

令和 4 年 10 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04937

研究課題名(和文) 幹細胞由来ペプチドを用いた革新的大動脈瘤治療法の開発

研究課題名(英文) Possibility of Mesenchymal Stem Cells-derived Peptide Therapy for Aortic Aneurysm

研究代表者

碓氷 章彦 (Usui, Akihiko)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30283443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤に対する人工血管置換術は侵襲が大きく、新たな低侵襲治療法の開発が望まれる。これまでに抗炎症作用を持つ間葉系幹細胞(MSC)による大動脈瘤径縮小効果を報告した。本研究では、MSC産生因子の中から抗炎症作用を持つタンパクprogranulin (PGRN)とSecretory Leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)を同定した。これらタンパクを大動脈瘤モデルマウスに投与することにより、大動脈瘤進展抑制を認め、治療に有用であることを明らかにした。また、これらタンパクのアミノ酸配列をリファレンスに設計したペプチドは、in vitroにて抗炎症性効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに間葉系幹細胞による大動脈瘤縮小効果を報告してきたが、幹細胞療法は投与した細胞の安全性を担保する必要があり、臨床応用へのハードルが高い。それに比べ、MSC産生因子から合成するペプチドによる治療は、投与幹細胞に起因する問題(腫瘍化や異所性形質転換)を回避することができる。また、合成ペプチドは抗原性がないため安全性は確保できると考える。本研究では、MSC産生因子から同定したタンパクPGRNとSLPIが大動脈瘤治療に有効であることを確認した。また、このタンパクのアミノ酸配列をリファレンスとしたペプチドも抗炎症作用を認めている。従って、本研究で得られた成果は学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aortic aneurysm (AA) is a life-threatening disease associated with risk of aortic rupture. AA is caused by atherosclerosis and chronic inflammation, which contribute to expansion of the aorta. We have reported that ATII-induced AA model mice that received intravenous injection of MSCs exhibited regression of AA via immunomodulation, anti-inflammatory and tissue repair properties, mediated by paracrine effects. To identify soluble proteins secreted from MSCs, the conditioned medium of MSCs was analyzed using a protein array. We identified Progranulin (PGRN) and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) which participate in anti-inflammation. Intraperitoneal injection of recombinant protein PGRN and SLPI exhibited regression of AA. Using our original peptide array technology, we discovered a short-chain peptide derived from amino acids sequence of SLPI. We demonstrated that the short-chain peptide had a potency of anti-inflammation in vitro.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 間葉系幹細胞 産生因子 ペプチド progranulin SLPI 抗炎症作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は動脈硬化を基盤とし、高齢者・メタボリック症候群の増加に伴って、罹患患者数が増加している。加えて、日本胸部外科学会の年次報告でも胸部大動脈瘤手術は増加傾向を示し、厚生労働省人口動態統計によると、平成 25 年の「大動脈瘤及び解離」の総死亡数に対する割合は 1.3%で、死因の第 10 位であった。また、手術対象症例は年々高齢化しており、超低体温循環停止法など複雑な手術操作が必要な弓部あるいは胸腹部大動脈の人工血管置換術は、あらゆる心臓血管外科手術術式の中で最も侵襲が大きく、手術死亡率・合併症発症率がいまだに高い。従って、新たな大動脈瘤治療法の開発は国民的課題であると考えられる。

抗炎症作用・免疫抑制能を有する間葉系幹細胞(MSC)による炎症抑制療法は、移植片対宿主病(GVHD)などを対象にした臨床研究で有効性が報告されている。そこで我々はこれを大動脈瘤治療に応用し、apolipoprotein E 遺伝子欠損マウスに Angiotensin-II (AT-II) 負荷による大動脈瘤モデルマウスを用いた先行研究を行い、論文報告した。1つ目の先行研究では、腹部大動脈周囲への BM-MSC シート移植によって瘤径拡大抑制、MMP-2, 9 活性抑制、MCP-1, IL-1, TNF- α タンパク発現量減少、インスリン様成長因子(IGF)-1 および TIMP-2 のタンパク発現量増加が観察され、大動脈瘤の発症・進展抑制効果が示された(J Vasc Surg. 2011;54:1743-52.)。2つ目の先行研究では、静脈投与においても大動脈瘤の発症・進展抑制効果が得られた(J Transl Med 2013;11:175)。3つ目の先行研究では、すでに大動脈瘤を発症したマウスに対して BM-MSC を静脈投与したところ、大動脈瘤縮小効果が得られた(Eur J Cardio-Thoracic Surg. 2014;45:e156-65.)。

