

## 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 25 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	研究活動スタート支援
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23890230
研究課題名（和文）	虚血心筋ホーミングペプチドを用いた組織選択的心不全治療法
研究課題名（英文）	Tissue-selective heart failure treatment with the ischemic heart-homing peptide
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

## 研究成果の概要（和文）：

虚血心筋ホーミングペプチドの受容体探索に用いるアフィニティ担体は、磁性フェライトを Poly-glycidylmethacrylate 樹脂で被覆した直径 200 nm の微粒子であるビーズ（FG-ビーズ）を使用した。FG ビーズへのペプチドの固定化条件を検討した結果、N' 末端をアセチレン化したペプチドとアジド化した FG ビーズとの反応が至適であることがわかった。全身麻酔を施したラットの冠動脈前下行枝を一時結紮し、虚血心筋組織を採取し、組織破砕液を作成し、今後プルダウンアッセイを行う。

## 研究成果の概要（英文）：

To find a receptor molecule of the ischemic heart-homing peptide, the affinity screening is necessary and the carrier must play a key role. FG beads, which are 200nm in diameter and consisted of magnetic ferrite covered by Poly-glycidylmethacrylate resin, are used as affinity carrier to bind the ischemic heart-homing peptides. The condition to bind the peptide to FG beads was optimized, and the combination of the acetylene peptide at N'-terminus and azide FG beads worked not destroy tertiary structure of peptide. Then, pull-down assay with the affinity beads was performed to find receptors for the homing peptide from ischemic heart tissue of rats, which is made by temporary occlusion of left coronary artery.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：心筋虚血、アフィニティ精製、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化や生活習慣の欧米化により、わが国においても虚血性心疾患による心不全患者が増加している。虚血性心疾患の治療には、経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス手術などによる冠動脈再灌流療法が有効であるが、地理的な問題や社会的要因などから適切な時間に再灌流が行えない症例や、再灌流に成功しても心筋細胞の障害（再灌流障害）を合併する症例があり、これらは虚血性心筋症といわれる心不全に進行することが知られている。また、再灌流が成功しても発症後 30 日以内に不整脈など重篤な合併症を有する症例が約 5%存在する。冠動脈の狭窄や閉塞による血流低下で障害された心筋は、収縮力が低下し周囲の線維性組織の増生により弾性が失われ、その後も高圧に曝されるためさらに障害をうける。

現在精力的に研究されている再生治療分野では、虚血領域での血管新生や心筋細胞の新生が試みられている。例えば、骨髄細胞から血管内皮前駆細胞や心筋細胞に分化すると考えられる幹細胞を分離し虚血領域に移植する方法や、幹細胞因子やサイトカインなどに代表される生理活性物質を心筋に注射する方法などである。

他方、癌治療創薬分野では、分子生物学の進歩により標的分子を特異的に制御する「分子標的治療」が研究され、臨床の場においても広く用いられるようになった。この方法は正常細胞への影響をできるだけ抑えることを可能とし、副作用は軽微なものになると考

えられる。さらに、Drug Delivery System と呼ばれる組織親和性物質を用いた「組織標的治療」は、少量の薬剤の全身投与によっても、標的臓器での濃度を飛躍的に上昇させることができる。これによって、効果的な治療が行えると考えられ、今後の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

近年、この「組織標的治療」に用いる特異的なペプチド配列を見出す目的で、in vivo でのフェージディスプレイ法が開発された。我々は、ラット心筋梗塞モデルを用いて、このフェージディスプレイ法によるペプチドのスクリーニングを行い、虚血した心筋のみを標的とするペプチド配列を発見した。このペプチドは以下のとおり 9 つのアミノ酸で構成され (Cys- Ser- Thr- Ser- Met- Leu- Lys- Ala- Cys)、非常に低分子である (Molecular weight : 943 Da)。本ペプチドは静脈内に単独で投与した場合でも、分子量 40kDa の蛍光蛋白質と結合させて投与した場合でも、虚血心筋選択的に集積することを確認している。これは、このペプチドをこれまで研究されてきた心筋保護及び再生因子と融合した場合にも、虚血心筋に集積できることを示唆している。

組織選択的ホーミングペプチドを臨床に応用する場合には、組織選択性の検討だけでは不十分であり、そのメカニズムの解明が必要である。そのメカニズムとして予想されるのは、本ペプチドをリガンドとする受容体の存在である。

