

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08071

研究課題名(和文)自己組織化ヘパリンナノ粒子が示す抗炎症作用のメカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of anti-inflammatory action of self-assembling heparin nanoparticles

研究代表者

山下 富義 (YAMASHITA, FUMIYOSHI)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30243041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗凝固活性を消失させたヘパリンに、脂肪族アミンを結合させた誘導体を合成すると、自己組織化ナノミセル集合体を形成するだけでなく、リポポリサッカライド(LPS)刺激による炎症性サイトカインの産生を顕著に抑制する。本研究では、この抗炎症作用が他のグリコサミノグリカンでも同様に認められ、硫酸化度の高いものがより顕著であることを見出した。さらに、LPS刺激した後の各種遺伝子の発現変動の時系列データを数理モデルに基づいて解析し、転写因子活性に対する影響を定量的に評価したところ、ヘパリンナノ粒子はLPSによって活性化するTAK1-IKK-NFkappaB経路を選択的に阻害することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When non-anticoagulant heparin is conjugated with aliphatic amines, it comes to form self-assembling nanomicelles and exhibit remarkable suppressive effect on the production of proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated macrophages. The present study demonstrated that the anti-inflammatory effect can be observed with not only heparin but other glycosaminoglycans, being stronger as their degree of sulfation is higher. In addition, the time-series data of expression of a variety of genes following LPS stimulation were analyzed based on a mathematical model. The quantitative transcription network analysis indicated that the heparin nanoparticles appeared to selectively inhibit the activation of TAK1-IKK-NFkappaB pathway following LPS stimulation.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ヘパリン誘導体 抗炎症反応 数理モデリング 転写因子 因子分析

1. 研究開始当初の背景

ヘパリンは抗凝固薬として古くから用いられてきた医薬品であるが、最近、ウロン酸開環して脂質を縮合させたヘパリンの自己組織化ナノミセルが、薬剤を含有させることなくマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制することを見出した。ウロン酸開環して脂質を縮合させたヘパリンの自己組織化ナノミセルが、薬剤を含有させることなくマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制することを見出した (Babazada et al., J Control Release. 194:295-300, 2014.)。さらに、この効果が Toll-like 受容体 4 (TLR4) 選択的なシグナル伝達の遮断によることを明らかにするとともに、続報 (Babazada et al., J Control Release. 194:332-40, 2014.) ではこのヘパリンナノ粒子が関節炎モデルマウスでの炎症進行を抑制することを報告した。これらの結果から、ヘパリンナノ粒子は、TLR4 との関連が示唆されている様々な炎症性疾患、例えば潰瘍性大腸炎や代謝性疾患などへの治療的応用も期待される。

2. 研究の目的

本研究では大きく2つの目的を掲げた。1つは、ヘパリンで認められる抗炎症作用が他のグリコサミノグリカンでも認められるかを確認することである。ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸を取り上げ、同様にグリコール開裂と脂肪族アミン修飾を行った誘導体を合成し、リポポリサッカライド (LPS) によるマクロファージの炎症反応による抑制効果を比較した。第2の目的は、ヘパリン誘導体の作用機構を遺伝子発現ネットワークのレベルで解析することである。過去の研究では、LPS が TLR4/NFκB 経路を活性化するというよく知られた事実に基づき、ヘパリンナノ粒子がその経路を遮断することを明らかにしたが、炎症反応自体は複雑なネットワークを介して惹起されるはずであり、分子ネットワークに立脚したより詳細な理解が求められる。そこで、LPS 刺激によって変動する関連遺伝子発現の時系列データを取得し、これに対するヘパリン誘導体の影響を数理モデルに基づき定量的に解析した。

3. 研究の方法

3 - 1 . グリコサミノグリカン - ステアリルアミン結合体の合成

グリコサミノグリカン (ヘパリン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸) を過ヨウ素酸ナトリウムと 4 °C で 3 日間反応させた後、透析および凍結乾燥により製した白色粉末を水素化ホウ素ナトリウム溶液に溶解し、さらに 4 °C で 3 日間反応させた。生成物を透

析により精製した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドで活性化後ステアリルアミンと 25 °C で 24 時間反応させた。エタノール沈殿法により生成物を回収し、透析および凍結乾燥することによって、目的物のグリコサミノグリカン - ステアリルアミン結合体を得た。

