

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659022

研究課題名（和文）ヘパリンナノ粒子の多重標的機能を巧妙に利用した画期的関節リウマチ炎治療法の開発

研究課題名（英文）Development of heparin-based nanoparticles with multi-functional biological properties intended for rheumatoid arthritis therapy

研究代表者

山下 富義 (YAMASHITA FUMIYOSHI)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：30243041

研究成果の概要（和文）：

本研究では、多彩な機能をもつヘパリンを材料としてナノドラッグキャリアとして創製し、関節炎リウマチに対する治療を試みた。ネイティブのヘパリンあるいは一部の糖を開裂させたヘパリンにスフィンゴシンを結合させたヘパリン誘導体を合成した。これは水中で粒子径 120-200nm、ゼータ電位 -50～-60mV の自己組織化ナノ粒子を形成した。マウス腹腔マクロファージを用いた *in vitro* 実験の結果、スフィンゴシン/ヘパリン誘導体はそれ自体でもリポポリサッカライド刺激による炎症性サイトカインの産生を有意に抑制することが明らかとなった。一方、poly I:poly C 刺激による TNF- α の産生に対しては効果を示さないことから、スフィンゴシン/ヘパリン誘導体は TLR4/NF- κ B 経路に対して選択的に作用するものと推察された。II 型コラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いた治療実験においても、スフィンゴシン/ヘパリン誘導体、とりわけ一部の糖を開裂させたヘパリンの誘導体は顕著な抗炎症効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to develop a nano-sized drug carrier consisting of heparin, which has a variety of biological functions, and apply it to rheumatoid arthritis therapy. First, we conjugated native heparin or partially ring-opened heparin with sphingosine. These sphingosine-heparin conjugates form a self-assembling nanoparticle in water, which has the diameter of 120–200 nm and the ζ potential of -50 to -60 mV. Although inflammatory cytokines were produced following stimulation of mouse peritoneal macrophages with lipopolysaccharides, co-presence of the sphingosine-heparin conjugates, even without any drugs, significantly reduced the cytokine production. On the other hand, sphingosine-heparin conjugates were not effective against poly I:poly C-induced TNF- α production, suggesting that the conjugates act selectively on the TLR4/NF- κ B pathway. In the mouse model of type II collagen-induced arthritis, the sphingosine-heparin conjugates, especially that derived from partially ring-opened heparin, showed remarkable anti-inflammatory effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは、局所におけるリンパ球の異常な活性化により引き起こされる自己免疫疾患であり、進行性でかつ極度の痛みを伴うことから患者 QOL の極めて悪い疾患である。現在、関節リウマチの治療薬として、ステロイド薬や NSAIDs などの炎症抑制薬のほか、抗 TNF- α 抗体に代表される免疫異常を抑制する治療薬が注目されている。対処療法として痛みや炎症を抑えるステロイドや NSAIDs のほか、最近では免疫異常を抑制するメトトレキサートやヒト型 TNF- α 抗体なども臨床応用されているが、副作用が強かつ長期投与が必要とされることから、画期的な医薬品の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

ヘパリンは、抗凝固作用のみならず、細胞保護作用、アポトーシス抑制、細胞接着の制御など多彩な生理活性を有している。また、多くの成長因子がヘパリンに対して親和性を有することから、ヘパリンをこれらのドラッグデリバリーキャリアーとして利用することも試みられている。さらに、抗凝固作用による出血リスクを消失させるなど、ヘパリンの多彩な機能のうち必要なものを選択的に利用したヘパリン粒子を作成することができれば、その利便性をさらに高めることができる」と期待される。

関節リウマチは自己免疫疾患であり、マクロファージの異常活性化が原因の一つとされている。ヘパリンの抗炎症作用のメカニズムはまだ明らかにされていないが、ヘパリンの自己組織化ナノ粒子ミセルを創製することで、内包する薬剤の作用だけでなく、ヘパリンの作用との相乗効果が得られるのではないかと考えた。そこで、本研究では、ヘパリンを酸化的開環により抗凝固作用を消失させ、これにスフィンゴシンを縮合した両親媒性分子を合成した。検討の結果、これを水中分散させたナノ粒子はヘパリンよりも顕著に高い抗炎症作用を有することが明らかとなり、II型コラーゲン誘発関節炎モデルマウスにおいても薬剤の併用なしに著明な治療効果を示すことが明らかとなった。ここでは、粒子物性の評価結果も併せて本研究で得られた成果を報告する。