MSC による大動脈瘤縮小のメカニズムには、全身性パラクライン作用を推察した。MSC の静注で大動脈瘤に MSC はほとんど集積せず、腎臓、肺等に集積していたことから、生着細胞による直接的作用は軽微と考えた。一方、*in vitro* 検討で MSC 共培養による M α の MMP-2-9, TNF- α 遺伝子発現の低下および血管平滑筋細胞の elastin 遺伝子発現の増加を確認した。また、MSC 共培養によって IL-10 を介した炎症性 M1M から抗炎症性 M2M へのスイッチングや(J Cardiovasc Pharmacol Ther 2013;18:78-86.)、心筋梗塞モデルマウスへの MSC 静脈投与による血中の M1M 数減少および M2M 数増加といった報告(Basic Res Cardiol. 2011;106:1299-310.)があることから、MSC が産生する液性因子による抗炎症作用の関与が強く示唆された。

一方、生体内タンパクを利用したペプチド医薬品は、心不全に対する心房性ナトリウム利尿ペプチド(カルペリチド)など、すでに臨床で広く使われている。また基礎研究では、膀胱関連タンパクのアミノ酸配列から合成した 16 残基のペプチドのラットぶどう膜炎モデルへの眼内血管投与で炎症性サイトカインの発現が抑制され、抗炎症効果が得られたとの報告がある(PLoS One. 2011;6:e29155.)。申請者らは、生体吸収性ポリマーに血管内皮細胞高親和性の 3 残基機能性ペプチド(CAG)混和による内皮化しやすい小口径人工血管の開発(Kuwabara F, Usui A, et al. Ann Thorac Surg. 2012;93:156-63. J Artif Organs. 2012;15:399-405.)を行ってきた。この機能性ペプチドは、加藤竜司ら(名古屋大学創薬研究科細胞分子情報学分野)の独自技術「ハイスループットペプチドアレイ細胞アッセイ法(PIASPAC 法) Kato R, et al. J Biosci Bioeng. 2006;101:485-95. 特開 2010-222300, 2011-046637」で発見されたペプチドである。本研究では本技術による大動脈瘤治療に有用なペプチド探索を試みる。

2. 研究の目的

MSC が産生する液性因子を同定し、その中から抗炎症や組織修復に関与する因子を探索する。選んだ因子のリコンビナントタンパクを用い、*in vitro* および *in vivo* にて抗炎症効果を調べる。抗炎症効果が得られたリコンビナントタンパクは、アミノ酸配列を参照に *in silico* にて短鎖ペプチドを設計する。設計した短鎖ペプチドは、*in vitro* にて抗炎症効果の有効性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)培養上清に含まれるタンパクの同定

4-6 週齢 Apolipoprotein E 遺伝子欠損マウスの両大腿骨から骨髄を採取し、密度勾配遠心法にて単核球層を取り出し培養した。継代を繰り返して樹立した BM-MSC は、フローサイトメトリーにて特異的表面抗原マーカー Sca-1, CD29, CD44, CD106 陽性および Cd11b, CD31, CD34, CD80, CD86, CD117 陰性であることを確認した。また、分化誘導培地を用いて骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化能を確かめた。MSC であることを同定した細胞を用いて、80%コンフルエントまで培養した。その後、血清フリー DMEM 培地に変更し、48 時間静置したのち、培養上清を回収して透析・濃縮した。濃縮した培養上清は、タンパクアレイ RayBio, Label-Based mouse antibody array 308 で解析した。

(2) リコンビナントタンパクによる治療効果の確認

タンパクアレイにて同定されたタンパクの中から、抗炎症作用や組織修復に携わる因子をピックアップした。その中でも特に高発現していた因子を候補とし、そのリコンビナントタンパクが大動脈瘤に対して有用かどうかを *in vitro* および *in vivo* にて効果を確認した。

In vitro :

TNF- α で炎症を惹起した炎症性マクロファージ (M ϕ , J774A.1 cell line) またはマウス大動脈を組織培養し樹立した血管平滑筋細胞 (VSMC) に、50nM PGRN または 50nM SLPI を培養培地に添加した。それぞれ単独または複合添加した。比較対象群として、無添加群を用いた。添加してから 96 時間後に細胞から RNA 抽出し、定量 RT-PCR を行なった。M ϕ では、IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-2, MMP-9 の遺伝子発現量を、VSMC では、Elastin, TGF- β 1, IGF-1, TIMP-1, TIMP-2 の遺伝子発現量を比較評価した。一方、培養培地を回収し、NO $_2$ /NO $_3$ assay kit (同仁化学) を用いて NO 産生量を測定し比較評価した。