3 - 2 . LPS 刺激マウス腹腔マクロファージに対する抗炎症効果の評価

5 週齢の ICR 系雌性マウスにチオグリコレート培地を腹腔内投与し、4 日後に腹腔マクロファージを採取した。採取された腹腔マクロファージは 10% ウシ胎児血清を含有する RPMI1640 培地に再懸濁した後、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後培地を OptiMEM に交換し、種々の濃度のグリコサミノグリカン - ステアリルアミン結合体を添加した後、LPS を最終濃度 20 ng/mL で添加した。24 時間培養後、上清中の TNF-α 量を ELISA 法にて定量した。細胞毒性の評価は WST-1 アッセイ法により評価した。

3 - 3 . マイクロアレイデータからの LPS 応答遺伝子の同定

LPS 刺激されたヒト由来単球系細胞に対するマイクローアレイデータを GEO データベースから取得した (GSE3491, GSE4748, GSE3037, GSE55608)。Welch の t 検定により LPS による遺伝子発現変動の p 値を計算したのち、Fisher の combined probability test に基づき、独立性を仮定しながら、統合 p 値を計算した。

$$-\sum_{i=1}^m \ln p_i \sim \chi^2(2m) \quad (1)$$

統合 p 値が 0.001 以下、fold change の幾何平均が 1 以上の遺伝子を有意であると判定した。

3 - 4 . 転写因子結合部位 (TFBS) 解析による LPS 応答性転写因子の同定

まず UCSC genome browser により TFBS データセットおよび転写開始部位データセットを取得した上で、転写開始部位周辺のプロモーター領域 [-5kb, +1kb] の塩基配列を解析し、全ゲノム遺伝子の TFBS を同定した。次に、LPS 応答性遺伝子に共通する TFBS の出現頻度をカウントし、全ゲノム遺伝子と比較した。有意差検定は両側 Z 検定により行い、p 値が 0.05 以下である場合に有意と判定した。

3 - 5 . マルチプレックス mRNA 測定による LPS 応答性遺伝子の発現変動およびヘパリン誘導体の影響の評価

ヒト単球由来 THP-1 細胞をフォルボール

-12-ミリスレート-13-アセートの存在下 48 時間培養し、マクロファージ様に分化誘導した。培地を OptiMEM に変更後、LPS を作用させ、2 時間まで 20 分おき、その後 4 時間まで 30 分おきに細胞を消化した。一部の実験では、LPS と同時に、グリコール開裂ヘパリン-ステアリルアミン誘導体あるいは IκB キナーゼ阻害剤 TPCA-1 を投与した系で同様の実験を行った。THP-1 細胞消化液からの RNA 抽出は QuantiGene Sample Processing Kit を用いて行い、mRNA は QuantiGene Plex 2.0 Assay for mRNA Quantification を用いたマルチプレックス法により定量的に測定した。

3 - 6 . スパース因子分析モデルによる LPS 処置後の時系列遺伝子発現変動の定量的解析

まず、mRNA 量に関する時系列データを平滑化スプライン関数により内挿し、その一次微分から各サンプリングポイントにおける mRNA 量の変化速度を算出した。

次に、各遺伝子の mRNA 発現 (X_i) は、転写因子活性化による合成と 1 次速度による分解によって規定されるとし、(2)式に示す動的モデルを仮定した。

$$\frac{dX_i}{dt} = \frac{\alpha_i}{1 + \exp(\sum_j \gamma_{ij} Z_j + \varepsilon_i)} - \beta X_i \quad (2)$$

ここで、 α_i および β はそれぞれ基準生成速度、一次消失速度定数を表し、 Z_j は潜在的転写因子 j の活性、 γ_{ij} は遺伝子 i と転写因子 j との関連係数であり、 ε_i は誤差を表す。なお、mRNA の消失速度は遺伝子の種類に依らず一定であると仮定した。(2)式を変形すると、

$$\ln\left(\frac{\alpha_i}{dX_i/dt + \beta X_i} - 1\right) = \sum_j \gamma_{ij} Z_j + \varepsilon_i \quad (3)$$

