

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870470

研究課題名(和文)ホスホランバン・アプタマーを利用した新たな心不全治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of phospholamban aptamer as a novel therapeutic tool for treatment of heart failure

研究代表者

酒井 大樹 (Sakai, Hiroki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40464367

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)：本研究では、ホスホランバンに特異的に結合し、心筋小胞体へのCa²⁺取り込みを促進する核酸アプタマーを新たな心不全治療薬として開発することを試みた。その結果、細胞膜透過性ペプチドの改変型TATペプチドを付加した膜透過型ホスホランバン・アプタマーが、成獣ラットより単離した心筋細胞の収縮・弛緩能、及びCa²⁺濃度変化の促進効果を示すことが明らかになった。また、この膜透過型アプタマーは、心不全モデルマウスにおいて一部のマウスであるが、心機能の改善効果を示した。以上より、膜透過型ホスホランバン・アプタマーが新たな心不全治療薬として利用できる可能性が示唆された。

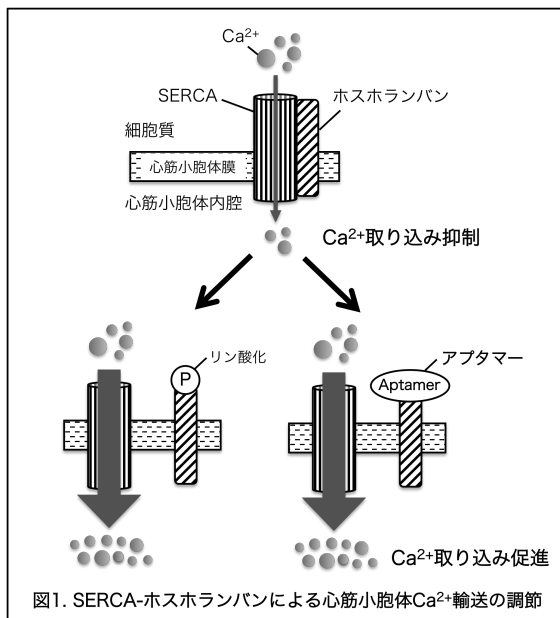
研究成果の概要(英文)：We tried to develop phospholamban aptamer as a novel therapeutic tool for treatment of heart failure. We conjugated the phospholamban RNA aptamer with a cell-penetrating peptide, the modified TAT peptide. This cell-penetrating phospholamban aptamer enhanced contraction/relaxation of isolated adult rat cardiomyocytes as well as corresponding Ca²⁺ transients. In the mouse heart failure model, the cell-penetrating phospholamban aptamer improved cardiac functions some mice. These results suggested that the cell-penetrating phospholamban aptamer is a potential therapeutic tool for treatment of heart failure.

研究分野：薬理学

キーワード：ホスホランバン アプタマー 心不全治療薬 細胞膜透過性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

心臓の収縮・弛緩では、心筋細胞内の心筋小胞体による Ca^{2+} 輸送が重要な役割を果たす。この Ca^{2+} 輸送は、心筋小胞体 Ca^{2+} ポンプである sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) が行い、心筋小胞体に特異的な膜蛋白質であるホスホランパンにより調節される。ホスホランパンは、SERCA と相互作用することにより Ca^{2+} の取り込みを抑制するが、カテコラミン刺激によって cAMP 依存的にホスホランパンがリン酸化されると SERCA との相互作用が解除され、心筋小胞体 Ca^{2+} の取り込みが促進される。心筋小胞体 Ca^{2+} 取り込みの促進は、心筋の弛緩を促進するだけでなく、次に放出される Ca^{2+} 量が増加するため収縮力の増加をもたらす (図 1)。



