

平成 30 年 4 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10300

研究課題名(和文) RANK系シグナルをターゲットとした脳梗塞における新規炎症制御ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-inflammatory peptide targeting RANK signal in ischemic stroke

研究代表者

栗波 仁美 (Kurinami, Hitomi)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10638555

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)：本研究により、MHP1の活性中心部位が明らかになると共に、TLR4だけでなくTLR2や7/8などのシグナルも抑制できることが明らかとなった。また、血清中での半減期や代謝産物も明らかとなった。また、静注において、脳梗塞部位に浸潤できることも明らかとなり、末梢投与にて、神経機能障害の改善、脳梗塞サイズの改善も明らかとなった。また、RANKLで問題となる破骨細胞の活性化を惹起することは無かった。ただ、治療効果を得るためには大量のペプチドが必要であったため、今後、マウス血清との混合によって得られた分解産物情報に基づいたペプチドの改変が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：MHP1 is a newly developed synthetic peptide composed of the DE and a part of the EF loop of the receptor activator of nuclear factor- κ B (NF- κ B) ligand (RANKL). In this study, we demonstrated that MHP1 significantly inhibits Toll-like receptor (TLR) 2-, 4-, and 7/8- induced inflammation in microglia/macrophages without osteoclast activation. Knockdown of RANK receptor cancelled the anti-inflammatory effects, indicating that the effects were through RANK signal. HPLC/MS analysis showed that around 50% of MHP1 still remained after 30 minutes; in fact, the active sites of MHP1 were still preserved in some of the degradation products. In mice with tMCAo, MHP1 could cross the blood-brain-barrier in peri-infarct regions. The administration of MHP1 4 or 6 hours after cerebral ischemia successfully reduced infarct volume and prevented the exacerbation of neurological deficits without affecting osteoclast activation. MHP1 peptide could be a novel agent for the treatment ischemic stroke.

研究分野：老年内科

キーワード：炎症 脳梗塞 RANKL RANK 合成ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアによる炎症の制御は、脳梗塞や多発性硬化症、アルツハイマー病などの急性炎症および慢性炎症において重要な治療ターゲットであり、炎症に関与する様々な化合物の有効性がいままでも検討されてきたが、臨床応用には至っていないのが現状であり、新たな作用機序を有する薬剤の開発が必要とされている。

我々は中枢神経系における炎症制御に関わる新規のシグナル系として RANK (受容体) を介した RANKL (リガンド) シグナル系 (RANKL/RANK シグナル) の研究を行ってきた。RANKL/RANK 系は骨代謝に関与するシグナル系としての研究が多く行われてきたが、マウス脳梗塞モデルにおいて、RANKL および RANK mRNA が脳虚血 4-5 時間で脳虚血周囲部に発現しはじめ 12-24 時間をピークに 72 時間後まで発現が増加しており、活性化ミクログリアがその発現細胞であることを見出した。また、リコンビナント RANKL (rRANKL) の脳室内投与では脳梗塞の拡大が抑制され、神経細胞・グリア細胞の混合培養系では、rRANKL での前処理により、LPS による TLR4 を介した炎症性サイトカインの発現および神経細胞死が抑制されることを明らかにした¹⁾。

しかし、rRANKL の全身投与では、破骨細胞の活性化による骨粗鬆症の誘発懸念があることが問題であった。そこで我々は、RANKL において RANK 結合部位でありながら破骨細胞の活性化作用が報告されていない DE、EF ループを含む RANKL 部分ペプチド (15-30 アミノ酸、MHP: Microglia/Macrophage Healing Peptide と命名) を作成した。5 種類の MHP のうち、ミクログリアの細胞株である MG6 細胞を用いた検討では、MHP1 が最も強力な抗炎症作用を有していた。また、神経細胞グリア初代培養を用いた検討で

