

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390481
 研究課題名（和文） 新規機能性素材の敗血症治療への応用：新規治療概念の確立
 研究課題名（英文） A new therapeutic concept for the treatment against sepsis using a functional material, 1,5-anhydrofructose

研究代表者

阿邊山 和浩（ABEYAMA KAZUHIRO）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授
 研究者番号：30284897

研究成果の概要： HMGB1 蛋白の細胞の放出・分泌は「炎症の拡大・遷延化因子あるいは個体レベルでの疾患の予後増悪因子」として作用する。今回の研究において、我々は、新規機能性単糖 1,5-D-アンヒドロフルクトース(1,5-AF)が、①炎症性転写因子 NF- κ B の制御と② HMGB1 蛋白の機能制御、③細胞内糖代謝系の機能修飾などの3つの作用を介し、抗炎症作用を発揮するユニークな創薬シーズとなり得ることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,900,000	0	5,900,000
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	15,000,000	2,730,000	17,730,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・救急医学

キーワード： 1,5-AF、1,5-AG、Ascopyrone-P (APP)、HMGB1 蛋白、敗血症・多臓器不全、低酸素・嫌気代謝、炎症

1. 研究開始当初の背景

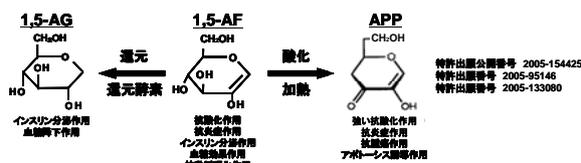
(1) 救命救急医療の現場においてみられる敗血症などによる多臓器不全状態は、救命率を低下させる最も大きな要因の1つであるにもかかわらず、現時点の医療レベルでは決定的な治療法は未だ確立していない。これに関して、障害された細胞核から放出される HMGB1 蛋白が、「炎症の拡大・遷延化因子」あるいは「個体死へのメディエーター」として働くことが判明し、HMGB1 蛋白機能を標的とした新規治療法の可能性が注目されてきている。しかしながら、敗血症にみられる臓器の代謝異常と細胞外 HMGB1 との関連

性・分子機構などについては、ほとんど明らかにされていない。この謎について、1) HMGB1 遺伝子を欠損させたマウスの発現型が低血糖（生直後）であること、2) 敗血症モデルにおいて、単純な抗炎症療法では改善されない敗血症モデルでの致死性が、インスリンやインスリン抵抗性改善薬投与により抑制（致死率の低下）できるという事実などから、申請者らは、仮説として、「細胞外 HMGB1 は、受容体 RAGE を介して、細胞の炎症のシグナル伝達時間を延長させ（細胞内 ATP の消費増加）、細胞外からのグルコース取り込み能の低下を促し、結果として細胞

内エネルギーの枯渇による機能低下状態を誘導させる作用がある」という可能性を想定していた。

(2) 申請者らはこれまでに、癌、動脈硬化、糖尿病などに対して、潜在的に治療効果を発揮しうる可能性のあるユニークな低分子の新規機能性単糖とその誘導体

(1,5-anhydrofructose; 1,5-AF と ascopyrone P; APP) を見出してきた(下図)。



具体的な機能としては、①1,5-AFには、還元糖としての特徴である抗酸化性以外に、抗菌作用、血小板凝集抑制作用、血糖降下・インスリン分泌促進作用、抗炎症作用など、②1,5-AFの加熱・酸化等により生成されるAPPには、さらなる強い抗酸化性(1,5-AFの約5000倍、N-acetylcysteineとほぼ同等かそれ以上)、抗炎症作用、抗腫瘍作用(細胞のアポトーシス誘導能)など、ユニークな薬理学的作用が存在することである。③また、1,5-AFは、生体内のNADPH還元酵素により、インスリン分泌促進作用がある1,5-AG(anhydroglucitol)に変化することも明らかにされてきた。

