

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659263

研究課題名(和文) 抗炎症作用を持つタンパク質を利用した新たな抗炎症剤の In vivoでの検証

研究課題名(英文) In vivo validation of a novel anti-inflammatory peptide pharmaceutical

研究代表者

岡本 一起 (Kazuki, Okamoto)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40177085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、核内酸性タンパク質(MTI-II)は、炎症性転写因子NF- κ Bのコリプレッサーとして働き、強力な抗炎症作用を持つことを見いだした。MTI-IIを利用すれば、ステロイド薬と同じ作用機序で強力な抗炎症作用を持つが重篤な副作用を持たない新しい抗炎症剤が開発できる。そこで、MTI-IIを抗炎症剤として開発するために細胞内導入配列と融合させたMTI抗炎症剤を作製した。本研究の目的は、ステロイド薬の適応疾患(特にアレルギー性免疫疾患である花粉症や自己免疫疾患である関節リウマチ)でのMTI抗炎症剤の有効性を検証することである。

研究成果の概要(英文)：I have found a small nuclear acidic protein (abbreviated as MTI-II), which works as a co-repressor for NF- κ B and directly inhibits the transcriptional activity of NF- κ B. The MTI-II will become a good anti-inflammatory agent without severe side effects, instead of the steroidal anti-inflammatory drug (SAID). I constructed the fusion protein of MTI-II and the protein transduction domain (MAID) and showed that the MAID had the strong anti-inflammatory activity in vivo. The aim of this study is to verify practical effectiveness of the MAID on the SAID adaptation disease (the mite-antigens induced atopic dermatitis mice and the collagen-induced arthritis rats).

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：抗炎症剤 ステロイド薬 NF- κ B コリプレッサー バイオ医薬品 ペプチド医薬品

1. 研究開始当初の背景

(1) ステロイド薬 (グルココルチコイド・ホルモン) は、グルココルチコイド受容体 (GR) が炎症性転写因子 NF- κ B の転写活性を直接阻害することにより強力な抗炎症作用を発揮する (Mckay, L.I. et al. (1999) *Endocrine Reviews* 20, 435-459)。しかし、GR の抗炎症作用の仔細な分子機構は、未だ不明な点が多い (Murphy, S.H. et al. (2011) *PNAS* 108, 171171-17122)。

(2) 申請者は新しいタイプのコアクティベーター (MTI-II) を発見し (Okamoto, K. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 36986-36993)、これが GR と同様に NF- κ B の転写活性を直接阻害することを見いだした (特許番号 4,874,798 (日本) 7,932,226 (米国))。また、MTI-II は GR とは異なり、DNA に結合しないのでホルモン作用 (ステロイド薬の副作用) を発揮しない。そこで、MTI-II を抗炎症剤として利用できれば、ステロイド薬と同程度に強力に副作用の少ない抗炎症剤が開発できると考え、本研究の着想に至った。

(3) MTI-II は低分子量タンパク質で、そのままでは細胞内に取り込まれない。そこで、タンパク質細胞内導入配列を N 末端と C 末端に付加した 2 種類の MTI 抗炎症剤 (H11RM と HM11R) を作成し、炎症モデル

動物に投与して、その抗炎症作用を検討した。その結果、MTI 抗炎症剤は、カラゲニン足腫浮腫急性炎症モデルラット (図 1A) とクロトン油誘発結膜炎モデルラット (図 1B) でステロイド薬 (デキサメサゾン: Dex) と同程度に強力な抗炎症作用を持っていることが判った。さらに、ステロイド薬の主な副作用として血糖値上昇作用が知られているが、MTI 抗炎症剤は血糖値を上昇させなかった (図 1C)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**ステロイド薬の適応疾患での MTI 抗炎症剤の有効性** (抗炎症作用と副作用) を検証することにより、ステロイド薬より使いやすく、ステロイド薬に代わる新たな抗炎症剤を開発することである。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 抗炎症作用の測定: HeLa 細胞にレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子、 κ B-Luc2P) を導入し、TNF α 刺激後のルシフェラーゼの誘導とその抑制で抗炎症作用を測定した。

(2) *in vivo* 抗炎症作用の測定: 化学合成した MTI ペプチド抗炎症剤 (MPAID) (48 アミノ酸残基、後述) をダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎モデルマウスとコラーゲン誘導関節炎 (リウマチ) モデルラットにそれぞれ塗布投与 (16 日間毎日) と腹腔内投与 (29 日間毎日) し、各炎症モデルの炎症スコアを測定した。さらにステロイド薬の副作用の指標となる血液生化学的検査 (血糖値、白血球数、コルチコステロン濃度、肝逸脱酵素など) を実施した。

