

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790150
 研究課題名 (和文) 骨輸送担体を用いた新規慢性関節リウマチ治療薬の開発
 研究課題名 (英文) Augmented anti-arthritic effect of soluble RAGE
 tagged with an acidic oligopeptide
 研究代表者
 高橋 達雄 (TAKAHASHI TATSUO)
 北陸大学・薬学部・助教
 研究者番号：50445904

研究成果の概要 (和文)：可溶性 receptor for advanced glycation endproducts (esRAGE)は、関節リウマチの病態進展に関与する HMGB1 のおとり受容体として機能する。骨輸送担体である酸性オリゴペプチド (AcOP) を esRAGE に共役させることによって、おとり受容体としての機能を保持したまま esRAGE の骨への移行性を増大させることに成功した。また、AcOP と共役した esRAGE (AcOP-esRAGE) は少なくとも 1 週間以上骨へ蓄積することが明らかとなった。AcOP-esRAGE は、esRAGE と比較して関節リウマチモデルマウスの関節腫脹を強く抑制したことから、AcOP による esRAGE の骨ターゲティングは関節リウマチ治療に有用であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts (esRAGE) can act as decoy receptor of HMGB1 involved in progression of rheumatoid arthritis. Tagging with an acidic oligopeptide (AcOP), bone-targeting carrier, was enable to augment bone distribution of esRAGE, while retaining function as decoy receptor. Moreover AcOP-tagged esRAGE retained in bone at least one week after intravenous injection. In rheumatoid arthritis model mice, weekly injection of AcOP-tagged esRAGE attenuated swelling of four limbs more effectively than untagged esRAGE. Thus bone-targeting system with an acidic oligopeptide is applicable to esRAGE as potential agent of rheumatoid arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、関節リウマチ、可溶性 RAGE、酸性オリゴペプチド、

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は持続性の骨膜炎をきたし、骨・軟骨破壊を伴うことを特徴とする自己免疫疾患である。RA 患者は関節破壊による関節の変形および機能的障害を生じるため、QOL の観点からも RA の発症・増悪を防ぐことは重要な課題であるといえる。炎症関節局所では滑膜の増殖、パンス形成に加えてマクロファージなどの免疫担当細胞の浸潤が見られ、それらの細胞から分泌される炎症性サイトカインが RA の発症および骨・軟骨破壊に重要な役割を果たすことが分かっている。Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1)、IL-6 は代表的な炎症性サイトカインであり、特に TNF- α は RA の病態形成の主要なメディエーターと考えられている。実際、TNF- α のモノクローナル抗体や受容体アナログといった生物学的製剤による TNF- α シグナルの阻害は RA の画期的な治療として確立された。臨床ではインフリキシマブやエタネルセプトの RA に対する有効性が明らかとなっており、特にこれら生物学的製剤は disease-modifying-antirheumatic drugs では十分な効果が得られない骨・関節破壊性病変に対し効果的である。しかし、抗 TNF- α 療法を皮切りに RA に対する生物学的製剤の開発が進んでいる一方で幾つかの問題点も浮上している。標的の生理学的活性を完全に抑えることに起因する敗血症や日和見感染といった重大な副作用の発現はもっとも憂慮すべき課題である。また、高価な薬剤費のわりに有効性は 50%程度にとどまっており、生物学的製剤の改善すべき点は残されている。

マクロファージによって分泌される HMGB1 が関節リウマチ患者の滑液中で増加しており、HMGB1 が RA の病態進展に関与している可能性が示唆されている。HMGB1 は、マクロファージの膜上に発現するその受容体 receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) と結合し、TNF- α などの炎症性サイトカイン発現を誘導する。また、膜貫通領域を持たない可溶性 RAGE (esRAGE) は RAGE のおとり受容体として機能し、esRAGE の投与により RA モデルマウスの病態を改善したことから、esRAGE の生物学的製剤としての応用が期待される。

酸性オリゴペプチド (AcOP) は骨の主な無機成分であるハイドロキシアパタイト (HAP) に高い親和性を持ち、薬物の骨輸送担体としての機能が注目されている。AcOP を共役させたエストラジオールは骨に選択的に移行することで子宮などにおける副作用が軽減され、また高濃度が長期間骨にとどまることにより投与量の軽減および骨に対する作用の長期化が可能である。また AcOP を共役させることによりエストラジオールのような小

分子ばかりでなく、アルカリフォスファターゼのように巨大な分子である酵素の骨への移行性を増加させることも可能である。

2. 研究の目的

本研究は、esRAGE の生物学的製剤としての応用を目指し、AcOP と共役させることにより骨移行性を高めた esRAGE の RA 治療効果を証明することを目的とする。AcOP によって esRAGE の骨への移行性を高めることは、抗 RA 作用を増加させるだけでなく、投与量の減少、投与間隔の延長、副作用の軽減を可能にすると考えられる。

