

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18989

研究課題名(和文) 臨床応用を目的とした新規心不全治療薬、ホスホランバンアプタマーの開発

研究課題名(英文) Development of phospholamban aptamer as a treatment of heart failure for clinical application

研究代表者

酒井 大樹 (SAKAI, Hiroki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40464367

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)：本研究では、膜透過型ホスホランバン・アプタマーを新たな心不全治療薬として開発し、それを臨床応用するために必要な改良を行った。その結果、機能と安定性を保持した最小単位のホスホランバン・アプタマーを得ることに成功した。本アプタマーは単離心筋細胞の収縮・弛緩能の増大、及びそれに対応したCa²⁺動態を示した。一方、心不全モデルマウスでは安定した効果が得られなかった。本アプタマーを新たな心不全治療薬として臨床応用するためには、体内薬物動態や心臓への送達法についてさらに改善する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a cell-penetrating phospholamban aptamer as a novel therapeutic tool for treatment of heart failure. We optimized the nucleotide sequence of the phospholamban aptamer which retains the functional activity and is stable in the serum. The obtained phospholamban aptamer enhanced contraction/relaxation of isolated adult rat cardiomyocytes as well as corresponding Ca²⁺ transients. However, no consistent improvement of cardiac function was obtained in a mouse heart failure model by administration of the aptamer. Further modification would be necessary to improve the pharmacokinetic property of the aptamer for clinical application.

研究分野：薬理学

キーワード：心不全治療薬 アプタマー 細胞膜透過性ペプチド ホスホランバン

1. 研究開始当初の背景

心臓の収縮・弛緩では、心筋細胞内の心筋小胞体による Ca^{2+} 輸送が重要な役割を果たす。この心筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みは、 Ca^{2+} ポンプである sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) が行い、心筋小胞体膜に存在するホスホランバンは SERCA2a による Ca^{2+} 取り込みを抑制的に調節している。カテコラミン刺激により cAMP 依存的にホスホランバンがリン酸化されると、SERCA2a への抑制が解除され Ca^{2+} 取り込みが促進される (図 1)。その結果、心筋の弛緩を促進するだけでなく、次に放出される Ca^{2+} 量が増加するため収縮力の増強がもたらされる。

慢性心不全では、非リン酸化状態のホスホランバンが増加し SERCA2a 活性が著明に低下している。これらは、細胞レベルでの病態と密接に関連しており、逆に様々な心不全モデルで、ホスホランバン遺伝子のノックアウトやノックダウンが心不全を改善することが報告されている。このようなホスホランバンを標的とする心不全治療薬があると、まず弛緩の促進をもたらし、二次的に収縮力を増強する新たなタイプの治療薬となり得る。また、従来の強心薬とは異なり細胞外から内への Ca^{2+} 流入増加はなく、心拍数を増加させることもない理想的な心不全治療薬となる。しかしながら、これまでの SERCA2a-ホスホランバン系を標的とした治療法は、すべてウイルスベクターを用いた遺伝子治療であり、ホスホランバンに直接作用するような心不全治療薬は未だ開発されていない。

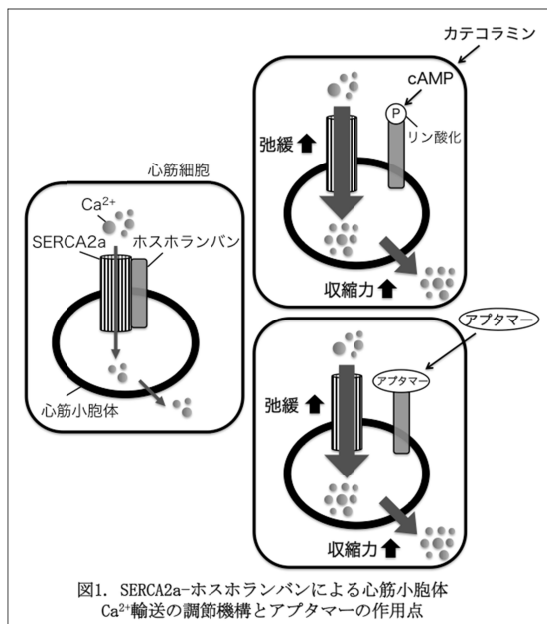


図1. SERCA2a-ホスホランバンによる心筋小胞体 Ca^{2+} 輸送の調節機構とアプタマーの作用点

このような状況下で、申請者らはホスホランバンに特異的に結合し、SERCA2a との相互作用を解除する薬物の開発に取り組み、ホスホランバンに結合し SERCA2a の活性を促進する核酸アプタマー (ホスホランバン・アプタマー) の創製に成功した。さらに、得られたアプタマーに細胞膜透過性ペプチドの改

変型 TAT を連結させた膜透過型ホスホランバン・アプタマーを開発し、単離心筋細胞の培養液へ添加することにより収縮・弛緩能の亢進とそれに対応した Ca^{2+} 動態の変化をもたらすことを見出した。