は、MHP-1 は IL-6 や TNF α の培養中への炎症性サイトカインの発現と神経細胞死を抑制することを見出していた。また、破骨前駆細胞において rRANKL あるいは MHP1 を培地に加えた系において TRAP 染色を行ったところ、rRANKL では破骨細胞への分化が促進されるのに対し、MHP1 では抗炎症作用を示す濃度において、破骨細胞への分化が認められていなかった。これらの結果をもとに、MHP1 をマウス脳梗塞モデルにおいて脳室内投与での治療効果についての予備検討を行ったところ、0.625 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ の 4 時間後投与にて、72 時間後の脳梗塞サイズおよび神経機能障害が低下傾向であった。また、MHP1 をヒトの配列に基づいて設計しなおした MHP6 においても (マウスと 3 アミノ酸の相違)、ヒトマクロファージ細胞株である THP-1 細胞における LPS 負荷による炎症性サイトカインの発現を抑制していたが、同様に MHP1 も THP-1 細胞での効果を認めていたことから、マウスを用いた MHP1 の薬効評価は、ヒトへの応用にも有効である事が示唆されていた。

2. 研究の目的

上記のような背景から、MHP1 は rRANKL とは異なり、骨粗鬆症を来すことなく、効果的に TLR 関連の炎症を抑制できる新規の脳梗塞治療薬としての可能性を秘めていると考えられた。しかし、臨床応用のための薬剤開発のためには、下記の点をさらに明らかにする必要があった。

- (1) MHP1 の活性部位はどこか。
- (2) 実際に MHP1 が RANK シグナルを介して TLR 関連の炎症を抑制しているのか。
- (3) MHP1 により破骨細胞への分化を促進する可能性が、分子レベルでは否定できてない。
- (4) MHP1 の作用は TLR 以外のシグナルを抑制するのか、TLR の種類により、作用に差がある

のか。

(5) 長期保管ができる安定なペプチドか。血清中では安定か？

(6) 血液脳関門を超えて脳内に浸潤できるか。

(7) 末梢投与にて治療効果があるのか。

これらの問題点を明らかにすることを目的として、本研究課題を遂行した。

3. 研究の方法

(1) MHP1 の活性部位の検討

→30 アミノ酸からなる MHP1 の C 末端のみを欠損させた 11-26 アミノ酸からなる MHP および、N 末端のみを変異させた MHP を用いて、LPS により誘発される炎症性サイトカインの発現に対する抑制効果を検討する。

(2) RANK ノックダウン細胞における MHP1 の硬化検討

→ MG6 あるいは RAW 264.7 細胞を用いて RANK を siRNA でノックダウンし、MHP1 の効果を検討することによって、RANK シグナルを介しているか明らかにする。

(3) RAW264.7 細胞における破骨細胞への分化シグナルの検討

→RAW 細胞に RANKL あるいは MHP1 を投与後、破骨細胞分化の master regulator である NFATc1 や ACP5 の発現を realtime RT-PCR で確認し、核内の p65 の発現を TransAM® NF κ B Transcription Factor ELISA Kit にて検討する。

(4) TLR4 以外の炎症シグナルへの作用の検討

→MG6 細胞を用いて、FSL1 (TLR2 リガンド)、R848 (TLR7/8 リガンド)、S100A β (RAGE リガンド) による炎症性サイトカインへの作用を明らかにする。

(5) MHP1 の安定性についての検討

→MHP1 を水溶液の状態にして半年間、4 度保管を行い、作用の検討を行う。また、37 度で 24 時間置いた場合の活性化をみる。さらに、マウス血清と反応させた場合の HPLC/MS での分解の程度を明らかにし、分解部位の解明も行う。

