

令和 4 年 4 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18013

研究課題名（和文）血漿ペプチドーム技術にて同定した新規キニノーゲン由来ペプチドの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel kininogen-derived peptides identified by plasma peptideome technology

研究代表者

小川 顕史（Ogawa, Akifumi）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：70458785

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）：申請者の所属研究室は、質量分析を用いてヒト血漿中に存在する低分子量ペプチドを発見する「ヒト血漿ペプチドーム技術」の開発に成功した。既存のあらゆるペプチドデータベースに記録のない配列をもったペプチドを化学合成し、購入した培養細胞に添加して細胞内カルシウム濃度の上昇や遺伝子増殖などの細胞応答を模索したところ、キニノーゲン由来の2種類の新規ペプチドに強力な細胞内シグナル惹起作用を認め、さらに異なる新規ペプチド2種類にブラジキニンに対するアンタゴニスト作用を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブラジキニン、あるいは生体内に存在するその類似物質の解明は、人体における疼痛や掻痒、時には生命に関わる急性アレルギー疾患などといった治療に難渋する疾患・病態の診断や治療に有益である。当大学が開発・改良した技術によって、「生理活性をもった新規キニノーゲン由来ペプチドがあり、それらが確実にヒト血中に存在している」ことがわかった。本研究の遂行が未解明の疾患・病態に一石を投じ、創薬を含めた新たな治療法開発につながるなどの波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in developing a "human plasma peptideome technology" that discover low molecular weight peptides present in human plasma using mass spectrometry. When peptides with sequences not recorded in all existing peptide databases were chemically synthesized and added to purchased cultured cells to search for cellular responses such as increased intracellular calcium concentration and gene proliferation, two types of sequences derived from kininogen were found. A strong intracellular signal-inducing effect was observed in the peptides of the above, and an antagonistic effect on bradykinin was also observed in two different peptides.

研究分野：内分泌学

キーワード：ブラジキニン 新規ペプチド

## 1, 研究当初の背景

ブラジキニン<sup>1</sup>は強力な発痛物質として認知されているが(Calixto JB et al. Pain 2000;87:1-55)、我が国で難病指定されている遺伝性血管性浮腫や、花粉症といった発痛以外の分野においても関与が指摘されている。遺伝性血管性浮腫は皮膚、粘膜に浮腫の出現を繰り返し、重症例は窒息で死亡する危険性のある疾患である(Bork K , et al. J Allergy Clin Immunol.130:692-697, 2012)。また、スギ花粉症は我が国ではありふれた疾患であり、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜に抗原を滴下するとキニン類の産生が認められることから、キニン類の作用を阻害することが鼻過敏症の症発予防に有効である可能性が示されている(Proud D, et al. J Clin Invest. 72:1678-1685, 1983)。しかし、これらの病態をすべて解明することは非常に難しく、創薬の分野においても依然として効果的なブラジキニン関連薬剤は存在しないと言っても過言ではない。ブラジキニンにおける未知のメカニズムを解明することは、人体に与える様々な苦痛をコントロールする手段の開発に有益であると考えられる。

ヒト血漿中には、未知の低分子量ペプチドが多数存在している。申請者らは、当大学のプロテオミクスセンターが考案した「ヒト血漿中の大分子量蛋白を除去して微量ペプチド分画を高度に濃縮するペプチド抽出技術(Kawashima Y et al. J Proteome Res 2010;9:1694-705)」に改良を重ね、低分子量ペプチドの抽出効率を大きく高めることに成功し、200 µl の血漿サンプルから1万種を超える超微量ペプチドを同定した。同定されたペプチド配列のうち、既存のペプチドデータベースに存在しない配列をもつ低分子量ペプチドを列挙し、その中から周辺の配列や血漿中濃度をもとに生理活性をもつ可能性が高いと推察したものを化学合成し、培養細胞を用いてスクリーニングを行ったところ、キニノーゲンに由来するペプチド群の中に強力な細胞内濃度上昇作用があることを見出した。申請者らは、上述の技術を用いてヒト血漿中に16種類のキニノーゲン由来ペプチドが確実に存在することを発見し、少なくとも2種類の新規ペプチド(以下、#4、#11)に強力な細胞内シグナル惹起作用があることを突き止め、更に異なる2種類の新規ペプチド(以下、#12、#13)は、ブラジキニンに対する内因性アンタゴニストとして働く物質であることが示唆された。

## 2, 研究の目的

本研究の目的は、疼痛や掻痒、時には生命に関わる急性アレルギー疾患などといった治療に難渋する疾患・病態を、内分泌学の観点から解明に導くことであり、その目的の達成に近づく可能性を秘めた新規キニノーゲン由来ペプチドの機能解析を行う。

