

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659814

研究課題名(和文) リポソーム化ラクトフェリンを用いた新規慢性関節リウマチ予防法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic approach of rheumatoid arthritis with liposomalized lactoferrin

研究代表者

高田 隆 (Takata, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：10154783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：慢性関節リウマチ(RA)の新しい治療薬としてのリポソーム化ラクトフェリン(L-LF)の有効性を明らかにすることを目的とし、以下の結果を得た。

1. RA発症モデルマウスで観察される関節の破壊は、L-LFを前投与した群で有意に減少した。2. LFはTNF- α によってヒト滑膜細胞とマクロファージに誘導される炎症性サイトカインの発現をNF- κ BならびにMAP kinase経路の抑制を介して抑制した。3. L-LFの経口投与によって、Tregが増加しTh17が減少するとともに、血清中のIL-17が減少することが明らかとなった。以上の結果から、L-LFは関節リウマチの新しい治療薬となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Aim of the study was to clarify the effectiveness of liposomalized lactoferrin (L-Lf) as a new therapeutic agent of rheumatoid arthritis (RA). The following results were obtained.

1. Administration of L-Lf significantly reduced the joint destruction observed in RA model mice. 2. Lf inhibited expression of inflammatory cytokines induced in human macrophages and synovial cells by TNF- α . Through inhibition of the map kinase and NF κ B pathways. 3. By oral administration of L-Lf decreased Th17 and increased Treg populations, and reduced IL-17 level in serum. These results show that L-Lf could be used as a new therapeutic agent for RA.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：ラクトフェリン 関節リウマチ 骨破壊 炎症性サイトカイン リポソーム

1. 研究開始当初の背景

1 研究の学術的背景

ラクトフェリン(LF)は、抗菌作用、免疫賦活作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用などの多彩な機能を有し、種々の疾患に対して投与が試みられている。近年、リポソーム化により胃での消化を抑え、小腸での吸収率を高めたリポソーム化 LF を 1 週間経口投与したマウス単球の LPS 刺激による TNF- α 産生量が激減することが報告された。そこで、我々はリポソーム化 LF をリポポリサッカライド (LPS) 誘導歯周組織破壊モデルラットに 経口投与することにより、LPS の誘導する歯周組織での TNF- α 異常産生や歯槽骨破壊が著しく抑制されることを報告した (Lab Invest. 2010)。また、歯周炎患者にリポソーム化 LF を経口投与することによって歯周組織破壊の有意な改善がみられることも報告した (Biol Pharm Bull. 2010)。さらに、LF の抗炎症効果が様々な炎症性刺激の伝達に必須のタンパク質である TRAF6 の抑制を介していることを明らかにした (J Biol Chem. 2012)。一方、TNF- α の異常産生は歯周病と同様に軟組織の炎症とそれに近接する骨組織の破壊を特徴とする慢性関節リウマチでも症・進行のメカニズムとして注目されている。そこで、本研究では、LF が慢性関節リウマチの発症・増悪を TNF- α 産生抑制を介して抑制することで、予防・治療薬として用いことができるのではないかとこの着想に到った。

2. 研究の目的

本研究では、1) 慢性関節リウマチ自然発症マウスモデル (SKG マウス) を用い、LF 経口投与が慢性関節リウマチの発症・進行に及ぼす影響 2) T 細胞や滑膜細胞に対する LF の影響について詳細に検討し、予防・治療薬としての LF の応用の可能性について明らかにし、前臨床的なデータとすることを目的に以下の検討を行った。

3. 研究の方法

1. 関節リウマチ自然発症モデルマウス (SKG マウス) を用いた実験病理学的検討

1. 関節リウマチの作成

SKG マウスは関節リウマチ自然発症モデルマウスでの腹腔内に Mannan を投与することによって関節リウマチを誘発した。

2. 関節の臨床的評価

1) 関節の炎症を坂口らの方法 (J Clin Invest 114:582-588, 2004) に従って関節炎誘導開始時 (0 週) から 20 週まで週 1 回、経時的にスコア化し、比較検討した。

2) 関節の骨破壊を 20 週経過の時点でマイクロ CT にて評価する。3D-CT 像を作成し、骨密度、皮質骨、海面骨量を算出各群で比較検討した。

3) 組織学および免疫組織化学的評価

関節炎誘導後 5、10、20 週経過時の関節組織における炎症の程度、破骨細胞数や骨破壊

の程度を組織計測学的に評価するとともにサイトカイン発現を免疫組織化学的染色で比較検討した。

平成 25 年度

リポソーム化 LF の慢性関節リウマチの発症・進行 に対する抑制効果の実験病理学的検討

実験群にはリポソーム化 LF を 500、100、10 mg/kg/day となるように飲料水に混和し、関節炎誘導 1 週間前から経口投与し (LF-RA 群)、LF 非投与リウマチ群 (RA 群)、対照群 (Cont 群) と比較検討した。比較項目は、平成 24 年度の実験 1. と同様とした。さらに、in vivo における LF の体内動態を免疫組織化学的に検討した。

滑膜細胞株ならびにマクロファージを用いた LF 作用メカニズムの解明

1. LF 受容体の同定: 滑膜細胞およびマクロファージにおける LF 受容体を、LF 受容体候補の LRP-1、LRP-2、CD14 などを対象に検討した。

2. LF の細胞内動態: 細胞内に取り込まれた LF の示す動態について免疫染色ならびにウェスタンブロットング法にて経時的に明らかにした。

3. LF の抗炎症メカニズムの検討: LF の抗炎症メカニズムとしての LF と TRAF6 との結合についてウェスタンブロットング法にて調べるとともに、転写因子である NF- κ B 活性を ELISA 法にて定量することで、抗炎症作用について明らかにした。