3. 研究の方法

(1)スフィンゴシン/低抗凝固作用ヘパリン結合体(sphingosine-low anticoagulant heparin conjugate, S-LACHP)の合成

ヘパリンを pH5.0 で過ヨウ素酸と 72 h 反応

させた後、グリセロールで過剰の過ヨウ素酸を分解し、2日間透析した。凍結乾燥後、塩基性 (pH9.5) 条件下水酸化ホウ素ナトリウムと 3h 反応させた。透析で精製後、ホルムアミドに溶解し、水溶性カルボジイミド存在下スフィンゴシンと 24h 反応させた。反応液にエタノールを貧溶媒として過剰量添加し、沈殿させた後、遠心・再懸濁を繰り返して精製し、目的物を得た。比較対象として、ネイティブのヘパリンとスフィンゴシンとを縮合させた結合体 (sphingosine-heparin conjugate, S-HP) も併せて合成した。

(2)S-LACHP および S-HP の自己組織化ナノ粒子の物性評価

異なるモル比でヘパリンとスフィンゴシンを反応させて得られた S-LACHP あるいは S-HP を水中に分散させた。得られたナノ粒子懸濁液の粒子径およびゼータ電位を測定した。また、透過型電子顕微鏡(TEM)によりナノ粒子の形状を観察した。

臨界ミセル濃度とヘパリンナノ粒子コアの疎水環境を評価するために、各ナノ粒子にピレンを内包させた条件下で、蛍光スペクトルを測定した。371-373nm および 381-383nm の2つの振動ピークを算出した。

(3)マウス腹腔滲出性マクロファージを用いた細胞障害性および抗炎症作用の評価

マウス腹腔内にチオグリコレート培地を注射し、4日後に腹腔内に滲出した細胞を回収した。得られた細胞をディッシュ上に播種し、2h後に接着していた細胞を滲出性マクロファージとし、各種実験に供した。濃度 0.5 mg/mL の S-LACHP あるいは S-HP、および 20 ng/mL のリポポリサッカライド(LPS)の共存下、WST-1 アッセイ法により細胞障害性を評価した。さらに、LPS を作用後 24h までの TNF- α の産生量を ELISA 法により測定した。また、LPS の代わりに 10 ng/mL の polyI:polyC を作用させたときの TNF- α 産生についても評価を行なった。これらの薬剤による作用は OptiMEM 培地中で評価した。

(4)II型コラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いた治療実験

2 mg/mL ウシII型コラーゲン含有フロイント完全アジュバント (CFA) 100 μ L をマウス尾根部に注射し、21日後にII型コラーゲン含有不完全アジュバント 100 μ L を腹腔内注射して追加免疫した。初回感作後 30日以降、治療実験を行うととし、S-LACHP あるいは S-HP 20mg/kg を一日一回両膝関節に注射した。その後、足腫脹、血中抗体価、血中および組織中サイトカイン量を経日的に測定した。関節炎の程度は、皮膚紅斑、足指腫脹、

関節強直を指標に3段階でスコア化した。

4. 研究成果

(1) S-LACHP の物性評価

NMR 測定により、過ヨウ素酸化によってヘパリン分子中のグルクロン酸部位のC2-C3結合が開裂していること、sphingosineとの反応によりアミド結合が形成されていることが確認された。S-HPとS-LACHPの間で、ヘパリンとスフィンゴシンの同じ仕込み量のもの进行比较すると、S-LACHPのほうのスフィンゴシン導入率が高くなる傾向が示され、例えば、仕込み量比1:15のもので比較すると、S-HPではカルボキシ基の4.2%が修飾されたのに対し、S-LACHPでは約2倍の8.2%が修飾されていた。

