

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462152

研究課題名(和文) 虚血心筋に特異的に結合するペプチドを用いた薬物送達法の開発と心不全治療への応用

研究課題名(英文) The drug delivery application of the ischemic myocardium targeting 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット虚血心筋組織を標的とするペプチド配列を臨床で創薬に応用すべく、メカニズム解明を行った。心筋組織での受容体分子を探索するため、ラット心臓に虚血再灌流傷害を加え、ナノ磁性ビーズに結合したペプチドでプルダウンアッセイを行った。電気泳動で数種類のタンパク質のバンドを認め、それぞれを質量分析を用いたプロテオーム解析を行った結果、5種類のタンパク質が同定された。この受容体候補タンパク質とペプチドとの相互作用をin vitroで確認するために、ラット心筋細胞株H9c2を用いて、シアン化ナトリウムを用いた虚血再灌流モデルを構築したが、この条件では、H9c2細胞によるペプチドの取り込みは見られなかった。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanism of the ischemic myocardium targeting peptide that was found by in vivo phage display in rats, we performed the pull down assay with the peptide-tagged nano magnetic beads in the rats' ischemic myocardium. We harvested 10 bands from a gel-electrophoresis and analyzed them with mass finger printing by mass-sectrometry combined with MALDI-TOF. We obtained 5 candidate proteins. In order to verify whether these proteins are receptors of the homing peptide, we constructed recombinant candidate proteins that are tagged with fluorescence. To establish in vitro ischemia-reperfusion condition with cells, we succeeded to use a chemical condition with sodium cyanide instead of with a hypoxic chamber. We confirmed the cell damage by LDH release and ATP generation by the cells. Although the chemical ischemia-reperfusion worked and mimic the in vivo ischemia-reperfusion, the cells did not absorb the fluorescence-tagged homing peptide.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：虚血性心筋症 ホーミングペプチド ペプチド創薬 培養細胞 プロテオーム解析

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、我が国においても虚血性心疾患罹患患者数が増加し、死因の上位を占めている。経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス術が有効ではあるが、虚血傷害や再灌流傷害による虚血性心筋症は進行することが多く、心不全となることが知られている。前述の治療法の開発によって心筋梗塞による死亡は減少したが、虚血性心不全による死亡数は増加している。治療として、再灌流治療に加えて、虚血傷害を受けた心筋組織を健全な組織と入れ替える再生医療や再灌流傷害を予防する治療法の開発が必要である。心筋保護作用のある薬物を全身投与すると傷害を受けている心臓組織に薬物を送達することができず、全身の副作用が出現する。そこで、我々はこれまで、心筋保護作用のある薬物を虚血心筋組織に送達する方法として「虚血傷害心筋組織を標的とするペプチド」の開発を目指して研究を行った結果、*in vivo* ファージディスプレイ法により「虚血傷害心筋特異的集積ペプチド配列」を見出した。このペプチド配列を薬剤に付加することで、薬剤を虚血心筋組織に送達することが可能となる。

2. 研究の目的

「虚血傷害心筋特異的集積ペプチド」を治療に応用するためには、組織特異的に到達するメカニズムの解明が必要である。今回の研究では、そのメカニズムを解明することを第一の目的とした。

3. 研究の方法

A. 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。

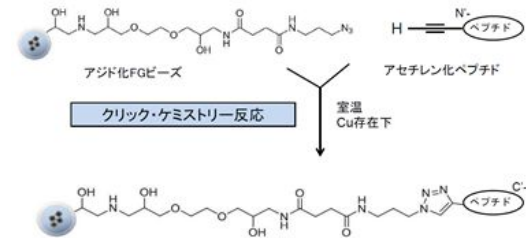
B. この受容体が、なぜ虚血傷害を受けた心筋にのみ出現し、ホーミングペプチドと結合するのか、その機構を低酸素培養した心筋細胞を用いて明らかにする。

