

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10644

研究課題名(和文) 虚血心筋組織特異的送達ペプチドを用いた虚血性心不全の新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new drugs with ischemic myocardium targeting peptides

研究代表者

神吉 佐智子 (KANKI, SACHIKO)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40411350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：虚血心筋特異的ペプチド(Ischemic Myocardium Targeting Peptide; IMTP)は静脈内投与によって虚血障害を受けた心筋組織に特異的に集積するが、その機序を解明するために、培養細胞測定系を確立した。虚血再灌流による細胞傷害については、シアン化合物による無酸素状態下での細胞内のLDH活性、ATP、ADP、AMP量で評価した。蛍光タグをつけたIMTPペプチドの取り込みは、虚血再灌流傷害細胞では確認できなかった。アフィニティ精製で得たIMTPペプチド受容体候補タンパク質5種についてもHEK293細胞で発現させ虚血条件下での障害の程度を測定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vivoで確認された事象をin vitro実験系で再現することは困難であることが多い。組織親和性ペプチドの親和性のメカニズムや虚血再灌流による細胞傷害のメカニズムを検討するために、培養細胞で虚血再灌流傷害を惹起しその程度を評価できる測定系の確立を試みた。細胞内アデニンヌクレオチドと乳酸の測定による細胞障害の判定は、今後の詳細な虚血再灌流傷害機序の解明に寄与することが期待される。

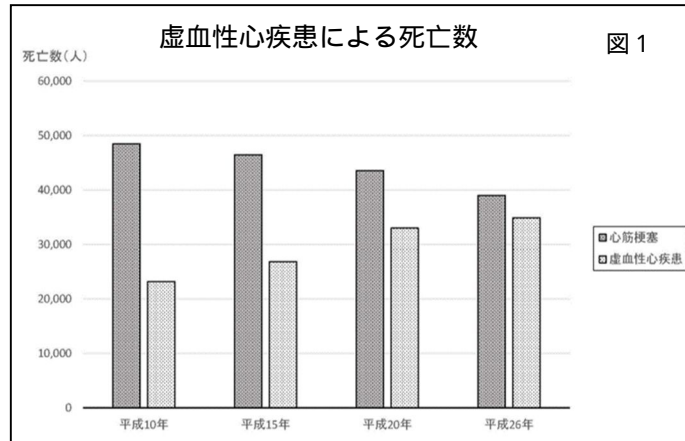
研究成果の概要(英文)：Ischemic Myocardium Targeting Peptide (IMTP) accumulates in specifically ischemic-injured cardiomyocytes in rodent models. We conducted conditional confirmation of in vitro assessment system with cultured rat heart cells (H9c2). We also developed a method of HPLC, by which adenine nucleotides in the cells could be rapidly assayed. We could not confirm IMTP peptide uptake by H9c2 by Image X-press since the uptake was too little to detect by fluorescent observation. We induced cell injury under chemical ischemia with cyanide compound, and measured adenine nucleotides and LDH activity in cultured cells.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：虚血再灌流傷害

1. 研究開始当初の背景

世界に例を見ない高齢化社会を迎えているわが国において、死因に占める心疾患の割合は年々増加している。人口動態総覧によれば、図1に示すように「心筋梗塞による死亡」は減少しているが、「心筋梗塞以外の虚血性心疾患による死亡」は増加している。心筋梗塞の急性期死亡は、経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス手術などの冠動脈再灌流療法の開発や、病院までの到着時間短縮などの医療環境の改善によって減少したが、再灌流療法のみでは虚血性心筋症(心不全)に進展する。これらの症例では、多種の薬物治療や植え込み型除細動器移植を行わなければならず、長期の入院治療を要するため個人的・社会的負担は増大する。虚血性心不全への進行を防止するには、傷害心筋を健常組織と入れ替える再生治療や再灌流療法に加えて、新たな**虚血心筋保護治療の開発が必要**である。