動的光散乱法による測定の結果、調製されたS-HPとS-LACHPの自己組織化ナノ粒子の平均粒子径は120-200nmの範囲であり、同じ仕込み量比のもので比較するとS-LACHPのほう小さかった。また、興味深いことに、S-HPではスフィンゴシンの割合が増加するにつれて粒子径が大きくなるのに対し、S-LACHPでは逆に小さくなる傾向が認められた。本結果より、S-LACHPではグルクロン酸ユニットのC2-C3結合が開裂しているために回転自由度が高く、フレキシブルな構造を取れるためにタイトな疎水性相互作用が形成されるものと推察された。各ナノ粒子のゼータ電位は-50~-60mV程度であり、表面電荷には大きな差異が認められず、ヘパリンの硫酸基や未反応のカルボキシ基が粒子表面に配置されているものと考えられた。これは、電子顕微鏡写真 (Figure 1) において粒子の周りにコロナが観察されることから支持される。

ナノ粒子コア部の疎水環境を評価するために、各ナノ粒子に蛍光物質ピレンを内包させ蛍光スペクトルを測定した (Figure 2)。339 nmで励起後、371-373 nm (I_I) および381-383 nm (I_{III}) の2つの振動ピークの比を算出したと

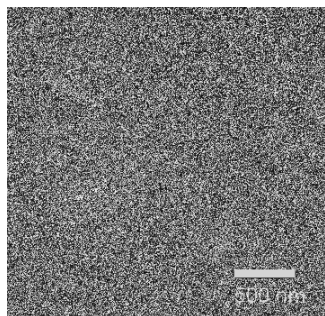


Figure 1. Transmission electron microscopy of sphingosine-heparin conjugates in water.

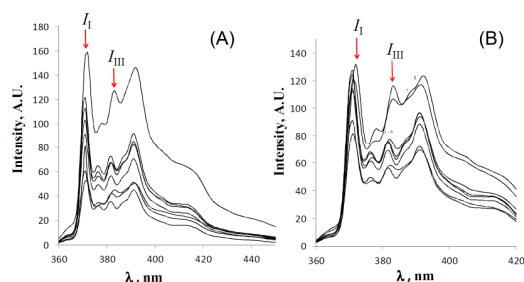


Figure 2. Fluorescent emission spectra of pyrene in aqueous solutions of S-HP (A) and S-LACHP (B) at different concentrations.

ころ、S-LACHPでは特に低濃度域 (~0.1 mg/mL) から濃度依存的に I_I/I_{III} 比が減少する傾向が認められた。したがって、S-LACHPの臨界ミセル濃度はS-HPに比べて低く、低濃度でも疎水的環境が形成されることが明らかとなった。本結果は、先の粒子径における違いともよく対応するものと考えられる。

(2) マウス腹腔滲出性マクロファージを用いた細胞障害性および抗炎症作用の評価

S-LACHPおよびS-HPのいずれにおいても、マウス腹腔より単離した滲出性マクロファージと0.5mg/mLの濃度で24hインキュベーションしても細胞毒性は観察されなかった。マウス腹腔マクロファージに対してLPSを作用させると、培地中に炎症性サイトカインであるTNF- α が分泌されることが知られている。そこで、このTNF- α 分泌に対するヘパリンの影響を評価した。Figure 3は、ヘパリン誘導体を作用させたときのマクロファージからのTNF- α 分泌を経時的に測定した結果である。S-HPあるいはS-LACHPを単独で作用させても未処理条件とほとんど違いが認められなかった。LPSを作用させると顕著なTNF- α 産生が認められたが、スフィンゴシン結合ヘパリン誘導体の共存下ではTNF- α の産生が有意に抑制された。特に、S-LACHPで顕著な効果が認められた。一方、ヘパリンや還元ヘパリンでもTNF- α 産生が抑制される傾向にあったが、スフィンゴシン結合体ほど顕著ではなかった。スフィンゴシン結合体が自己組織化ミセルを形成することと併せて考えると、ナノ粒子化することによって抗炎症作用が増強される可能性が示唆された。また、この抗炎症作用にはLPSによるNF- κ Bの活性化抑制が関与していることが示された (Figure 4)。