4. 研究成果

(1) 当初は細胞内導入配列を N 末端と C 末端に付加した 2 種類の MTI 抗炎症剤 (H11RM と HM11R) で検証する予定であったが、現状ではタンパク質の発現量が少なく、研究開発が十分に進められないことがわかった。そこで、MTI-II の抗炎症作用の作用中心となるアミノ酸領域を決定し、**化学合成できる長さの MTI ペプチド抗炎症剤 (MPAID) の開発を試みた。**その結果、酸性アミノ酸領域にタンパク質導入配列を付加したペプチドが、*in vitro* で全長の MTI-II と同程度強力に NF- κ B 活性を抑制することを確認した。

(2) 次に化学合成した MPAID の抗炎症効果をステロイド薬の適応疾患 (アトピー性皮膚炎とリウマチ) モデル動物で検証した。その結果、MPAID はダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎モデルマウス (図 2) とコラーゲン誘導関節炎 (リウマチ) モデルラット (図 3) で強力な抗炎症作用を発揮した。ステロイド

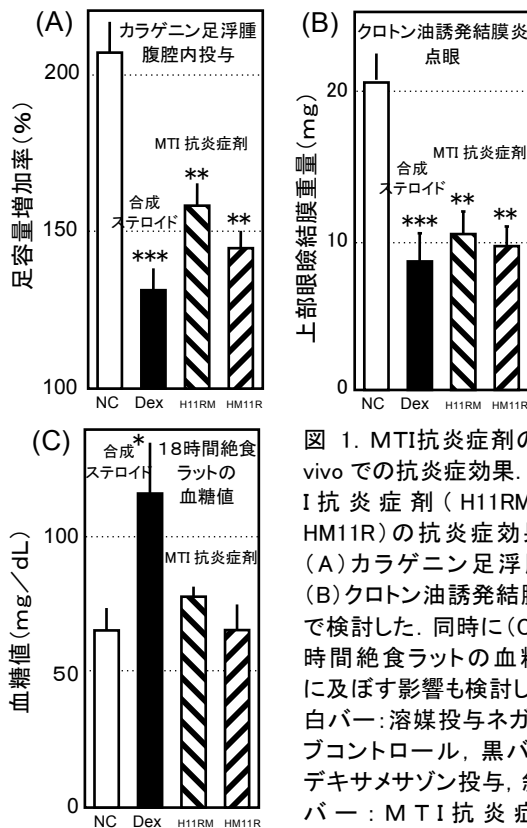


図 1. MTI 抗炎症剤の *in vivo* での抗炎症効果。MTI 抗炎症剤 (H11RM と HM11R) の抗炎症効果を (A) カラゲニン足浮腫と (B) クロトン油誘発結膜炎で検討した。同時に (C) 18 時間絶食ラットの血糖値に及ぼす影響も検討した。白バー: 溶媒投与ネガティブコントロール, 黒バー: デキサメサゾン投与, 斜線バー: MTI 抗炎症剤 (H11RM と HM11R) 投与。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. NC

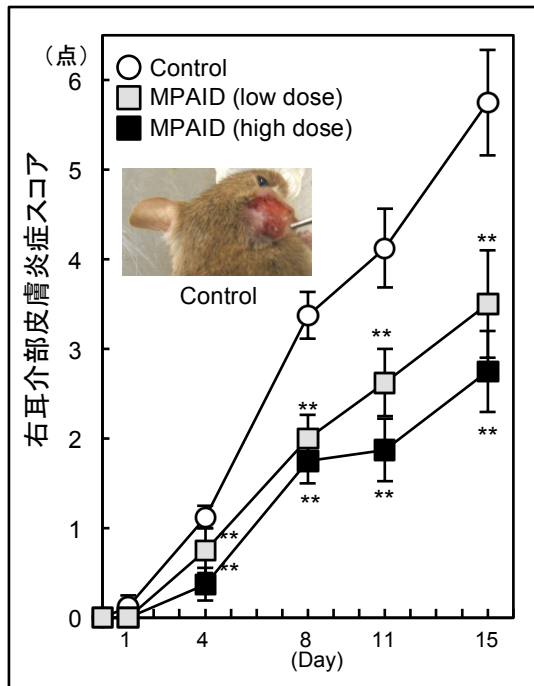


図2. MPAIDのアトピー性皮膚炎モデルマウスに対する抗炎症作用. NCマウスにダニ抗原を反復皮内投与することで右耳介部に慢性皮膚炎病態を惹起させた. これにMPAID (low dose: 0.2 mg, high dose: 1 mg) を塗布投与した. 抗原投与後の耳介部の皮膚症状をスコア化して縦軸に示した. * *: $p < 0.01$ vs. Control