が得られる。パラメータ決定方法としては、まず、 α_i および β を適当に定めて(3)式の左辺を計算し、データ行列をスパース因子分析により解析することで、 Z_j 、 γ_{ij} 、 ε_i を定める。この手順に対して非線形最小二乗法を適用し、モデル誤差ができる限り小さくなるように最適な α_i および β を決定した。計算は統計ソフト R 上で行い、スパース因子分析および非線形最小二乗法に対してそれぞれ "fanc" と "nloptr" パッケージを利用した。

さらに、得られた γ_{ij} は転写因子 j と遺伝子 i との関係を表すことから、 γ_{ij} と TFBS の有無との相関を解析することで、潜在的転写因子 j の実体を推論した。

4 . 研究成果

4 - 1 . 各種グリコサミノグリカンナノ粒子の物性評価

未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、コン

ドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の 4 つのグリコサミノグリカンに対して、過ヨウ素酸酸化によるグリコール開裂を行い、ステアリルアミンとの結合体を合成した(以下、それぞれを gs-HPST、gs-LHST、gs-CSST、gs-HAST と称する)。各グリコサミノグリカン誘導体を分散して得られるナノ粒子の粒子径は 100~150 nm 程度、ゼータ電位は -20~-40 mV であり、臨界ミセル濃度も 0.014-0.018 mg/mL と各誘導体間で大きな差は認められなかった。

4 - 2 . LPS 刺激マウス腹腔マクロファージに対する抗炎症効果

LPS 刺激時にマクロファージから産生される TNF- α 量を ELISA 法により定量したところ、コンドロイチン硫酸を除いてグリコサミノグリカン存在下 TNF- α 産生がわずかに減少した。グリコサミノグリカンをグリコール開裂すると TNF- α の産生抑制効果は完全に消失したが、ステアリルアミンと縮合させることによって、通常のグリコサミノグリカンに比べて強力に TNF- α の産生を抑制できるようになった。各グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の TNF- α 産生抑制効果に関して用量依存性を評価し、IC50 値を算出したところ、gs-LHST で最も効果が高く(0.010 mg/mL)、次いで gs-HPST (0.018 mg/mL)、gs-CSST (0.033 mg/mL)、gs-HAST (0.113 mg/mL)の順となった (Figure 1)。

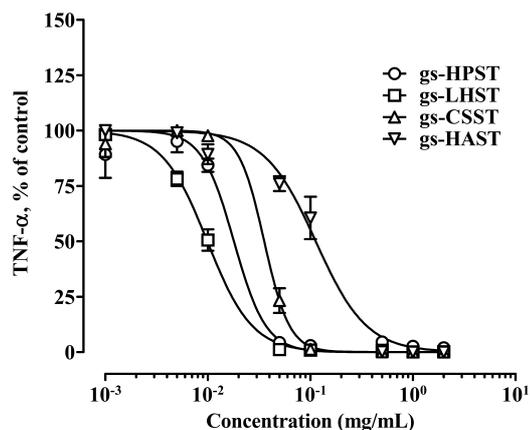


Figure 1. Concentration-dependent inhibitory effect of glycol-split glycosaminoglycan-stearylamine conjugates on TNF- α production from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages.

4 - 3 . 各種 Toll 様受容体リガンド刺激によるサイトカイン産生に対する抑制効果

グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の抗炎症効果が LPS 特異的かどうかを確認するために、TLR2 のリガンドである Pam2CSK4 と TLR3 のリガンドである Poly(I:C)を用いて、前項と同様の実験を行っ

た。Pam2CSK4 の刺激に対しては、LPS の場合とは異なり、いずれのグリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体も TNF- α 産生抑制効果を示さなかった。一方、Poly(I:C) の刺激に対しては gs-HAST を除くすべてにおいて、LPS に比べ弱いものの TNF- α 産生が抑制される傾向にあった。ただし、Poly(I:C) の添加により細胞毒性が認められたことから、この TNF- α 産生抑制は Poly(I:C) の細胞傷害性と関連する可能性もあり、TLR3 経路に対する効果については結論できなかった。

4 - 4 . マイクロアレイおよび TFBS 解析による LPS 応答性遺伝子および転写因子の同定

GEO データベースから取得した4つのデータセット (GSE3491, GSE4748, GSE3037, GSE55608) を使用して統計的に解析したところ、LPS に対して有意に応答する遺伝子が 285 個見つかった。次に、これらの遺伝子の発現制御に関わる転写因子を同定するために、プロモーター領域にある転写因子結合部位 (TFBS) の共通性を両側 Z 検定により解析した。その結果、LPS により向上調節される TFBS が 63 個見つかった。相関の高かった上位の TFBS を Table 1 にまとめた。