2. 研究の目的

以上の背景より、敗血症・多臓器不全のような状態の治療において、救命率を向上させるためには、1) 炎症細胞(白血球)の活性化抑制による2次的な細胞・組織障害の防御(いわゆる抗炎症療法による炎症性転写因子NF- κ Bの制御)、2) HMGB1の機能制御(放出抑制、機能阻害)、3) 細胞内糖代謝系の改善の3つの要素を同時に満たす必要性があるものと考えられ、また、1,5-AFとその誘導体は、上記3つの要素を同時に満たす「敗血症・多臓器不全に対する治療薬」開発のための有望な薬用素材になりうる候補と考えられる。したがって、本研究の目的は、1) 上記①-③の仮説の証明、2) 予備試験での1,5-AFの薬理学的作用のメカニズム解明、3) 救命率向上に寄与できる新規治療法開発(1,5-AFの治療薬への応用・プロトコルの構築、より有効性が期待できる作用の強い1,5-AF誘導体探索)を達成することであ

る。

3. 研究の方法

(1) 1,5-AFの生体に及ぼす影響についての検討：①細胞培養レベルでの1,5-AF及びその誘導体の炎症・免疫(サイトカイン産生能など)に対する影響について、②動物実験レベルでは、皮膚の炎症モデルを用いて、1,5-AFの抗炎症作用について検討を行なった。③小動物の血清・臓器サンプル用いて、代謝関連のマーカー(血糖、乳酸産生、脂質プロファイル、インスリン、レプチン、アディポネクチンなどの内分泌性ホルモンの変動など)について検討した。④細胞レベルにおいては、 β 細胞からのインスリン分泌、脂肪細胞分化(インスリンのターゲット細胞)の変化などについて検討した。

(2) HMGB1蛋白機能・シグナル伝達機構における1,5-AFの標的部位についての解析：①1,5-AFとその誘導体による核内蛋白(ヒストン、炎症性転写因子NF- κ B、HMGB1)の炎症性刺激応答性のアセチル化反応に及ぼす影響、②炎症刺激を受けた細胞からのHMGB1放出などについて検討した。

(3) 1,5-AFとその誘導体の作用のメカニズム、gene microarray法などを用いた検討：抗炎症作用や低酸素性障害に対する保護効果への作用のメカニズムについても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 1,5-AFの安全性

培養細胞レベルでの添加による毒性試験、個体レベルでの安全性試験(マウスやカニクイザルに対する経口投与方法、マウスを用いた腹腔内注射による投与方法などでの試験)において、1,5-AFは、本物質を応用するうえで想定される条件設定(濃度、暴露時間：急性毒性試験プロトコル)では、細胞障害性や個体での臓器障害や死亡例のような有害事象、血液・生化学データ上の異常値は確認できず、薬理作用発現を目的とした実用域(1,5-AF用量100~300 mg/kg程度に相当)において毒性を示唆する所見は全くみられないことが確認できた。

(2) 糖・脂質代謝系への影響についての検討
①1,5-AFによるインスリン分泌促進作用：膵臓ランゲルハンス島内分泌細胞由来の細

胞株 (HIT、MIN6) において、1,5-AF とその生体内代謝産物である 1,5-AG (これはもともと生体内にも存在し、正常人の血液中に約 20 $\mu\text{g/ml}$ 程度存在し、糖尿病患者などでは、低値を示すことが知られている) は、それぞれ単独において、インスリン分泌促進作用は全くみられなかったものの、グルコース刺激によるインスリン分泌を増強させる作用を有することが確認できた (図 1)。

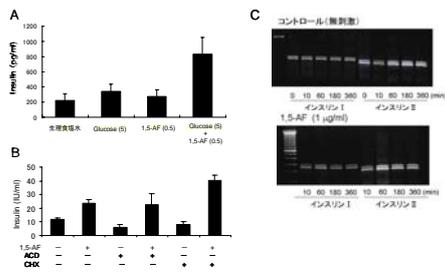


図1 1,5-AF によるインスリン分泌促進作用: (A) マウス 1,5-AF 腹腔内投与 (25 mg/kg 30 分後) のインスリン分泌。グルコース刺激でのインスリン分泌を増強している。(B) 転写阻害剤 (アクチノマイシン D 1 $\mu\text{g/ml}$; ACD)、蛋白合成阻害剤 (シクロヘキシミド 1 $\mu\text{g/ml}$; CHX) の 1,5-AF インスリン分泌促進効果に及ぼす影響 (これらの mRNA・蛋白合成阻害剤は、1,5-AF の作用に全く影響を与えない)。(C) RT-PCR でのインスリン mRNA の発現解析 (1,5-AF は、インスリン mRNA 合成には、影響を与えない)。