これまでに虚血性心不全に対する治療法は精力的に研究されており、血管内皮前駆細胞や心筋細胞に

分化する幹細胞を虚血領域に移植する方法や、SDF-1 のような幹細胞因子やスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)などの心筋再生・保護因子の冠動脈内注射や心筋に直接注射する方法が臨床段階として検討されている。しかし心筋への細胞移植や注射は侵襲が大きく、患者の負担を軽減するために**新たなドラッグデリバリーシステム**を開発しなければならない。静脈注射による全身投与で虚血心筋組織特異的に薬物を送達する方法があれば、病院到着を待たずして心筋梗塞発症早期に心筋保護治療を開始することができる。

癌創薬分野では、薬剤分子の局在を制御する「分子標的治療薬」が臨床で広く使われるようになったが、最近では病的組織で特異的に効果を発揮する組織親和性物質を用いた「組織標的治療薬」が研究開発されている。これは、全身投与した少量の薬物が**標的組織で薬効を発揮**するものであり、組織親和**ペプチド**が広く用いられている。

我々は、虚血心筋特異的ペプチドを見出す目的で、虚血再灌流傷害ラットに対してファージディスプレイ法を行った。虚血再灌流傷害を作成したラットに、ファージライブラリーを静脈内投与し、虚血心筋組織に集積したファージの遺伝子配列を解析することで、**虚血心筋特異的ペプチド配列**(Ischemic Myocardium Targeting Peptide; IMTP)を発見した。このペプチドは STSMLKA 配列を持つ 9 個のアミノ酸からなる環状ペプチドである。ラットとマウスの心筋虚血モデルを用いた実験で、この IMTP ペプチドが 50kDa の大きさのタンパク質を虚血心筋組織に特異的に集積させることを確認した。ペプチド自体に心毒性はなく、心筋傷害を改善する傾向が認められた。このことから IMTP ペプチドは、ある程度の大きさを持つ心筋保護治療薬を虚血心筋に送達できると考えられる。通常、こういったペプチドには受容体となる分子が存在し、この受容体を同定することが組織親和ペプチドの臨床応用に必須と考えられている。最近我々は、ペプチドを付加したビーズをアフィニティ探索子として用いた動物実験で、受容体分子の候補を 5 つまで絞り込むことができた。受容体分子はいずれも心筋組織に多く分布しミトコンドリアや細胞質などに分布するタンパク質である。現在、それら 5 つのタンパク質の遺伝子を組換えたベクターを作

成し、低酸素培養心筋細胞を用いて研究を継続している。

本研究期間中には、同定された受容体分子の、虚血時に特異的に発現するメカニズムの解明
受容体分子と IMTP ペプチドの解離定数の測定、体内薬物動態の測定 SDF-1 α , SOD, シクロス
ポリリン A と IMTP ペプチドとの融合タンパク質をそれぞれ作成し、動物実験で心筋保護作用を
確認する。

2. 研究の目的

虚血性心不全による死亡率を改善するためには、再灌流傷害から虚血心筋を保護する新たな
治療法の開発が必要である。我々は、ファージディスプレイ法を用いて、虚血心筋組織に特異的
に集積するペプチド(Ischemic Myocardium Targeting Peptide: IMTP)を発見した。さらにこの IMTP
の受容体が正常の心筋内に存在する複数のタンパク質であることも明らかにした。本研究では、
IMTP を用いて虚血性心筋症の治療を開発するため、これらの受容体タンパク質が虚血時にのみ
特異的に IMTP と結合するメカニズムを解明するため、培養細胞系での虚血再灌流傷害の条件を
検討した後、虚血条件下の細胞障害が IMTP によって抑制できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 心筋虚血を模倣する in vitro 条件の検討

ラット心筋再組織由来細胞株 H9c2 にシアン化ナトリウムを暴露し、細胞内、培養液中の LDH 活
性と ATP 量を測定した。グルコースの含有・不含とシアン化ナトリウムの暴露時間を変化させ
た。

100mm の培養皿に H9c2 を 1×10^6 個培養し、シアン化ナトリウムを加えた培地を HEPES バッ
ファーを用いて作成した。一定時間経過後、再酸素化培地を加え、10 分後に培地を除去し、0.5
規定 過塩素酸 (PCA) を加え氷冷。PCA を 5 規定 水酸化カリウムで中和。HPLC を用いてピーク
から ATP, ADP, AMP 量は測定した。中和による希釈と培地の残存量を考慮し、 1×10^6 個培養細
胞あたりの ATP, ADP, AMP 量を算出した。培地中の LDH 活性として、NADH の酸化活性を測定し
た。

