

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890019

研究課題名（和文）プラスミノゲン活性化抑制因子阻害薬を用いたマクロファージ浸潤炎症誘発機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of molecular mechanisms of the inflammatory macrophage migration by using a small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1.

研究代表者

市村 敦彦（ICHIMURA ATSUSHIKO）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10609209

研究成果の概要（和文）：本研究によって、既已取得している PAI-1 阻害薬開発候補化合物がマクロファージ浸潤及びそれに伴う組織の炎症を抑制出来ることを示し、炎症性疾患に対する治療効果とその分子機構を解明することを見出した。PAI-1 がマクロファージを誘引する分子機構を明らかとし、PAI-1 阻害薬の新たな薬効を発見した。これらの結果から、PAI-1 阻害薬が新しいクラスの抗炎症・抗腎臓病薬としての可能性を持っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Our findings demonstrated that a small molecule PAI-1 inhibitor represents a novel class of anti-inflammatory agents targeting M $\phi$  migration by the inhibition of the interaction of PAI-1 with low-density lipoprotein receptor-related protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：薬理学 免疫学 炎症 マクロファージ PAI-1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プラスミノゲン活性化抑制因子 (PAI-1) は、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) の活性を阻害し、線溶系を抑制する蛋白である。PAI-1 は血管壁内皮細胞および肝臓から放出される線溶阻止因子であり、血栓溶解時には、PAI-1 が t-PA と複合体を形成して t-PA の活性を消失させ、プラスミン産生を抑制することで線溶を抑制する。プラスミンは血栓溶解のみならず、組織破壊と修復、細胞の移動、血管新生、動脈硬化といった様々な重要な生理機能や病態に

も関与している。PAI-1 欠損マウスを解析した複数の報告から、PAI-1 の欠損が抗炎症、骨髄再生、抗線維化といった効果を持つことが明らかになった。更に近年、マクロファージが炎症組織へと浸潤する際、細胞をフィブリンから脱離させる役割を担っていることが報告された (EMBO J. 2006)。PAI-1 欠損マウス由来のマクロファージでは遊走活性が失われることから、マクロファージの浸潤において PAI-1 が必須の因子の一つであることが示されている。これらの知見から、PAI-1 の低分子化合物による阻害によって、PAI-1

欠損により見られた病態治療・寛解効果、特にマクロファージの浸潤阻害による炎症阻害効果を得られると推測される。

(2) 当研究室ではこれまで、経口投与可能な PAI-1 阻害薬の開発に取り組んできた。In silico スクリーニングと複数の新規化合物合成の結果、ラットやサル of 血栓症モデルで抗血小板薬 clopidogrel と同等以上の抗血栓作用を有する開発候補品を複数得ている。PAI-1 の X 線構造を基にした in silico 探索によりヒット化合物を取得し、抗血栓作用を動物で証明した。そこで、構造最適化を実施し、新規誘導体を合成した。その中から安全性薬理試験、遺伝毒性試験、一般毒性試験などですぐれたプロファイルを示す化合物の取得に成功した。現在、開発候補品としてさらに構造最適化を展開し、約 400 の新規化合物から、さらに優れた医薬品開発候補化合物として有望な化合物を取得している。

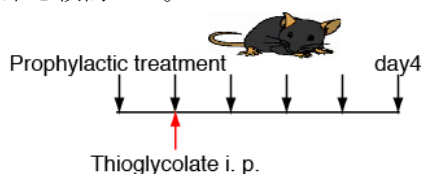
## 2. 研究の目的

本研究の目的は、既に取得している PAI-1 阻害薬開発候補化合物(TM5275)がマクロファージの遊走と組織浸潤及びそれに伴う組織の炎症を抑制出来ることを示し、炎症性疾患モデルに対する治療効果とその分子薬理的メカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の手法を用いて研究を行った。

(1) in vivo マクロファージ遊走モデルによる腹腔内マクロファージの浸潤抑制効果を検討した。



上図に示す通り、チオグリコレート培地投与一日前から PAI-1 阻害薬 TM5275 を 10 または 100mg/kg で一日一回経口投与した。チオグリコレート培地を腹腔内に投与後、4 日目における腹腔内の集積細胞を、冷 PBS で wash することで回収し、計量した。