心不全などの病的状態では、心筋小胞体 Ca^{2+} 輸送の異常が深く関与することが知られている。現在、心不全治療に用いられている強心薬は、細胞外から内への Ca^{2+} 流入を増加させるが、心筋細胞内の Ca^{2+} 動態を制御するものではない。そのため、心筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みによる弛緩が十分に行われず、有効な心拍出力が得られないことがしばしばある。従って、細胞外からの Ca^{2+} 流入を伴わず、弛緩が十分に達成されることで収縮力の増強作用が得られる強心薬の開発が望まれている。心筋小胞体の SERCA-ホスホランパン系は、その理想的な作用点であり心不全治療の格好の標的であるが、現在までにホスホランパンに直接作用する心不全治療薬は開発されていない。

申請者の所属する研究室では、ホスホランパンに特異的に結合し、SERCA との相互作用を解除することにより心筋小胞体の Ca^{2+} 取り込みを促進する一本鎖オリゴヌクレオチド (アプタマー) を選定することに成功した (Tanaka Y. et al., J. Pharmacol. Exp.

Ther. 329:57-63, 2009)。アプタマーとは、抗体のように標的分子に強く結合する短い一本鎖オリゴヌクレオチドであり、それ自体が遺伝情報を持たない、遺伝子発現制御を伴わない、免疫原性がない、化学合成による大量生産や化学的修飾による最適化が可能といった多くの利点があり、次世代の医薬品として注目されている。

アプタマーを新しい心不全治療薬として開発するためには、血中での安定性を確保することや、心筋細胞内への導入法を確立することが必須である。申請者らはこれまでに、分解耐性を持つホスホチオエート修飾アデニンを導入した改良型ホスホランパン・アプタマーの開発に成功した (特願 2012-028555)。この改良型アプタマーは、血中での安定性が高いことに加え、ホスホランパンに高親和性を示し、心筋小胞体の Ca^{2+} 取り込みを促進することが見出されている。一方、ホスホランパン・アプタマーの細胞内への導入方法については有効な方法が得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、ホスホランパン・アプタマーを新たな心不全治療薬として開発することを目的とし、細胞膜透過性ペプチドを付加したアプタマーによる効果を検討した。細胞膜透過性ペプチドは、一般的に塩基性アミノ酸に富む 10-20 残基程度のアミノ酸で構成され、生体への安全性も高いことから、ドラッグデリバリーの観点からも近年注目されている (Gupta B. et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 57:637-651, 2005)。本研究ではまず単離心筋細胞での細胞膜透過性ペプチドを付加したアプタマーの効果を検証した。さらに心不全モデル動物を用いて、生体におけるアプタマーの効果の評価した。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜透過性ペプチドを付加したホスホランパン・アプタマーの合成
本研究では、細胞膜透過性ペプチドとしてよく知られているアンテナペディア、TAT、改変型 TAT を選択した。これらペプチドとホスホランパン・アプタマーを連結し、膜透過型ホスホランパン・アプタマーを合成した。また、対照群としてアプタマーの配列をランダムに入れ替えたスクランブル・ホスホランパン・アプタマーを合成した。

(2) 単離心筋細胞の収縮・弛緩及び Ca^{2+} 動態の解析

6-8 週齢のオス成獣ラットよりコラゲナーゼ灌流法により心筋細胞を単離し、膜透過型ホスホランパン・アプタマーを添加した。アプタマーの効果は、 Ca^{2+} 蛍光プローブの Fura-2 を心筋細胞に導入後、IONOPTIX 社製の心筋細胞内 Ca^{2+} 収縮性同時測定システムを用い、電気刺激下の心筋細胞の収縮・弛緩力、及び

Ca²⁺濃度変化を解析することにより評価した。

(3) 心筋小胞体 Ca²⁺量の測定

膜透過型ホスホランパン・アプタマーを添加した単離心筋細胞に Ca²⁺蛍光プローブの Fluo-3 を導入し、電気刺激下 20 mM のカフェイン処理前後の心筋細胞における Ca²⁺濃度を蛍光顕微鏡により測定した。

(4) 膜透過型ホスホランパン・アプタマーの動物での効果の解析

拡張型心筋症モデルマウスの MLP 欠損マウスの尾静脈より膜透過型ホスホランパン・アプタマーを投与し、心臓超音波検査、及びカテテルを用いて心機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 膜透過型ホスホランパン・アプタマーの単離心筋細胞での効果