(6) FITC 標識 MHP1 を用いた脳内移行性検討

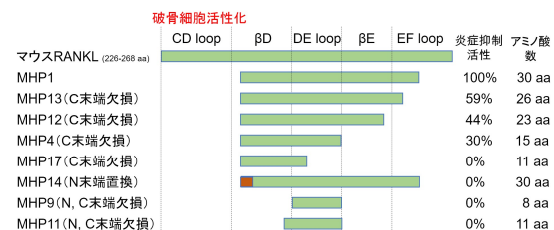
→FITC 標識 MHP を脳梗塞マウス(一過性中大脳動脈閉塞モデル)の虚血 4 時間後に静注し、脳組織にて、脳実質内への浸潤の有無を明らかにする。

(7) 末梢投与での治療効果を明らかにする

→(6)の結果に基づき考慮した投与方法にて、一過性脳虚血モデルを用いて MHP1 を脳虚血 4, 6 時間後に投与し、脳梗塞サイズおよび神経機能障害の解析からその効果を明らかにする。また、骨への影響については、麻痺肢の橈骨を採取し、TRAP 染色を行うことにより破骨細胞の活性化を明らかにする。

4. 研究成果

まず、MG6 細胞にて LPS 刺激にて上清に産生される IL-6 および TNF α の発現から、C 末端欠損 MHP および N 末端変異 MHP の作用を解析した。その結果をまとめたものを図 1 に示す。



- MHP1のC末は欠損しても、DEループまでの欠損であれば活性はある。
- N末端アミノ酸は活性に重要である。
- DEループのみでは活性を認めない。

図 1 MHP1 の活性部位のまとめ

MHP1 の作用を 100%とした場合、C 末端欠損により、徐々に TLR 関連炎症抑制効果は減弱していくが(図中 MHP13,12,4)、 β D 配列および DE ループを有する配列(MHP4)までは効果が認められた。また、MHP1 の N 末端の 1 アミノ酸を別のアミノ酸に置換した MHP14 では、効果が全くみとめられず、また、DE ループのみ

(MHP9,11)でも効果が認められなかった。これらの結果から、MHP1 の活性中心(最小配列)は MHP4 である β D+DE ループの配列であることが明らかとなり、今後の MHP1 の改変において、N 末端の改変は活性を失う可能性が示唆された

次に、siRNA を用いて、RANK をノックダウンした場合の MHP1 の作用について検討を行った(図 2)。

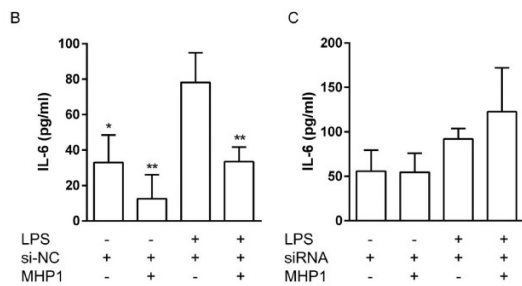


図 2 RANK ノックダウン RAW 細胞における MHP1 の抗炎症作用

MG6 細胞では RANK のノックダウン効率が良くなかったため、RAW264.7 細胞での検討であったが、RANK をノックダウンした細胞では、MHP1 による TLR4 関連炎症性サイトカイン発現抑制効果がキャンセルされており、MHP1 の効果が RANK を介していることが明らかとなった。

さらに、RAW264.7 細胞における破骨細胞への分化の系における検討では、RANKL では、NFATc1 および ACP5 の発現が強く、破骨細胞への分化が促進されていたが、MHP1 の投与では、NFATc1 および ACP5 の発現は抑制されていた(図 3)。

