

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462214

研究課題名(和文) RANKL/RANKをターゲットにした炎症制御による新規脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic approaches in ischemic stroke targeting regulation of inflammation through RANKL/RANK signal

研究代表者

島村 宗尚 (Munehisa, Shimamura)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：60422317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞におけるリコンビナントRANKL(rRANKL)の治療効果をマウスで検討した。脳室内投与では5 ng、皮下投与では1 µgの複数回投与により脳梗塞の悪化を抑制でき、治療可能時間は発症より6時間以内であった。また、脳梗塞部位における炎症性サイトカインの発現も抑制されていた。しかし、rRANKLの皮下投与により骨密度の低下が報告されたため、経鼻投与による脳への投与を試みたところ、RANKLの発現は脳内で増加していたが、治療効果はなかった。以上より、脳室内投与あるいは破骨細胞を活性化しない方法での皮下投与であれば、rRANKLは脳梗塞の悪化を抑制できる新規治療法になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the possibilities of a novel therapy using recombinant RANKL (rRANKL) in ischemic stroke model in mice. The optimal dose of rRANKL for preventing exacerbation of stroke size and inflammation was 5 ng i.c.v. or 1 µg s.c. with repetitive injections, whose therapeutic window was 6 hrs after the insult. Expression of inflammatory cytokines was also inhibited in rRANKL-treated mice. However, we found that another group showed repetitive systemic injections of rRANKL caused osteoporotic changes in bone in mice. To avoid the side effects, we tried intranasal injection of rRANKL to achieve direct delivery of rRANKL in brain. rRANKL was successfully delivered to brain, but the therapeutic effects were not shown probably due to insufficient amount of delivered rRANKL. Thus, therapeutic application of rRANKL has been shown to be possible in intracerebroventricular injection or systemic injection with some modifications, which do not activate osteoclast.

研究分野：神経内科

キーワード：脳梗塞 マクロファージ ミクログリア 炎症 RANKL RANK OPG

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞の悪化を抑制する治療法として、脳梗塞後の炎症抑制をターゲットとする治療法の開発が試みられてきたが、現状では、ラジカルスカベンジャーであるエダラボンのみが臨床応用されている。しかし、エダラボンのみでは脳梗塞悪化の抑制効果が十分ではなく、作用機序が異なる新たな薬剤の開発が必要である。

そこで我々は脳梗塞の炎症に関わる新規分子の探索を進めてきたが、近年、脳梗塞における予後不良因子の一つに、血清中のOsteoprotegerin (OPG)値が高値である¹ことに着目した。OPGは Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)のデコイレセプターであり、RANKLに結合することによりRANKLのシグナルを調整している。RANKLは受容体であるRANKに結合するが、RANKはマクロファージに発現しており²、骨髄由来マクロファージではRANKLの刺激により、Toll-like受容体 (TLR) 2,4,9の下流にあるMyD88の発現が抑制され、炎症性サイトカインの発現が抑制される³。このことから我々は、RANKLが脳梗塞において炎症を抑制する方向に作用し、OPG高値の場合にはRANKLの作用が抑制されることにより炎症反応が抑制されず、脳梗塞が悪化することを予想した。そこで、マウス脳梗塞（一過性中大脳動脈閉塞）モデルで検討したところ、脳梗塞4-6時間後からOPG/RANKL/RANKのmRNAの発現量が脳梗塞部位で増加し、免疫染色ではF4/80陽性マクロファージおよびミクログリアにそれらを強く発現していることを見いだした。また、リコンビナントRANKL

(rRANKL) 5 ngを脳虚血60分後あるいは4時間後に脳室内に投与し、以降、24、48時間後に脳室内に投与することにより、72時間後の脳梗塞サイズが減少することを見いだした。さらにOPGの欠損によりRANKLの血清濃度が上昇しているOPG^{-/-}マウスでも脳梗塞体積が有意に減少し、F4/80陽性細胞の浸潤が抑制されていた。これらの結果は、脳梗塞ではRANKLが梗塞サイズの拡大を抑制する方向に作用することを示唆した。また、ミクログリアと神経細胞の混合培養系を用いた検討では、rRANKLにて前処理を行うことにより、TLR4のリガンドであるlipopolysaccharide (LPS) 負荷による神経細胞死が抑制され、培地中に発現するIL-6が低下することが示された。TLR4は脳梗塞後に梗塞病変で生じるdamage-associated molecular patterns (DAMPs)の受容体であることから、RANKLは脳梗塞後のDAMPsによるTLR4を介した炎症性サイトカインの発現を抑制することにより、脳梗塞の増悪を抑制する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記のような背景から、RANKL/RANK系は脳梗塞後のTLR4を介した炎症制御に関わり、このシグナルの賦活は脳梗塞の治療に応用できる可能性が示されたが、以下の点が解決すべき問題点として残っていた。(1)内因性RANKLの発現が脳梗塞後に強くなるが、このRANKLは脳梗塞の炎症制御に関連しているか明らかとなっていない。

