

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659081

研究課題名（和文） 炎症反応を制御する相補性ペプチドの研究

研究課題名（英文） Novel Complementary Peptides Control Inflammatory Responses

研究代表者

岡田則子（OKADA NORIKO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20160682

研究成果の概要（和文）：補体反応の過程で生成されるアナフィラトキシン C5a は極めて強力な起炎因子であり、好中球や血管内皮細胞を刺激活性化してサイトカインを放出させ、サイトカインストームを引き起こす。アナフィラトキシン C5a により惹起されるこれら重篤な炎症性病態の全容を解明するために、C5a に対する阻害ペプチドを、相補性ペプチド創出技術を用いて創出した。C5a 相補性ペプチド AcPepA の効果をラット脳虚血再灌流モデルで検討したところ、AcPepA を投与した群はクリニカルスコアを有意に抑制した。

研究成果の概要（英文）：C5a anaphylatoxin is considered to be an effective target for treatment of hyperinflammation since C5a stimulates neutrophils and endothelial cells, then generation of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and other inflammatory cytokines. To clear how C5a induces to serious inflammatory responses, we generated C5a inhibitory peptides with an evolutionary computer program that generates complementary peptide (C-pep) sequences. We showed that a novel C5a C-peptide, AcpepA significantly improved an injury score compared to PBS control on rat model with brain ischemia and reperfusion injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	360,000	2,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：アナフィラトキシン C5a、エンドトキシンショック、補体

1. 研究開始当初の背景

マイナスストランド DNA から読まれたとした時のペプチドをアンチセンスペプチド (ASP) と呼ぶが、この ASP は本来のペプチド (センスペプチド：SP) と相互反応をすることが Blalock(1983)により提唱されてい

ることに注目し、SP/ASP の反応概念を導入してコンピュータプログラム ANTIS を作成した。この ANTIS により、任意のタンパク質内あるいはペプチド間での相互反応部位が自動的に検出可能となった。さらに、ANTIS により同定される標的部位を用いて、

標的ペプチドに反応性を持つと予測される相補性ペプチドを設計する相補性ペプチド設計プログラム MIMETIC を開発した。

我々は、この ANTIS および MIMETIC を用いて、任意のタンパク質、例えばトロンボモジュリンや ProCPR、HIV レトロウィルスの逆転写酵素などのタンパク質に対する機能阻害活性のある相補性ペプチドを高い効率ですでに創成している。さらにアナフィラトキシン C5a に対するモノクローナル抗体が敗血症モデル動物に対する治療効果を発揮することが報告されているので、我々はヒト C5a 阻害ペプチド AcPepA を、相補性ペプチド創出技術を用いて創成した。AcPepA はカニクイザルでのエンドトキシンショックや新生児ブタでの CLP 敗血症に対して高い救命効果や延命効果を発揮することを確認できた。それらの動物実験での解析結果より AcPepA の投与による効果は、敗血症の後期産物として知られる HMGB1 や MIF などの炎症性サイトカインの産生を強力に抑制することが相乗的に働いている事も判明した。

2. 研究の目的

相補性ペプチド創出技術は我々が開発した相補性ペプチド設計コンピュータプログラム MIMETIC を活用して任意の標的ペプチドに結合するペプチドである相補性ペプチドを創出する技術である。補体反応の過程で生成されるアナフィラトキシン C5a は極めて強力な起炎因子であり、フェントモルのオーダーで好中球や血管内皮細胞を刺激活性化して TNF α 、HMGB1、MIF などのサイトカインを放出させ、サイトカインストームを引き起こす。アナフィラトキシン C5a により惹起されるこれら重篤な炎症性病態の全容を解明するために、ラットの C5a や副次的に産生される HMGB1、MIF などの起炎因子に対する阻害ペプチドを相補性ペプチド創出技術を用いて新たに設計創出して、これらの炎症阻害ペプチドの効果をエンドトキシンショックや回盲部結紮穿孔(CLP)敗血症モデルなどを含む全身性炎症反応症候群 (SIRS) 病態を動物実験モデルを用いて解析し、アナフィラトキシンや他の起炎因子のヒト SIRS 病態への関与とその制御を目的に解析する。

3. 研究の方法

(1) ラット遺伝子組み換え C5a の作製

ラット肝臓から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリ作成後、RT-PCR で C5a 及び C5adesArg を増幅した。PCR-product をクローニングベクターに組み込み、大腸菌に形質導入をして、クローニングを行い、遺伝子配列を決定した。最後に発現ベクターに組み

