

平成30年6月22日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15523

研究課題名(和文)血管新生因子アンチセンスホモロジーボックス由来ペプチドによる脳梗塞の血管新生療法

研究課題名(英文)angiogenic therapy for cerebral infarction with anti

研究代表者

高野 晋吾 (TAKANO, SHINGO)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：50292553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質分子内にはセンスペプチド・アンチセンスペプチドとして相互に対応するアミノ酸配列が散在し、アンチセンスホモロジーボックス(AHB)と呼ばれる。AHBに対して相補的に設計合成したペプチドは標的蛋白質の機能の抑制や促進が期待される。血管新生因子受容体、FGFRのAHB由来ペプチドを作成し、内皮細胞への効果を評価した。FGFR細胞外ドメインのAHBペプチドに最も強い内皮細胞増殖促進効果がみられた。その促進効果は、アミノ酸配列を変えた変換ペプチドおよびsiRNAによるFGFRノックダウンで消失し、FGFR由来AHBペプチドは血管新生促進作用をもち、脳梗塞治療への応用を考える。

研究成果の概要(英文)：Anti-sense homology box (AHB) is composed of sense peptide complemented with anti-sense peptide and distributed physiologically within the molecule. Peptide synthesized by amino acid complementary to AHB has been suggested to have some physiological function to its target protein. We made a peptide targeting to FGFR derived AHB. A peptide located in extracellular domain of FGFR showed a prominent endothelial cell proliferative activity. Its proliferative action was disappeared by amino acid exchanging peptide and siRNA for FGFR. This peptide has angiogenic activity and is available for therapy of cerebral infarction.

研究分野：脳神経外科

キーワード：アンチセンスホモロイボックス ペプチド療法 FGF2 脳梗塞 内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生因子抑制剤は腫瘍血管新生抑制剤として注目されているが、血管新生因子促進剤は殆ど注目されていない。血管新生因子内のアンチセンスホモロジーボックス (AHB) に注目し、AHB に相補的なペプチドを合成することにより、ペプチドがその血管新生因子に対して何らかの生理活性があるのではと着想し、まずその血管内皮細胞に対する生理活性を明らかにして、その後、血管新生の抑制に働くのであれば脳腫瘍に対する戦略を、促進に働くのであれば脳梗塞に対する戦略を考えた。本研究は脳梗塞治療への展開を考えた点が新しい。

## 2. 研究の目的

強力な血管新生因子である繊維芽細胞増殖因子 (FGF) と血管内皮増殖因子 (VEGF) は脳腫瘍では増殖促進因子として、脳梗塞では脳梗塞軽減因子として働いている。FGF 受容体 (FGFR) および VEGF 受容体 (VEGFR) は全分子の遺伝子配列、アミノ酸配列が決定されており、FGFR および VEGFR に対して生理活性を持つペプチドの合成を目的とした。

FGFR、VEGFR をはじめ蛋白質分子内にはセンスペプチド・アンチセンスペプチドとして相互に対応するアミノ酸配列が散在し、AHB と呼ばれる (Baranyi 1995)。AHB は相互反応を起こし、高次構造の形成と維持に重要な働きをしていると考えられる。AHB から標的ペプチドに対応する相補性ペプチドをコンピュータプログラムで設計合成したペプチドは標的タンパク質の機能を抑制あるいは促進することが期待される。近年ではエンドセリン受容体の AHB 由来ペプチドの *in vivo* 効果 (Goto 2010, Bajory 2014) や Fas ligand の AHB 由来ペプチドの癌細胞抑制効果 (Hayakawa 2000) が報告され、AHB 由来合成ペプチドの生体への応用が期待される。

FGFR に対する AHB 由来ペプチドを作成し、*in*

*vitro* で内皮細胞の増殖への効果の評価し、*in vivo* での評価は、増殖促進なら脳梗塞モデルで、増殖抑制ならば脳腫瘍モデルで確かめる。

## 3. 研究の方法

細胞培養：ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) を用いた。

FGFR に対する AHB ペプチドの合成：FGFR1 全分子での AHB の部位を 14 箇所同定し、各 AHB に対する相補的なアミノ酸配列から 14 個のペプチドを作成した (株式会社オペロン)。