4. 研究成果

ナノ磁性ビーズのホーミングペプチド結合

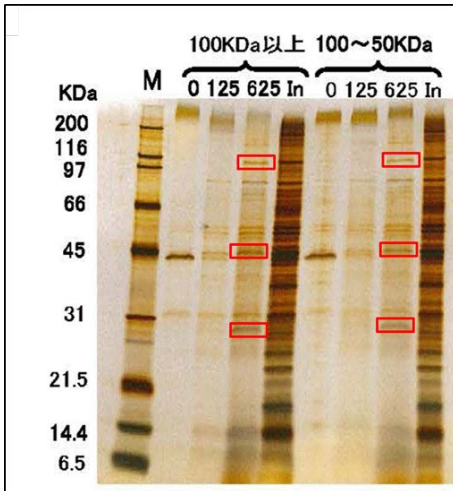
ホーミングペプチドの虚血心筋細胞における受容体分子の探索は、ナノ磁性微粒子に固定化したペプチドを用いたブルダウン法で行った。ナノ磁性微粒子は、非特異的吸着が非常に低いと考えられるフェライトを Poly-glycidylmethacrylate 樹脂で封入した直径 200 nm の微粒子である FG ビーズ (多摩川精機) を用いた。ホーミングペプチドは、構成する 9 つのアミノ酸のうち第 1 位と第 7 位のシスチンがジスルフィド結合により環状構造をとっており、ペプチド中のアミノ酸にビーズが結合するとペプチドの 3 次元構造が大きく変化すると考えられるため、FG ビーズは N'-末端に結合させる必要があった。そこで、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。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、ペプチドの FG ビーズへの結合が確認できた。



虚血組織のブルダウンアッセイとタンパク質解析

ペプチド結合 FG ビーズを用いた受容体分子探索は、ラットの心筋虚血再灌流組織を摘出し破砕液とビーズを反応させた。SD ラット (体重 200g、雄) に全身麻酔下に気管内挿管を行い、左第 3 肋間を開胸し、冠動脈左前下行枝を 30 分間虚血後に 10 分間の再灌流を行った。虚血作成は体外式心電図の ST 変化で判断した。ラットを犠牲死させ心臓を取り出し、左心室虚血領域、左心室非虚血領域、右心室を採取し凍結した。心筋虚血は心電図変化と肉眼的色調変化で判断した。33 匹の手術を行ったが、そのうち 4 匹は心筋虚血中に心室細動となり 30 分間の虚血時間を達成できなかった。そのほかの 29 匹を組織液抽出実験に用いた。左心室虚血組織に組織抽出用バッファ 25 μ L/組織重量 (mg) を加え、gentle MACS™ tissue dissociator を用いて粗破砕液を作成後、超音波破砕を加えて組織抽出液を作成した。組織抽出液はまず限外濾過法を用いて 3-50k Da, 50-100kDa, 100kDa 以上の 3 分画に分離した。その後、それぞれの分画液と、ペプチド結合ビーズを結合反応させアフィニティー精製を行ったところ、電気泳動後の銀染色法で特異的バンドが確認できた。これらがペプチドの受容体の候補であるため、ゲルからバンドを切り出しゲル内消化を行いタンパク質を抽出した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) でイオン化し、飛行時間型質量分析 (TOF-MS) を行った。ゲル内タンパク質はアルキル化処理と消化酵素によって消化断片に分解し、ペプチドマスフィンガープリンティング法を行い、タンデム質量分析法でマススペクトルデータを用いて、配列データベースに対して検索を行った。その結果 5 つのタンパク質を受容体候補として同定した。それぞれ、ミトコンドリアや細胞質にあるタンパク質であった。