(2)OPG^{-/-}マウスにおける RANKL の過剰発現による脳梗塞増悪抑制効果が、実際に RANKL/RANK シグナルによる作用か明らかとなっていない。

(3)rRANKL での治療マウスあるいはOPG^{-/-}マウスでの炎症性サイトカインの発現抑制効果が明らかとなっていない。

(4)治療可能な時間は脳虚血後何時間までか。また、投与量を調節することにより治療効果は上昇するか。

(5)末梢投与での治療が可能であるか、明らかではない。

これらの問題点を明らかにすることを目的として、本研究課題を遂行した。

3. 研究の方法

(1)RANK-Fc キメラを用いた内因性 RANKL および過剰発現 RANKL 抑制による脳梗塞への作用の検討 (研究目的(1)、(2)に該当)

→RANK-Fc キメラを脳室内に 4 μg 投与し脳内の RANKL/RANK シグナルを抑制することによる脳虚血 72 時間後の脳梗塞サイズ (クレシルバイオレット染色で判定) の変化を解析する。

(2)Real-time RT-PCR を用いた炎症性サイトカインの発現の検討 (研究目的(3)に該当)

→rRANKL 5 ng を脳虚血後 4, 24 時間目に脳室投与した野生型マウスおよび OPG^{-/-}マウスにおいて 48 時間後に脳梗塞部位から mRNA を抽出し、IL-6,

TNF-α, IL-1b, MCP-1, iNOS, Arg1 の定量を行う。

(3)治療可能時間、投与量、投与経路の検討 (研究目的(4)、(5)に該当)

→治療可能時間の検討として、脳虚血 6 時間後、12 時間後から 5 ng の脳室投与を開始し、24 時間後、48 時間後に再投与、72 時間後に脳梗塞サイズを解析した。投与量増加による治療効果への影響については、脳虚血 4 時間後からの rRANKL を 0.25 ng, 50 ng, 100 ng で投与することにより、上記と同様に検討した。投与経路については、rRANKL 0.01 μg, 0.1 μg, 1 μg を脳虚血後 4 時間目から 12 時間ごとに 60 時間まで皮下投与、あるいは、脳虚血 4 時間後に経鼻投与にて rRANKL を 600 ng 投与することにより、治療効果を検討した。皮下投与の実験においては、エダラボンを 3 mg/kg (腹腔内投与) で 4 時間目から 12 時間ごとに投与し、効果を比較した。

4. 研究成果

まず、野生型マウスにおいては、RANK-Fc キメラを脳室内投与した野生型

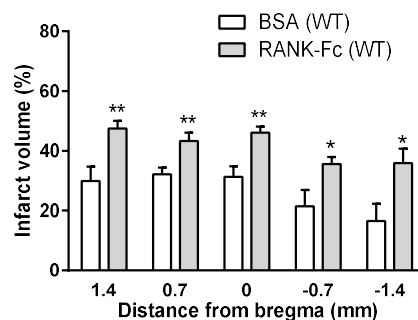


図1 RANK-Fc キメラ投与による脳梗塞サイズへの作用の検討

マウスにおいては、脳梗塞サイズが増加することが明らかとなった（図1）。さらにOPG^{-/-}マウスにおいても、RANK-Fcキメラを投与することにより、脳梗塞サイズは