### 3, 研究の方法

- (1) 96 ウェルプレートにヒト培養細胞をそれぞれ定着させ、FLU04-AM で前処置を行い、蛍光プレートリーダーを用いて新規ペプチド添加後の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を観察する。使用する培養細胞は、ブラジキニン受容体が発現しているヒト線維芽細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト骨細胞（骨肉腫：MG-63）とした。ブラジキニンを対象とし、新規ペプチド #4、#11、#12、#13 をそれぞれ  $10^{-6}$  から  $10^{-8}$ M の濃度で添加し 7 秒毎の蛍光強度変化を分析する。
- (2) 新規キノーゲン由来ペプチドが既存のブラジキニン(B1、B2)受容体に結合するか否か、また結合する場合はこれらの下流に位置する経路のシグナル伝達についても検証を行う。培養細胞に細胞内カルシウムイオン濃度測定試薬である FLU04-AM 導入した後、B2 受容体アンタゴニスト (HOE-140)、Phospholipase C 阻害薬(U-73122)によって前処置を行ったうえでブラジキニン (B2 アゴニスト)、des-Arg<sup>10</sup>カリジン (B1 アゴニスト)、ペプチド#4、#11、#12、#13 を添加する。使用する培養細胞は、ブラジキニン B2 受容体の発現が豊富な MG-63 細胞、B1 受容体の発現が豊富なヒト胎児肺線維芽細胞 (IMR-90) とする。
- (3) MG-63 細胞にブラジキニン、#4、#11、#12、#13 を  $10^{-7}$ M で 30 分間作用させ、c-fos mRNA の変動をリアルタイム PCR 法にて定量的に解析する。続いて、サイトカインの発現定量を目的としたマイクロアレイ解析を行う。本実験は炎症と関連のあるヒト線維芽細胞を使用し、ペプチドの作用時間は既存の実験結果から反応が最も強く観察される 8 時間とした。

### 4, 研究成果

- (1) ヒト線維芽細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト骨肉腫細胞に FLU0-4AM を添加し、ブラジキニン (BK)、ペプチド#4、#11、#12、#13 を添加したところ、BK (図 1-A) と#4 (図 1-B) は  $10^{-6}$ M から  $10^{-8}$ M、#11(図 1-C)は  $10^{-6}$ M から  $10^{-7}$ M にわたり段階的に細胞内カルシウム濃度上昇作用を認めたが、#12、#13 は無反応であった。続いて#12、#13 を  $10^{-5}$ M で 30 分間の前処置を行ったあとに BK を作用させると、前処置のない BK の添加に比して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制されることが明らかになった (図 1-D)。#12、#13 は BK に対して内因性のアンタゴニストとして働く物質であることが示唆される。