これらの結果は、膜透過型ホスホランバン・アプタマーが心不全治療薬として利用可能であることを示唆するが、臨床応用するためにはその配列を最適化し生体内で効果が長時間持続する安定型に改良することや、動物の様々な心不全モデルを用いてその動態や有効性を検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ホスホランバンに特異的に結合し、心筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みを促進するアプタマーを新たな心不全治療薬として臨床応用することを目的とし、アプタマー配列の最適化と安定性を検討した。また、心不全モデル動物を用いてホスホランバン・アプタマーの効果の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 改変型ホスホランバン・アプタマーの作製

本研究では、細胞膜透過性ペプチドの改変型 TAT ペプチドを付加した膜透過型ホスホランバン・アプタマーを合成し、解析に用いた。また対照群として、アプタマーの配列をランダムに入れ替えたスクランブル・ホスホランバン・アプタマーを合成した。

(2) Ca^{2+} -ATPase 活性の測定

Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性の測定は、イヌ心臓より調整した筋小胞体ベシクルを用い、20 mM imidazole-HCl (pH 6.9)、100 mM KCl、2 mM MgCl_2 、5 mM NaN_3 、0.1 mM ATP、0.11 ~ 16.3 μM の遊離 Ca^{2+} 、5 μM ionomycin、2.5 mM phosphoenolpyruvate と 30 IU/ml pyruvate kinase で構成した ATP 再生系により行った。反応は 37 °C 下で ATP 添加により開始し、4 分後に 0.3 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine と 0.35 M HCl 溶液を加え停止した。ATPase 活性はマイクロプレートリーダーにより測定した。

(3) ホスホランバン・アプタマーの安定性の解析

ホスホランバン・アプタマーの安定性は、ヒト血清を用いて評価した。血清にアプタマーを混合し 37 °C で 0 ~ 24 時間静置後、フェノールにより抽出した。抽出物を電気泳動し、アプタマーの残存量を解析した。

(4) 単离心筋細胞の収縮・弛緩及び Ca^{2+} 動態の解析

心筋細胞は 6-8 週齢のオス成獣ラットよりコラゲナーゼ灌流法を用いて単離した。3 時間培養した細胞に膜透過型ホスホランバン・アプタマーを添加し、さらに 4 時間培養

した。アプタマーの効果は、Ca²⁺蛍光プロブの Fura-2 を心筋細胞に導入後、24 mM HEPES、126 mM NaCl、4.4 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、10 mM NaH₂PO₄、11 mM glucose、0.5 mM probenecid (pH 7.4) 条件下で IONOPTIX 社製の心筋細胞内 Ca²⁺・収縮性同時測定システムを用い、0.5 Hz の電気刺激下の心筋細胞の収縮・弛緩力、及び Ca²⁺濃度変化を解析することにより評価した。

(5) ホスホランパン・アプタマーの動物での効果の解析

拡張型心筋症モデルマウスの MLP 欠損マウスの尾静脈より膜透過型ホスホランパン・アプタマーを投与し、心臓超音波検査、及びカテーテルを用いて心機能を評価した。ホスホランパン・アプタマーの体内動態の解析には、ビオチン化ラベルした膜透過型ホスホランパン・アプタマーを用いた。アプタマー投与したマウスより組織を採取し、凍結切片を作製後、アビジン抗体を用いて組織へのアプタマーの局在を解析した。

4. 研究成果

(1) ホスホランパン・アプタマーの最適化と安定性の解析

これまでの研究により効果が認められているホスホチオエート修飾アデニンを導入した 40 mer の RNA ホスホランパン・アプタマー 19 (Apt19) を用い、配列の最適化を行った。表 1 に示すように Apt19 の両末端を部分的に欠損したものを合成し、Ca²⁺依存性 ATPase 活性への効果を検討した。

表 1. ホスホランパン・アプタマー 19 の全長 (1-40) と種々の長さのアプタマー配列。

1-40	aaaGGGaUGGGaGGGaGGaaGGGGUGGCaaCaUGGGCUGG
11-31	GaGGGaGGaaGGGGUGGCaaC
11-25	GaGGGaGGaaGGGGU
17-31	GGaaGGGGUGGCaaC
17-25	GGaaGGGGU
11-18	GaGGGaGG

a: ホスホチオエート修飾アデニン

結果の概要を表 2 に示す。500 nM のアプタマー濃度において、11-31、11-25、17-31 は全長の Apt19 (1-40) と同等の Ca²⁺依存性 ATPase 活性を示したが、17-25、11-18 では全く活性が見られなかった。また 100 nM の濃度では、

表 2. 各ホスホランパン・アプタマー 19 の Ca²⁺依存性 ATPase 活性への効果

	500 nM	100 nM
1-40	+++	+++
11-31	+++	+++
11-25	+++	+++
17-31	+++	+
17-25	-	-
11-18	-	-