4. 研究成果

上記のように、慢性関節リウマチモデルマウス (SKG マウス) を用いた in vivo の検討ならびに滑膜細胞やマクロファージなどを用いた in vitro の系で検討し、以下の結果を得た。1. リウマチ発症モデルマウスで観察される関節の腫脹ならびに関節の破壊は、L-LF を前投与した群では有意に減少することを肉眼的 (リウマチスコア)、画像的 (microCT) ならびに病理組織学的に確認した。2. 経口投与した L-LF は小腸から吸収され血行性に全身に分布することを確認した。3. ヒト滑膜細胞株を用いた検討の結果、LF は TNF- α の刺激によって滑膜細胞に誘導される炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかとなった。4. ヒト滑膜細胞に対する LF の効果は LF のレセプターである LRP-1 を介したものであることが明らかになるとともに、NF- κ B ならびに MAP kinase 経路の活性化の抑制を介して抑制することか明らかとなった。5. ヒトマクロファージを用いた検討においても、LF は TNF- α の刺激でマクロファージに誘導される炎症性サイトカインの発現を、NF- κ B ならびに MAP kinase 経路の活性化の抑制を介して抑制することが明らかとなった。6. いずれの細胞においても、LF は細胞内に取り込まれ、TRAF6 に結合することで、NF- κ B ならびに MAP kinase 経

路の活性化の抑制することが明らかとなった。7. L-LF の経口投与によって、Treg が増加し Th17 が減少するとともに、血清中の IL-17 が減少することが明らかとなった。

以上の結果から、L-LF は関節リウマチの発症・進行を抑制する新しい治療薬として用いられる可能性が示された。

なお、ヒト滑膜細胞が入手でき、マウスより良い in vitro の系として位置づけることができたので、当初計画したマウス由来の細胞の不死化は実施しなかった。また、マウスの関節滑液中のサイトカインの ELISA による解析は、繰り返し試みたが、関節液量が解析に足るだけ十分量採取することができず、意味のあるデータを集めることができなかった。

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2件)

1. Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, Yanagisawa S, Subarnbhesaj A, Chanbora C, Ayuningtyas NF, Ishikado A, Tanaka K, Takata Ta E, Takata T, Lactoferrin inhibits infection-related osteoclastogenesis without interrupting compressive force-related osteoclastogenesis. Arch Oral Biol 59(2):226-32. 2014. DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.11.002 (査読あり)

2. Kawazoe A, Inubushi T, Miyauchi M, Ishikado A, Tanaka E, Tanne K, Takata T, Orally administered liposomal lactoferrin inhibits inflammation-related bone breakdown with out interlaping orthodontic tooth movement. J Periodontol 84(10):1454-1462, 2013. DOI:10.1902/jop.2012.120508 (査読あり)

[学会発表](計8件)

1. Takata T, Oral administration of liposomalized lactoferrin inhibits bone resorption by periodontitis and other bone destructive diseases. 8th International Dental Collaboration of the Mekong River Region Congress (招待講演), 2013年12月05日～2013年12月06日, プノンペン、カンボジア

2. Inubushi T, Kosai A, Yanagisawa S, Chanbora C, Miyauchi M, Yamasaki S, Sugiyama E, Ishikado A, Makino T, Takata T, Bovine lactoferrin enhances osteogenesis through TGF- receptor signaling. International Association of Dental Research- Asia Pacific Region. 2013年10月06日～2013年10月10日、バンコク、タイ

3. Takata T, Inubushi T, Miyauchi M, Ishikado A, Makino T Oral administration of liposomal bovine lactoferrin is useful for prevention and control of periodontitis. XIth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications(招待講演), 2013年10月06日～2013年10月10日、ローマ、イタリア

4. Inubushi T, Kosai A, Yanagisawa S, Chanbora C, Miyauchi M, Yamasaki S, Sugiyama E, Ishikado A, Makino T, Takata T, Bovine lactoferrin enhances osteogenesis through TGF- beta receptor signaling. XIth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications. 2013年10月06日～2013年10月10日、ローマ、イタリア

5. 犬伏俊博、宮内睦美、敖敏、石角 篤、牧野武利、高田 隆、ラクトフェリンによる骨吸収抑制作用とその分子生物学的メカニズム 第56回春季歯周病学会、2013年05月31日～2013年06月01日、東京

6. 犬伏俊博、宮内睦美、敖敏、石角 篤、牧野武利、高田 隆、ラクトフェリンによる骨吸収抑制作用とその分子生物学的メカニズムの検討 第5回日本ラクトフェリン学会、2012年10月27日、東京

7. 西山今日子、犬伏俊博、宮内睦美、敖敏、石角 篤、牧野武利、高田 隆、ラクトフ

エリンはマクロファージのTNE-a産生を抑制
する 第5回日本ラクトフェリン学会、2012
年10月27日、東京

8. 犬伏俊博、宮内睦美、敖敏、石角 篤、牧
野武利、高田 隆、ラクトフェリンによる
骨吸収抑制作用とその分子生物学的メカニズ
ムの検討 硬組織再生生物学会 第5回日本
ラクトフェリン学会、2012年08月25日、名古
屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 隆 (TAKATA TAKASHI)
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授
研究者番号：10154783

(2) 研究分担者

宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・准教
授
研究者番号：50169265

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)
広島大学・大学病院・助教
研究者番号：10403627

犬伏 俊博 (INUBUSHI TOSHIRO)
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教
研究者番号：30550941