Toll like receptor 3 (TLR3) のリガンドとして知られる poly I: poly C を用いて同様の実験を行なった。poly I: poly C でも TNF- α 産生が認められるが、LPS の場合とは異なって S-HP および S-LACHP はほとんど抑制効果を示さなかった。本結果から、スフィンゴシン/ヘ

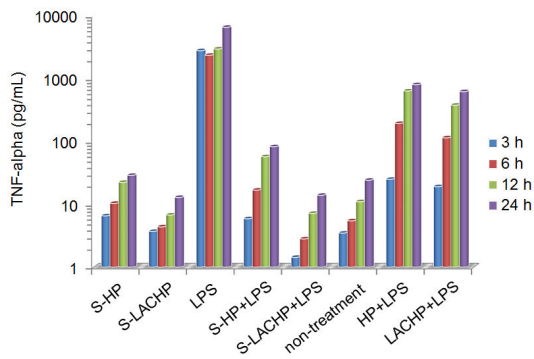


Figure 3. Effect of heparin derivatives on LPS-induced TNF- α production in mouse peritoneal macrophages. The TNF- α level in the culture medium was measured at different time points (3-24 h). HP, LAC, S-HP, and S-LACHP represent native heparin, reduced low anticoagulant heparin and their sphingosine conjugates, respectively.

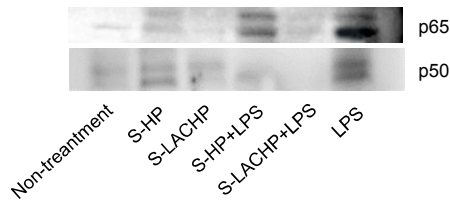


Figure 4. Intranuclear NF- κ B following treatment with sphingosine-heparin conjugate and/or LPS.

パリン結合体は LPS の受容体である TLR4 を介した経路に対して選択的に作用し、抗炎症作用を示すことが推察された。

(3) II型コラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いた治療実験

II型コラーゲンは、皮膚に含まれる一般的なコラーゲン (I型コラーゲン) とは異なり、軟骨組織に多く含まれる。II型コラーゲン誘発関節炎モデルは、異種由来のII型コラーゲンを投与して感作することで、関節軟骨に含まれるII型コラーゲンも異物と誤認し攻撃させることで関節炎を誘導するものであり、ヒトのリウマチ性関節炎や慢性炎症のモデルとして注目されている。0日目にII型コラーゲン含有完全アジュバントを尾根部に、21日後にII型コラーゲン含有不完全アジュバントを腹腔に投与したところ、追加免疫の7日後 (28日目) 以降に血清抗体価の急激な上昇、体重の減少が見られ、関節炎の発症も認められた。

30日目以降、各種ヘパリン誘導体および I κ B キナーゼ阻害剤 TPCA-1 を1日1回膝関

節に注射し、治療効果を評価した (Figure 5)。基剤のみ投与した場合には、30日以降も関節炎が進行したのに対し、S-LACHP、TPCA-1のそれぞれ単独あるいは併用した場合は、関節炎の進行が有意に抑制された。また、S-HP投与群でも若干の抑制効果が認められた。また、35、40、45日後に組織中の炎症性サイトカイン量を測定したところ、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6のいずれに関しても、ヘパリン誘導体の投与により有意に減少した。また、血中抗体価に関しても各種治療群で有意な減少が認められた (Figure 6)。

(4) 考察

ヘパリンは強い負電荷を有し、マクロファージにスカベンジャーレセプターを介して取り込まれるとの報告がなされてきた。当初、疎水コアを有するヘパリンナノ粒子を開発することで、薬剤を活性化したマクロファージに送達することで、高い治療効果が得られると予想した。実際に、蛍光標識したナノ粒

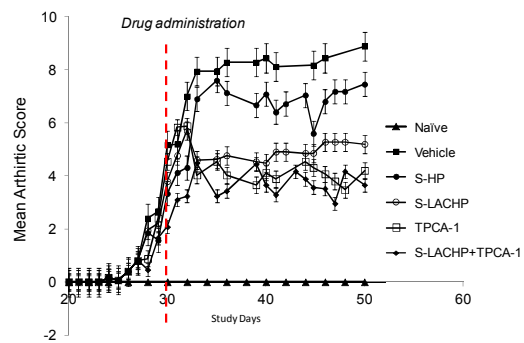


Figure 5. Healing effect of sphingosine-heparin conjugates and/or the I κ B kinase inhibitor TPCA-1 on collagen-induced arthritis in mice.

