

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790988

研究課題名(和文) 組織特異的ペプチドを用いた神経疾患への分子治療および体外イメージングの開発

研究課題名(英文) Molecular therapy and imaging for neurodegenerative disease with tissue specific targeting peptides

研究代表者

寺島 智也(Terashima, Tomoya)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40378485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄組織特異的な体外イメージング技術の開発や安全性の高い新規分子治療法(遺伝子治療およびペプチド療法)の開発を目指して、脊髄特異的結合ペプチドの同定を行った。その結果、我々は脊髄組織特異的に標識する2種類のペプチド(7アミノ酸からなる)を同定した。そのペプチドを用いてイメージングの検討を行ったが、残念ながら、感度の問題で期待する結果は得られなかったが、組織のターゲティングには成功し、短鎖の遺伝子を脊髄組織まで効率よく輸送することが可能であった。そのため、この技術は、神経難病治療へ十分応用可能であると考えられ、新規分子治療法への今後の発展性が期待された。

研究成果の概要(英文)：Engineering the new strategy of imaging or molecular therapy for spinal cord, we investigated to identify the specific peptides to bind with spinal cord. At last, we identified two kinds of peptides, which had high affinity with spinal cord. Next, we tried the examination for the imaging of spinal cord with using the peptides. Unfortunately, we couldn't success to establish the new imaging method with the peptides because the sensitivities had some problems. However, we succeeded the targeting to spinal cord with the peptides, which could effectively deliver the small oligonucleotides to spinal cord. This strategy has high potential to realize the new molecular therapy for non-curable neurological disease, which is expected to be arranged to more suitable condition for the neurodegenerative diseases.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：分子治療 遺伝子治療 イメージング 組織特異的ペプチド 標的化

### 1. 研究開始当初の背景

神経難病に苦しむ患者は数多く、そのほとんどは難治性で、確立された治療法が存在しない。そのため治療法の開発は急務であり、世界中の研究者が日々、新規治療法開発に取り組んでいる。その中でも、近年、再生医療や遺伝子治療が大変注目を浴びているが、安全性や実用性の面で、まだまだ解決しなければならない問題点は多い。そこで、我々は遺伝子治療に“組織特異性”を組み込むことに着目した。目的臓器や細胞のみに治療を施してやるのが可能となれば、副作用を最小限に抑えられるとともに、効率よく治療効果が得られることが予想され、安全性や有効性の飛躍的な向上が期待できると考えたからである。我々は現在までに神経細胞特異的に結合するペプチドを見つけ、その同定したペプチド配列を用いて安全で副作用の少ない遺伝子治療ベクターの開発に成功した。

そこで、今回、我々は、脊髄特異的結合ペプチドの新規同定を行い、脊髄神経細胞の特異的ターゲティングを実現し、それらを用いた組織特異的な体外イメージング技術の開発や安全性の高い組織特異的な新規分子治療法（遺伝子治療法およびペプチド療法）の開発を行い、神経難病の病勢把握のための画像診断や新規治療法の臨床応用への新たな可能性を提唱することを目的とし、これらの検討を行うことに至った。

### 2. 研究の目的

動物実験において、脊髄神経細胞に特異的に結合するペプチドを同定することにより、細胞特異的なターゲティングを実現し、体外イメージング技術の開発および新規分子治療（ペプチド治療、遺伝子治療法）の開発に応用することにより、神経難病への新たな診断技術および治療技術の新しい方向性を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脊髄神経細胞特異的ターゲティングペプチドの同定

M13 ファージ(繊維状ファージ)の親和性決定に関わっているとされる先端部の7つのアミノ酸配列をランダムに発現するように改良されたファージライブラリー (C7C Phage library (NEB))のうち $10^{12}$ 個のファージを C57/BL マウスに静脈注射し、5分後に経心臓的に脱血および洗浄を行い、脊髄を採取。重さを量り、培養液にてホモゲナイズ後、大腸菌と混和にて感染させたのち、LB Agar と混合、プレーティングにて、ファージのプラークを得て、ファージのタイターをチェックし、脊髄単位重量あたりのファージ数を求める(バイオパンニング)。その後、十分量のファージを増幅させ、再度 $10^{12}$ 個のファージを新たな wild type マウスに投与し、以下同じ過程を三回繰り返す。そこで、回を重ねることにより、脊髄より回収できるファージ