膜透過型ホスホランパン・アプタマーを添加した心筋細胞の収縮・弛緩力、及び Ca²⁺動態を解析した。その結果、改変型 TAT ペプチドを付加したアプタマー (mTAT-Apt) により促進効果が認められた (図 2)。一方、スクランブル・ホスホランパン・アプタマー (mTAT-Scr) では促進効果は認められなかった。次に、mTAT-Apt の添加濃度や添加時間を検討したところ、2.5 μM 以上で 2~16 時間効果が持続することが判明し、単離心筋細胞における mTAT-Apt の効果は、5 μM で 4 時間添加することが最適と判断した (図 3)。

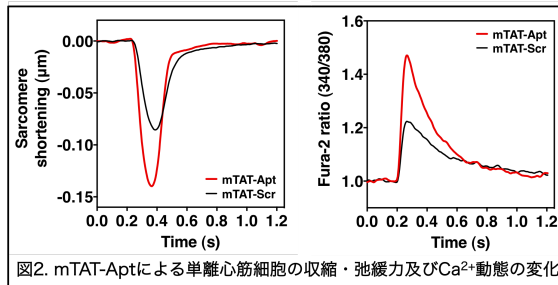


図2. mTAT-Aptによる単離心筋細胞の収縮・弛緩力及びCa²⁺動態の変化

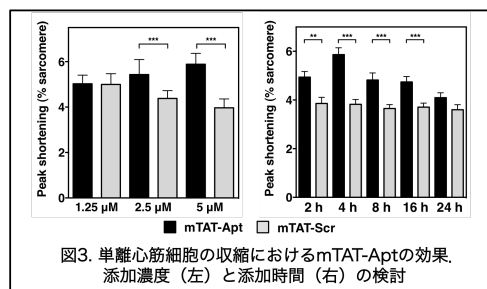


図3. 単離心筋細胞の収縮におけるmTAT-Aptの効果。添加濃度 (左) と添加時間 (右) の検討

mTAT-Apt を添加した心筋細胞では、mTAT-Scr に比べ最大短縮率の増加や収縮・弛緩速度が促進された。また、Ca²⁺動態に関しても mTAT-Apt により最大 Ca²⁺濃度の増加、及び弛緩時の時定数の短縮が認められた (図 4)。さらに、カフェインを用いて心筋小胞体の Ca²⁺量を測定したところ、mTAT-Apt 添加により有意に増加することが明らかとなった (図 5)。

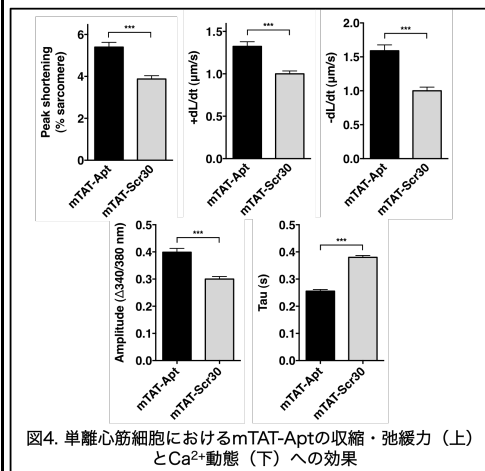


図4. 単離心筋細胞におけるmTAT-Aptの収縮・弛緩力 (上) とCa²⁺動態 (下) への効果

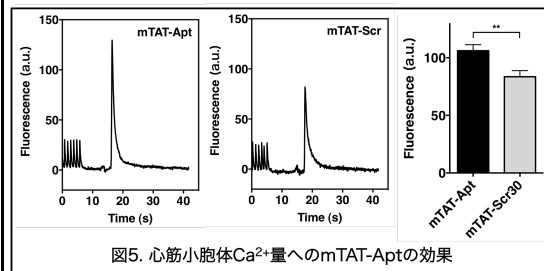


図5. 心筋小胞体Ca²⁺量へのmTAT-Aptの効果

次に、現在心不全治療薬として使用されている 受容体遮断薬と mTAT-Apt が併用可能かどうか解析した。mTAT-Apt を添加した単離心筋細胞に 受容体遮断薬のプロプラノロールを添加したところ、mTAT-Apt による促進効果は阻害されなかった (図 6)。従って、mTAT-Apt は 受容体遮断薬と併用することが可能であると考えられた。

