

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08380

研究課題名(和文)血液凝固第IX因子由来ペプチドの血管保護作用

研究課題名(英文)Activation peptide of coagulation factor IX protects vascular endothelial cells

研究代表者

日だい 智明(HIDAI, Chiaki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70228732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非活性型の血液凝固第IX因子(F9)には血管透過性抑制作用がある。この活性はF9の activation peptideに局在しており、化学合成ペプチド(F9-AP)の静脈内投与は敗血症モデルや脳挫傷モデルで治療効果を示す。本研究では、脳挫傷モデルにおいて、F9-APの投与によりc-fosやVEGFなどの急性反応物質や炎症のマーカー遺伝子が増加していることが分かった。一方、血管内皮細胞を用いた実験では、F9-APはIL6やトロンピンなど複数のリガンドによるシグナルを同時に抑制し、機序として脂質ラフトの関与が推察された。さらに、脳梗塞モデルでもF9-APによる梗塞巣の縮小が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞の治療では、発症から6時間以内の血流再開が虚血による一次的障害を抑制し、予後の改善に有効であると知られているが、その条件で病院にたどり着ける患者は全体の10%に満たない。一方、脳梗塞は、脳外傷同様に炎症による二次的障害が臨床上重要な意味を持つので、それを防止できるF9-APは、新たな脳梗塞の治療戦略の存在を示唆している。また、F9-APの抗炎症作用は、これまで知られている、NSAID、ステロイド、免疫抑制剤と異なる機序による可能性が高い。COVID19による肺炎など、炎症反応は未だ十分にはコントロールできていない反応であり、本研究の成果は新しい抗炎症薬の発明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been found that an inactive coagulation factor IX (F9) inhibits vascular permeability. This activity is localized to the activation peptide of F9, and intravenous administration of a chemically synthesized peptide (F9-AP) showed therapeutic effects in sepsis and brain contusion models. In this study, we investigated the mechanism of action of F9-AP. In the brain contusion model, acute reactants such as c-fos and VEGF and marker genes of inflammation were increased, which could not be considered as simple inhibition of inflammation. On the other hand, in experiments using vascular endothelial cells, F9-AP simultaneously suppressed signals from multiple ligands such as IL6 and thrombin, suggesting the involvement of lipid rafts as a possible mechanism. F9-AP-induced reduction of infarct nests was also observed in a cerebral infarction model.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脳梗塞 炎症反応 血液凝固因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) F9-AP の抗炎症作用

従来、敗血症、Disseminated Intravascular Coagulation Syndrome (DIC)、Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)、動脈硬化、虚血などの重要疾患で、炎症と凝固の密接な関係が指摘されてきた。凝固反応は炎症性サイトカイン分泌を刺激し、炎症は血管内皮細胞を刺激して凝固を促進する。二つの病態は違いに増強しあう関係にあり、positive feedback loop を形成するためにコントロールが困難である。今年、世界的な問題となった新型コロナウイルスの重症患者では、炎症反応と凝固反応の亢進が中心的病態であり、この分野において我々が十分な治療方法を持たない事が明らかになった。

F9-AP は血管内皮の透過性を維持するペプチドである。FIX は普段は流血中を循環しているタンパクで、創傷の刺激が加わると一部 (activation peptide) が切断されて活性化し、血液を凝固させる。我々は、非活性型の凝固第9因子 (FIX) や、その activation peptide が血管内皮の透過性を抑制することを発見した。また、化学合成した当該ペプチド (F9-AP) を静脈内投与することにより、敗血症モデルでの肺水腫や脳外傷モデルでの脳浮腫が改善することを示した。

F9-AP による治療は、脳外傷モデルで脳浮腫を抑制しただけでなく、外傷後の炎症による二次的損傷を著しく抑制して神経機能を改善した。脳外傷モデルでは止血・凝固反応と炎症反応が複雑に関連して脳損傷が進行する。このような止血・凝固と炎症が亢進した状態では、多くの細胞や分子がネットワーク様に刺激し合い、複雑な反応が起きている。F9-AP には、このような複雑な病態を示す他の疾患への効果も期待できる。

F9-AP は広範囲の反応を同時に抑制する可能性がある。培養細胞を用いた *in vitro* の実験において、F9-AP の添加により、Cholera Toxin beta subunit (CTXB) で染まるクラスター化した lipid raft が減少した。lipid raft は多くの膜受容体が集まる細胞膜上の構造であり、その減少は複数の受容体を介する反応を同時に抑制すると推察される。敗血症や脳外傷の様な複雑な病態を示す疾患モデルに対して F9-AP が有効なのは、止血・凝固反応の抑制 (抗凝固薬や抗血小板薬) と炎症反応の抑制 (副腎皮質ステロイド) といった個々の反応への対応ではなく、多くの反応を同時多発的に抑制するからかもしれない。