替えを行い、大腸菌に形質転換、培養させコロニーを採取し、目的の発現ベクターを得た。

(2) ラット C5a レセプターの発現解析
ラットの好中球・好塩基球様の培養細胞で、C5a 受容体 (C5aR と C5L2) が発現しているかどうかを RT-PCR で検討した。細胞株は Shay と RBL-2H3 細胞を用い、これらの細胞から mRNA を採取後、RT-PCR を行った。

(3) ラット組織における C5a 受容体の発現
ラットの各臓器から mRNA を取り出し、RT-PCR 後、電気泳動を行った。

(4) 脳虚血再灌流モデルにおける C5a 阻害ペプチドの効果

脳虚血再灌流モデルはラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルを用いた。まず、Sprague Dawley Rat 6w(♂)を2%イソフルラン麻酔下に置き頸部正中切開し、迷走神経の保存に留意しつつ右頸動脈分岐部に達した。右総頸動脈を血管クリップではさみ、外頸動脈を切断し、そこから逆行性に内頸動脈へ塞栓糸を挿入した。先端が中大脳動脈分岐部に至ったところで挿入部を結紮し、塞栓糸を固定、CCA のクリップを外し、創部を縫合した。次いで、再灌流は、1時間後(Mild ischemia)または1.5時間後(Severe ischemia)に、塞栓部位を解放し血流を再開し、再灌流直前に AcPepA(4mg/kg)を尾静脈より投与を行った。コントロールは Saline i.v.群とした。術後7日目に運動機能評価を行った。

4. 研究成果

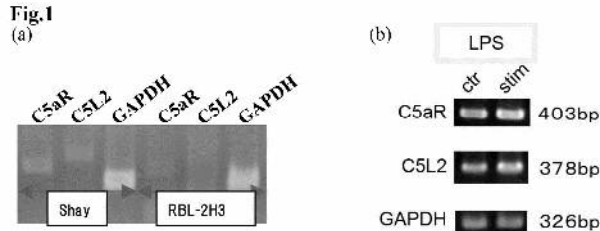
(1) ラット遺伝子組み換え C5a の作製

ヒトの C5a 阻害ペプチド AcPepA を相補性ペプチド創出技術を用いて創出しており、C5a 活性阻害示すことを確認して来た。そこで、このヒト C5a 阻害ペプチドがラット実験系において、抗炎症作用を発揮できるかを検証し、さらにラット C5a の活性を阻害できる相補性ペプチドを新たに設計して、抗炎症作用の基礎的な作用機序の解明ことを試みた。まず、C5a 相補性ペプチドのラット C5a への結合性を調べるために、大腸菌発現系を用いて遺伝子組み換えラット C5a を作製することを試み、発現ベクターを構築した。

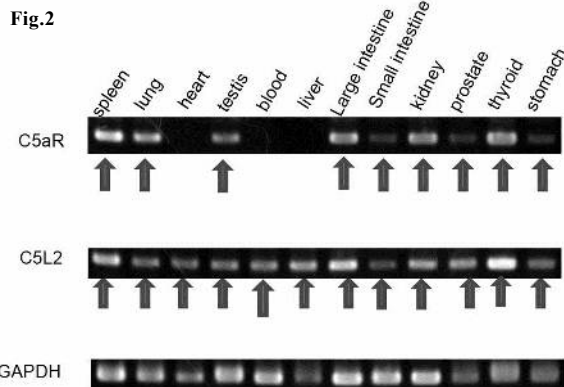
(2) ラット C5a レセプターの発現解析

次にラット C5a の機能阻害活性を解析するために、ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 及び顆粒球細胞株 Shay における C5a レセプターの発現を調べたところ、共に C5a レセプターが発現していることが分かった(Fig. 1a)。次にザイモザンで処理したラット血清を用いて RBL-2H3 細胞に刺激を加えてみたが、未処理の細胞を大きな変化はなかった。RBL-2H3 細胞上の C5a レセプターの発現があまり強くないのが原因と考えられたので、細菌感染時に C5a レセプターの発現が増強するのではないかと考え、LPS で Shay 及び RBL-2H3 細胞を刺

激したところ、C5a レセプターの発現が増強されることが明らかとなった(Fig. 1b)。また、ウイルス感染モデルとして poly-IC で刺激を行ったところ、LPS と同様に C5aR 及び C5L2 の両 C5a レセプターの発現が増強されることが明らかとなった。