3. 研究の方法

(1) esRAGE および AcOP-esRAGE 発現ベクターの構築：正常ヒト肺由来 RNA から RT-PCR 法によって esRAGE cDNA を得た。AcOP が esRAGE の C 末端に付加した遺伝子組み換えタンパク質を得るため、AcOP をコードする DNA 配列を含むプライマーを用いて AcOP-esRAGE cDNA を作製した。本研究では、AcOP として 6、10 あるいは 14 個のアスパラギン酸からなる連続配列を設定した。上記の cDNA は、発現ベクターに組み込まれた後、CHO-K1 細胞へトランスフェクションし、受容体タンパク質を得た。

(2) esRAGE および AcOP-esRAGE の精製：CHO-K1 細胞で発現させた上記受容体タンパク質は培養上清中に分泌されるため、培養上清を回収して精製を行った。受容体タンパク質を含む培養上清は、まず超ろ過によって脱塩・濃縮した後、陰イオンクロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順に精製を行った。

(3) HAP との結合親和性：HAP 100 μg を含む Tris 緩衝液に受容体タンパク質を加えて 1 時間振盪後、遠心した。上清中に含まれる受容体タンパク質を遊離型としてウェスタンブロットティングによって定量し、HAP と結合した受容体タンパク質量を算出した。

(4) esRAGE および AcOP-esRAGE の組織分布：受容体タンパク質を蛍光標識し、マウス

(DBA/1J、オス、7 週齢) の尾静脈から 1 mg/kg の用量で投与した。投与 24、72、168 時間後に後肢、肝臓、腎臓を摘出し、組織切片を作製した。その組織切片中の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、受容体タンパク質の組織分布を確認した。

(5) HMGB1 との結合親和性：Nickel gel 10 μl および His-tagged HMGB1 5 μg を含むリン酸緩衝液に受容体タンパク質を加えて、室温で 15 分間振盪した。遠心後、上清を捨て、リン酸緩衝液で Nickel gel を洗浄後、0.25 M イミダゾール 20 μl を加えて Nickel gel に結合している HMGB1-受容体タンパク質複合

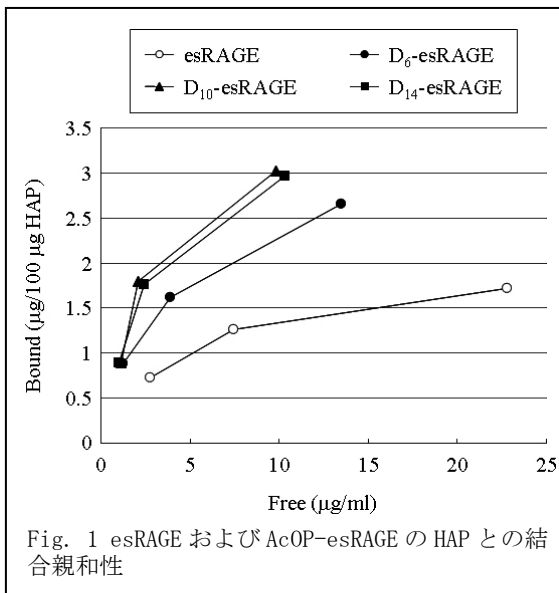
体を遊離させた。ウェスタンブロッティングによって HMGB1 に結合した受容体タンパク質量を定量した。

(6) マクロファージからの TNF- α 遊離: マウスマクロファージ (RAW264.7 cell) に HMGB1 を作用させ、遊離してくる TNF- α 量を ELISA によって測定した。また、esRAGE および AcOP-esRAGE の TNF- α 遊離に及ぼす影響も同様に試験した。

(7) コラーゲン誘導性関節炎に対する esRAGE および AcOP-esRAGE の治療効果: マウス RA モデルとして、コラーゲン誘導性関節炎を用いた。ウシ II 型コラーゲン 150 μ g を含むアジュバントをマウス (DBA/1J、オス、7 週齢) の尾根部に皮内投与し、3 週間後、再度ウシ II 型コラーゲン 150 μ g を含むアジュバントを背部皮下に投与した。esRAGE および AcOP-esRAGE は 2 度目のコラーゲン投与と同時に投与を開始し、週に 1 度、尾静脈から 1 mg/kg の用量で投与した。最初のコラーゲン投与から 5 週間後に四肢指跡の発赤・腫脹をスコア化し、治療効果を判定した。

