

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860185

研究課題名(和文) PAI-1阻害薬の抗炎症効果に関する分子薬理学的解析

研究課題名(英文) Molecular pharmacological analysis of anti-inflammatory effects of PAI-1 inhibitor

研究代表者

市村 敦彦 (Atsuhiko, Ichimura)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教

研究者番号：10609209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はPAI-1阻害薬の抗炎症効果の分子薬理学的メカニズムを解明することを目的として実施した。複数の炎症性疾患モデルを用いてPAI-1阻害薬の薬効を評価可能なモデルを探索した。その結果、高脂肪食負荷による食事性肥満モデルにおける抗炎症効果並びに、それに伴う全身のエネルギー代謝改善効果を見出した。PAI-1阻害薬の薬効発揮メカニズムを検討した結果、脂肪細胞の分化抑制効果による脂肪蓄積の抑制効果と、肝臓や脂肪組織へのマクロファージの浸潤抑制効果が協働的に作用することにより、薬効が発揮されていることが明らかとなった。以上の結果から、PAI-1阻害薬の代謝改善薬としての可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted with the aim to elucidate the molecular pharmacological mechanism of anti-inflammatory effect of PAI-1 inhibitors. The suitable pathological model of inflammation to evaluate efficacy of PAI-1 inhibitors was searched. As a result, we have successfully found anti-inflammatory effect of PAI-1 inhibitors on high fat diet (HFD)-induced obesity model. PAI-1 inhibitors attenuated HFD-induced impaired systemic glucose and energy metabolism. Further analyses of molecular mechanisms of the efficacy of PAI-1 inhibitors demonstrated that PAI-1 inhibitors suppressed accumulation of fat in adipocyte accompanying with the inhibition of infiltration of inflammatory macrophages into adipose tissue and the liver. These results suggest the possibility of PAI-1 inhibitors as novel therapeutic agent of metabolic disorders.

研究分野：分子薬理学

キーワード：分子薬理学 創薬

1. 研究開始当初の背景

プラスミノーゲン活性抑制因子(PAI-1)は、組織プラスミノー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うことが報告された (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。申請者の所属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、ラットやサルの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。研究会支持点で、臨床開発候補品として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。23-24 年度に助成を受けて行った、PAI-1 阻害薬を用いた M ϕ 遊走阻害効果の研究において、この低分子 PAI-1 阻害薬を経口投与することにより、in vivo, in vitro 両方で容量依存的な M ϕ 遊走阻害活性を示すこと 腎臓病モデル(ラット Thy1 モデル)において、糸球体への M ϕ 浸潤抑制効果を示すこと PAI-1 が細胞膜上の分子である LRP と結合することで、直接 M ϕ 遊走を惹起することを見出した (ATVB, 2013)。即ち、M ϕ は炎症局所で異所性に発現が亢進した PAI-1 を遊走因子として炎症部位に浸潤し、PAI-1 阻害薬は PAI-1 とその受容体様の細胞膜分子 LRP の相互作用を阻害することでこれを抑制し、抗炎症作用を発揮するものと考えられる。申請者はこれまで、マイクロアレイデータを用いた低発現遺伝子の組織発現分布予測に関する研究 (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.

2008)、非翻訳 RNA である miRNA と細胞内シグナル制御に関する研究 (Mol Pharmacol. 2010)、更に脂肪酸受容体 GPR120 欠損マウスの表現型解析及び、ヒト GPR120 の SNPs 探索受容体機能の関係に関する研究を行い (Nature. 2012) 一連の研究に於いて、大規模かつ網羅的なデータ解析手法、分子・細胞生物学的手法と細胞内シグナル制御に関する技術と知識、マウスを用いた生理・病態学的実験手法など幅広い知識と基礎及び応用生物学に関する技術を習得している。これらの知識と技術を総合的に活かすことで、PAI-1 阻害による抗炎症効果を基礎、応用の両面から明らかにできるものと考えた。