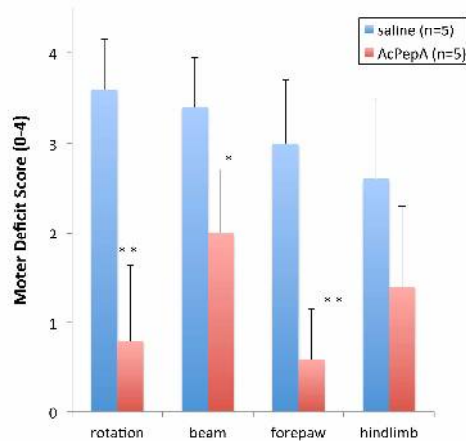


(3) ラット組織における C5a 受容体の発現
C5a 阻害ペプチドがラット実験系において、抗炎症作用を発揮できるかを検証するため、まず、ラット組織における 2 つの C5a 受容体の発現を RT-PCR で行った。C5aR は、Spleen と Thyroid で主に発現している一方、C5L2 は Spleen, Kidney, Testis, Thyroid, Large intestine, Blood, Lung で発現していることが確認できた(Fig. 2)。



(4) 脳虚血再灌流モデルにおける C5a 阻害ペプチドの効果
合成した C5a 相補性ペプチドの阻害活性が脳疾患における代表的なモデルであるラット脳虚血再灌流モデルで有効であるかどうかを検討した。C5a 相補性ペプチド AcPepA を投与した群はクリニカルスコアを有意に抑制した(Fig. 3)。また、延命効果も見られた。しかしながら、TNF、MIF、IL-1、IL-6 等のサイトカインを蛍光ビーズ法により測定したところ、差は見られず、ELISA 法で測定した HMGB1 も同様であった。さらに脳の組織学的評価を H.E 染色および Kluver-Barrera 染色で行ったが、正常ラット脳と比較すると脳虚血再灌流ラットにおいて虚血性変化は起こっているものの C5a 相補性ペプチド投与群においてその変化が减弱していることは確認できなかった。

Fig.3 Score of Each Motor Function Test after 7days at MCAO I/R



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)

[雑誌論文] (計 12 件)

① Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Interleukin-17A-Producing T Lymphocytes in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. Microbiol. Immunol., 57: 139-144 (2013)

② Goto T, Hussein MH, Kato S, Daoud GA, Kato T, Sugiura T, Kakita H, Nobata M, Kamei M, Mizuno H, Imai M, Ito T, Kato I, Suzuki S, Okada N, Togari H, Okada H, Endothelin Receptor Antagonist Attenuates Oxidative Stress in Neonatal Sepsis Model. Pediatric Research, 72: 600-605 (2012)

③ Farkas I., Sarvari M., Aller M., Okada N., Okada H., Liko I., Liposits Z. Estrogen receptor alpha and beta differentially mediate C5aR agonist evoked Ca-influx in neurons through L-type voltage-gated Ca channels. Neurochem. Int. 60: 631-639 (2012)

④ Mizuno M., Ito Y., Harris CL., Suzuki Y., Okada N., Matsuo S., Morgan BP. Membrane complement regulators protect against fibrin exudation increases in a severe peritoneal inflammation model in rats. Am. J. Physiol. Pharmacol., 302: F1245-F1251 (2012)

⑤ Horiuchi T., Ohi H., Ohsawa I., Fujita T., Matsushita M., Okada N., Seya T., Yamamoto T., Endo Y., Hatanaka M., Wakamiya N., Matsumoto M., Inoue N., Nonaka M., Kinoshita T. Guideline for

Hereditary Angioedema (HAE) 2010 by the Japanese Association for Complement Research - Secondary Publication. *Allergology Int.*, 61:559-562 (2012)

⑥ 牧江俊雄, 黒田祥平, 中村 剛, 今井優樹, 森永 紀, 北谷 和之, C型慢性肝炎の治療薬開発を通してみた国内外の臨床試験検索サイトの活用方法の模索. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 43: 446-451 (2012)

⑦ Ito Y, Torii Y, Ohta R, Imai M, Hara S, Kawano Y, Matsubayashi T, Inui A, Yoshikawa T, Nishimura N, Ozaki T, Morishima T, Kimura H, Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children. *Cytokine*, 56:180-187 (2011)

⑧ Okada H, Imai M, Ono F, Okada A, Tada T, Mizue Y, Terao K, Okada N, Novel Complementary Peptides to Target Molecules. *Anticancer Res.*, 31: 2511-2516 (2011)

⑨ Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y, Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol. Immunol.*, 55(3):191-198 (2011)