(2) in vitro トランズウェルを用いたマクロファージ遊走評価実験における、PAI-1 阻害薬の遊走阻害効果を検討した。ヒト単球様細胞株である THP-1 をホルボールエステルで刺激し、マクロファージ様に分化誘導した細胞を用いて実験を行った。分化誘導後の THP-1 細胞を、溶媒 (DMSO) のみまたは PAI-1 阻害薬 (TM5275, 0, 1, 10 $\mu$ M) で刺激し、30 分間プレインキュベートした。その後、3 $\times$ 10<sup>4</sup> 個程度の細胞をトランズウェルの上部に播種した。トランズウェル下部には組み

換え PAI-1 タンパク質を溶解した RPMI1640 培地をおき、24 時間培養した。トランズウェル下部へと移動した細胞を固定し、染色した後顕微鏡下で 1 ウェルあたり 4 視野カウントし、その平均値を比較定量した。

(3) PAI-1 の結合する分子の探索により、マクロファージ遊走を惹起する分子メカニズムの解明を試みた。PAI-1 は、t-PA/u-PA, ビトロネクチン、LRP1 といった複数の分子との相互作用が報告されていた。これらの内、どの分子との相互作用がマクロファージ遊走惹起に重要であるかを解明するため、それぞれの分子との相互作用のみを失った変異体組み換え PAI-1 タンパク質を用いて、トランズウェルによる in vitro 遊走実験を行った。先述同様にトランズウェル上部に分化誘導後の THP-1 を播種し、下部には各変異体組み換え PAI-1 タンパク質を溶解した RPMI1640 培地をおいた。24 時間培養後に、トランズウェル下部へと移動した細胞をカウントした。

(4) PAI-1 が LRP1 との相互作用によりマクロファージの遊走を惹起していることが明らかとなったことから、PAI-1 阻害薬により PAI-1 と LRP1 の直接相互作用を阻害できるか否かを検討した。ELISA プレート上に組み換え LRP1 タンパク質をコートし、3%BSA 溶液で 37 $^{\circ}$ C 1 時間ブロッキングを行った後、Alexa488 で蛍光標識した組み換え PAI-1 タンパク質を加えてインキュベートした。この際、10 $\mu$ M の PAI-1 阻害薬または溶媒 (DMSO) のみで 37 $^{\circ}$ C 1 時間のプレインキュベートを行った。インキュベート後に蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定して比較した。

(5) ラット抗 Thy1 腎炎モデルにおける in vivo 抗炎症効果を検討した。SD ラットに対して抗 Thy1 抗体を 1mg/kg B. W. で投与し、腎炎を惹起した。この際、TM5275 30mg/kg B. W. または溶媒 (0.5% カルメロースナトリウム) のみを抗体投与一日前から一週間後まで一日一回経口投与した。抗体投与 -1, 1, 3, 5, 7 日目における尿を採取し、尿中のタンパク質量を定量した。また、抗体投与 7 日目において解剖を行い、腎臓組織及び血液を採取した。腎臓の病理サンプルを HE 染色、Masson's Trichrome 染色、PTAH 染色、Wt-1 及び Des の免疫染色を行うとともに、腎臓における遺伝子の発現を比較し、薬効発揮の分子メカニズムを解析した。

## 4. 研究成果

(1) チオグリコレート投与時、腹腔内の PAI-1 量が優位に増加していること、及び、PAI-1 阻害薬投与によりこれが抑制されるこ

とを見出した(図 1)。また、PAI-1 阻害薬の経口投与により、陽性対照のステロイド薬であるデキサメタゾンと同等に、腹腔内に集積するマクロファージの浸潤を抑制出来ることを見出した(図 2)。