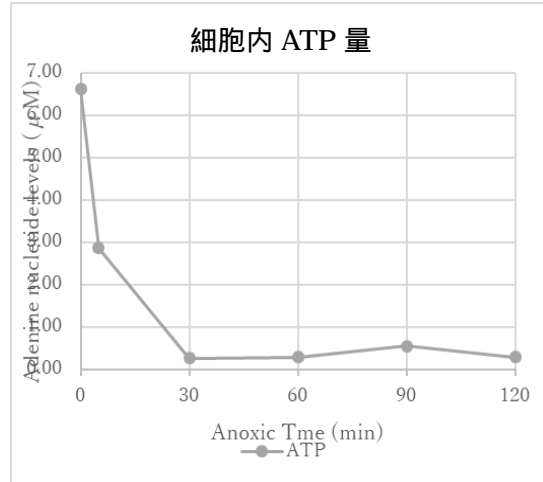
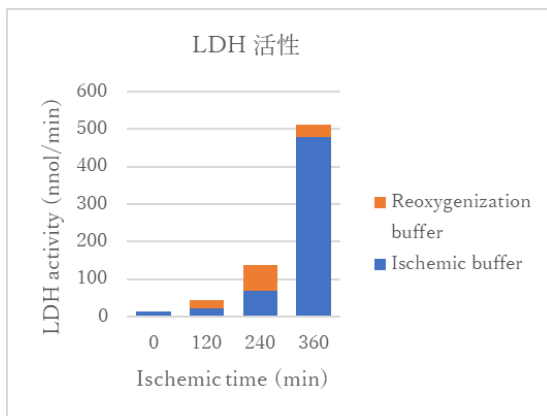


受容体候補タンパク質の過剰発現

受容体候補タンパク質がホーミングペプチドの受容体であるかどうかを確認するために、ホーミングペプチドとの相互作用を検討することとし、5種類のタンパク質遺伝子を細胞に過剰発現させ、虚血傷害環境下で細胞がペプチドを取り込むかどうかを確認することとした。タンパク質遺伝子に蛍光色素タンパク配列を付加し、発現ベクター (pMmCy1-MNL) にクローニングし、培養心筋細胞 (H9c2 細胞) に Nucleofection system を用いて遺伝子導入を行い蛍光色素を付加した受容体タンパク質を過剰発現させた。蛍光顕微鏡で観察することで5個の組み換え遺伝子それぞれのタンパク質発現を確認した。

In vitro 虚血再灌流条件の検討

In vitro で虚血再灌流傷害を再現するため、低酸素培養システムの構築を試みたが、安定した細胞傷害を再現することができなかったため、シアン化ナトリウムを用いた化学的傷害を用いた実験系を立ち上げた。虚血再灌流傷害は、細胞からの LDH 漏出量と、細胞内 ATP 量によって検討した。30 分、60 分、90 分、120 分の虚血で細胞内 ATP 量が有意に低下することが確認できた。30 分の虚血後に 10 分の再酸素化によって ATP は 92% 値まで回復していた。



虚血再灌流傷害でのホーミングペプチド取り込み

H9c2 細胞に虚血再灌流傷害を加え、ホーミングペプチドが取り込まれるかどうかを検討した。培養細胞 H9c2 にシアン化ナトリウムを一定時間後添加後に蛍光タンパク質を付加したホーミングペプチドを添加し、生細胞蛍光イメージングで細胞内蛍光量を定量した。細胞内蛍光量は虚血再灌流傷害で増加しなかった。このため、ペプチドの受容体遺伝子で形質転換した H9c2 を用いて同様に実験したが、細胞内のホーミングペプチド量は増加しなかった。H9c2 はラットの胎児心臓から分離された細胞株で、増殖が容易であるが、心筋細胞に見られるような自発収縮が見られず、in vivo で見られる現象を再現することは難しい。今後は、in vivo の条件を再現できる細胞種に変更することを検討している。

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

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

(2)研究分担者

渡邊 房男 (WATANABE Fusao)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40183719

(3)連携研究者

三重野 繁敏 (MIENO Shigetoshi)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10411373