また、本作用は、遺伝子・蛋白合成レベルでのインスリン産生促進に基づくものではなく、細胞からの分泌機能の亢進によるものであることが明らかとなった。また、マウス、カニクイザルでの試験において、1,5-AF は、血中インスリン濃度を増加させ、正常範囲内で血糖値を下降させる方向に作用したものの、体重増加、中性脂肪、コレステロールの異常値 (高脂血症の所見)、低血糖の合併症はみられなかった。以上より、1,5-AF (あるいは 1,5-AG) は、血糖値の上昇 (グルコース刺激) に応答したインスリン分泌を促進させ、空腹時のような血糖値の低い状態においては働かない「on demand 型あるいは、低血糖などの合併症のない血糖降下・インスリン分泌作用」といったユニークな薬理作用を有することが判明した。

② 1,5-AF のインスリン標的細胞に対する作用: インスリンの標的である間葉系の細胞株 (脂肪細胞前駆細胞としての 3T3-L1 や 10T1/2、骨格筋前駆細胞モデルである C2C12) において、脂肪細胞分化誘導およびインスリン・グルコース刺激に応答した脂肪細胞の成熟化に対して、1,5-AF は、やや抑制的に作用

したが、一方、1,5-AG は、促進的に作用した (図 2 の A と B)。さらに、本実験系において、1,5-AG には、PPAR- γ アゴニストにより誘導される脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を増強させる作用があることが明らかになり (図 2 の C)、1,5-AF には、間接的なアディポネクチンの作用が示唆された。

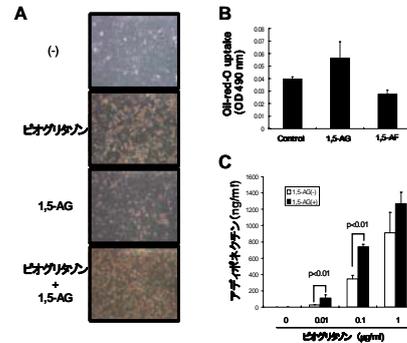


図2 1,5-AG の脂肪前駆細胞のインスリン感受性増強作用: (A) 1,5-AG (50 $\mu\text{g/ml}$) の脂肪細胞分化誘導促進作用 (10T1/2 細胞をグルコース 5 mg/ml、デキサメサゾン 1 μM 、IBMX 0.5 μM で 48 時間以上刺激し、さらに、グルコース 5 mg/ml、インスリン 10 $\mu\text{g/ml}$ 存在下で 5 日間培養した後の変化。オイルレッド - O 染色 $\times 100$) (B) 細胞内に取り込まれたオイルレッド - O の定量化 (脂肪細胞分化の程度を示す指標) の結果。(C) 1,5-AG のアディポネクチン産生促進効果。

(3) 生体防御反応系 (炎症・免疫系) に対する影響についての検討

① 局所免疫・炎症反応に対する 1,5-AF の効果: 局所においては、病巣に浸潤、活性化した炎症細胞 (好中球、単球、リンパ球など) によるサイトカインの分泌が、炎症状態の維持・拡大に寄与していることが知られている。そこで、培養細胞レベルで、A) LPS 刺激、あるいは、炎症病巣モデルとしての B) 繊維芽細胞との共培養系における白血球モデル (HL-60、THP-1、U937) からの炎症性サイトカイン産生に対する 1,5-AF の効果を検討した (図 3 の A と B)。いずれの系においても、1,5-AF は、刺激応答性の炎症性サイトカイン分泌に対する容量依存的な抑制作用を有した。また、それぞれ HLA が異なるヒトリンパ球 (T リンパ球) と抗原提示細胞 (マクロファージ) との混合培養 (allogenic MLR 法) の実験系においても、1,5-AF は、T リンパ球の増殖能 (図 4 の A) やサイトカイン産生能 (IL-2、IL-4、IFN- γ) を低下させた。