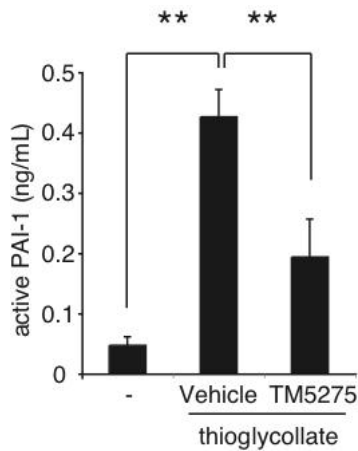


図 1. チオグリコレート腹腔内投与時における活性型 PAI-1 量及び、PAI-1 阻害薬経口投与による影響。\*\*, P<0.01 vs Vehicle

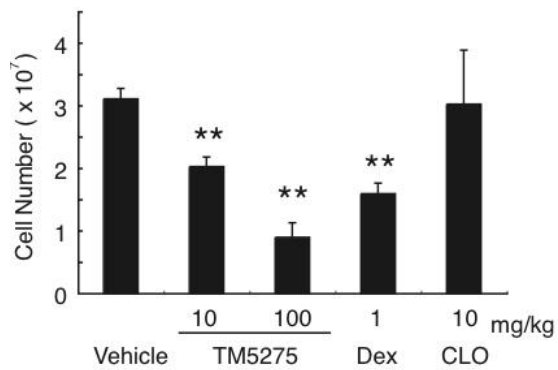


図 2. チオグリコレート投与により集積したマクロファージの数に対する PAI-1 阻害薬の影響。Dex: デキサメタゾン, CLO: クロビドグレル, \*\*, P<0.01 vs Vehicle

(2) トランズウェルを用いた in vitro マクロファージ遊走実験において、PAI-1 が直接マクロファージの遊走を惹起すること、またこれが PAI-1 阻害薬のプレトリートにより阻害されることを見出した(図 3)。PAI-1 阻害薬の遊走阻害効果は容量依存的であった。

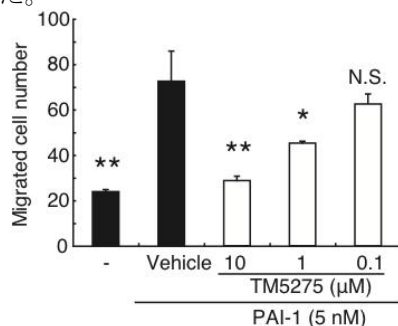


図 3. PAI-1 により惹起されるマクロファージ遊走量および、これに対する PAI-1 阻害薬の影響。N.S.: not significant, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01 vs Vehicle

(3) 変異体 PAI-1 を用いた遊走実験から、LRP1 との相互作用能のみを持たない R76E 変異体でのみマクロファージ遊走が惹起されないことを見出した(図 4)。これらの結果から、PAI-1 とマクロファージ膜上に存在する LRP1 が相互作用することで、遊走が惹起されることが示された。

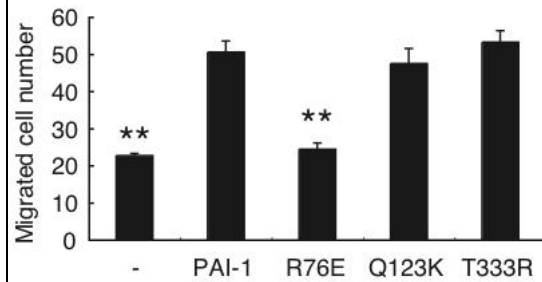


図 4. 変異体組み換え PAI-1 タンパク質によるマクロファージ遊走惹起能。R76E: LRP1 との相互作用能のない変異体 PAI-1, Q123K: ビトロネクチンとの相互作用能のない変異体 PAI-1, T333R: t-PA/u-PA との相互作用能のない変異体 PAI-1, \*\*, P<0.01 vs PAI-1

(4) PAI-1 阻害薬は PAI-1 と LRP1 の直接相互作用を阻害できることが明らかとなった(図 5)。すなわち、先の結果を合わせると、PAI-1 阻害薬は PAI-1-LRP1 直接相互作用を阻害することにより、マクロファージの遊走惹起を阻害していることが示唆される。

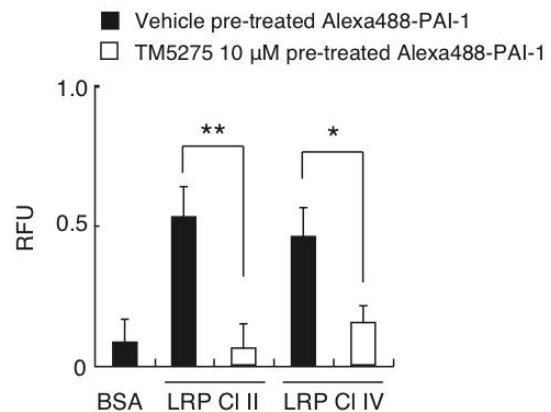


図 5. PAI-1 および LRP1 直接相互作用に対する PAI-1 阻害薬の影響。LRP C1 II: LRP1 クラスター-2, LRP C1 IV: LRP1 クラスター-4, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01 vs Vehicle pre-treated Alexa488-PAI-1