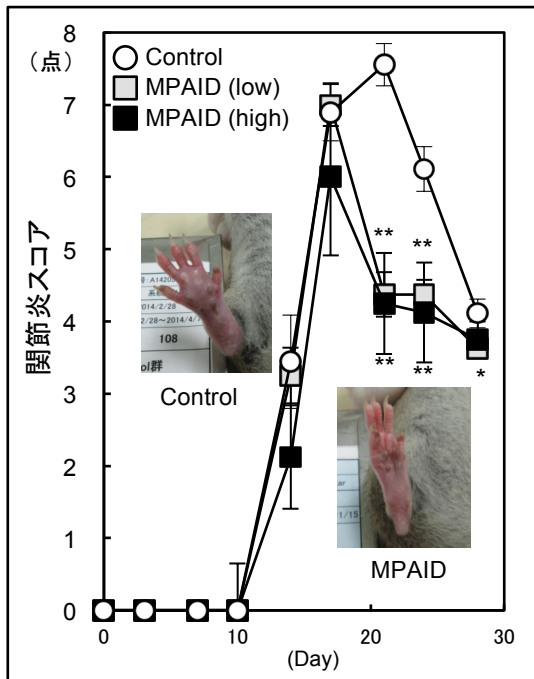


図3. MPAIDのⅡ型コラーゲン関節炎(リウマチモデル)ラットに対する抗炎症作用. DA/SlcラットをⅡ型コラーゲンで感作し, 関節炎を惹起させた. これにMPAID (low dose: 0.7 mg, high dose: 3.5 mg) を腹腔内投与した. 感作後の関節炎症状をスコア化して縦軸に示した. * : $p < 0.05$, * *: $p < 0.01$ vs. Control

薬の副作用の指標となる血液生化学検査(血糖値、白血球数、コルチコステロン濃度、肝逸脱酵素など)でMPAID投与群は溶媒投与群(ネガティブコントロール)の結果と同じ

であった。すなわち、MPAIDがin vivoで抗炎症効果を発揮すること、さらに副作用が少ないことがわかった。MPAIDはステロイド薬の長期投与が必要なアトピー性皮膚炎、リウマチなどに有効な薬となりうる。

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 1件)

- ① 岡本一起、三井寛之、加藤智啓、抗炎症療法における unmet needs. NF- κ B 阻害薬. 炎症と免疫、査読無し、21、2013、229-233

〔学会発表〕(計 6件)

- ① 岡本一起、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、加藤智啓、新しいタイプの核内レセプター・コアクティベーター (MTI-II) を利用した NF- κ B 阻害薬の開発、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館 (京都)
- ② 岡本一起、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓、ピリドキシンと協調して抗炎症作用を発揮する抗炎症タンパク質 MTI-II を利用した抗炎症剤の開発、日本ビタミン学会第 66 回大会、2014 年 6 月 13 日、姫路商工会議所 (姫路・兵庫県)
- ③ 岡本一起、表山和樹、飯塚進子、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、加藤智啓、グルココルチコイド受容体コアクティベーター (MTI-II) とビタミン B6 の共同的抗炎症効果、第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場 (神戸・兵庫県)
- ④ 岡本一起、表山和樹、飯塚進子、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、加藤智啓、新規の抗炎症タンパク質 MTI-II の抗炎症作用に対するピリドキシンの効果、日本ビタミン学会第 65 回大会、2013 年 5 月 17 日、一橋大学一橋講堂 (東京)
- ⑤ 岡本一起、表山和樹、飯塚進子、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、加藤智啓、グルココルチコイド受容体コアクティベーター (MTI-II) の新しい抗炎症薬としての利用、第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡・福岡県)
- ⑥ 岡本一起、飯塚進子、佐藤利行、有戸光

美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、
磯橋文秀、加藤智啓、グルココルチコイ
ド受容体コアクティベーター(MTI-II)の
ステロイド抗炎症作用における役割、日
本ビタミン学会第 64 回大会、2012 年 6
月 22 日、長良川国際会議場（岐阜・岐
阜県）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクタ
ー、形質転換体、NFκB 阻害剤、及び NFκB
亢進性疾患の治療剤

発明者：岡本一起

権利者：聖マリアンナ医科大学

種類：特願

番号：2014-257827

出願年月日：平成 26 年 12 月 19 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 一起 (OKAMOTO, Kazuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40177085

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：