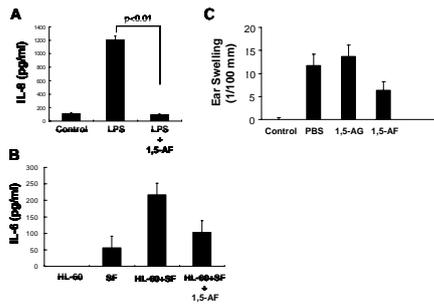


図3 1,5-AFの抗炎症作用: (A) LPS (1 µg/ml) 刺激下での、U937細胞の24時間後のIL-8産生。(B) 慢性関節リウマチの滑膜繊維芽細胞(SF)との共培養(24時間)によるHL-60細胞からのIL-6産生に対する1,5-AF(5 mg/ml)の効果。(C) 1%クロトンオイル塗布24時間後の耳介皮膚腫脹反応に対する1,5-AF(100 mg/kg、腹腔内投与)の効果。

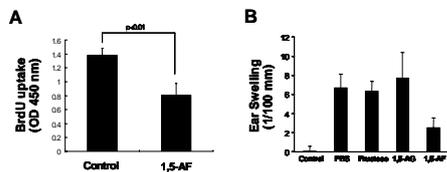


図4 1,5-AFの抗アレルギー作用: (A) HLAが異なるヒトリンパ球と抗原提示細胞(マクロファージ)との混合培養におけるT細胞の増殖性に対する1,5-AF(50 µg/ml)の効果。(B) オキサゾロンによる耳介皮膚の遅延型過敏反応(耳介皮膚腫脹反応)に対する1,5-AF(100 mg/kg、腹腔内投与)の効果。

以上のような培養細胞レベルでの実験でみられた抗炎症・抗アレルギー(免疫抑制)作用は、実際の動物実験系、つまり、マウスの耳介皮膚にクロトンオイルを塗布した際の急性皮膚炎症(図3のC)や感作物質としてオキサゾロンを用いた皮膚免疫反応などのモデル(図4のB)においても、1,5-AF投与による効果としての耳介浮腫の軽減、病理組織像での炎症細胞浸潤の抑制という形で確認することができた。

②重篤な全身性の免疫不全状態モデルにおける1,5-AFの作用: また、1,5-AFは、担癌モデル(B16メラノーマを腹腔内に播種した末期癌あるいは悪液質モデル; 図5)、重症エンドトキシンショックモデル(LPSの腹腔内投与による致死性のマウスエンドトキシンショックモデル: 4/10の生存率)の2種類の全身性の炎症状態(致死性のモデル)の実験系においても、生存を延長させる傾向に作用した。

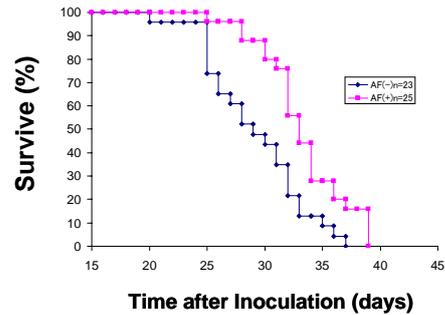


図5 重篤な全身性の免疫不全状態モデル(マウスでの担癌モデル)における1,5-AFの作用: C57/black 6系のマウスに、同系由来の腫瘍株B16メラノーマ細胞を腹腔内に播種(106/mice)し、癌性腹膜炎状態を惹起させた末期癌あるいは悪液質モデルに対する1,5-AF(1%含有飼料の給餌試験)の効果。

③炎症と低酸素、低酸素刺激下の細胞における1,5-AFの作用: 腫瘍組織や関節リウマチの活動性の強い病巣では細胞が低酸素(嫌気)状態にあることが知られており、実際に、本実験で用いたCIAマウスの関節炎の病変部分においても強い低酸素状態に陥っていることが判明した(図6)。また、組織低酸素の部分と細胞外HMGB1の分布も一致していることが示唆された(図7)。