そこで、本研究の第1段階では、ナノ磁性微粒子を用いたプルダウン法を応用して、目的の受容体分子を精製し、質量分析法を用いて同定する。さらに、ラット心筋梗塞モデルを用いて、この受容体分子の虚血による発現機構とそのシグナル伝達系を解明する。次に、第2段階として、本ペプチドと種々の虚血心筋保護再生因子との融合蛋白質を作成し、虚血心筋に対する治療効果が増強されるかを判定する。

### 3. 研究の方法

(1) 虚血心筋における本ホーミングペプチドの受容体をアフィニティー担体を用いて精製を行う。このアフィニティー担体は、直径 200 nm のナノ磁性粒子に本ペプチドを固定して作成する。単離した受容体は、質量分析法を用いて、その分子種を同定する。

(2) この受容体が、なぜ虚血傷害を受けた心筋にのみ出現し、ホーミングペプチドと結合するのか、その機構を低酸素培養した心筋細胞を用いて明らかにする。

(3) 虚血心筋を保護再生する作用がある SDF-1 $\alpha$ 、SOD、VEGF 等の諸因子と本ペプチドとの融合蛋白質を作成し、虚血心モデル動物に投与する。この融合蛋白質群が虚血傷害心筋に集積することで、本来の保護再生因子よりも、どれだけ効果が増強されるのかを検定する。

### 4. 研究成果

本研究の第一目的である、虚血心筋細胞におけるペプチドの受容体分子の同定には、ペプチドを付加した担体をリガンドとしてプル

ダウン法を行うこととした。しかし、受容体発現量は非常に少ないと予想され非特異的吸着が通常よりも低い FG-ビーズ（東京工業大学・半田宏教授開発、磁性フェライトを Poly-glycidylmethacrylate 樹脂で被覆した直径 200 nm の微粒子であるビーズ）を使用することにした。さらに、ペプチドは構成する 9 つのアミノ酸のうち第 1 位と第 7 位のシスチンがジスルフィド結合により環状構造をとっており、この三次元構造が受容体との結合に重要であることがわかっているため、ペプチドへのビーズの結合部位がペプチドの N' 末端となるようにペプチド付加ビーズの作成には熟考を要した。ペプチドの N 末端にヒスチジンタグを付加し、種々に変化させた官能基をもつ FG ビーズをペプチドと反応させたが、いずれの官能基でも FG ビーズへのペプチドの結合は見られなかった（表、FG ビーズの仕込量 50nmol/mg, 官能基量 Ts ビーズ 200nmol/mg, リンカービーズ 500nmol/mg, NHS ビーズ 200nmol/mg）。

配列	Ts ビーズ		エポキシビーズ		NHSビーズ (水pH7.5)	
	ゲル	BCA法	ゲル	BCA法	ゲル	BCA法
MARTKQTARKSTGGKAPRKQ HHHHHH	x	0.0	○	0.0		
MARTKQTARKSTGGKAPRKQ C			○	2.7	○	4.7
MARTKQTARK(pS)TGGKAPR KQHHHHHH	x	0.0	○	1.1	○	2.9
HHHHHHGGCSTSLKAC	x	0.0	x	0.5		

(nmol/ビーズ1mg)

ゲル・・・タンパク質結合実験および電気泳動、銀染色の評価  
 ○→固定化できていると判断  
 ×→固定化できていないと判断  
 BCA法・・・BCA法による定量値  
 HPLC・・・HPLC(高速液体クロマトグラフィー)による定量値

そこで、ペプチドの N 末端をアセチレン化し、アジド化した FG ビーズと結合させたところ、仕込み量の増加に伴い固定化量が増加していることが確認でき、ペプチドが FG ビーズに結合したと考えられた。

仕込量 ( $\mu\text{M}$ )	仕込量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	固定化量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
0	0.0	0.0
5	1.1	1.1
25	5.5	4.1
125	27.3	11.1

ペプチド結合 FG ビーズを用いた受容体分子探索は、心筋虚血再灌流モデルラットにビーズを静脈内投与するという in vivo での反応を予定していたが、受容体分子の発現が極めて少量である可能性が高い点から、ラットの心筋虚血再灌流組織を摘出し破碎液とビーズを反応させることにした。ラットは、全身麻酔後、気管内挿管を行い、左開胸で右心室全面の左冠動脈を一時的に結紮し、心電図と虚血領域の色調変化で心筋虚血を確認した。再灌流の後に虚血心筋組織を採取し急速凍結する。20匹のラットから得た虚血心筋の組織破碎液を調整し、今後、先に準備したビーズと反応させる予定としている。

#### 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 (計0件)

#### 6. 研究組織

(1) 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