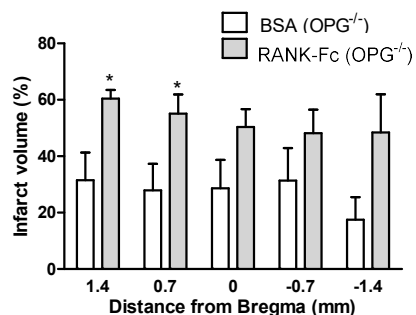


図2 RANK-Fcキメラ投与による脳梗塞サイズへの作用の検討(OPG^{-/-}マウス)。

増加することが示された（図2）。以上のことから、脳梗塞で内因性に増加しているRANKLは脳梗塞の増悪を抑制する方向に作用していることが明らかとなり、また、RANKLを過剰発現した場合のRANKLも脳梗塞の増悪を抑制していることが示された。

mRNA定量による炎症性サイトカインの発現での検討では、rRANKLを投与したマウスではIL-6, IL-1 β , TNF α , MCP-1が低下していたが、iNOSやArg1といったマクロファージ/ミクログリアのM1/M2マーカーには明らかな差を認めなかった。これに比較しOPG^{-/-}マウスではIL-6, IL-1 β , TNF α , MCP-1, iNOSが低下、Arg1は増加していた。これらのことから、rRANKLによる一過性の刺激では脳梗塞後の炎症性サイトカインの発現を低下させることができるものの、マクロファージ/ミクログリアのフェノタイプには影響を与えず、OPG^{-/-}マウスのような持続的なRANKL刺激下では、マクロファージ/ミ

クログリアのフェノタイプにも作用することが示唆された。

治療可能時間については、脳室投与の実験にて脳梗塞後6時間目までは脳梗塞サイズの縮小効果を認めた（図3）が、12時間

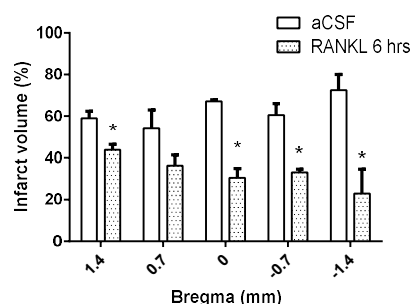


図3 脳虚血後6時間でのrRANKL脳室投与による脳梗塞サイズへの影響

後投与では明らかな効果を認めなかった。投与量について、rRANKLを0.25 ng, 50 ng, 100 ngにて検討したが、0.25 ngでは効果が減弱し、50, 100 ngでは脳梗塞サイズは増加傾向を認めた。これらのことから、rRANKLには有効治療濃度域、有効治療時間があり、それぞれ5 ngが最大投与量、発症から6時間が有効であることが明らかとなった。

末梢からの投与実験については、0.01 μ g, 0.1 μ g, 1 μ gを脳虚血4, 12, 24, 36, 48, 60時間に皮下投与した。まず、n=2での予備検討にて、0.01 μ g, 0.1 μ gでは脳梗塞サイズの縮小効果がないことが明らかとなったため、1 μ gを投与する実験を行った（図4）ところ、エダラボンと同程度の縮小傾向となることが明らかとなったことから、rRANKLは脳梗塞の新規治療薬となりうる可能性が示唆された。ただ、rRANKLをラットに皮下投与した実験では、0.05 mg/kg (20 gのマウスで1 μ g)では一過性の骨梁幅の低下、0.25 mg/kg

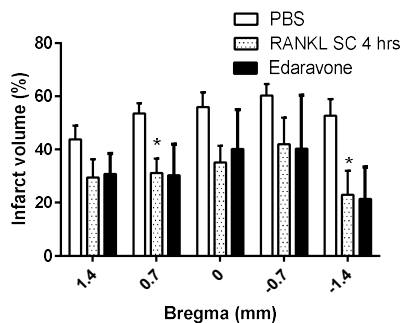


図 4 脳虚血後 4 時間目からの皮下投与による rRANKL の脳梗塞への効果

(マウスで 5 μ g)にて骨密度の低下が報告されている⁴ことが明らかとなったため、皮下投与による副作用を回避できることが期待できる経鼻投与による脳への直接効果を検討した。600 ng の rRANKL を経鼻的