(5) 抗 Thy1 腎炎モデルにおける PAI-1 阻害薬の経口投与により、PAI-1 の腎臓における発現が抑制され、それとともにマクロファージマーカー遺伝子の発現および糸球体へのマクロファージ浸潤が抑制された(図 6)。また、組織学的解析により、腎臓における微小血栓の形成やフィブリン沈着も優位に抑制され、上皮細胞の傷害マーカーの発現抑制が観られた。これらの結果から、PAI-1 阻害薬の経口投与により、腎炎が寛解していることが示された。また、そのメカニズムはマクロファージの浸潤抑制による抗炎症効果のみならず、線溶系の亢進による血栓形成と線維化の抑制効果や、上皮細胞の保護効果によって複合的に得られていることが示唆された。

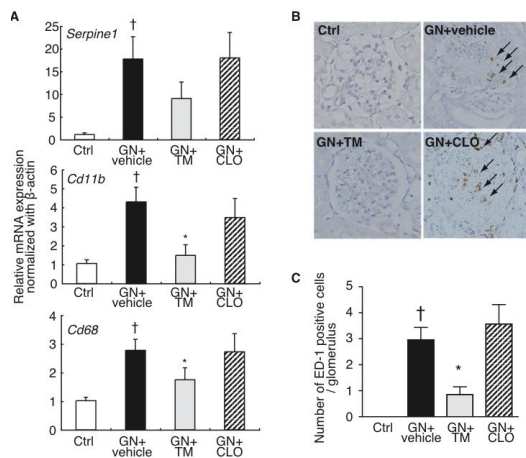


図6. ラット抗 Thy1 腎炎モデルでの PAI-1 阻害薬の効果。A 腎臓における PAI-1 およびマクロファージマーカー遺伝子 (Cd11b, Cd68) の発現。Ctrl: 腎炎非惹起群, GN+Vehicle: 腎炎惹起、溶媒 (0.5%CMC) 投与群, GN+TM: 腎炎惹起、PAI-1 阻害薬投与群, GN+CLO: 腎炎惹起、クロピドグレル投与群 †,  $P < 0.01$  vs Ctrl, \*,  $P < 0.05$  vs GN+Vehicle B PAI-1 阻害薬の腎糸球体におけるマクロファージ浸潤への影響。抗 CD68 抗体による免疫染色像。矢印は CD68 陽性細胞。C 糸球体あたりの CD68 陽性細胞数。1 個体当たり 50 個の糸球体について調べ、その平均値を示す。

以上の結果から、PAI-1 阻害薬は、PAI-1-LRP1 相互作用を阻害することによりマクロファージの遊走を阻害し、ラット腎炎モデルにおいて抗炎症・病態寛解効果を発揮することが明らかとなった。PAI-1 阻害薬は新たなクラスの抗炎症薬としての応用が期待される。

## 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 4 件)

1. **Ichimura A**, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Epub ahead of print. 2013 doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301224. 査読有り
2. Hara T, Hirasawa A, **Ichimura A**, Kimura I, Tsujimoto G. Physiological functions of fatty acid receptors and their therapeutic potential. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 140:275-279, 2012 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/140/6/140\\_275/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/140/6/140_275/_article) 査読有り
3. **Ichimura A**, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choquet H, Besnard P, Lecoq C, Vivequin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffei C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Körner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Balkau B, Lévy-Marchal C, Rouskas K, Kouvatzi A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuk I, Tsujimoto G, Froguel P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 483:350-42012, 2012 doi: 10.1038/nature10798. 査読有り
4. Sofue T, Kiyomoto H, Kobori H, Urushihara M, Nishijima Y, Kaifu K, Hara T, Matsumoto S, **Ichimura A**, Ohsaki H, Hitomi H, Kawachi H, Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *Am J Hypertens*. 25:604-611, 2012 doi: 10.1038/ajh.2012.1. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. **Atsuhiko Ichimura**, Takashi Dan, Tadayuki Tsujita, Miyata Toshio. Generation of Glyoxalase 1-deficient mice 11<sup>th</sup> International Symposium on the

Maillard Reaction, 2012 September 18<sup>th</sup>,  
Nacy France

2. **市村敦彦**、段 孝、宮田敏男 グリオキサ  
ラーゼ 1 欠損マウスの創出  
第 21 回日本メイラード学会, 2011 年 10  
月 28 日, 東京ステーションコンファレン  
ンス 602, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市村 敦彦 (ICHIMURA ATSUHIKO)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10609209

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし