

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09253

研究課題名（和文）再灌流治療に併用可能な心筋虚血領域標的ペプチドを用いた心筋保護治療法の開発

研究課題名（英文）The development of Cardioprotection therapy with ischemic myocardium-homing peptide along with revascularization

研究代表者

神吉 佐智子（Kanki, Sachiko）

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：40411350

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）：虚血性心不全による死亡率を改善するためには、心筋虚血後に傷害を受けた心筋組織の機能維持と回復を目指した心筋保護治療法の開発が必要である。我々が見出した、虚血心筋組織に特異的に集積するペプチド（Ischemic Myocardium Targeting Peptide: IMTP）は、虚血心筋組織に薬物を送達する目的で使用できる可能性がある。IMTPの親和性物質はラット心筋から単離した。この物質群が組織親和性のメカニズムに関与していると考えられる。本研究ではin vitroでの虚血状態を模倣する培養条件が設定でき、今後はIMTPペプチドの薬剤送達条件を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
虚血傷害組織のみを標的とする心筋保護治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：To improve mortality from ischemic heart failure, it is necessary to develop myocardial protection therapies aimed at maintaining and restoring function of injured myocardial tissue after myocardial ischemia. We have identified a peptide that accumulates specifically in ischemic myocardial tissue (Ischemic Myocardium Targeting Peptide: IMTP), which could be used to deliver drugs to ischemic myocardial tissue. This group of substances may be involved in the mechanism of tissue affinity. In this study, we were able to establish culture conditions that mimic ischemic conditions in vitro and will examine the conditions for drug delivery of IMTP peptides in the future.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：心臓血管外科

キーワード：虚血再灌流傷害 虚血組織送達 心筋細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎えている日本において、心疾患による死亡は悪性新生物(癌)に次いで2番目に多い。人口動態総覧によれば、「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(図1)。2015年度の循環器専門・研修関連施設における心不全による入院患者数は約24万人で、年に1万人以上の割合で増加している。心不全の背景疾患としては、冠動脈疾患の頻度が最も多く、2000~2004年登録のCHART-1研究における23%から、2006~2010年登録のCHART-2研究では47%に増加し、上昇傾向である(2017年改訂版心不全ガイドライン)。他の要因の心不全と同様に、図2に示されるような心不全の進展ステージをたどり、生涯にわたる多種の薬物治療や複数回の入院治療、ときには植え込み型除細動器移植を要し、個人的・社会的負担は増大する。心不全の進行を抑制するには、可能な限りPCIや冠動脈バイパス術、血栓溶解療法などの再灌流療法により心筋虚血を解除し、急性期より左室リモデリング抑制を考慮した治療を行うことが推奨されている。左室リモデリング抑制は心筋虚血後の心不全を最小限に抑えるための方法として有効であるが、虚血心筋の根本的な機能回復(心筋保護治療)ではない。そこで、心機能維持と回復を可能とする根本的な心筋保護治療法の開発は、喫緊の課題である。

心筋虚血後に傷害を受けた心筋組織の機能維持と回復を目指した心筋保護治療法は、これまでに国内外で精力的に研究がおこなわれてきた。これまでに心筋保護効果が明らかに示されているのはIschemic preconditioning (IP)であるが、虚血に先立って治療としての虚血を行うことは現実的ではなく、IPのメカニズム解明によって薬物IPや遠隔部位IPなど臨床に即した治療法が検討されている。しかし、全身投与や冠動脈投与による心筋保護薬の投与は、健常臓器や健常心筋組織への副作用があり、収縮力低下や血圧低下による冠動脈血流量の低下を招く。そこで、虚血傷害組織のみを標的とする心筋保護治療薬の開発が期待される。

2. 研究の目的

我々は、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ペプチドに心筋保護作用のある薬物を結合すれば、健常組織では低濃度で副作用を示さないが、傷害を受けた虚血心筋でのみ高濃度となり薬理作用を発揮できる新たな薬物送達法として臨床応用が期待できる。我々はこれまでの研究で、IMTPペプチドに親和性のあるタンパク質5種を同定するに至った。これら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った。本研究では、親和性タンパク質とIMTPペプチドとの結合特性を比較検討

し、IMTP ペプチドの組織標的特性のメカニズムを解明する。その後、メカニカルストレスがかかる生理的な環境下における、IMTP ペプチド及びその親和性タンパク質の虚血心筋保護作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 親和性タンパク質とペプチドの親和性を評価するためのシステムの構築

通常培養環境における心筋虚血

領域標的ペプチド (IMTP) と、

その親和性タンパク質 (IMTP-

R) の親和性を評価するため、培

養細胞を用いた *in vitro* システム

を構築する。IMTP-R 候補タンパ

ク質 5 種類の cDNA をラット心

臓から PCR 法を用いてクローニ

ングし、それらの C-末端に緑色

蛍光タンパク質 MiCy を付加す

るため、哺乳類細胞用発現ベクター phmMiCy-NMLinker にサブクローニングする (MiCy-IMTP

-R)。これを哺乳細胞に遺伝子導入することで細胞内で過剰発現させる。遺伝子発現細胞はネオ

マイシンで選択する。このタンパク質発現はウェスタンブロッティングで確認し、目的タンパク

質が安定的に発現する条件を検討する。IMTP ペプチドと IMTP-R とのタンパク質相互作用は蛍

光顕微鏡を用いて蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) で評価する。培養細胞としては、ラット心

筋細胞 H9c2、ヒト胎児由来腎細胞である HEK293、ラット新生児心筋細胞の初代培養、ヒト iPS

細胞由来心筋細胞が考えられる。細胞によっては遺伝子導入が困難であったりタンパク質過剰

発現が細胞毒性となる可能性がある。

(2) 心筋虚血を模倣する低酸素条件下の細胞培養

in vitro での心筋虚血は低酸素培養で模倣する。低酸素培養チャンバーが使用できない為、培

養培地にシアン化ナトリウムを添加し、グルコースの含有・不含とシアン化ナトリウムの暴露時

間を変化させる。暴露条件の調整は細胞の ATP, ADP, AMP 量を測定して最適化する。

(3) メカニカルストレッチによる細胞チャレンジ

心筋細胞はひと時も休むことなく収縮と弛緩を繰り返している。また、近傍の細胞により伸展を

受ける。この状態が心筋細胞における定常状態である。虚血下で細胞が収縮と弛緩を行わなくて

も付近の心筋細胞から伸展刺激を受け、さらに前負荷と呼ばれる心室内を充満による血液の圧

力の負荷もかかっている。本研究では、*in vitro* で細胞に負荷を与えるため、ストレッチチャ

ンバーでの培養によるストレッチチャレンジを行う。培養細胞を接着物質をコーティングした

ストレッチチャンバーに移し、細胞がチャンバーにしっかりと接着する条件で、一定時間、一定

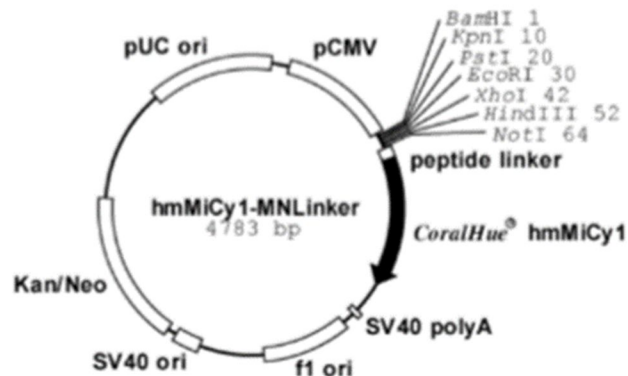
のスピードでストレッチ条件の設定やチャンバーの選定、チャンバーコーティングの条件を検

討する。

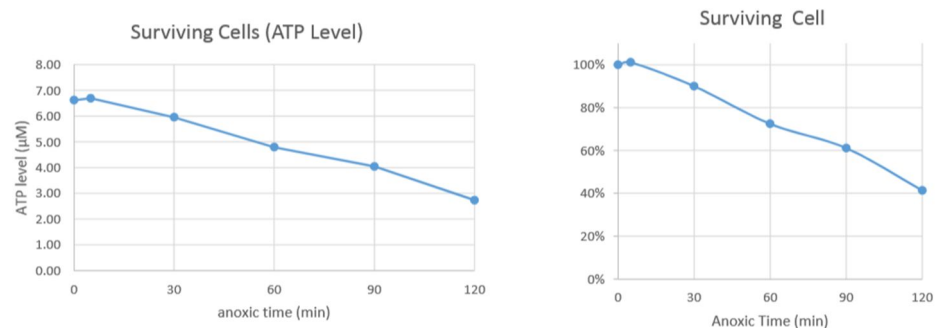
4. 研究成果

H9c2 細胞はラットの心筋芽細胞由来の細胞株であり心筋細胞の研究に広く用いられているため、

今回の研究で用いることとした。しかし、成熟した心筋細胞の特性を完全には再現できないとい



う限界がある。 *in vitro* で心筋虚血状態を低酸素培養で模倣するため培養培地にシアン化ナトリウムを添加し、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。ATP量で細胞生存を確認したところ、下の図の通り、120分で40%の細胞が生存する状態となった。時間と共に生存する細胞が減少していることがわかる。



ついで、H9c2細胞にIMTP-Rの5種類のタンパク質を phmMiCy-NMLinker にサブクローニングし、5種類のMiCy-IMTP-Rを作製した。これをH9c2細胞にNucleofectorを用いて遺伝子導入した。遺伝子発現を確認したが、H9c2では遺伝子導入効率が悪く、次の実験に進むことができなかった。このため、使用する細胞種をHEK293に変更した。HEK293は、ヒト胎児腎細胞由来の細胞株であり、遺伝子発現やタンパク質発現の研究に広く使用されている。遺伝子導入は効率よく行えたが、ただし、心筋細胞の特性を持たないため、心筋研究には適していない可能性がある。そこで、ヒトiPS細胞から心筋細胞に分化させる実験を行った。自律拍動が確認できる状態になったが、分化効率が非常に悪いだけでなく、安定化に数週間かかり遺伝子導入などは考えられない状態であった。並行して、ストレッチチャンパー実験を立ち上げた。この間、COVID19蔓延状態で、機器が日本に入っていない状態が続いた。最終的には筑波大学の工作室で特注することができた。ストレッチチャンパーの培養皿はシリコンで鑄造されている。コーティング条件を検討したがいずれのコーティング剤でも安定して細胞を培養することができなかった。そこで、プラズマ処理機を導入したところ、安定した細胞接着が確認できた。

COVID19蔓延状況で研究を継続することが大変な状態であったが、*in vitro*での虚血細胞を用いた実験の条件設定が整った。

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	三重野 繁敏 (Mieno Shigetoshi) (10411373)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	
研究分担者	渡邊 房男 (Watanabe Fusao) (40183719)	大阪医科薬科大学・医学部・功労教授 (34401)	2021年3月26日に変更申請のとおり、2021年3月31日付で退職し、それ以降も功労教授として科研費の応募資格は有するが、本研究課題への参画が不定期となり、研究協力者に変更した。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関