数が増加し、より親和性の高い、ペプチド配列が得られる。三回のバイオパンニング後、再度ファージ溶液をマウスに投与し、脊髄を取り出した後、20マイクロ-50マイクロメートルほどの厚さの切片より、前角細胞をレーザーキャプチャーし、得られた組織を大腸菌に感染させ、ファージをリカバーする。そこで得られたファージをひとつずつ遺伝子シーケンスを行い、同配列の頻度の高いものから数個を候補の特異的ペプチドとする。また、候補として同定された脊髄神経細胞特異的標識ペプチド(7アミノ酸配列)を合成し、蛍光色素やビオチンで標識。それをマウスに経静脈的に投与し、組織学的に蛍光強度を評価およびペルオキシゾーム-アビジンにてビオチン化ペプチドと結合させ、DAB 発色にて染色性を定量することにより個々のペプチドの親和性を評価する。また、標識細胞の種類や特徴を十分把握し、治療や画像検査へ応用可能かを評価、決定する。

#### (2) 脊髄神経細胞特異的ペプチドのイメージングへの応用

同定した脊髄神経細胞特異的ペプチドを合成し、蛍光色素で標識後、疾患モデルマウスに経静脈的に投与。生体のままで、経時的に、体外イメージング装置で蛍光強度を評価し、行動学的検査のデータや実際の組織切片での残存ニューロンとの相関性を比較検討し、検査技術としての有用性を評価するとともに、症状や病期の分類への応用について検討する。

#### (3) 脊髄神経細胞特異的ペプチドの分子治療への応用

同定した脊髄神経細胞特異的ペプチドに疾患抑制的に働く small oligo を結合させ、SOD1 トランスジェニックマウス(ALS モデルマウス)に投与し、運動機能障害を効率よく抑制できるか否かを検討する。また、行動学、組織学および生化学的検討も同時に行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 脊髄特異的ターゲティングペプチドの同定

脊髄前角細胞特異的結合ペプチドを同定するために、ランダムファージライブラリー (C7C Phage library (NEB)) のファージ $10^{12}$ 個を用いて、in vivo ファージディスプレイを行った。C57/BL マウスにファージライブラリーを注射し、脊髄組織を回収するバイオパンニングを5回繰り返し、結合力の高いファージのシーケンスを検索すると共に、脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓を取り出し、結合頻度について検討を行った。

[結果 1] in vivo ファージパンニングを5回繰り返すことにより、1回目のライブラリー投与に比べ、2~5回目で、回収されるファージ量は漸増し、5回目終了で1回目の約1000倍の量のファージが回収された。

【結果2】5回で得られたファージの組織結合部に相当する遺伝子をシークエンスすることにより、2つの親和性の高い配列候補が同定された。配列Aは、全体の約66%で、配列Bは、全体の26%で認められ、いずれも高頻度に存在することが示された。

【結果3】配列AおよびBを含むファージを増幅させ、単一のファージの $10^{12}$ 個をそれぞれ、マウスに注射し、脳、脊髄、心臓、肝臓、腎臓を取り出して、ライブラリーに対する親和性の変化を検討したところ、配列A、配列Bでは、単位重量あたり、脊髄組織で最も高い親和性を示し、ライブラリーに比し、1000から10000倍の高親和性を示した。他臓器については、配列Aでライブラリーと同程度、配列Bでは、ライブラリーの数倍から10倍程度の親和性を認められたが、脊髄に対する親和性には、遠く及ばなかった。以上より、現在までに、脊髄組織特異的結合ペプチド2つを同定した。

#### (2) マウス脊髄組織へのイメージングの応用

感度の問題より、蛍光標識ではなく、同定した脊髄ペプチドを酸化鉄で標識し、尾静脈より経静脈的に投与を行いMRIにて撮影する方針に変更した。同定したペプチドを酸化鉄で標識することは可能であったが、MRIにて信号を検出するためには、やはり感度の問題があり、全身投与では、更に大量のペプチドが必要であり、感度を増幅させるような工夫が必要であり、当初の計画の様に、イメージングへの応用としては、検討の余地を残した。