In vivo :

大動脈瘤モデル : 24 週齢以上、雄の Apolipoprotein E 遺伝子欠損マウスの背部皮下に、1000ng/kg/day angiotensin II (ATII) を 4 週間持続注入 (持注) する浸透圧ポンプ (Osmic Pump, Alzet 2004) を埋植することによる大動脈瘤モデルマウスを作成した。ATII 持注前および持注 4 週間後に超音波診断装置を用いて、横隔膜下大動脈径を計測した。

投与と評価 : ATII 持注 4 週間後、市販リコンビナントタンパク 10 μ g PGRN または 10 μ g SLPI を腹腔内投与した。それぞれ単独もしくは複合投与した (pre-iv, PGRN 群、SLPI 群、PGRN + SLPI 群)。比較対象群として 0.2mL 生理食塩水を投与した (saline 群)。投与 1 週間後に超音波診断装置を用いて横隔膜下大動脈径を計測した (post-iv)。また、大動脈瘤組織を取り出し、組織切片を elastica van gieson (EVG) 染色し組織学的観察を行なった。

(3) ペプチド設計と in vitro における検証

SLPI のアミノ酸配列 131aa から 3-4 残基のペプチドを insilico にて 120 種類設計し、ペプチドアレイを作成した。ペプチドアレイに TNF- α で炎症を惹起した炎症性マクロファージ (M ϕ , J774A.1 cell line) を播種し、96 時間後に NO $_2$ /NO $_3$ assay kit (同仁化学) を用いて NO 産生量を測定し比較評価した。この中からリコンビナントタンパク SLPI 添加時と同程度の NO $_2$ /NO $_3$ 産生抑制効果を持つ 3 残基ペプチド 8 種類をピックアップし、ペプチド合成して粉末状にし、M ϕ 培養培地に添加して NO 産生量を測定した。

4 . 研究成果

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) 培養上清中に含まれるタンパクの同定

MSC 培養上清をタンパクアレイ RayBio, Label-Based mouse antibody array 308 で解析したところ、256 因子を同定した。その中には抗炎症性作用や免疫寛容、組織修復能を持つ因子、Progranulin (PGRN)、secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)、adiponectin-like 3, IL-13, IL-27, IL-4, TGF- β 1 が同定された。蛍光強度は PGRN が 683.2、SLPI が 7.1 と高い数値を示した (図 1)。

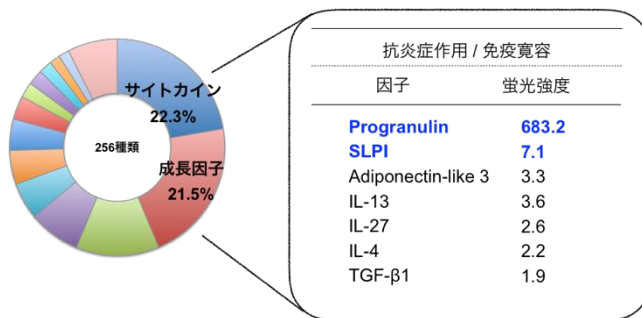


図1 MSC培養上清中タンパクの同定

(2) リコンビナントタンパクによる治療効果の確認

In vitro: M ϕ では、PGRN, SLPI の単独または複合添加により、IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-2, MMP-9 遺伝子発現量が無添加群に比べて有意に低下した (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, 図 2)。

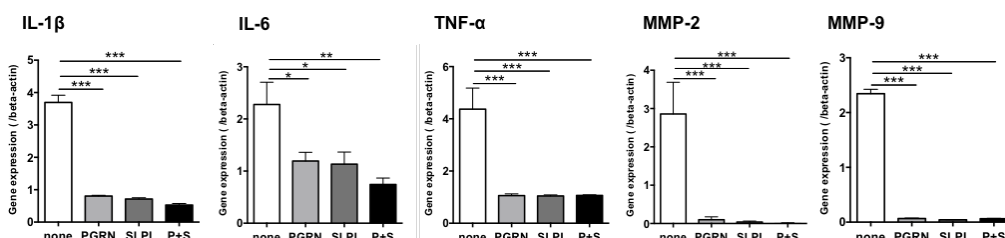


図2 PGRN, SLPI添加によるM ϕ 遺伝子発現変化

VSMCでは、PGRN, SLPIの単独または複合添加により、elastin 遺伝子発現量が無添加群に比べて有意に上昇した (* $p < 0.05$, 図3)。TGF- β 1, IGF-1, TIMP-1, TIMP-2の遺伝子発現量に差はなかった。

