

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03737

研究課題名(和文) 大動脈瘤に対する新規バイオ医薬の開発

研究課題名(英文) Development of peptide drugs for a new alternative treatment of aortic aneurysm

研究代表者

碓氷 章彦 (USUI, Akihiko)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30283443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤は破裂すると死に至るため、破裂予防のために人工血管置換術が行われるが、侵襲が大きく新たな低侵襲治療法の開発が求められる。間葉系幹細胞が産生する白血球型セリンプロテアーゼ阻害因子(SLPI)は、大動脈瘤モデルマウスにおいて抗炎症作用を介した瘤径拡大抑制効果を示し、SLPIのアミノ酸配列から設計した3-4残基ペプチドは、炎症性マクロファージが産生する一酸化窒素(NO)の産生抑制がみられ、SLPIを模倣したペプチド医薬創出の可能性が示唆された。しかし効果が弱かったため、培養条件や評価系の見直しが必要であることが判明した。見直した培養条件と評価系は、ペプチド探索に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてSLPIタンパク投与により大動脈瘤径拡大抑制効果が示されたことから、研究成果には医学的意義および社会的意義があると考えられる。タンパク医薬は効果は期待出来る反面、高価で抗原性・免疫刺激性の問題もある。一方、ペプチド医薬は、比較的安価で化学合成でき、抗原性がなく生体への安全性は高い。その一方でタンパクに比して効果が減弱される可能性がある。我々が設計したSLPI模倣性短鎖ペプチドは、抗炎症作用を示したものの効果が弱く、評価の見直しが必要となった。しかし、再検討により得られた結果は、ペプチド医薬創成のための基礎研究として学術的意義を持つと考える。

研究成果の概要(英文)：Rupture of aortic aneurysms (AA) causes exceedingly high mortality rate. Surgical repair is effective treatment to prevent rupture, however, surgical repair in elderly and high-risk patients increase the risk of surgical mortality and perioperative complications. In this study, administration of recombinant protein of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), which has anti-inflammatory properties, attenuated AA growth in mice. To create new peptide drugs, we designed 120 patterns of short-chain peptides which were referenced from amino acids sequence of SLPI by in silico screening. Some short-chain peptides exhibited low level of nitric oxide (NO) secreted from inflammatory macrophages. However, it is necessary to review cell culture conditions, evaluation system, and design of peptides due to weak anti-inflammatory effects of short-chain peptides. The reviewed results worked as a system for evaluation of short-chain peptides.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 ペプチド 抗炎症作用 マクロファージ 一酸化窒素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化等を背景に、大動脈瘤患者数並びに手術件数は増加している。大動脈瘤に対する人工血管置換術は比較的侵襲が大きく、対象患者は高齢で予備能力の低い患者群で、Shaggy Aorta 等重症例では手術適応に苦慮することが多い。従って、新たな低侵襲な治療法の開発が求められている。

大動脈瘤は動脈硬化の終末像で、慢性炎症を呈する。病理像では血管壁の強度や弾性を担うエラスチン繊維の構造破壊が顕著に観察される。マクロファージを中心とした炎症性細胞が浸潤し、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, 腫瘍壊死因子の TNF- α など) やケモカイン (マクロファージ走化因子: MCP-1 など)、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2,9 等を産生し、エラスチン分解や炎症を助長させる。この一連の病態を是正するため、抗生物質やスタチン、JNK 阻害薬など様々な分子治療研究が行われており臨床治験に至ったものもあるが、安定した治療効果や安全性に課題が残されている。

研究代表者らは、間葉系幹細胞(MSC)静脈内投与による大動脈瘤治療の有効性を示してきた。治癒メカニズムには MSC のパラクリン作用が示唆され、MSC 産生因子の中に抗炎症作用・組織修復に関わる因子として Progranulin(PGRN)および Secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)の重要性と、それらによる大動脈瘤治療効果の可能性を見出した。

PGRN は、細胞分化や組織修復、炎症に関する自己分泌型タンパクで、TNF-receptor2(TNF- α R2)に結合して TNF- α シグナル伝達を遮断し抗炎症作用を示す。その一方で、MMP-9 などにより分解され、活性型ペプチド Granulin (GRN) となって炎症促進性を示す側面も持つ。