(2) H9c2 細胞への IMTP ペプチドの受容体候補タンパク質の遺伝子導入と in vitro 虚血実験

IMTP ペプチドでラット虚血心筋組織のプルダウンを行い質量分析の結果、5 種類のタンパク質
が同定された。それぞれミトコンドリアや細胞質にあるタンパク質であった。これら 5 種類の遺
伝子に蛍光色素タンパク質配列を付加し、発現ベクター-phmMiCy1-MNL にクローニングし、H9c2
に遺伝子導入した。これらの受容体高発現 H9c2 に、シアン化ナトリウム添加とグルコースフリ
ー培養を行った。遺伝子発現細胞はネオマイシンで選択した。

(3) 受容体遺伝子導入 H9c2 の蛍光付加 IMTP のとりこみ

IMTP ペプチドには蛍光色素 TAMRA を付加し、細胞内蛍光色素量を ImageXpress で測定した。

(4) 受容体遺伝子導入 H9c2 の in vitro 虚血条件下の細胞動態の観察

Sony 社製 SI8000 cell imager を用いて H9c2 の Timelapse imaging を行い、虚血条件下での細胞
動態を観察する。

(5) H9c2 細胞の心筋細胞分化と IMTP ペプチド取り込み

受容体遺伝子導入 H9c2 を Retinoic acid 添加により心筋細胞に誘導する。虚血条件下での挙動を
観察する。

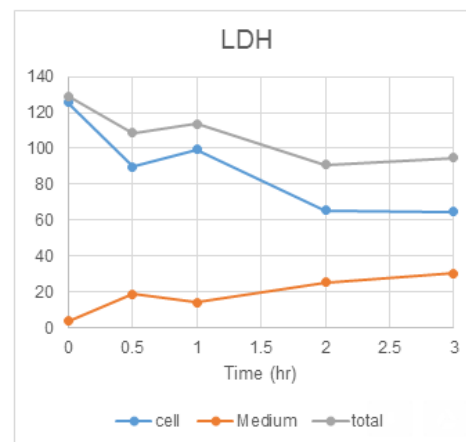
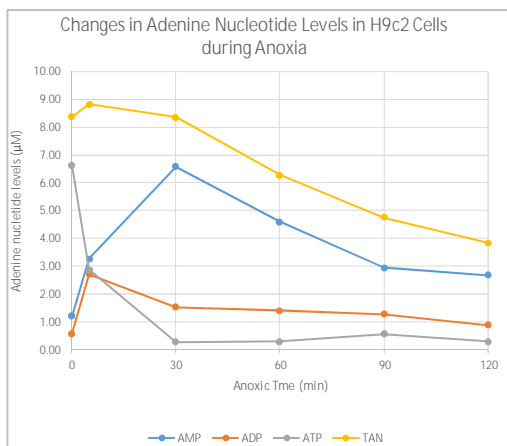
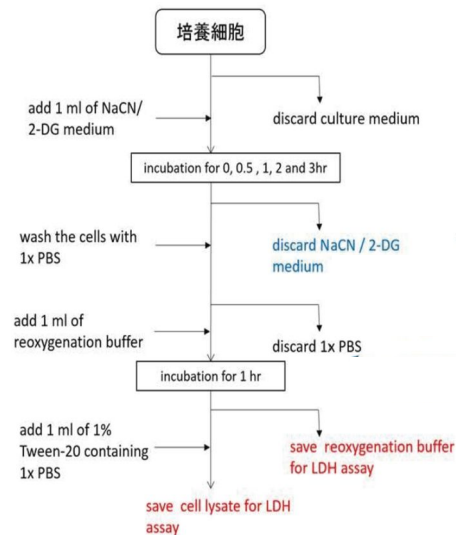
(6) HEK293 細胞への IMTP ペプチドの受容体タンパク質の遺伝子導入との in vitro 虚血実験

安定的に遺伝子を発現できる HEK293 細胞に変更し、受容体タンパク質の遺伝子を pcDNA3.1 ベ
クターにクローニングし、HEK293 で受容体タンパク質を高発現させた。100mm の培養皿に
HEK293 を 1×10^6 個培養し、シアン化ナトリウムを加えた培地を HEPES バッファーを用いて作