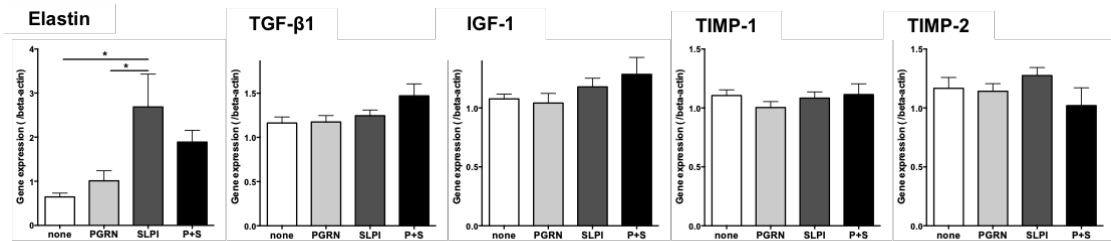


図3 PGRN, SLPI添加によるVSMC遺伝子発現変化

In vivo : saline 群では、投与1週間後に大動脈瘤径拡大を示したのに対し、PGRN, SLPI 単独または複合投与群では、大動脈瘤径縮小傾向を示した(図4A)。また、EVG染色による組織学的観察では、saline 群で顕著な elastin 繊維の構造破壊・分解された所見を示したのに対し、PGRN, SLPI 単独または複合投与群では、elastin 構造が維持されている所見を認めた(図4B)。

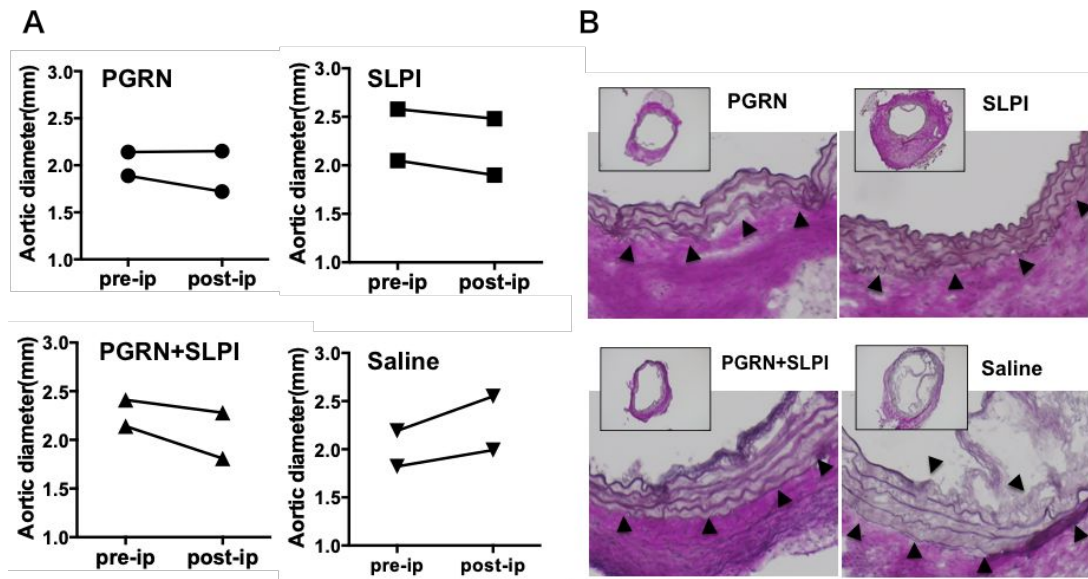


図4 PGRN, SLPI投与による大動脈瘤径の変化と組織切片EVG染色画像

(3) ペプチド探索と in vitro における検証

PGRN と SLPI どちらも in vivo にて大動脈瘤径拡大抑制効果が示されたことから、PGRN, SLPI は大動脈瘤治療に有用であることが判明した。そこで PGRN, SLPI のアミノ酸配列を調べたところ、PGRN の配列数が 593 aa であったのに対して SLPI の配列数が 131 aa と比較的短いことが判明したため、まずは SLPI からペプチド探索を試みることにした。SLPI のアミノ酸配列をリファレンスとした 3-4 残基の短鎖ペプチドを in silico にて設計した。120 種類の短鎖ペプチドが得られ、これらのペプチドアレイを作成した。LPS で炎症刺激した炎症性 M を、ペプチドアレイ上に播種し 96 時間培養したところ、リコンビナントタンパク SLPI 添加時と同程度に NO₂/NO₃ 産生を抑制する短鎖ペプチド 8 種類を発見した。