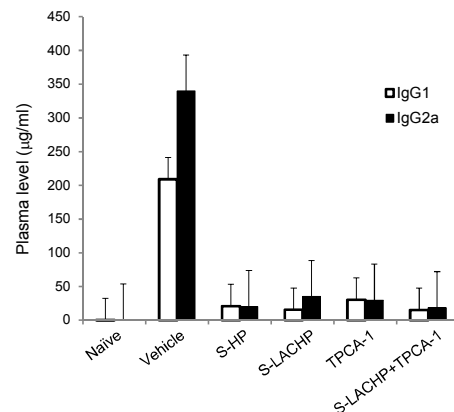


Figure 6. Serum IgG levels on day 45 in the mouse model of collagen-induced arthritis, following treatment with sphingosine-heparin conjugates and/or TPCA-1.

子とマクロファージとインキュベーションしたところ、細胞内への取り込みが観察された。しかしながら、LPS 刺激したマクロファージに対してヘパリンナノ粒子のみを作用させても炎症性サイトカイン産生の強力な抑制効果が示されるとともに、poly I:poly C に対してはほとんど効果を示さないことから、ヘパリン誘導体は、炎症性サイトカインの産生に関わる細胞内のシグナル伝達経路に作用するというよりはむしろ、おそらく LPS の受容体である TLR4 に対して直接作用しているのではないかと推察される。本件については、さらなる分子レベルでの結合評価を行い、仮説の検証が必要である。

スフィンゴシン/ヘパリン結合体は関節炎モデルマウスにおいても有意な治療効果を示した。特に S-LACHP の効果は顕著であり、結果としては TPCA-1 との相乗作用が認められなかった。これは、TPCA-1 が I κ B キナーゼ阻害剤であり、同様に NF- κ B 経路を抑制するため、S-LACHP が上流で十分な効果を示した結果によるかもしれない。スフィンゴシン/ヘパリン結合体のもう一つの利点として、自己組織化して疎水性コアを形成し難溶性薬剤を可溶化できる点が挙げられる。TPCA-1 はほとんど水に溶けないため、治療実験ではエタノールを混合した注射液を用いたが、スフィンゴシン/ヘパリン結合体ではその必要がない。このように可溶化作用があるため、投与する薬剤の選択肢を広げることができる。本研究結果から考察すると、TLR4/NF- κ B 経路とは異なる標的に作用する関節炎治療薬を利用し、スフィンゴシン/ヘパリン結合体に内包することで、より顕著な治療効果が得られる可能性が期待される。

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)

[学会発表] (計3件)

(1) Hasan Babazada、福岡美帆、山下富義、橋田 充、ヘパリンナノパーティクルの物性及び免疫抑制効果の検討、日本薬物動態学会第 27 年会、タワーホール船堀 (東京都) 2012 年 11 月 20-22 日

(2) Hasan Babazada、福岡美帆、山下富義、橋田 充、Mechanisms of anti-inflammatory effect of heparin-sphingosine nanoparticles in activated macrophages in vitro、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜 (神奈川県) 2013 年 3 月 27-30 日

(3) 福岡美帆、Hasan Babazada、山下富義、橋田 充、スフィンゴシン結合両親媒性ヘパリンによるナノ粒子の調整と物性評価、日本

薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜 (神奈川県) 2013 年 3 月 27-30 日

[その他]

ホームページ等

<http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/report/yamashita/kaiken/houga2011.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 富義 (YAMASHITA FUMIYOSHI)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：30243041

(2)研究分担者

橋田 泰彦 (HASHIDA YASUHIKO)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特定研究員
研究者番号：30512462

(3)連携研究者

樋口 ゆり子 (HIGUCHI YURIKO)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：40402797