成した。一定時間経過後、再酸素化培地を加え、10分後に培地を除去し、0.5規定過塩素酸 (PCA) を加え氷冷。PCA を5規定水酸化カリウムで中和。HPLC を用いてピークから ATP, ADP, AMP 量は測定した。中和による希釈と培地の残存量を考慮し、 1×10^6 個培養細胞あたりの ATP, ADP, AMP 量を算出した。遺伝子導入していない HEK293 細胞において、虚血2時間後の ATP 量は虚血のない細胞の約 40% で H9c2 細胞と同様であった。導入する遺伝子によって細胞の増殖率が異なるため、ディッシュ当たりのタンパク質量を正確に測定する必要があり、Bradford 法、BCA 法、Lowry 法、Biuret 法を検討した結果、Biuret 法で正確なタンパク質量が測定できることがわかった。Biuret 法で測定したタンパク質量を細胞量として、ATP 量の測定値を比較した。

4. 研究成果

(1) H9c2 細胞の虚血条件下での ATP, ADP, AMP 生成量
シアン化ナトリウムは可逆的な無酸素状態が作れるが、暴露時間を延長すると ATP, ADP, AMP の総量が低下し、細胞死が惹起でき、時間の延長と共に死細胞量が増加した。虚血培地として、シアン化ナトリウム 10 mM, NaCl 106 mM, KCl 4.4 mM, $MgCl_2$ 1mM, $CaCl_2$ 0.9 mM, HEPES 25 mM, Phosphate buffer, pH 6.5 2 mM を用いた。HEPES をバッファとして用いたため、 CO_2 インキュベーターで培養すると全細胞死が惹起されたが、これは炭酸ガスによる培地の酸性化によるものであった。細胞の LDH 活性は、虚血時間延長と共に低下し、培地内への漏出も認められた。2時間の虚血暴露によって、細胞は約 40% 死亡していると考えられた。



(2) H9c2 細胞への受容体タンパク質の遺伝子導入

ラット心臓抽出液からタンパク質 5 種類の cDNA をクローニングし、それらの C-末端に蛍光タンパク質 Midoriishi-Cyan (MiCy) が付加するように哺乳類細胞用発現ベクター-phmMiCy-NMLinker にサブクローンした。

(3) 虚血条件下での H9c2 の蛍光付加 IMTP のとりこみ

蛍光色素 TAMRA を付加した IMTP ペプチドを外注し、H9c2 細胞に虚血条件下で添加した IMTP ペプチドの取り込みを、細胞内蛍光色素量として ImageXpress で測定したが、バックグラウンドが高く有効な蛍光量として測定できなかった。自家発光と細胞固定の方法に問題があると考えら

れた。また、取り込み量が検出感度以下であることも問題であると考えられた。

(4) 虚血条件下での H9c2 の細胞動態の観察

Cell image analyzer である SI8000(Sony 社製)を用いて、虚血条件下での H9c2 細胞の細胞動態を観察したところ、細胞は表面から突起のような球体を飛び出したり細胞内に戻したりしながら骨格をダイナミックに変化させていることがわかった。この突起は Bleb や Cell protrusion と考えられた。この突起は破裂することはなかったが、細胞の生死との関連は不明であった。この突起が、のちにエクソソームとして細胞外 LDH 量増加に関与している可能性も考えられた。

