応用するためには *in vivo* においても同様の作用をする必要がある。そこで LPS を腹腔内投与した肝炎モデルマウスを用いて HEE-PRX の作用を検討した。LPS を 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与した BALB/c マウスは 12 時間以内にすべてのマウスが死亡した。しかし、あらかじめ HEE-PRX を投与したマウスに LPS を投与した結果、48 時間後においても 9 割以上のマウスが生存していた (図 3)。また、LPS 投与 6 時間後において、血液中の AST、ALT 量が HEE-PRX の投与によって大幅に低下していたことより、LPS、D-galactosamine による肝障害が抑制されたと考えられる。また、LPS 投与 6 時間後の肝臓中の炎症性サイトカイン遺伝子発現量を評価した結果、HEE-PRX の投与により炎症性サイトカイン遺伝子発現量も大幅に低下することが明らかになった。以上の結果より、培養細胞で見られた HEE-PRX による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制作用は *in vivo* においても有効だと考えられる。

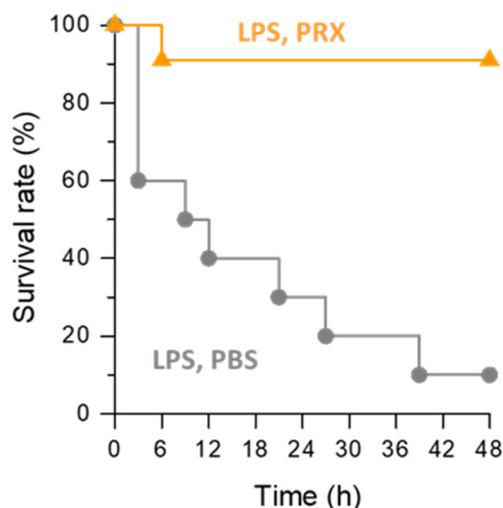


図 3. LPS 誘導性劇症肝炎マウスモデルに対する HEE-PRX の生存期間延長効果 (n = 10).

当初、HEE-PRX は水溶性を高めるための官能基を修飾しているため、とくに *in vivo* でマクロファージに対して取り込みが低いと考えていた。しかしながら、本結果は HEE-PRX が肝臓中のマクロファージ (クッパー細胞) へと取り込まれたため、炎症応答を抑制したと考えられる。RAW264.7 細胞に対して、HEE-PRX よりも取り込みが顕著に高いカルボキシ基修飾 PRX でも同世の実験を行ったが、HEE-PRX の方が *in vivo* での効果が高かった。両者の体内動態を比較した結果、HEE-PRX の方が血中滞留性、組織集積性が高いことが明らかになった。このため、*in vitro* では細胞取り込み量の少ない HEE-PRX でも *in vivo* では有効に作用するのだと予想される。