8 種類の短鎖ペプチドを合成して粉末状とし、再溶解したものを炎症性マウロファージの培養培地に添加して効果の再確認を行なった。添加して 24 時間培養後の NO₂/NO₃ 産生量を測定したところ、短鎖ペプチド VLL がより高い抗炎症作用を示した。また、短鎖ペプチドの濃度依存性は認められなかった(図5)。

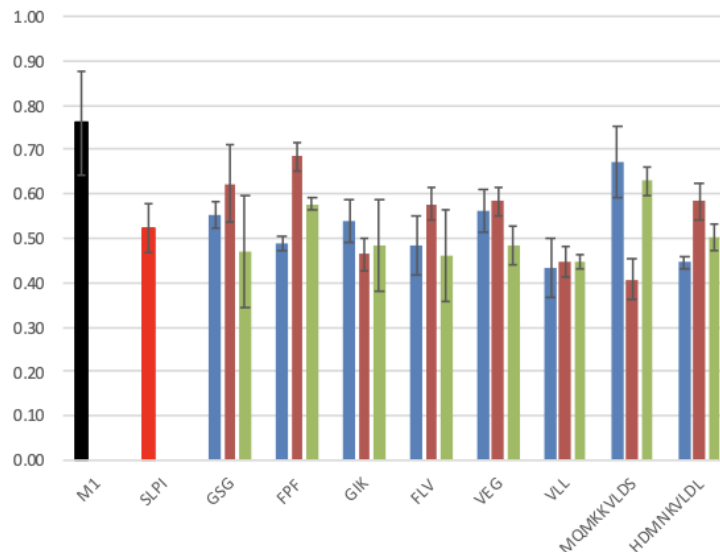


図5 合成ペプチド添加による炎症性MφNO₂/NO₃産生量の変化

以上の結果から、本研究では以下のことについて明らかにした。

MSC 産生因子を網羅的探索したところ、256 因子の中から抗炎症作用および組織修復に関わる因子 PGRN および SLPI を同定した。

市販リコンビナントタンパク PGRN および SLPI は、in vitro において炎症性マクロファージに対し抗炎症作用を示した。

市販リコンビナントタンパク PGRN および SLPI は、in vivo にて大動脈瘤径拡大抑制効果を示した。

SLPI アミノ酸をリファレンスにし in silico で設計した 120 種類のペプチドから、in vitro で市販リコンビナントタンパク SLPI と同程度に抗炎症を示すペプチド 8 種類を発見した。8 種類の短鎖ペプチドを合成して粉末状にし、炎症性マクロファージの培養培地に添加したところ、合成ペプチド VLL は、より高い炎症抑制効果を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamawaki-Ogata A, Fujimoto KL, Mutsuga M, Tokuda Y, Usui A, Narita Y. Stem cell therapy for aortic aneurysm: Does the administrated cell type influence the therapeutic effects? J Regen Med. 2019;8:1. DOI:10.4172/2325-9620.1000150 (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年「間葉系幹細胞 (MSC) による大動脈瘤治療効果に関与する MSC 産生因子の同定とタンパク治療の可能性」緒方藍歌、成田裕司、碓氷章彦
第 82 回日本循環器学会 2018 年「Possibility of Protein Therapy using PGRN and SLPI for Aortic Aneurysm」Aika Yamawaki-Ogata, Yuji Narita, Akihiko Usui.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：成田 裕司

ローマ字氏名：NARITA, Yuji

所属研究機関名：名古屋大学

部局名： 医学部附属病院
職名： 講師
研究者番号（8桁）：60378221

研究分担者氏名： 緒方 藍歌
ローマ字氏名：OGATA, Aika
所属研究機関名： 名古屋大学
部局名： 医学系研究科
職名： 特任助教
研究者番号（8桁）：70718311

研究分担者氏名： 加藤 竜司
ローマ字氏名：KATO, Ryuji
所属研究機関名： 名古屋大学
部局名： 創薬科学研究科
職名： 准教授
研究者番号（8桁）：50377884

研究分担者氏名： 蟹江 慧
ローマ字氏名：KANIE, Kei
所属研究機関名： 名古屋大学
部局名： 創薬科学研究科
職名： 助教
研究者番号（8桁）：80636407

研究分担者氏名： 荏原 充宏
ローマ字氏名：EBARA, Mitsuhiro
所属研究機関名： 国立研究開発法人物質・材料研究機構
部局名： 国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点
職名： MANA 准主任研究者
研究者番号（8桁）：10452393

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。