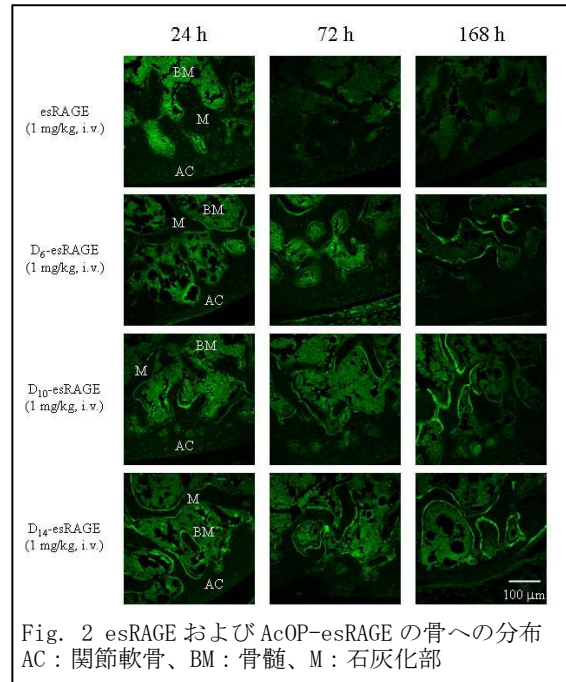
4. 研究成果

(1) HAP との結合親和性: esRAGE と比較して AcOP-esRAGE は HAP に対し、高い親和性を有していた。アスパラギン酸の数が増加するにつれ、その親和性は増加する傾向にあった (Fig. 1)。

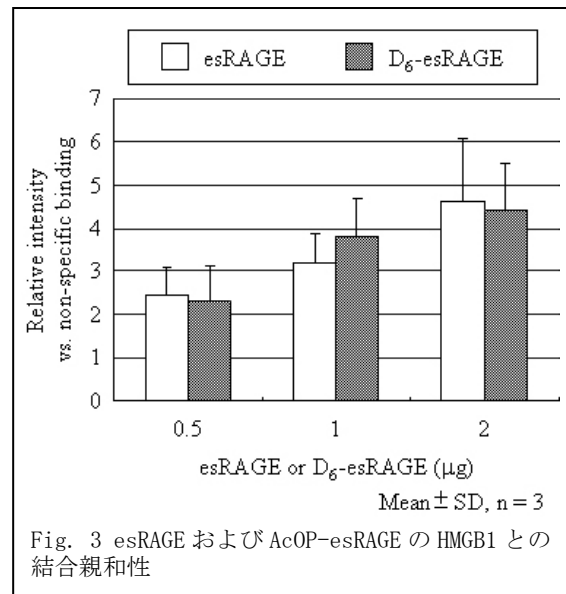


(2) esRAGE および AcOP-esRAGE の組織分布: マウス大腿骨骨端部において、esRAGE は投与 24 時間後骨髄への分布が認められるが、72 時間後ではほとんど認められなかった (Fig. 2)。AcOP-esRAGE は投与 24 時間後に骨髄への分布が認められ、さらに石灰化部表面への吸

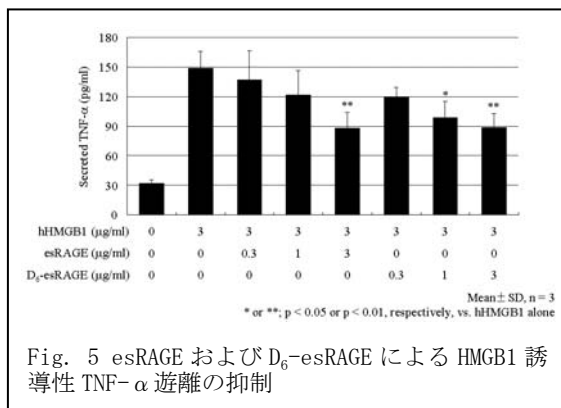
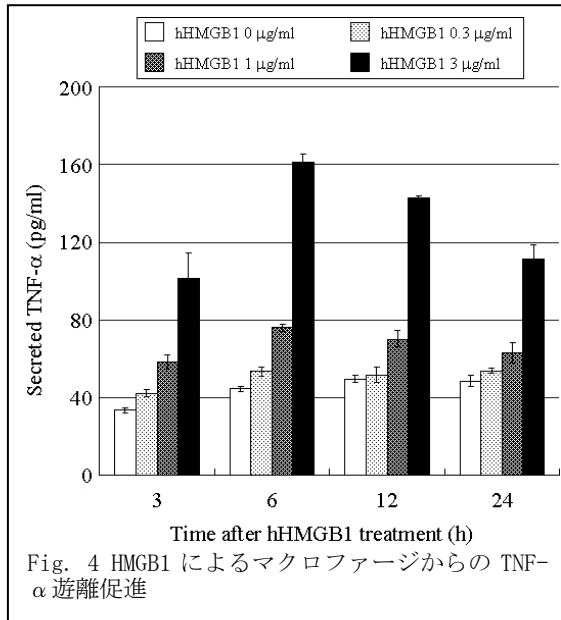
着が観察された。AcOP-esRAGE は、投与 168 時間が経過した後も石灰化部への蓄積が認められた。このことから AcOP-esRAGE は、投与後少なくとも 1 週間は骨へ蓄積し、骨において長時間薬理作用を発揮するものと考えられる。また、AcOP を構成するアスパラギン酸の数によって骨動態に顕著な変化が認められなかったことから、以降の実験はアスパラギン酸 6 つから成る AcOP を共役させた esRAGE (D₆-esRAGE) を用いた。肝臓および腎臓においては esRAGE と AcOP-esRAGE の分布に顕著な差は認められなかった。