以上の結果より、HEE-PRX によるコレステロールの排泄促進作用が炎症性サイトカインの発現抑制につながることを示唆された。コレステロールの排泄と炎症応答の抑制を結びつける分子メカニズムについては今後も継続した評価が必要であるものの、HEE-PRX の炎症応答抑制作用は *in vivo* でも有効であり、炎症が関連する様々な疾患治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名 Tonegawa Asato, Tamura Atsushi, Yui Nobuhiko | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Acetylation of Cyclodextrin Threaded Polyrotaxanes Yields Temperature Responsive Phase Transition and Coacervate Formation Properties | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Macromolecular Rapid Communications | 6. 最初と最後の頁 2000322 ~ 2000322 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/marc.202000322 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tonegawa Asato, Tamura Atsushi, Zhang Shun Yao, Yui Nobuhiko | 4. 巻 200 |
| 2. 論文標題 Hydrophobicity of acyl groups in β -cyclodextrin-threaded polyrotaxanes dominates the formation and stability of self-assembled nanoparticles | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Polymer | 6. 最初と最後の頁 122537 ~ 122537 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polymer.2020.122537 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nishida Kei, Tamura Atsushi, Kang Tae Woong, Masuda Hiroki, Yui Nobuhiko | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 An antibody/supermolecule conjugate for tumor-specific targeting of tumoricidal methylated β -cyclodextrin-threaded polyrotaxanes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B | 6. 最初と最後の頁 6975 ~ 6987 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0TB00575D | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tonegawa Asato, Tamura Atsushi, Yui Nobuhiko | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Emerging Nanoassembly of Polyrotaxanes Comprising Acetylated β -Cyclodextrins and High-Molecular-Weight Axle Polymer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ACS Macro Letters | 6. 最初と最後の頁 826 ~ 834 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmacrolett.9b00280 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamada Yuma, Daikuhara Shinnosuke, Tamura Atsushi, Nishida Kei, Yui Nobuhiko, Harashima Hideyoshi | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 Enhanced autophagy induction via the mitochondrial delivery of methylated β -cyclodextrin-threaded polyrotaxanes using a MITO-Porter | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Communications | 6. 最初と最後の頁 7203 ~ 7206 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc03272j | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tamura Atsushi | 4. 巻 139 |
| 2. 論文標題 Intracellularly Degradable Polyrotaxanes for Therapeutic Applications | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI | 6. 最初と最後の頁 143 ~ 155 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00168-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tamura Atsushi | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Design of supramolecular polymers for modulating intracellular lipids and their therapeutic applications | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Drug Delivery System | 6. 最初と最後の頁 62 ~ 63 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dd.34.62 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Shibaguchi Kai, Tamura Atsushi, Terauchi Masahiko, Matsumura Mitsuaki, Miura Hiroyuki, Yui Nobuhiko | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Mannosylated Polyrotaxanes for Increasing Cellular Uptake Efficiency in Macrophages through Receptor-Mediated Endocytosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 439 ~ 439 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24030439 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 大橋 萌, 田村篤志, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 オリゴエチレングリコール修飾ポリロタキサンによる炎症応答抑制効果 |
| 3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Zhang Shunyao, 田村篤志, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 Design of pH-responsive anionic polyrotaxanes and the modulation of cellular internalization efficiency |
| 3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 田村篤志 |
| 2. 発表標題 シクロデキストリン超分子ポリマーを用いた疾患治療 |
| 3. 学会等名 多糖の未来フォーラム2019（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田村篤志 |
| 2. 発表標題 シクロデキストリン含有ポリロタキサンの医薬応用に関する研究 |
| 3. 学会等名 第36回シクロデキストリンシンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui |
| 2. 発表標題 Acid-degradable polyrotaxanes prevent LPS-induced fulminant hepatitis |
| 3. 学会等名 Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society - AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress (TERMIS-AP + ABMC7 2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 田村篤志, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 細胞内分解性ポリロタキサンによる自然免疫系への介入 |
| 3. 学会等名 第68回高分子討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田村篤志, 大橋萌, 早川清雄, 大石由美子, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 -シクロデキストリン含有ポリロタキサンによる炎症抑制と急性肝炎治療への応用 |
| 3. 学会等名 第35回日本DDS学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長尾隆廣, 田村 篤志, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 軸高分子組成の異なるポリロタキサンの合成と細胞に対する作用の評価 |
| 3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴口塊, 田村篤志, 松村光明, 三浦宏之, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 炎症抑制を目指したマクロファージ標的指向性マンノース修飾ポリロタキサンの機能評価 |
| 3. 学会等名 日本補綴歯科学会 平成30年度東京支部学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田村篤志, 大橋萌, 早川清雄, 大石由美子, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 細胞内分解性ポリロタキサンによるマクロファージの炎症応答抑制作用 |
| 3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴口塊, 田村篤志, 松井秀人, 松村光明, 三浦宏之, 由井伸彦 |
| 2. 発表標題 マクロファージ標的型リガンド導入ポリロタキサンの構造特性が細胞内取込みへ及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第67回高分子討論会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 産業財産権の名称 カルボキシン化分解性ポリロタキサンの製造方法 | 発明者 由井伸彦, 田村篤志, 張 順堯 | 権利者 国立大学法人 東 京医科歯科大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-082376 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|