また、核内 p65 の発現も若干は増加するものの

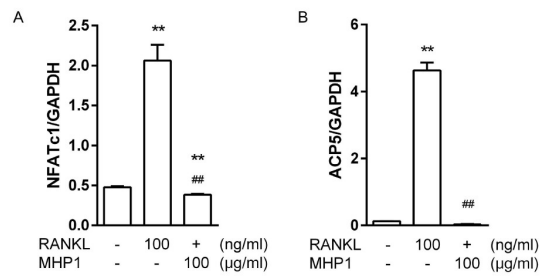


図 3 MHP1, RANKL 刺激による RAW 細胞における破骨細胞関連 mRNA の発現

RANKL に比較し、弱い発現であった。このことは、破骨細胞において MHP1 が RANKL とは異なる作用であることを示していた。

また、FSL1 による TLR2 シグナル、R848 による TLR7/8 シグナルはいずれも MHP1 で抑制されるが(図 4)、S100 β による RAGE シグナルによるサイトカインの発現は抑制されなかったことから、MHP1 の作用は TLR に特異的に作用する可能が示唆された。

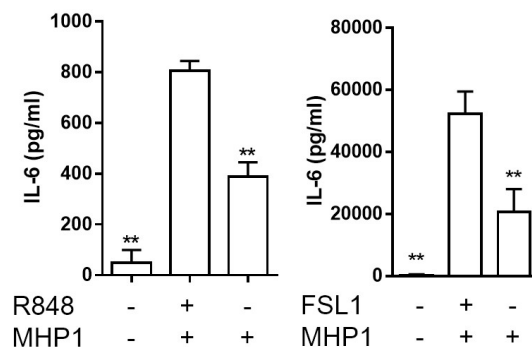


図 4 R848, FSL に対する MHP1 の作用

さらに、MHP1 を水溶液の状態にし、半年間 4 度で保管後に LPS 刺激 MG6 細胞で検討したところ、IL6 の発現が十分に抑えられており(図 5)、水溶液の状態では非常に安定したペプチドであることが明らかとなった。

次に、37 度に 24 時間保管した後の活性を検討したところ、4 度保管に比較すると活性は若干低下するが、活性自体は維持されていることが明らかとなった。さらに、MHP1 の HPLC/MS での

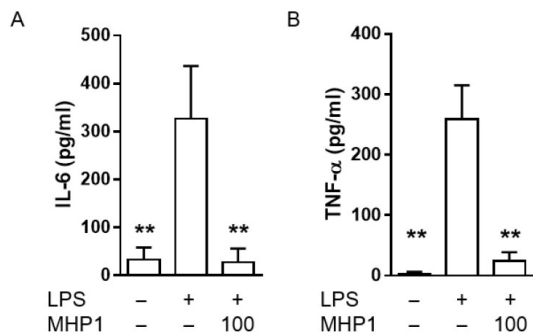


図5 水溶液状態にて4度で半年保管後の活性測定系を確立し、マウス血清と混合した場合の半減期を計測したところ、半減期は約30分であり

(図6)、通常、合成ペプチドが血清中ではペプチダーゼにより2-3分で分解されることに比較すると、非常に安定したものであることが明らかとなった。また、この検

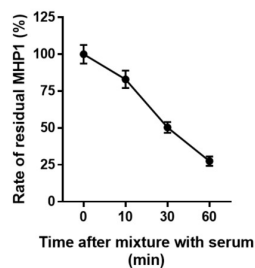


図6 血清との混合後のMHP1の残存率

討により、血液中でのMHP1の分解産物が明らかとなったが、分解産物には前述の活性最小単位であるβD+DEループを含む物も多く認められ、全体的には、活性は30分以上保たれることが示唆された。

次に、FITCで標識したMHP1を脳虚血4時間後に静注したところ、正常側の脳においてはMHP1がBBBを超えることなく、血管内のみ認められたが、虚血側の脳においては投与5分後にMHP1がBBBを超え、脳内に浸潤しており、1時間後には脳内に残存はしているものの、浸潤量は少なくなっていることが明らかとなった。この結果から、脳梗塞におけるMHP1の効果を期待するのであれば、静注後に持続投与を行う必要があると考えられた。

そこで、脳虚血4時間後あるいは6時間後にMHP1を300μg/匹で緩徐に静注後、Alzetポンプにて、336μgを持続皮下投与し、48時間後に脳梗塞面積を評価した(図7)。