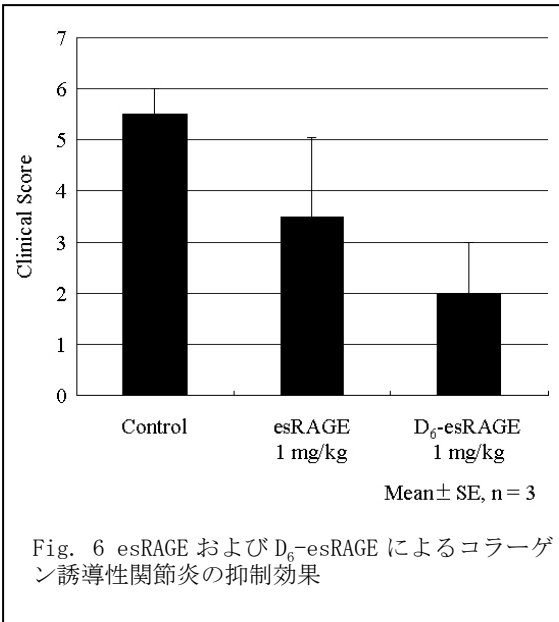
(3) HMGB1 との結合親和性: esRAGE および D₆-esRAGE はいずれも HMGB1 に対してほぼ同等の結合親和性を有していた (Fig. 3)。



(4) HMGB1 による TNF- α 遊離促進と esRAGE および D₆-esRAGE による阻害: HMGB1 は、マクロファージからの TNF- α 遊離を濃度依存的に促進した。マクロファージ培養上清中の TNF- α 量は HMGB1 を作用させてから6時間で最大に達し、その後徐々に減少していった (Fig. 4)。HMGB1 3 μ g/ml を作用させることによって促進した TNF- α 遊離は、esRAGE および D₆-esRAGE 3 μ g/ml の併用によって 50% 抑制された (Fig. 5)。



(5) コラーゲン誘導性関節炎に対する esRAGE および D₆-esRAGE の治療効果: ウシ II 型コラーゲンによって誘導される関節炎を下記のようにスコア化した (0: 変化なし、1: 1 指または複数指の腫脹、2: 全体にみられる発赤・腫脹、3: 全体にみられる強度の発赤・腫脹)。四指指跡のスコア合計は、最初のコラーゲン投与から 5 週目でおおよそ 5.5 であり、esRAGE 投与群では 3.5 であった。D₆-esRAGE 投与群では 2.0 であり、esRAGE 投与群と比較すると病勢がマイルドであった。



結論として、AcOP を共役させることによって esRAGE の薬理活性を減弱させることなく、骨移行性を上昇させることが可能であった。In vivo での AcOP-esRAGE の RA 治療効果については、さらなる検討が必要であるが、予試験的に治療効果が上昇する傾向が確認された。

本研究では、AcOP を esRAGE の関節リウマチ治療効果改善のために用いたが、他の関節リウマチ治療薬への応用も可能であると考えられる。AcOP を用いた薬物の骨ターゲティングに関する報告は国内外でも少なく、特に RA 治療薬に関する報告はない。関節リウマチ治療における骨ターゲティングの有用性を実証したことは、インパクトの大きな成果である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- Ishizaki J, Waki Y, Takahashi-Nishioka T, Yokogawa K, Miyamoto KI: Selective drug delivery to bone using acidic oligopeptides. J Bone Miner Metab, 27: 1-8, 2009, 査読有
- Takahashi T, Yokogawa K, Sakura N, Nomura M, Kobayashi S, Miyamoto K: Bone-targeting of quinolones conjugated with an acidic oligopeptide. Pharm Res, 25: 2881-2888, 2008, 査読有

3. Takahashi-Nishioka T, Yokogawa K, Tomatsu S, Nomura M, Kobayashi S, Miyamoto K: Targeted drug delivery to bone; pharmacokinetic and pharmacological properties of acidic oligopeptide-tagged drugs. Curr Drug Discov Technol 5: 39-48, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計1件)

高橋 達雄、関節リウマチ治療効果増強を目指した可溶性 RAGE の骨ターゲティング、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 達雄 (TAKAHASHI TATSUO)

北陸大学・薬学部・助教

研究者番号：50445904

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：