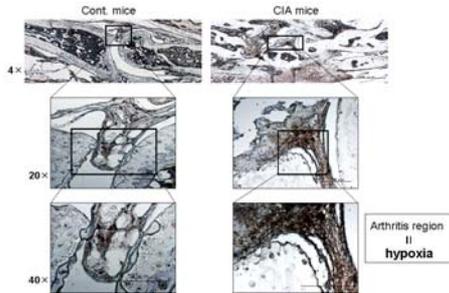


図6 CIAマウスの関節炎における病巣部分と組織低酸素状態(ピモニダゾール染色陽性)の分布

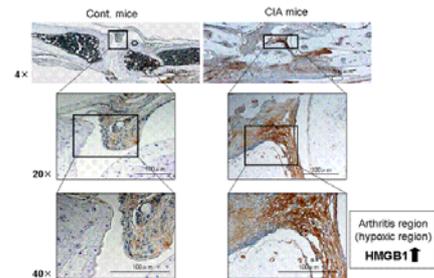


図7 CIAマウスの関節炎における病巣部分と核外のHMGB1分布

そこで、低酸素刺激による細胞外への HMGB1 分泌・放出増加の可能性とそれに対する 1,5-AF の作用について検討を行ったところ、種々の細胞において、低酸素刺激は、能動的な HMGB1 分泌・放出（壊死により、蛋白が漏出したものではない）が確認され、その現象に対して、1,5-AF は、抑制的に作用することが明らかとなった（図 8）。また、1,5-AF には、種々の細胞における嫌気状態での細胞死を抑制するといった細胞保護効果があることも判明した（図 8）。

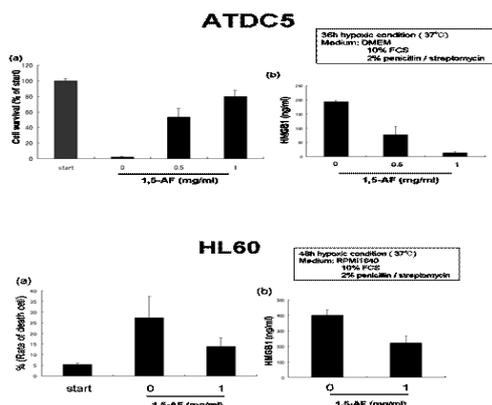


図 8. 低酸素刺激下での種々の細胞現象に対する 1,5-AF の効果（細胞保護効果と HMGB1 放出・分泌に対する抑制効果）

(4) 1,5-AF の薬理作用とファーマコゲノミクス

1,5-AF 及びそれから派生する誘導体誘導体などの生体に対する影響について検討を行ったところ、①1,5-AF 刺激により、2 倍以上の変動を示した遺伝子を全抽出し、バイオインフォマティクスに基づいた細胞内シグナルに関連するパスウェイ解析を行った結果、脂質のβ酸化に関連する経路を筆頭に、その他、細胞増殖関連、細胞骨格制御関連、抗炎症作用に関わる遺伝子群の変動が観察された。②また、1,5-AF を高圧・高温の処理を加えることにより生成される APP には、増殖性の高い細胞に作用し、細胞周期上の S 期の増加と G2/M 期の減少、それ以降のアポトーシスを誘導する性質が存在することが判明した。これらの細胞現象に先行して、APP 刺激により顕著に誘導される遺伝子発現パターンについて、細胞現象と関連したパスウェイのカテゴリー名を頻度順に挙げると NF-κB signaling (炎症反応・細胞生存に関わる経路)、アポトーシス・細胞周期関連であり、APP の薬理学的作用・機能性などを予測すると、「抗炎症作用」、「アポトーシス誘導作

用」、「細胞周期停止に基づく増殖抑制作用」という結果であった。③1,5-AF の生体内代謝産物である 1,5-AG についても、同様の解析を行い、1,5-AG は、細胞に対して、インスリン感受性を高める方向のベクトルを有する遺伝子発現制御(β2-integrin の発現低下と Akt の発現増加)を誘導するという結果が得られた。