⑩ Goto T, Hussein MH, Kato S, Daoud GA, Kato T, Sugiura T, Kakita H, Nobata M, Mizuno H, Imai M, Ito T, Kato I, Suzuki S, Okada N, Togari H, Okada H, Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model. *Eur J Intensive Care Med.*, 36(12):2132-2139 (2010)

⑪ Asai S, Kimbara N, Tada T, Imai M*, Campbell W, Okada H, Okada N, Procarboxypeptidase R Deficiency Causes Increased Lethality in Concanavalin A-induced Hepatitis in Female Mice. *Biol Pharm Bull.*, 33:1256-1259 (2010)

⑫ 今井優樹, 岡田則子. 腫瘍の補体制御因子による免疫回避. *臨床免疫・アレルギー科* 56: 31-37 (2011)

[学会発表] (計 11 件)

① Imai M, Ohta R, Okada N, Enhancing antibody immunotherapy by orally administered herbal medicine Juzen-taiho-to. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 2012 年 12 月 5~7 日、神戸国際会議場(神戸)

② Mizuno T, Mizuno M, Imai M, Suzuki Y, Kushida M, Yamada K, Noda Y, Maruyama S, Okada H, Okada N, Matsuo S, Ito Y, C5a is a target to prevent peritoneal tissue damage in acute peritoneal injury in rats. XXIV International Complement Workshop, October 10th-15th, 2012, Crete, Greece, *Immunobiology* 217: (2012)

③ 今井優樹, 太田里永子, 岡田則子, 口腔癌に対する抗 MUC1 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性と補体膜制御因子の影響. 第 49 回補体シンポジウム, 2012 年 8 月 24~25 日、大阪成人病センター(大阪)

④ 水野智博, 水野正司, 櫛田真由, 野田幸裕, 山田清文, 今井優樹, 岡田秀親, 岡田則子, 丸山彰一, 松尾清一, 伊藤恭彦, 急性腹膜炎生涯に対するアンチセンス C5a ペプチドの治療効果. 第 49 回補体シンポジウム, 2012 年 8 月 24~25 日、大阪成人病センター(大阪)

⑤ Imai M, Ohta R, Okada N, Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 2011 年 11 月 27~29 日、幕張メッセ(千葉市)

⑥ Okada N, Imai M, Goto T, Hamed M, Okada A, Ono F, Okada H, Inactivation of C5a anaphylatoxin is an effective treatment of sepsis. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 2011 年 11 月 27~29 日、幕張メッセ(千葉市)

⑦ 太田里永子, 伊藤嘉規, 鳥居ゆか, 木村宏, 岡田則子, 今井優樹, H1N1 インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシン及び HMGB1 の関与. 第 48 回補体シンポジウム, 2011 年 9 月 2~3 日、名古屋市立大学医学部(名古屋)

⑧ 朝井鈴佳, 金原紀章, 多田豊廣, 今井優樹, Campbell W, 岡田秀親, 岡田則子, プロカルボキシペプチダーゼ R 欠損はコンカナバリン A 誘発性肝炎による致死率を雌マウスにおいて増大させる. 第 48 回補体シンポ

ジウム、2011年9月2～3日、名古屋市立大学医学部(名古屋)

⑨ 水野智博, 水野正司, 榎田真由, 野田幸裕, 山田清文, 今井優樹, 岡田秀親, 岡田則子, 丸山彰一, 松尾清一, 伊藤恭彦、急性腹膜障害に対する C5a の関与と C5a 阻害薬の有用性. 第 48 回補体シンポジウム、2011年9月2～3日、名古屋市立大学医学部(名古屋)

⑩ 太田里永子, 伊藤嘉規, 鳥居ゆか, 木村宏, 岡田則子, 今井優樹、新型 H1N1 インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシンの関与. 第 47 回補体シンポジウム、2010年9月10～11日、コラッセふくしま(福島)

⑪ Asai S, Imai M, Kimbara N, Tada T, Campbell W, Okada H, Okada N, Procarboxypeptidase R Deficiency Causes Increased Lethality in Concanavalin A-induced Hepatitis in Female Mice. XXIII International Complement Workshop, August 1st-5th, 2010, New York, NY, USA, Mol. Immunol., 47: 2199 (2010)

[図書] (計 1 件)

① 今井優樹、岡田則子 基礎編「後期経路」, p26-38、 「補体への招待」、大井 洋之, 木下 タロウ, 松下 操 編、メジカルビュー社、2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 則子 (OKADA NORIKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20160682

(2) 研究分担者

今井 優樹 (IMAI MASAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30440936