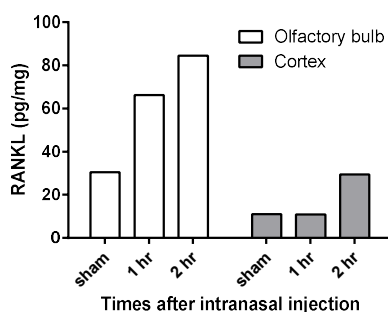


図 5 rRANKL の経鼻投与による嗅球、大脳皮質での rRANKL の発現

に投与することにより、大脳皮質に rRANKL はデリバリーされる事が明らかとなり (図 5)、600 ng、1 μ g の rRANKL を投与したうえで脳梗塞サイズの比較を行ったが、脳梗塞サイズの増悪抑制効果は認めず、経鼻投与では脳梗塞に対する治療効果を発揮できるほどの濃度には達していないことが考えられた。

以上の結果から、rRANKL は脳梗塞発症後 6 時間目の脳室投与、あるいは 4 時間目までの皮下投与にて治療効果が認められた

が、皮下投与の場合、破骨細胞に作用させないための Drug Delivery System の利用や、破骨細胞を活性化させることのない RANKL の改変体などの開発が必要であることが考えられた。

(参考文献)

1. Jensen, J. K. *et al.* Osteoprotegerin concentrations and prognosis in acute ischaemic stroke. *J. Intern. Med.* **267**, 410–7 (2010).
2. Ferrari-Lacraz, S. & Ferrari, S. Do RANKL inhibitors (denosumab) affect inflammation and immunity? *Osteoporos Int* **22**, 435–446 (2010).
3. Maruyama, K. *et al.* Receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *J. Immunol.* **177**, 3799–805 (2006).
4. Campbell, G. M., Ominsky, M. S. & Boyd, S. K. Bone quality is partially recovered after the discontinuation of RANKL administration in rats by increased bone mass on existing trabeculae: An in vivo micro-CT study. *Osteoporos. Int.* **22**, 931–942 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Shimamura M, Nakagami H, Osako MK, Kurinami H, Koriyama H, Zhengda P, Tomioka H, Tenma A, Wakayama K, Morishita R. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111:8191–8196.

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① Shimamura M, Nakagami H, Osako KM, Kurinami H, Wakayama K, Koriyama H, Morishita R. Role of OPG/RANKL/RANK System in Ischemic Brain in Mice. *International Stroke Conference 2014*, 2014.2.11、サンディエゴ<ポスター>

- ② 島村宗尚 (1 番目), 他. 「脳梗塞後の炎症を制御する RANKL-RANK シグナルについての検討」第 21 回国際個別化医療学会、2015.10.17、大阪<ポスター>
- ③ 島村宗尚 (1 番目), 他. 「RANK シグナルをターゲットにした脳梗塞における新規治療法についての検討」第 6 回日本脳血管・認知症学会学術大会、2015.9.19、東京<口演>
- ④ 島村宗尚 (1 番目), 他. 「RANKL-RANK is a novel anti-inflammatory signaling system in ischemic brain」第 56 回日本神経学会学術大会、2015.5.20、新潟<口演>
- ⑤ 島村宗尚 (1 番目), 他. OPG/RANKL/RANK axis plays critical roles in post-ischemic inflammation in brain、第 14 回日本抗加齢医学会総会、一般口演 3(03-2)、大阪、2014
- ⑥ 島村宗尚 (1 番目), 他. 「RANKL-RANK シグナルは脳梗塞後の炎症を制御する新規のシグナル分子である」第 21 回日本未病システム学会学術総会、2014.11.1、大阪<ポスター> 優秀演題賞
- ⑦ 島村宗尚 (1 番目), 他. 「RANKL/RANK axis is a Novel Inflammatory Signaling System in Ischemic Brain」第 5 回日本血管性認知障害研究会、2014.8.23、京都<ポスター>
- ⑧ 島村宗尚 (1 番目), 他. 「OPG/RANKL/RANK axis plays critical roles in post-ischemic inflammation in brain」第 14 回日本抗加齢医学会総会、2014.6.6、大阪<口演>

〔総説〕 (計 1 件)

Shimamura M, Nakagami H, Mochizuki H and Morishita R. Novel Molecular Mechanism in Toll-Like Receptor-Related Inflammation in the Ischemic Brain. J

Cardiovasc Disord. 2015;2(1): 1010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

ホームページ等

<http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/vme/greeting.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島村 宗尚 (SHIMAMURA MUNEHISA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授

研究者番号：60422317

(2) 研究分担者

栗波 仁美 (KURINAMI HITOMI)

大阪大学・大学医学部附属病院・助教

研究者番号：10638555