#### (3) モデル動物への治療検討

同定した脊髄組織に対する標的アミノ酸配列Aおよび配列B(7アミノ酸+両端にシステイン残基)を外部委託にて合成依頼。そのC端側に9つのアルギニンを付加し、N端には標識のためにFITCラベルとした。配列AまたはBを含むペプチドのみを尾静脈より注射し、脊髄組織での局在の検討を行った。結果として、合成ペプチドは、いずれも脊髄全体へと分布しており、脊髄組織内の細胞単位というよりは、組織としての標的化に応用できると考えられた。そこで、我々は、筋萎縮性側索硬化症のモデル動物であるSOD1(G93A)マウスにて、異常SOD1の発現を抑制することによる遺伝子治療を試みることにした。現在までに、SOD1蛋白のノックダウン効果が報告されているsiRNA-SOD1のオリゴを外部委託により合成。そのオリゴとペプチドを結合させ、SOD1(G93A)マウスに投与を行った。週1回または3回投与にて検討を行ったところ、脊髄組織内で変異型SOD1蛋白の発現抑制を認めた。運動機能障害の進展についても若干の遅延効果を認める傾向にあり、今後の更なる検討が期待された。

#### 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14件)

Terashima T, Kojima H, Urabe H, Yamakawa I, Ogawa N, Kawai H, Chan L, Maegawa H. Stem Cell Factor-Activated Bone Marrow Ameliorates Amyotrophic Lateral Sclerosis by Promoting Protective Microglial Migration. *J. Neurosci. Res.* 2014. (査読有)

Katagi M, Terashima T, Okano J, Urabe H, Nakae Y, Ogawa N, Udagawa J, Maegawa H, Matsumura K, Chan L, Kojima H. Hyperglycemia induces abnormal gene expression in hematopoietic stem cells and their progeny in diabetic neuropathy. *FEBS letters.* 2014. (査読有)

Ogawa N, Kawai H, Terashima T, Kojima H, Oka K, Chan L, Maegawa H. Gene therapy for neuropathic pain by silencing of TNF- $\alpha$  expression with lentiviral vectors targeting the dorsal root ganglion in mice. *PLoS One.* 2014. (査読有)

寺島智也. 糖尿病性神経障害の細胞生物学: 異常骨髄細胞の関わり. 糖尿病合併症, 28巻1号 S2-3, メディカルジャーナル社, 2014, in press. (査読無)

寺島智也, 小島秀人, 大井二郎, 川合寛道, 前川聡. 分子ZIPコード標識による超ウイルスベクターを用いたピンポイント遺伝子輸送. *滋賀医大誌* 26(1), a5-7, 2013. (査読無)

椎野顯彦, 小島秀人, 小松直樹, 小畑利之, 寺島智也, 前川聡, 犬伏俊郎, 柏木厚典. ファージディスプレイ法を用いた分子標的造影剤の開発: マウス膵臓の細胞の造影. *滋賀医大誌* 26(1), a8-10, 2013. (査読無)

藤野和典, 小島秀人, 松村一弘, 櫻美和子, 寺島智也, 小川暢弘. 肝血管走行改変と遺伝子治療による全膵機能再生の試み. *滋賀医大誌* 26(1), a11-13, 2013. (査読無)

小島秀人, 櫻美和子, 寺島智也, 前川聡, 木村博. 糖尿病合併症を誘導する異常骨髄幹細胞の同定と新規治療の

開発. 滋賀医大誌 26(1), a14-19, 2013.  
(査読無)

Urabe H, Kojima H, Chan L, Terashima T, Ogawa N, Katagi M, Fujino K, Kumagai A, Kawai H, Asakawa A, Inui A, Yasuda H, Eguchi Y, Oka K, Maegawa H, Kashiwagi A, Kimura H. Haematopoietic cells produce BDNF and regulate appetite upon migration to the hypothalamus. *Nat. Commun.*, 4:1526, 2013. (査読有)

Li R, Paul A, Ko KW, Sheldon M, Rich BE, Terashima T, Dieker C, Cormier S, Li L, Nour EA, Chan L, Oka K. Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium. *Eur. Heart J.*, 33(24): 3114-23, 2012. (査読有)

Terashima T, Kojima H, Chan L. Bone marrow expression of poly(ADP-ribose) polymerase underlies diabetic neuropathy via hematopoietic-neuronal cell fusion. *FASEB J.*, 26 (1) : 295-308, 2012. (査読有)

Takemura Y, Imai S, Kojima H, Katagi M, Yamakawa I, Kasahara T, Urabe H, Terashima T, Yasuda H, Chan L, Kimura H, Matsusue Y. Brain-Derived Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Peripheral Nerve. *PLoS One.*, 7 (9) : e44592, 2012. (査読有)

Chan L, Terashima T, Urabe H, Lin F, Kojima H. Pathogenesis of diabetic neuropathy: bad to the bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec;1240:70-6. (査読無)

Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H. Inactivation of TNF- $\alpha$  ameliorates diabetic neuropathy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Nov;301(5):E844-52. (査読有)

[学会発表](計 14 件)

小川暢弘、寺島智也、川合寛道、小島秀人、Kazuhiro Oka, Lawrence Chan、前

川 聡.  
TNF 発現抑制による脊髄後根神経細胞保護作用を介した神経因性疼痛への遺伝子治療 日本再生医療学会総会 2014.3.