F9-AP は inflammaraft を標的にしていると推察される。inflammaraft は、Yaksh 等が、神経膠細胞を用いた炎症反応の研究の結果から提唱した概念である。炎症に関連する受容体 (例えば、INF gamma 受容体や TLRs) が密集して共存している raft (inflammaraft) が存在し、その raft の形成を阻害することで複数のシグナルを同時に抑制できる。リガンドと受容体の結合をシグナルのスイッチに例えるなら、raft での受容体間相互反応は増幅器に相当すると考えられ、raft 形成の抑制により過剰反応のみ抑制されることが期待される。実際、F9-AP を正常ラットや脳外傷モデルに使用した際に、肉眼的観察でも、血液検査でも、有意な変化は認めなかった。

(2) 脳梗塞

脳梗塞は、脳外傷同様に、炎症による二次的障害が臨床上重要な意味を持つので、F9-AP による治療効果が期待される。脳梗塞の発症から 4.5 時間以内に tPA の静脈内投与による血流再開が成功すれば、虚血による一次的障害が抑制され、予後の改善に有効とされている。しかし、医療機関を受診するまでに時間がかかってしまう、脳出血がある場合には使用できない等の理由により、この治療を受けるのは脳梗塞患者の 5% と言われている。そのため、F9-AP の投与により、虚血後の二次的障害が抑制されれば、臨床的意味は大きい。

脳梗塞の予後を左右する転写因子として STAT3 が注目されている。STAT3 は炎症反応、虚血への反応、創傷治癒に必須のタンパクであり、それらの反応の最も上流に存在する転写因子である。脳虚血モデルを用いて STAT3 と予後への関与を評価した研究は 10 を越えるが、STAT3 が脳梗塞の予後を改善するのか悪化させるのか定まっていない。それらの研究によれば、発症後 3 日以降の治癒過程では STAT3 は予後を改善するが、それ以前の急性期では脳内の細胞の種類や STAT3 のリン酸化部位により効果が変わる。脳外傷モデルでは、F9-AP の投与は、受傷後 1-3 日間に効果を発揮した。従って、受傷後 1-3 日に起こる二次的障害は、チロシンリン酸化 STAT3 の細胞内動態が鍵を握っている可能性がある。

2 . 研究の目的

(1) F9-AP の作用機序の解明

本研究の目的の一つは、炎症の制御に F9-AP がどのように関わっているかの解明である。以前から F9-AP が raft のクラスター化を阻害することは分かっていたが、raft は多くのシグナルの共通経路であることから、その阻害には危険が予想され、raft 形成の阻害が F9-AP の作用メカニズムである可能性は低いと考えられた。しかし、神経免疫学の知見が集積されることによって inflammaraft の概念が提唱され、この仮説に真実味が出てきた。raft を標的とする治療法の長所は同時に複数のシグナルを抑制できることであり、疾患の責任分子を見つけて抑制する従来の方法とは異なる治療戦略と言える。本研究では、細胞や疾患モデルにおいて、F9-AP が細胞のシグナル伝達や生体の遺伝子発現に及ぼす影響を解析し、F9-AP の作用機序を解明する。

(2) F9-AP の脳梗塞への治療効果

二つ目の目的は、F9-AP が脳梗塞の有効な治療法になる可能性の追求である。ラットの脳梗塞モデルを作成し、F9-AP の静脈注射が脳梗塞巣のサイズを縮小することができるかどうかを検討する。

3 . 研究の方法

(1) 脳挫傷モデルラットの遺伝子発現解析

当初、脳梗塞モデルラットで遺伝子発現解析を行う予定であったが、良い標本ができるまでに時間がかかったため、研究を進めるために F9-AP の治療効果が確認されている脳挫傷モデルラ

ットを用いて RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行なった。

(2) 培養血管内皮細胞での細胞内シグナル伝達

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いて、F9-AP が、炎症性サイトカインの IL-6 と、血液凝固産物であるトロンビンの両方のシグナル伝達を抑制するかどうかを確認した。また、raft への影響についても検討した。

(3) 脳梗塞モデルラットへの治療効果

脳梗塞の作成には、光化学刺激血栓作成法を用いた。この方法では、Rose Bengal 色素を静脈内投与した後、局所の血管に緑色光を照射することにより血管内皮を障害し、照射部位に血栓を形成する。これにより中大脳領域に脳梗塞を作成することができる。脳梗塞作成 6 時間後に F9-AP を静脈内投与し、24 時間後に梗塞巣のサイズを評価した。