11-31 と 11-25 は全長と同等の活性であったが、17-31 では活性が減弱し、17-25 と 11-18

は活性を消失した。以上より、40 mer の Apt19 は 15 mer の 11-25 まで短縮可能であることが示唆された。

次に、得られたアプタマーの安定性を評価した。ヒト血清とアプタマーを混合し、37 °C 条件下における経過時間毎のアプタマー量を解析した。その結果、以前の研究でホスホランパンに特異的に結合し、Ca²⁺-ATPase 活性を増加することが見出されている DNA アプタマー 9 は血清混合 6 時間後以降で分解されるのに対し、Apt19 の 11-25 は少なくとも 24 時間まではほとんど分解されず、高い安定性を保持していることが明らかになった(図 2)。

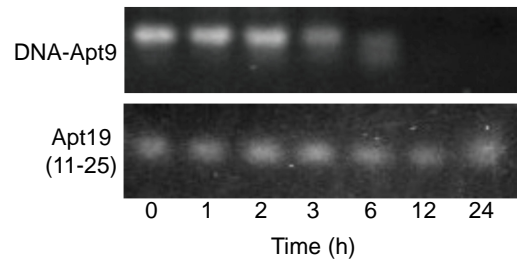


図 2. アプタマーの血清中での安定性解析

さらに、心筋細胞におけるアプタマーの効果解析した。成獣ラットより単離した心筋細胞にアプタマーを添加し、収縮・弛緩能及び Ca²⁺動態への影響を解析したところ、コントロールに比べ有意なサルコメア長の短縮や、収縮・弛緩速度の促進が認められた(図 3)。また、細胞内 Ca²⁺動態も同様に、アプタマーによる最大 Ca²⁺濃度の有意な増大と濃度低下時の時定数 (tau) の短縮を示した(図 3)。以上より、Apt19 の 11-25 が単離心筋細胞レベルでホスホランパンに結合し、SERCA2a に対する抑制効果を解除することにより Ca²⁺-ATPase 活性を増大し、収縮・弛緩能の増強をもたらすことが明らかとなった。

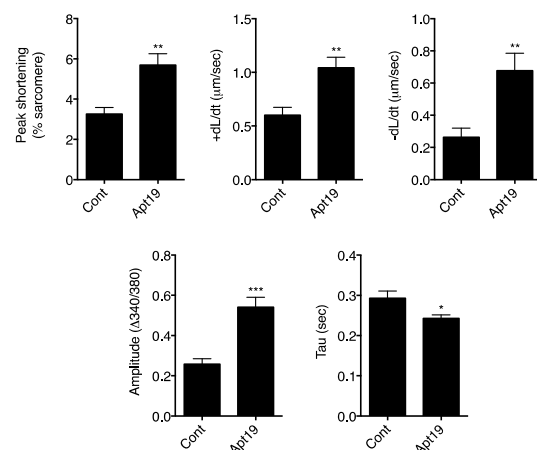


図 3. Apt19 (11-25) の単離心筋細胞における収縮・弛緩能 (上) と Ca²⁺濃度変化への効果 (下)。

(2) ホスホランパン・アプタマーの心不全モデル動物での効果の検証と体内動態解析

心不全モデルマウスに細胞膜透過性ペプチドを付加したホスホランパン・アプタマーを投与し、アプタマーの心臓への送達及び心

機能の改善効果を検討した。その結果、一部のマウスでは心機能の改善効果が認められたが、一貫した結果が得られなかった。また、ビオチン化した膜透過型ホスホランバン・アプタマーをマウスに投与し体内動態の解析を行ったが、アプタマーの心臓への特異的な集積は認められなかった。本研究で用いた細胞膜透過性ペプチドは、分子量が小さいため、速やかに腎臓から排泄されている可能性が高い。また、細胞膜透過性ペプチドには細胞特異性がないことから、マウスに投与したアプタマーが様々な組織に取り込まれ、効果を十分に発揮できない可能性もある。これらの点について、アプタマーのさらなる改良が必要である。

以上より、本研究では臨床応用を目指したホスホランバン・アプタマーの開発を試み、配列の最適化や生体内で安定性の高いアプタマーを創製することに成功した。また、本アプタマーは単離心筋細胞レベルで収縮・弛緩能を著明に改善する効果が得られ、心不全治療薬として利用できる可能性が示されたが、動物レベルでは安定した効果が得られなかった。今後、アプタマーの体内動態や心臓への送達を改善するような改良を加えて行く必要がある。

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)

[学会発表](計2件)

酒井 大樹、松浦 健二、本田 健、西田 輝夫、乾 誠 . IGF-1 promotes epithelial wound healing independently of the IGF-1 receptor via angiotensin II signaling . 第 89 回日本薬理学会年会、平成 28 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

酒井 大樹、松浦 健二、本田 健、榎藤 俊一、山本 久斗、西田 輝夫、乾 誠 . 皮膚創傷治癒過程における IGF-1 と知覚神経由来のサブスタンス P との協調作用のメカニズム . 第 68 回日本薬理学会西南部回、平成 27 年 11 月 21 日、海峡メッセ下関(山口県・下関市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 大樹 (SAKAI, Hiroki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40464367