中江由希、小島秀人、寺島智也、榎美和子、小川暢弘、岡野純子、Zhao Li、小松直樹、前川 聡. 標的化ナノダイヤモンドベクターの開発:DRG 神経細胞への遺伝子輸送ベクター 日本再生医療学会総会 2014.3.

榎美和子、小島秀人、中江由希、寺島智也、岡野純子、宇田川潤、前川 聡. 糖尿病性神経障害を誘導する異常な骨髄幹細胞の同定. 日本再生医療学会総会 2014.3.

Terashima T, Kojima H, Ogawa N, Yamakawa I, Urabe H, Kawai H, Maegawa H. SCF-activated bone marrow transplantation in ALS model mice. The 24th Annual Meeting of the International Symposium on ALS/MND. Milan, Italy, December, 2013.

寺島智也 糖尿病性神経障害の細胞生物学:異常骨髄細胞の関わり. 日本糖尿病合併症学会総会 シンポジウム 2013.9.

寺島智也、端真季子、小川暢弘、小島秀人、杉原芳子、山川 勇、大井二郎、金一暎、川合寛道、前川 聡. ALS モデルマウス脊髄組織におけるケモカイン発現と疾患関連性についての検討. 日本神経学会総会 2013.5.

小島秀人、中江由希、早瀬史子、寺島智也、榎美和子、小松直樹. 細胞標的化ナノダイヤモンドベクターの開発. 日本再生医療学会総会 2013.3.

榎美和子、寺島智也、小島秀人. 糖尿病における骨髄幹細胞の分化異常と糖毒性メモリー. 日本再生医療学会総会 2013.3.

寺島智也、小川暢弘、小島秀人、浦部博志、山川 勇、早瀬史子、大井二郎、金一暎、川合寛道、前川 聡. 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける骨髄由来細胞の治療有用性の検討. 日本再生医療学会総会 2012.6.

Nobuhiro Ogawa, Tomoya Terashima, Kazuhiro Oka, Hideto Kojima, Fumiko Hayase, Jiro Oi, Isamu Yamakawa, Hyoh Kim, Lawrence Chan, Hiromichi Kawai, Hiroshi Maegawa.

ENGINEERING OF GENE  
THERAPY FOR NEUROPATHIC  
PAIN BY SILENCING OF TNF $\alpha$  IN  
DRG FROM SPINAL NERVE  
TRANSECTION MODEL MOUSE.  
Japan Society of Gene Therapy.2012.6.

寺島智也、小川暢弘、小島秀人、浦部博志、山川 勇、早瀬史子、大井二郎、金一暁、川合寛道、前川 聡. 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける SCF 培養骨髄由来細胞の治療有用性. 日本神経学会 2012.5.

早瀬史子、寺島智也、中江由紀、大井二郎、小川暢弘、山川 勇、金 一暁、川合寛道、鳥居隆三、小島秀人、前川 聡. カニクイザル脊髄後根神経節を用いた細胞特異的ターゲティングの実現. 日本神経学会 2012.5.

小川暢弘、寺島智也、小島秀人、早瀬史子、金 一暁、山川 勇、川合寛道、前川聡、Kazuhiro Oka、Laurence Chan. TNF $\alpha$  発現抑制を介した神経因性疼痛に対する遺伝子治療法の開発. 日本神経学会 2012.5.

寺島智也、小川暢弘、小島秀人、浦部博志、山川 勇、片山由理、真田 充、川合寛道、前川 聡. 筋萎縮性側索硬化症における骨髄由来細胞の関連性及び治療への有用性の検討日本神経学会 2011.5.

〔図書〕  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況（計 1 件）

名称：脊髄組織標的化ペプチド及びその利用  
発明者：寺島智也、前川 聡、小島秀人  
権利者：国立大学法人滋賀医科大学  
番号：特願 2014-82766  
出願年月日：2014 年 4 月 14 日  
国内外の別： 国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
寺島智也 (TERASHIMA TOMOYA)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40378485

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者  
小島秀人 (KOJIMA HIDETO)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00225434