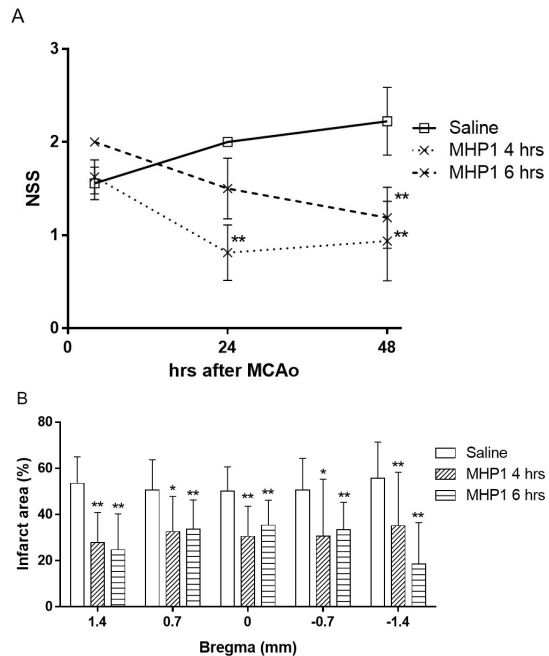


図7 末梢投与によるMHP1の効果(脳梗塞)

その結果、MHP1を4時間後、6時間後から開始したマウスでは、神経機能および脳梗塞面積が、生食投与マウスより改善していることが明らかとなった。また、麻痺肢橈骨のTRAP染色による評価では、破骨細胞の活性化は惹起されておらず、MHP1の全身投与は、脳梗塞に伴う破骨細胞の活性化を惹起させることがないことが明らかとなった。

以上の結果から、MHP1は脳梗塞急性期におけるTLR関連の炎症制御による治療薬となりうる事が示唆されたが、臨床応用を考えた場合、大量のペプチドが必要なため、今後、マウス血清との混合によって得られた分解産物情報に基づいたペプチドの改変が重要であると考えられた。

(参考文献)

1. Shimamura, M. *et al.* OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8191-8196 (2014).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) Kurinami H, Shimamura M, Nakagami H, *et al.* A Novel Therapeutic Peptide as a Partial Agonist of RANKL in Ischemic Stroke. *Sci Rep* 2016;6:38062.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hitomi Kurinami. Development of a novel anti-inflammatory and anti-osteoclastic peptide based on RANKL for treatment of ischemic stroke. Society for Neuroscience, 2016.11.16, San Diego, USA (poster)
- ② Hitomi Kurinami. Development of a Novel Anti-inflammatory and Anti-osteoclastic Peptide Based on DE-loop and EE-loop in Rankl for Treatment. International Stroke Conference 2016, 2016.2.18, LA, USA (oral)
- ③ 島村宗尚 「A novel partial anosit-like RANKL peptide inhibiting TLR-induced inflammation in ischemic brain」第 57 回日本神経学会総会、2016.6.20.兵庫 (口演)
- ④ 栗波 仁美 「RANKL シグナルをターゲットにした脳梗塞における新規治療法についての検討」脳心血管抗加齢研究会 2015、2015.11.28、大阪 (口演)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 発明の名称「炎症性サイトカイン分泌抑制活性を有するオリゴペプチド」
発明者: 島村宗尚、中神啓徳、栗波仁美、森下竜一
出願人: 国立大学法人大阪大学

番号: 特願 2015-102502 (H27.5.20)

PCT/JP2016/064446 (H28.5.16) 各国移行 (米国、欧州 (英)、カナダ、中国、オーストラリア)

ホームページ等

<http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/vme/greeting.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
栗波 仁美 (KURINAMI HITOMI)
大阪大学・大学医学部附属病院・助教
研究者番号: 10638555
- (2) 研究分担者
島村 宗尚 (SHIMAMURA MUNEHISA)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号: 60422317