2. 研究の目的

血栓溶解因子 t-PA の阻害蛋白 PAI-1 は、様々な重要な生理機能を担っており、血栓症や炎症性疾患等の病態に広く寄与している。PAI-1 欠損マウスが炎症に対して抵抗的があることが報告され、マクロファージの浸潤に PAI-1 が必須であることが示された。申請者らは、抗炎症効果の観点から低分子化 PAI-1 阻害化合物の探索を行い、PAI-1 阻害化合物を取得した。更に、PAI-1 阻害薬がマクロファージの浸潤阻害活性を発揮し、腎臓病モデルラットにおいて、糸球体へのマクロファージの浸潤抑制効果を示すことを見出した。そこで本研究では、PAI-1 の関わる炎症性疾患モデルを用いて、PAI-1 阻害による抗炎症作用の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究の目的は、PAI-1 阻害薬がマクロファージ浸潤の抑制効果を示し、虚血再灌流腎や創傷時における組織炎症、更には代謝異常時の脂肪組織などの炎症性疾患に対して治療効果を有することを明らかにするとともに、PAI-1 阻害薬の治療効果発揮における分子薬理学的メカニズムを解明することである。本研究では、病態モデルにおける抗炎症効果及び、治療効果を示す知見が得られ、PAI-1 が相互作用する分子や関連する細胞内シグナルを解明し、論文を発表することで研究目標を達したと判断する。具体的には、PAI-1 阻害薬を前投与した上で、片腎を摘出したマウスを用いて、腎臓の虚血再灌流を行い、腎機能の解析を行なって in vivo 薬効を確認する。除毛したマウスの背部に直径 8mm の円形の傷を作り、PAI-1 阻害薬を連続投与しながら創傷治癒速度及び瘢痕形成における in vivo 薬効を確認する。高脂肪食負荷を行い、食餌性肥満モデルを作成する。肥満時の脂肪組織にはマクロファージの浸潤が観られ、これが糖代謝を始めとした全身のエネルギー代謝の増悪に関わることが知られている。PAI-1 は脂肪組織より分泌されるサイトカインである、アディポサイトカインとして知られている。そこで、PAI-1 阻害薬を用いて肥満時の炎症を抑制することで、エネルギー代

謝に与える影響を調べる。 両モデルにおける組織の病理学的解析により Mφ 浸潤抑制や抗炎症効果を評価する。また遺伝子発現解析等から薬効発揮の分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

片腎摘出を行ったマウスについて、腎臓の虚血再灌流を実施した。60 分間の虚血のうちに血流を再開させることで、有意な BUN の増加、尿量の増加、クレアチンクリアランス(Ccr)の悪化、尿中アルブミン値の上昇、腎臓における Mφ マーカー Cd68 の発現上昇が観察された。そこで、PAI-1 阻害薬を虚血再灌流の前日から一日一回経口投与し、上記のパラメーターに対する寛解効果を調べた。複数の異なる PAI-1 阻害薬について薬効の有無をスクリーニングした結果、TM5441 において、わずかに尿中アルブミンの低下傾向が観られた(下図)。しかし、全体として PAI-1 阻害薬の本モデルに対する薬効は弱く不安定であり、腎臓の虚血再灌流時における腎障害に PAI-1 阻害薬を適用することは困難との結論に達した。

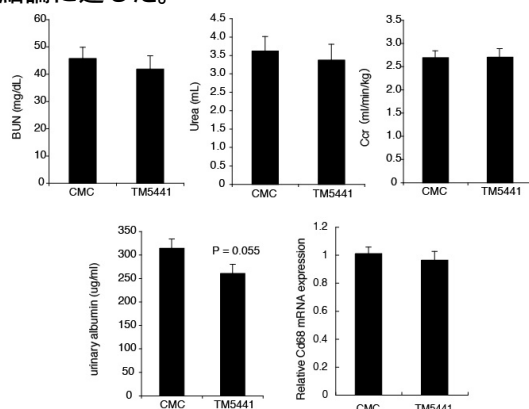


図1 TM5441 の腎虚血再灌流モデルに対する薬効の検討結果

そこで、期初の予定に加えて、これら以外の腎疾患モデルについても、複数のモデルで検討を行った。Thy1 腎炎で薬効を示した PAI-1 阻害薬の TM5441 の 30 mg/kg/日経口投与は、LPS 腎症マウスで陽性対照の edaravon と同様に再現性ある有効性を示し、血中 BUN、クレアチン・クリアランス並びに尿中アルブミンで有意な改善を示した。また、その作用は腎臓での Tnf- α の発現亢進に対する抑制効果であることが示唆された。しかし、TM5441 は、糸球体上皮障害モデル NEP25 マウス、尿管結紮モデルマウスでは効果を示さず、適応できる腎疾患がかなり限られる可能性が示唆された。