Table 1. Representative TFBSs of LPS-responsive genes

TFBSs	Transcription Factors	χ -test (p-value)
V\$CREL_01	Nuclear factor- κ B (NF κ B)	0
V\$NFKAPPAB_01	Nuclear factor- κ B (NF κ B)	0
V\$NFKAPPAB65_01	Nuclear factor- κ B (NF κ B)	0
V\$NFKB_C	Nuclear factor- κ B (NF κ B)	0
V\$MZF1_01	Myeloid zinc finger 1 (MZF)	2.45E-13
V\$ZIC2_01	Zinc finger protein ZIC 2 (ZIC2)	1.64E-06
V\$OCT1_05	POU domain, class 2, transcription factor 1 (POU2F1)	1.68E-05
V\$CREBP1_Q2	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2 (ATF2)	2.08E-05
V\$EGR1_01	Early growth response protein (EGR1)	2.29E-05
V\$E4BP4_01	Nuclear factor, interleukin 3 regulated (NFIL3)	8.75E-05
V\$MAZR_01	POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1 (MAZR)	1.19E-04
V\$ISRE_01	Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)	1.42E-04

4 - 5 . LPS 応答性遺伝子の発現変動に対するマルチプレックス mRNA 測定

マイクロアレイおよび TFBS 解析の解析結果を精査し、炎症反応と関係が報告されていて刺激した後 10 分おきに 150 分間、mRNA 発現をマルチプレックス法により測定した

結果を示している。図は、時系列データを標準化して階層的クラスタリングを行い、クラスターごとにデータをプロットしたものである。mRNA 発現プロファイルは遺伝子の種類によって大きく異なり、BTG2 や JUNB は早くにピークを迎えたのに対し、多くの遺伝子は

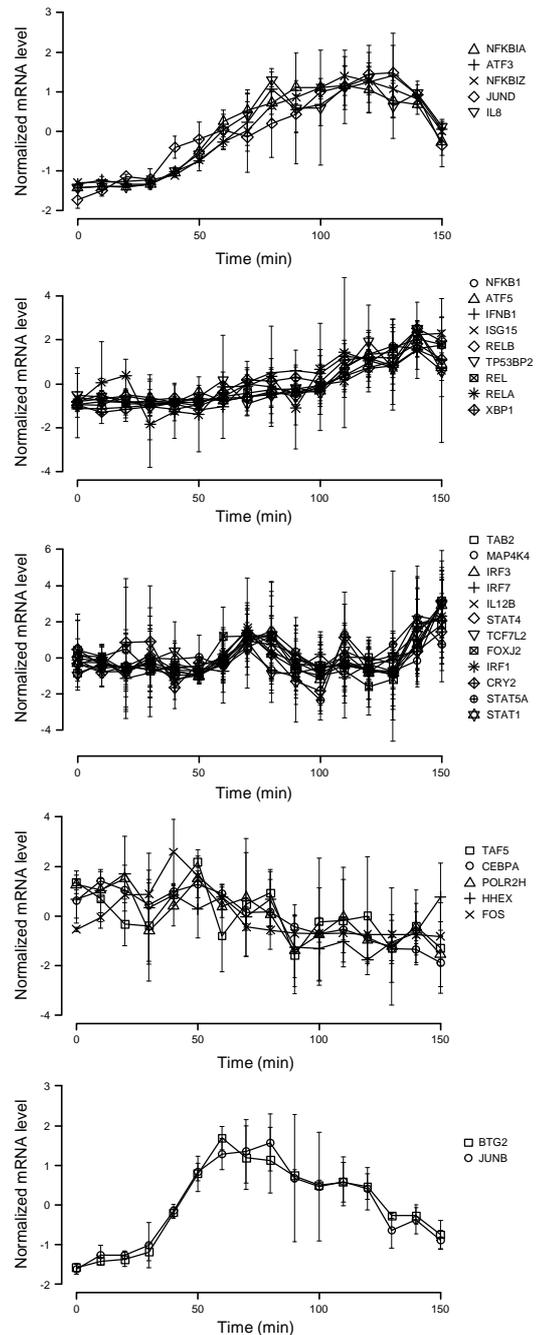


Figure 2. Time series data of mRNA expression of 33 genes following 100 ng/mL LPS stimulation in PMA-stimulated THP-1 cells. The data are normalized according to their variation in the sampling period.