4. 研究成果

(1) 脳挫傷モデルラットの遺伝子発現解析

パイロット・スタディとして外傷を加えた脳組織の RNA シークエンスを行ったところ、F9-AP の投与により以下のような変化が認められた。F9-AP を投与された脳は、抑制されているというより、むしろ活性化されていた。

IL6、IL11、LIF (leukemia inhibitory factor) の発現は外傷で増加し、F9AP でさらに著名に増加していた。

BDNA、NGF、VGF、BMP8b などの神経保護的な成長因子の著名な増加や、その他の成長因子 (VEGF、FGFs、TGFbs など) の増加が認められた。また、神経幹細胞の増殖に必要な Wnt1 も著増していた。

IEG の発現は刺激後数時間でピークに達した後、元に戻るが、F9AP の投与により cFos、FosB、cJun、JunB、EGR1-3、Arc などの IEG の発現が遷延し、著名に増加していた。

これらの結果は、F9-AP は炎症反応から増殖反応へスイッチするという仮説を示唆している。IL6、IL11、LIF は炎症にも増殖にも寄与する。傷害組織への血流の回復により F9-AP が供給され、増殖・治癒へのスイッチが入ると推察された。

F9-AP を投与された脳で、cFos、FosB、BDNF の発現が著増していたことから、CREB による転写が活性化していると考えられた (Steven et al. Cellular & Molecular Life Science 2020 77 4049)。CREB による転写活性は、アセチル化などのエピジェネティックな制御を受けることが知られている。脂質ラフトのクラスタリング阻害と CREB による転写を結びつける分子として HDAC (histone deacetylase) が浮上した。HDAC6 と 7 は、脂質ラフトと細胞質の間を移動する。F9-AP 投与による IEG や BDNF の持続的高発現は HDAC の細胞内局在によって調節されていると推察している (Singh et al. Neuropsychopharmacology 2018 43 1)。

炎症は治癒にとって必要なプロセスである。既存の抗炎症剤である NSAID やステロイドの投与は治癒を抑制することがあり、必ずしもよい治療結果をもたらさない。F9-AP は、特に脳において強力な治療効果を示す新しいタイプの抗炎症剤として効果を発揮する可能性がある。

(2) 培養血管内皮細胞 (HUVEC) での細胞内シグナル伝達

トロンビン刺激は、細胞の Rho-ROCK 系を刺激し、最終的にアクチンファイバーの形成を促進する。F9-AP を培養液に加えると、この反応は抑制された。

炎症性サイトカイン IL-6 は、JAK-STAT 系を刺激し、転写因子である STAT3 のリン酸化を誘導し、STAT3 の核内への移行を促進する。F9-AP の添加は、STAT3 の核への移行を抑制し、細胞質内に分布するようになることが発見された。また、この効果は、STAT3 のリン酸化とは無関係であることが確認された。もともと、炎症に関わる遺伝子の転写を上げる転写因子として注目されてきた STAT3 であるが、細胞質内ではミトコンドリアの機能を亢進させると考えられている。これは、F9-AP の神経保護作用や、増殖促進作用を裏打ちする結果と推察される。

methyl- β -cyclodextrin による脂質ラフトの形成阻害によって、上記の F9-AP の効果と同様な現象が観察されたことから、F9-AP は脂質ラフトの形成阻害を通じてこれらの活性を発揮する可能性が示唆された。

(3) 脳梗塞モデルラットへの治療効果

梗塞作成後 6 時間の脳梗塞ラットに F9-AP を静脈内投与して、脳梗塞巣のサイズを測定した。その結果、コントロール群では $32.4 \pm 2.2 \text{ mm}^3$ 、F9-AP 治療群では $16.3 \pm 2.6 \text{ mm}^3$ であり、F9-AP の静脈内投与は有意に梗塞巣のサイズを縮小した。また、実体顕微鏡による観察では脳出血は認められなかった。臨床的には、梗塞発症時から 4.5 時間以内に tPA による血栓溶解療法を行えば有効であるが、実際に治療を受けられるのは脳梗塞患者の 5% と報告されている。F9-AP の静脈内投与は、血栓溶解療法の恩恵を享受できない 95% の患者にとっての新たな治療法となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuusuke Fujiwara , Hisataka Kitano , Takamitsu Yamamoto , Shinichiro Kokubun , Chiaki Hidai	4. 巻 569
2. 論文標題 Activation peptide of coagulation factor IX improves the prognosis after traumatic brain injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 35-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.089.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoh Masaoka, Hisataka Kitano , Yuusuke Fujiwara, Kazuhiro Komiyama, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai
2. 発表標題 Suppression of multiple signaling pathways by a peptide that inhibit clustering of lipid rafts
3. 学会等名 American Society of Cell Biology（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗炎症剤及び医薬組成物	発明者 日台智明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-191421	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------