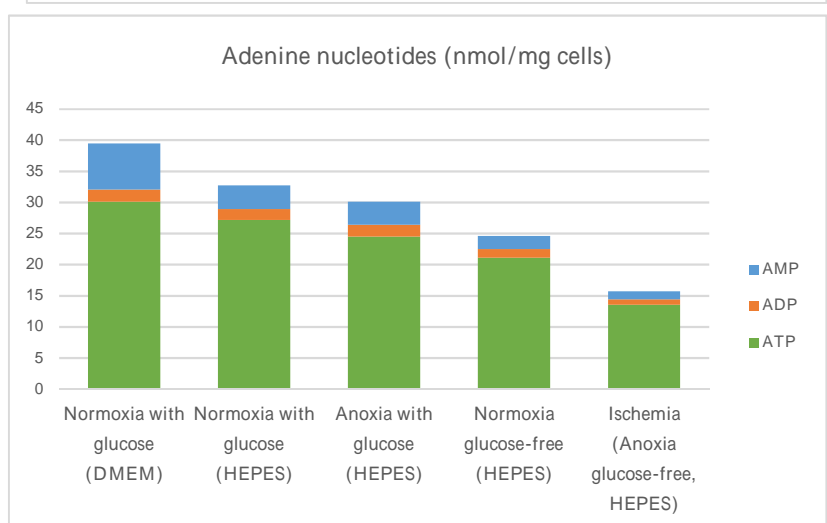
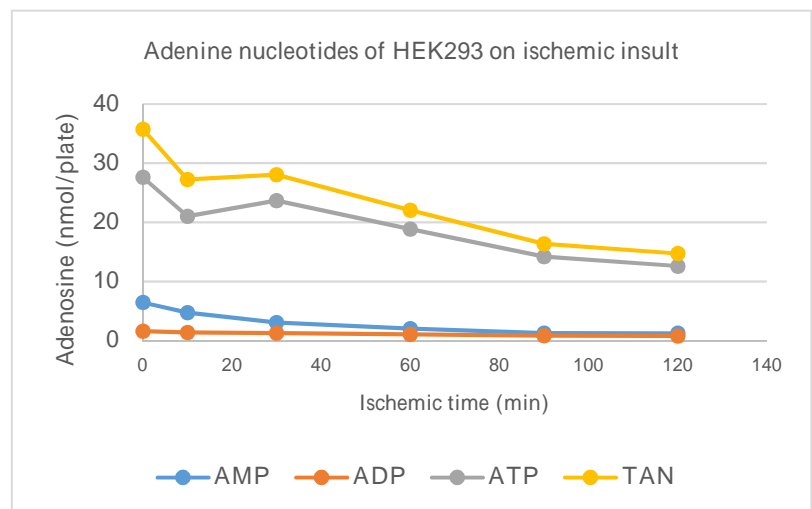
(5) H9c2 細胞の心筋細胞分化と IMTP ペプチド取り込み

H9c2 はラット心筋組織由来であるが、幼若であるためにラットの虚血再灌流傷害心で見られた IMTP ペプチドの取り込みが確認できない可能性があった。そこで、H9c2 を心筋細胞に分化誘導することを試みた。文献では Retinoic acid の添加や電気刺激により心筋細胞に分化できるとのことであったが、心筋細胞への分化は誘導できなかった。条件設定の検討が必要である。今後は iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導して、同様の検討を行う予定である。

(6) HEK293 細胞への IMTP ペプチドの受容体タンパク質の遺伝子導入との in vitro 虚血実験

H9c2 細胞から分化誘導した心筋細胞での IMTP 取り込みの観察が困難であることから、細胞種を HEK293 に変更して安定的に導入遺伝子を発現させることとした。受容体タンパク質に遺伝子を phmMiCy-NMLinker から切り出し pcDNA3.1 ベクターにクローニングした。H9c2 細胞と同様に、遺伝子導入した細胞をシアン化ナトリウムによる虚血条件下に培養し、前述の HPLC を用いて ATP, ADP, AMP 生成量を定量した。播種する細胞量は揃えたが、導入する遺伝子によって細胞増殖効

率が異なったため、培養皿に播種された細胞量をタンパク質量として測定し、細胞重量当たりの ATP, ADP, AMP 量を計測した。細胞タンパク量測定には細胞を溶解するために添加した Tween20 による測定阻害効果が無視できず、これを克服するために Bradford 法、BCA 法、Lowry 法、Biuret 法によるタンパク質量測定を試み、Biuret 法では阻害効果を認めなかった。しかし、感度が悪く試料の全量を使用する必要があったため、コントロールとしての ATP, ADP, AMP 量を測定することができなかった。導入した遺伝子によっては ATP 産生量が多いものもあるが、これは今後の研究結果と併せて検討する必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 房男 (WATANABE FUSAO) (40183719)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	三重野 繁敏 (MIENO SHIGETOSHI) (10411373)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	
研究分担者	福原 慎二 (FUKUHARA SHINJI) (70764984)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	