LPS 処理後 120 分ないし 140 分後にピークを向かえた。遅れてピークを迎えた遺伝子には NF κ B 関連遺伝子が多く含まれていた。一方、CEBPA などは遺伝子発現が減少する傾向に

あった。

4 - 6 . スパース因子分析モデル解析による LPS 応答性転写因子の推定

マルチプレックス法により測定された 33 遺伝子の mRNA 発現変動プロファイルを数値

Table 2. Factor loadings between LPS-responsive genes and latent transcription factors determined by sparse factor analysis.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
ATF3	0.74	0.65	-0.09
ATF5	-0.01	0.96	-0.22
BTG2	0.93	0	0
CEBPA	-0.05	-0.97	-0.15
FOS	-0.38	-0.70	-0.18
HHEX	-0.76	-0.46	0.41
IFNB1	0.44	0.89	0
ISG15	0.08	0.98	0.10
JUNB	0.94	-0.25	0.06
JUND	0.67	0.54	-0.48
MAP4K4	0	0.37	0.88
NFKB1	0	0.99	-0.07
NFKBIA	0.85	0.51	-0.08
NFKBIZ	0.76	0.64	-0.07
REL	0.13	0.98	0.04
RELB	-0.02	0.99	0.03
STAT1	-0.07	0.52	0.81
TAB2	0	0.68	0.69
XBP1	0.41	0.91	0

微分して変化速度を求め、(3)式に基づくスパース因子分析を行った。この際、LPS 処置による発現変動が相対的に少ない遺伝子は解析対象から外した。Table 2 は、因子分析により抽出された 3 つの潜在因子について、各遺伝子との関連性を示す因子負荷量の値をまとめたものである。これらの潜在因子はあくまで統計的相関から決定される仮想的な転写因子である。そこで、各遺伝子のプロモーター領域にある TFBS の有無と因子負荷量との相関を評価したところ、Factor 1、Factor 2、Factor 3 はそれぞれ AP-1、NFκB、STAT と類似したパターンを示すことが明らかとなった。

4 - 7 . ヘパリン誘導体共存下における LPS 応答性遺伝子の発現変動に関する評価

先のスパース因子分析および TFBS 解析の結果に基づき、代表的な LPS 応答性遺伝子として 12 個の遺伝子 (BTG2、JUNB、NFKB1、ISG15、IFNB1、XBP1、NFKBIA、ATF3、STAT1、IRF7、FOS、CEBPA) に絞り込んだ。次に、ヘパリン誘導体の作用機構を解析するために、LPS および gs-HPST の共存下、上記 12 種類の遺伝子の発現変動をマルチプレックス法により評価した。また、比較のために、gs-HPST の代わりに IκB キナーゼ阻害剤 TPCA-1 を共存させた場合についても同様の

評価を行った。Figure 3 は各遺伝子の mRNA 量の経時変化を示している。gs-HPST の存在下では、NFκB 結合部位の下流にある遺伝子の発現が顕著に抑制された (Fig. 3A)。これに対し、gs-HPST は LPS による IRF や STAT の下流遺伝子の発現変動に対して有意な変化を与えなかった。一方、AP-1 の下流遺伝子の JUNB や BTG2 に関しては、gs-HPST の共存下、遺伝子発現が上昇する傾向が認められた (Fig. 3C-D)。また