直径 8mm の円形創傷に対する PAI-1 阻害薬の治癒促進効果について検討した。創傷の前日から一日一回 PAI-1 阻害薬を経口投与し、創傷の大きさを測定することで治癒速度に対する影響を定量的に調べた。複数の化合物を用いて検討した結果、リード化合物

TM5275 の投与によって、一定の治癒促進効果が認められた。しかし、薬効の再現性は低く、効果も非常に不安定であった。これは、経口投与では PAI-1 阻害薬が病態部位まで到達できていない可能性を示唆している。そこで、PAI-1 阻害薬を軟膏状にして投与することも検討した。しかし、創傷部位に安定して PAI-1 阻害薬軟膏をとどめおくことも困難であり、投与経路や物性からの再検討を要することが判明した。

肥満時の PAI-1 発現亢進と、これに伴う脂肪組織の炎症に対する、PAI-1 阻害薬の効果を検討するため、60%高脂肪食(HFD)に対して PAI-1 阻害薬 TM5275 0.133%を混合した特殊飼料を作製し、体重増加や血糖値に対して与える影響を調べた。その結果、高脂肪食投与により、薬物非投与群においては文献値と同等の食事性肥満が惹起された。一方、TM5275 の投与により、これを行っていないマウスと比較して 10%程度の有意な体重増加抑制効果が観られた(下図)。また、2ヶ月間の投与後の空腹時血糖値についても、有意な寛解効果が観られた。

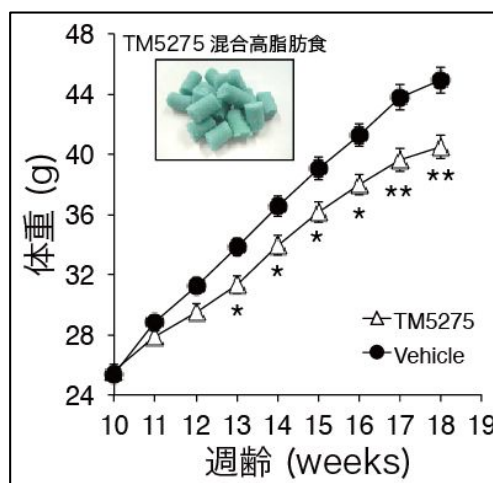


図2 TM5275 の食事性肥満時における体重増加抑制効果

以上の結果は、非常に高い再現性があり、TM5275 以外の PAI-1 阻害薬にも同様の効果が観られた。そのため、対象とする炎症性疾患として、食餌性肥満モデルを選択し、その後の詳細な薬効発揮メカニズムの解析を実施することとした。

HFD 投与によって惹起される肥満や糖尿病様の代謝異常といった病態は、脂肪組織や肝臓における Mφ 浸潤に伴う組織炎症により惹起されることが報告されている。そこで、白色脂肪組織での遺伝子発現を調べた。白色脂肪組織における遺伝子発現解析により、PAI-1 阻害薬持続投与による Mφ マーカー遺伝子 F4/80 の有意な発現低下が認められた。この結果は、PAI-1 阻害薬による PAI-1 阻害により、脂肪組織で発現亢進したアディポサイトカイン PAI-1 による Mφ の脂肪組織への

遊走が阻害されたことを示唆している。体重増加抑制に寄与している臓器を調べた結果、体重増加の抑制効果は主に白色脂肪組織の重量と肝重量の抑制に起因することが明らかとなった。これらの結果は、PAI-1 阻害薬が炎症を抑制するだけでなく脂肪組織への中性脂肪蓄積等に直接寄与している可能性を示していた。そこで、3T3-L1 細胞株を用いて、白色脂肪細胞への分化誘導実験において、PAI-1 阻害薬の処置を行い、脂肪細胞への分化と中性脂肪蓄積に対する影響を調べることとした。その結果、PAI-1 阻害薬を処置することにより、3T3-L1 細胞より誘導される脂肪細胞の分化が抑制され、細胞中への中性脂肪の蓄積も有意に抑制された。この時、Pparg2 を始めとする脂肪細胞の分化マーカー遺伝子 mRNA 発現も有意に抑制されていた。