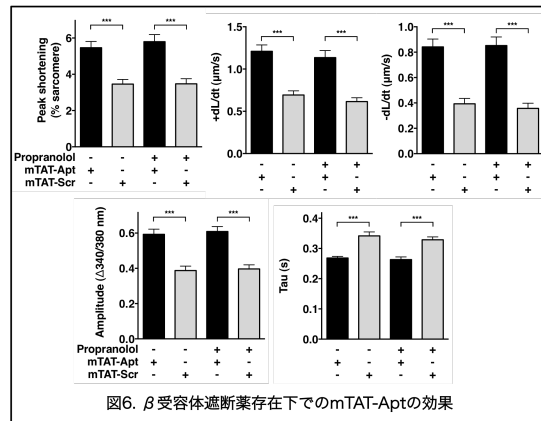


図6. β受容体遮断薬存在下でのmTAT-Aptの効果

(2) 膜透過型ホスホランパン・アプタマーの心不全モデル動物での効果

単離心筋細胞で mTAT-Apt による収縮・弛緩、及び Ca²⁺動態の促進効果が得られたため、mTAT-Apt の生体での効果を検討した。本研究では、拡張型心筋症モデル動物である MLP 欠損マウスを用いた。尾静脈より mTAT-Apt を投与し 4 時間後のマウスの心機能を解析したところ、mTAT-Apt 投与により心機能の改善効果が確認されたが、一部のマウスでは十分な効果を得ることができなかった。

(3)以上の結果より、mTAT-Apt は新たな心不全治療薬として利用できる可能性が示された。また、生体での安定性や心臓への効率的な輸送方法については、今後さらに検討する必要があると考えられた。

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2件)

Hiroki Sakai, Kenji Matsuura, Yoshie Tanaka, Takeshi Honda, Teruo Nishida, Makoto Inui. Signaling mechanism underlying the promotion of keratinocyte migration by angiotensin II. *Molecular Pharmacology*, 査読有り, 87, 2015, 277-285.
doi.org/10.1124/mol.114.096461.

Hiroki Sakai, Yasuhiro Ikeda, Takeshi Honda, Yoshie Tanaka, Kozo Shiraishi, Makoto Inui. A cell-penetrating phospholamban-specific RNA aptamer enhances Ca^{2+} transients and contractile function in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 査読有り, 76, 2014, 177-185.
doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.006

[学会発表](計4件)

酒井 大樹, 池田 安宏, 本田 健, 田中 貴絵, 白石 宏造, 乾 誠. Enhancement of Ca^{2+} transient and contractile function of cardiomyocytes by phospholamban specific RNA aptamer. 第88回日本薬理学会年会、平成27年3月20日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

酒井 大樹, 池田 安宏, 本田 健, 田中 貴絵, 白石 宏造, 乾 誠. ホスホランバンアプタマーによる心筋収縮能および Ca^{2+} トランジェントの増強作用. 第67回日本薬理学会西南部会、平成26年11月23日、産業医科大学(福岡県・北九州市)

酒井 大樹, 中島 京, 岩田 博夫, 乾 誠. Promotion of endothelial cell migration and tube formation by SEK-1005. 第87回日本薬理学会年会、平成26年3月21日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

酒井 大樹, 中島 京, 岩田 博夫, 乾 誠. SEK-1005 による血管内皮細胞の遊走及び管腔形成促進効果. 第23回日本循環薬理学会、平成25年12月6日、福岡大学メディカルホール(福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 大樹 (Sakai, Hiroki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40464367