(5) 結論

これらのことより、1,5-AF は、直接的な抗酸化作用や抗炎症作用に加えて、糖・脂質代謝制御作用を介して作用する新規抗炎症剤あるいは敗血症治療薬としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Souda M, Umekita Y, Abeyama K, Yoshida H. Gene expression profile during rat mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. 査読有、Int J Cancer. 2009; in press. (IF: 4.555)
- ② Hiwatashi K, Ueno S, Abeyama K, Kubo F, Sakoda M, Maruyama I, Hamanoue M, Natsugoe S, Aikou T. A novel function of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in association with tumorigenesis and tumor differentiation of HCC. 査読有、Ann Surg Oncol. 2008; 15(3):923-933. (IF: 3.917)
- ③ Tancharoen S, Matsuyama T, Abeyama K, Matsushita K, Kawahara K, Sangalungkarm V, Tokuda M, Hashiguchi T, Maruyama I, Izumi Y. The role of water channel aquaporin 3 in the mechanism of TNF-alpha-mediated proinflammatory events: Implication in periodontal inflammation. 査読有、J Cell Physiol. 2008; 217(2):338-349. (IF: 3.643)
- ④ Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, Yamada S, Nagayama S, Hashiguchi K, Sunahara N, Fukuzaki K, Nagata R, Komiya S, Maruyama I, Fukuda T, Abeyama K. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. 査読有、Arthritis Rheum. 2008; 58(9): 2675-2685. (IF: 7.677)
- ⑤ Ito T, Kawahara K, Nakamura T, Yamada S, Nakamura T, Abeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. 査読有、J Thromb Haemost. 2007; 5(1):109-116. (IF: 5.947)

- ⑥ Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. 査読有, Mol Cell Biol. 2007; 27(16):5650-5663. (IF: 6.42)
- ⑦ 阿辺山和浩, 吉元 寧, 丸山征郎, 炎症隔離分子としてのトロンボモジュリン、査読有、血管医学 2006; vol. 7. No.3.(特集:血管炎のオムニバス)19-25
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Horai N, Abeyama K., et al “Arthritis-associated myopathy”, a characteristic pathology of primate models. Society of Toxicology 48th Annual Meeting, 2009 Baltimore USA
- ② 阿辺山和浩, 新しい理論に基づいたサイトプロテクションと疾病の予防・治療法開発、株式会社新日本科学、遺伝子解析ミーティング、2009、鹿児島
- ③ 松田みゆき, 阿邊山 和浩, 他 5 名、カニクイザル (Cynomolgus Monkey) コラーゲン誘発性関節炎モデルにおける骨格筋の病理組織学的検討、第 25 回日本毒性病理学会、2009、静岡
- ④ Nagaoka T, Abeyama K, et al, Sequential Changes in Oleic Acid-Induced Lung Injury in Dogs. The Society of Toxicologic Pathology 26th Annual Meeting, 2007, Puerto Rico
- ⑤ Torikai M, Abeyama K, et al, Therapeutic efficacy of oral miconazole administration for the treatment of neonatal intestinal disorders, and its possible mechanism. The 40th Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Paediatric Surgeons, 2007 Queenstown, New Zealand
- ⑥ 鈴東昌也, 阿辺山和浩, 血清薬理学的ファーマコゲノミクスを用いた生薬薬効の解析、トミーデジタルバイオロジー社主催 Ingenuity pathway analysis ユーザーミーティング、2007、東京
- ⑦ Yang X, Abeyama K, et al, Sequential Histologic Changes of Oleic Acid-Induced Lung Injury in Cynomolgus Monkeys. The Society of Toxicologic Pathology 25th Annual Meeting, 2006 Vancouver, Canada
- ⑧ Horai N, Abeyama K, et al, Non-invasive Assessment of Pulmonary Disorder using Computed Tomography (CT)-Imaging in a Non-Human Primate. Society of Toxicology 45th Annual Meeting, 2006 San Diego CA USA
- ⑨ 寶来直人, 阿邊山和浩, 他 8 名、カニクイザ

ルにおけるコンピュータ断層撮影法(CT)を用いた肺傷害の診断、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006、名古屋

- ⑩ 坂東崇志, 阿邊山和浩, 他 7 名、カニクイザルにおけるコンピュータ断層撮影法(CT)を用いた肺傷害の診断、第 3 回日本予防医学会、2005、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿邊山 和浩 (ABEYAMA KAZUHIRO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30284897

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKUROU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：20082282

伊東 祐二 (ITO YUJI)

鹿児島大学・工学部・准教授

研究者番号：60223195

安部 淳一 (ABE JUNICHI)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：80128404