内皮細胞増殖試験：各 AHB ペプチド 100nM による内皮細胞の 3 日後の増殖を WST assay で測定した。

Western blot analysis：FGF 投与後の AKT および MAPK シグナルの評価を行った。

siRNA 実験：FGFR1 に対する siRNA でノックダウンした。

変換ペプチドの作成：アミノ酸配列を変えたペプチドの合成。

Biacore assay：合成ペプチドと内皮細胞の結合を生理学的に評価した。

## 4. 研究成果

### **AHB ペプチドの内皮細胞増殖促進効果：**

AHB ペプチドなしに対する 14 個の合成 AHB ペプチドの内皮細胞増殖程度を評価した。内皮細胞増殖効果の強い AHB ペプチド No.4 を用いて、以下の実験を進めた。また No.4 ペプチドの増殖促進作用は膠芽腫細胞 (U87 および U251 細胞) では見られなかった。

### **変換ペプチドによる内皮細胞増殖抑制**

**効果：**ペプチド No.4 には強力な内皮細胞増殖効果がみられた。このペプチドのうち 3 個のアミノ酸をランダムに変換した変換ペプチドを 2 種類作成した。いずれの変換ペプチドにも内皮細胞増殖

効果がないことを明らかにした。

#### **siRNA による FGFR1 抑制内皮細胞に対する**

**効果：**コントロールの内皮細胞では、AHB ペプチド No.4、100nM で、3日間培養で40%の細胞増殖がみられた。FGFR1 遺伝子を siRNA でノックダウンした細胞では、コントロールでみられた、AHB ペプチド No.4 100 nM による細胞増殖は見られなかった。AHB ペプチドによる内皮細胞増殖には FGFR1 が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

#### **ペプチドによる内皮細胞 FGF シグナル伝**

**達の解析：**ペプチド (No.4) の効果は内皮細胞特異的であるが、その細胞内でのシグナル伝達は明らかではない。内皮細胞をペプチドおよび FGF2 存在下に培養し、細胞分画を抽出し、FGFR のシグナル経路をリン酸化の状態も含めて (MAPK、リン酸化 MAPK、AKT、リン酸化 AKT、PKC、リン酸化 PKC) ウェスタン解析で評価した。MAPK および AKT および PKC シグナルともペプチド No.4 の投与により、リン酸化蛋白の発現増加を認めた。従って、ペプチド No.4 は内皮細胞に結合し、内皮細胞内で FGF2 シグナルが動いたことが明らかにされた。

#### **ペプチドの内皮細胞管腔形成への効**

**果：**AHB ペプチド No.4 100 nM は内皮細胞の管腔形成に対する効果は、コントロールと比べて違いは見られなかった。管腔形成アッセイの時間は6時間であり、この時間中では AHB ペプチドは管腔形成に影響を及ぼさなかった。

#### **Biacore technology によるペプチドと**

**受容体の相互間解析：**ペプチドと内皮細胞膜上 FGFR との相互解析を行うのに、ペプチドのような低分子を高感度で測定できるのが特徴の Biacore T200 (GEヘルスケア; 学内、永田研) を用いた。専用のセンサーチップ上に血管内皮細

胞を固定し、ペプチドを各種濃度で流すことにより、最も結合の効き目が早く、持続するペプチドを探索したが、今回のアッセイではこれまでの研究で、最も内皮細胞の増殖作用が強かったペプチド No.4 と内皮細胞との生理学的な結合は示すことができなかった。

これからの問題点: in vivo でペプチド No.4 が血管新生促進作用を、ラット皮下に埋め込む FGF2 含有リアクターによるアッセイによる評価ができていない。また、ラットの中大脳動脈閉塞および FGF2 徐放材留置モデルを用いての、ペプチド投与による脳梗塞改善の評価ができていない。さらに、もう一つの強力な血管新生因子である VEGF/VEGFR に対するの合成ペプチドの計画が進んでいない。

**結論：**FGFR に対する AHB ペプチドは血管内皮細胞増殖促進作用を持つ。今後、脳梗塞治療への応用を期待する。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高野晋吾 (TAKAN0, Shingo)  
筑波大学・附属病院・病院講師  
研究者番号: 50292553

##### (2) 研究分担者

上羽哲也 (UEBA, Tetsuya)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授  
研究者番号: 00314203

伊藤嘉朗 (ITO, Yoshiro)  
筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：90733014