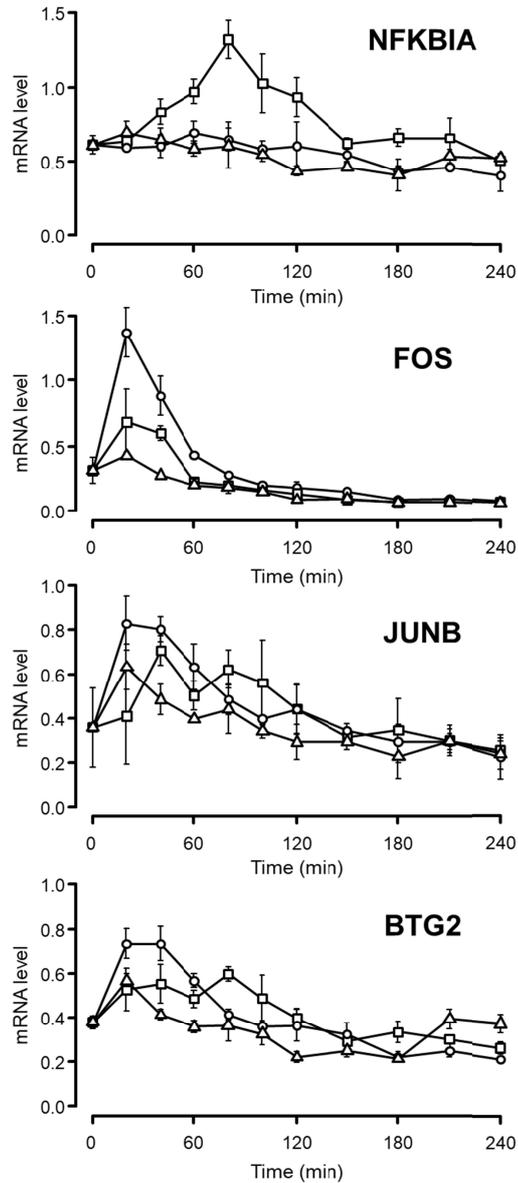


Figure 3. Time series data of mRNA expression of each gene in PMA-stimulated THP-1 cells following 100 ng/mL LPS alone (□) or together with 0.1mg/mL gs-HPST (○) or 1 μg/mL TPCA-1 (△).

TPCA-1 は、これら 4 つの遺伝子のいずれに対しても LPS による発現上昇を抑制する傾向を示した。NFκB は AP-1 の活性化に関与する JNK を阻害する。gs-HPST はこの経路を遮断することによって、JNK を介した AP-1 の活性化を助長したものと考えられる。一方、

TPCA-1 は、IKK のほか JNK も阻害するので、このような結果の違いが認められたと推察される。以上、LPS は TAK1-IKK-NFκB 経路、TAK1-JNK-AP-1 経路のいずれも活性化するが、gs-HPST は TAK1-IKK-NFκB 経路に対してのみ選択的に阻害作用を示すものと考えられる。

4 - 8 . まとめ

グリコール開裂したヘパリンにステアリルアミンを結合させた誘導体が、自己組織化ナノミセル集合体を形成し、LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生に対して抑制効果を示すという現象は、ヘパリンに限らず他のグリコサミノグリカンにおいても認められることが明らかとなった。LPS 刺激した後の各種遺伝子の発現変動のキネティックデータを解析したところ、グリコール開裂ヘパリン - ステアリルアミン誘導体は TAK1-IKK-NFκB 経路を選択的に阻害することが示唆された。

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 2 件)

山下富義、多階層生体機能モデリング・シミュレーション環境を利用した薬物相互作用の動的シミュレーション、薬学雑誌、査読有、138、2018、347-351。DOI:10.1248/yakushi.17-00191-2

Yanamoto S, Babazada H, Sakai S, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M, Anti-inflammatory effect of self-assembling glycol-split glycosaminoglycan-stearylamine conjugates in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Biol Pharm Bull, 査読有, 40, 2017, 540-545. DOI:10.1248/bpb. b 16-00928

[学会発表](計 5 件)

山下富義、多階層生体機能モデリング・シミュレーション環境を利用した薬物間相互作用の動的シミュレーション、日本薬学会第 137 年会、2017 年

Yamashita F, In silico pharmacokinetics: from QSAR to system modeling, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, 2017

Yanamoto S, Babazada H, Sakai S, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M, Anti-inflammatory effect of self-assembling glycol-split

glycosaminoglycan-stearylamine conjugates in lipopolysaccharide-stimulated macrophages, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, 2017

山下富義、薬物相互作用の in silico 予測、第 37 回日本臨床薬理学会学術総会、2016 年

山下富義、コンピューターサイエンスがもたらす薬剤学研究のイノベーション、第 21 回創剤フォーラム若手研究会、2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山下 富義 (YAMASHITA, Fumiyoshi)
京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30243041