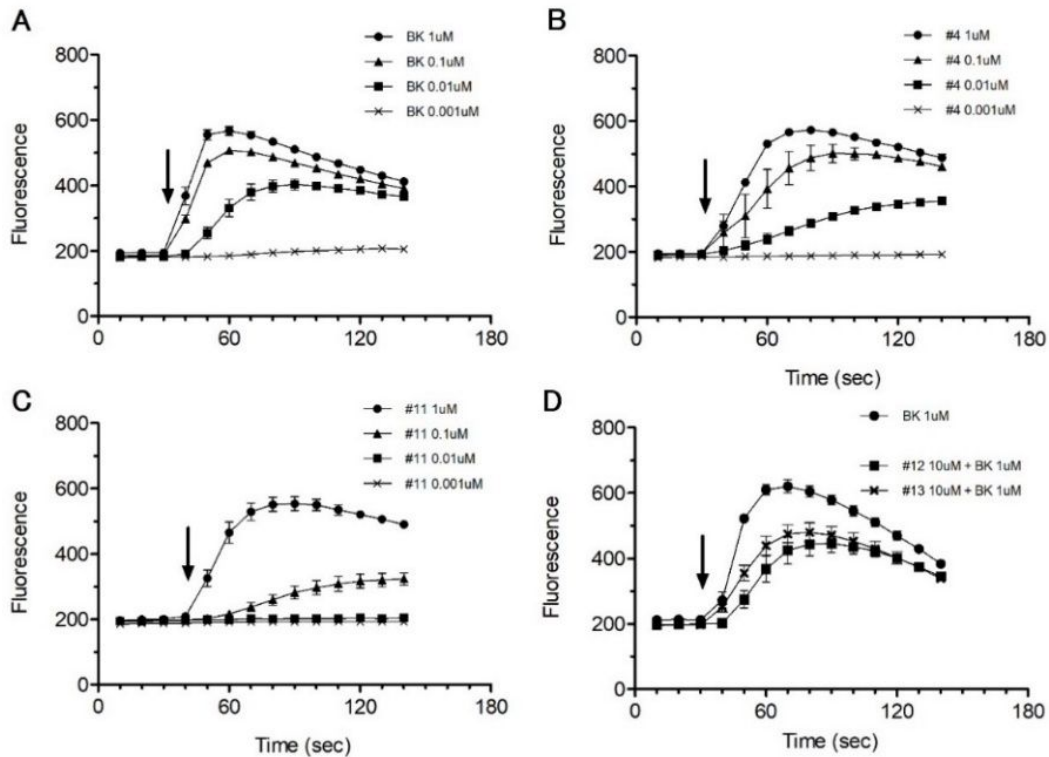


図1 新規キナーゼ由来ペプチドの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用

- (2) ブラジキニン B2 受容体拮抗薬である HOE-140 で前処置を行ったのちにブラジキニン、des-Arg<sup>10</sup>カリジン、ペプチド#4、#11 をそれぞれ MG-63 細胞に添加すると、すべてのペプチドで細胞内カルシウム濃度上昇は認められなかった。続いてブラジキニン B2 受容体の下流に位置するホスホリパーゼ C 阻害薬である U-73122 を前処置して同様の実験を施行すると、ブラジキニンと同様に#4、#11 によるシグナル伝達も完全に抑制された。また、B1 受容体を豊富に発現する IMR-90 細胞に HOE-140 で前処置を行い、わずかに発現する B2 受容体を完全に抑制した状態で上述のペプチドをそれぞれ添加すると、des-Arg<sup>10</sup>カリジンのみ有意な細胞内カルシウムイオン上昇作用を認めた。従って、#4、#11 は B1 受容体には結合せず、B2 受容体に結合し、ブラジキニンと同様のシグナル伝達を行う可能性が高い。

(3) ヒト線維芽細胞にブラジキニン(BK)、#4、#11、#12、#13をそれぞれ30分間添加して回収した細胞ライセートにおけるc-fos mRNA解析を行ったところ、BK、#4、#11、#13においてc-fos mRNAの発現量は増加した。さらに、ヒト線維芽細胞に $10^{-6}$ Mの#12、#13を添加して1時間刺激した後に $10^{-7}$ MのBKを添加して更に30分間刺激した場合のc-fos mRNAの発現量変化は、#12、#13の前処置を行わなかった場合に比して低下することが示された(図2-A) この結果は細胞内カルシウムイオン濃度変化と同様に、#12、#13がBKの内因性アンタゴニストとして働く可能性のあるペプチドであることを示唆する。続いて、ヒト線維芽細胞に#4(図2-B)、#11(図2-C)を8時間作用させて作成した細胞ライセートを用いてサイトカインの発現量変化を確認する目的でマイクロアレイ解析を行うと、IL-8、MCP-1、Endoglinなどの炎症関連遺伝子の増加が認められた。

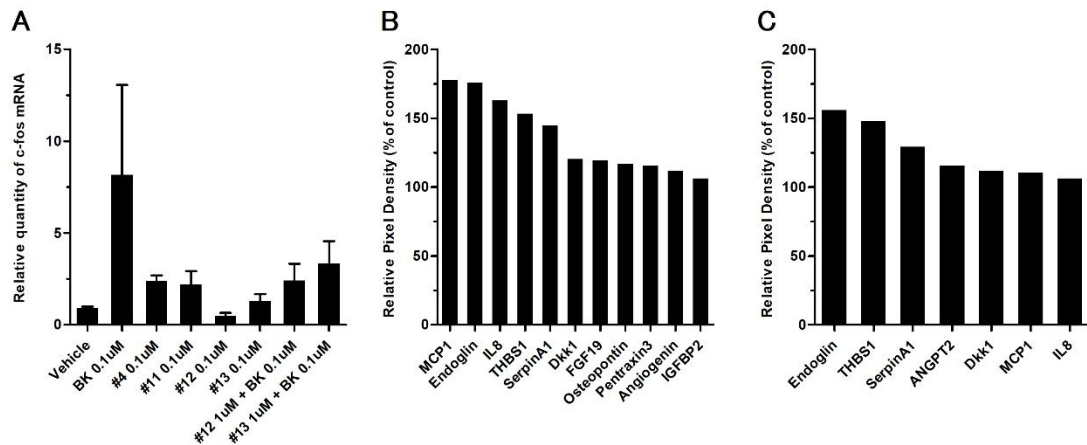


図2 新規キノーゲン由来ペプチドにおける遺伝子発現調節の検証

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------