以上の検討結果から、PAI-1 阻害薬の処置により、食事性肥満惹起時に生じる白色脂肪分化及び脂肪蓄積を抑制することによって、体重増加を寛解すると考えられる。また、白色脂肪組織から分泌される PAI-1 により惹起される Mφ 浸潤と炎症の抑制により、糖代謝の悪化を寛解し、空腹時血糖値の上昇を抑制していることが示唆される。

これらの知見から、PAI-1 阻害薬が新規のエネルギー代謝異常改善薬として使用できる可能性を示し、その薬効発揮の分子メカニズムの一部を解明した。

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 13 件)

1. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Antagonist TM5484 Attenuates Demyelination and Axonal Degeneration in a Mice Model of Multiple Sclerosis.

Pelisch N, Dan T, Ichimura A, Sekiguchi H, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T.

PLoS One. 2015 Apr 27;10:e0124510. doi: 10.1371/journal.pone.0124510. eCollection 2015.

2. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation.

Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I.

Nutrients. 2015 Apr 14;7(4):2839-49. doi: 10.3390/nu7042839.

3. Mitsugumin 56

(hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation.

Van B, Nishi M, Komazaki S, Ichimura A, Kakizawa S, Nakanaga K, Aoki J, Park KH, Ma J, Ueyama T, Ogata T, Maruyama N, Takeshima H.

FEBS Lett. 2015 Apr 28;589(10):1095-104. doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.028.

4. A novel antidiabetic therapy: free Fatty Acid receptors as potential drug target.

Sekiguchi H, Kasubuchi M, Hasegawa S, Pelisch N, Kimura I, Ichimura A.

Curr Diabetes Rev. 2015;11(2):107-15.

<http://www.eurekaselect.com/128940/article>

5. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer.

Mashiko S, Kitatani K, Toyoshima M, Ichimura A, Dan T, Usui T, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase S, Miyata T, Yaegashi N.

Cancer Biol Ther. 2015;16(2):253-60. doi: 10.1080/15384047.2014.1001271.

6. Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes.

Ichimura A, Hasegawa S, Kasubuchi M, Kimura I.

Front Pharmacol. 2014 Nov 6;5:236. doi: 10.3389/fphar.2014.00236. eCollection 2014.

7. Regulation of Energy Homeostasis via GPR120.

Ichimura A, Hara T, Hirasawa A.

Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Jul 11;5:111. doi: 10.3389/fendo.2014.00111. eCollection 2014.

8. Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism.

Hara T, Kashihara D, Ichimura A, Kimura I, Tsujimoto G, Hirasawa A.

Biochim Biophys Acta. 2014 Sep;1841(9):1292-300. doi:

10.1016/j.bbali.2014.06.002.

9. Therapeutic role and ligands of medium- to long-chain Fatty Acid receptors.

Hara T, Ichimura A, Hirasawa A.

Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Jun 2;5:83. doi: 10.3389/fendo.2014.00083. eCollection 2014.

10. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) molecule: new physiological roles and clinical applications.

Dan T, Ichimura A, Pelisch N, Miyata K, Akahori K, Miyata T.

Rinsho Ketsueki. 2014 Apr;55(4):396-404.

11. Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates N ω -nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence.

Boe AE, Eren M, Murphy SB, Kamide CE,

Ichimura A, Terry D, McAnally D, Smith LH, Miyata T, Vaughan DE.
Circulation. 2013 Nov 19;128(21):2318-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003192.

(2)研究分担者

該当なし

12. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism.

Hara T, Kimura I, Inoue D, **Ichimura A**, Hirasawa A.

Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2013;164:77-116. doi: 10.1007/112_2013_13.

(3)連携研究者

該当なし

13. A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration.

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.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 May;33(5):935-42. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301224.

〔学会発表〕(計2件)

Atsuhiko Ichimura, Takashi Dan, Toshio Mityata, A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 inhibits macrophage migration and attenuates renal injury, ISN Nexus Symposium, 2014 Apr 3-6, Bergamo (Italy)

Atsuhiko Ichimura, Takashi Dan, Toshio Mityata, A plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 inhibitor attenuates high fat diet induced obesity and improves glucose metabolism, ISN Nexus Symposium, 2014 Apr 3-6, Bergamo (Italy)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

該当なし

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

市村 敦彦 (ICHIMURA, Atsuhiko)

京都大学・学際融合教育研究推進センター・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教

研究者番号：10609209