SLPI は、セリンプロテアーゼ阻害因子で、抗微生物活性や抗炎症性活性、PGRN から GRN への分解抑制作用を持つ。また、LPS 刺激炎症性マクロファージに対し、NF- κ B 活性および TNF- α 産生抑制や、抗炎症性サイトカイン IL-10 および TGF- β 産生を促進することが報告されている。

これら背景から、PGRN と SLPI は大動脈瘤に対する治療効果が期待できるのではないかと着目した。さらに、各タンパクのアミノ酸配列から治療効果に有効な配列だけを取り出し合成したペプチド医薬としても、この PGRN と SLPI を利用できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、リコンビナントタンパク PGRN, SLPI 投与による効果検証を行ったのち、ペプチド探索を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vivo: リコンビナントタンパク rPGRN, rSLPI の投与による大動脈瘤治療効果の検証

6 ヶ月齢以上の apolipoprotein E 遺伝子欠損マウスに、皮下埋植の浸透圧ポンプから 1000ng/min/kg Angiotensin-II (ATII) 4 週間持続注入による大動脈瘤モデルマウスを作成した。0, 2, 4 週後にエコーで胸腹部大動脈径を測定し、4 週の時点で大動脈瘤形成を認めたマウスに、市販リコンビナントタンパク rPGRN, rSLPI を腹腔内投与した。投与濃度は 10mg/kg とした。単独投与群 (rPGRN 群, rSLPI 群)、複合投与群 (PGRN+SLPI 群)、生理食塩水投与群 (saline 群) を作成した。各タンパクを投与してからさらに 6, 8 週後もエコーで胸腹部大動脈径を測定した。8 週後に屠殺し、大動脈瘤組織を採取した。得られた組織は、組織学的評価 (Elastica Van Gieson (EVG) 染色)、蛍光免疫染色 (炎症性マクロファージ ; iNOS, 抗炎症マクロファージ ; CD206), タンパク発現量定量測定 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, TIMP-1, -2, IGF-1, TGF- β 1), MMP-2, -9 活性測定を行なった。また、シグナル伝達経路 NF- κ B, JNK, Akt のリン酸化タンパク量を ELISA にて測定した。

(2) In Silico: SLPI アミノ酸配列をリファレンスとしたペプチドの探索

動物種間で相同性が得られた配列から、3-4 残基ペプチドを 120 種類設計した。設計したペプチドはペプチドアレイを作成し、アレイ上に LPS 刺激したマウスマクロファージ (J774A. 1) を播種し 96 時間培養した。培養液中に含まれる一酸化窒素 (NO) 産生量を測定した。Positive control (Pos. cont.) として、rSLPI を用いた。

(3) In vitro: マクロファージ NO 産生促進のための培養条件の確立

① 炎症刺激因子の種類および刺激作用時間による NO 産生量の変化を調べた。マウスマクロファージ (J774A. 1) を 96 wellplate に播種し、LPS, TNF- α , LPS+TNF- α , IFN- γ , LPS+IFN- γ をそれぞれ培養培地に添加し、24, 48, 72 時間後に NO₂/NO₃ 産生量を測定した。

- ② 炎症刺激因子の種類および濃度による NO 産生量の変化を調べた。マウスマクロファージ (J774A.1) を 96 wellplate に播種し、LPS、TNF- α 、LPS+TNF- α 、IFN- γ 、LPS+IFN- γ をそれぞれ培養培地に添加し、48 時間後に NO₂/NO₃ 産生量および細胞数を測定した。
- ③ In vitro: rSLPI 添加による NO 産生量の検討
マウスマクロファージ (J774A.1) を 96 wellplate に播種し、rSLPI で 24 時間 pre-treatment したのち、LPS+TNF- α を培養培地に添加し、さらに 24 時間培養して NO₂/NO₃ 産生量を測定した。

4. 研究成果

- (1) In vivo: リコンビナントタンパク rPGRN, rSLPI の投与による大動脈瘤治療効果の検証
saline 群では継時的に瘤径拡大したのに対し、rSLPI 投与群は有意に瘤径拡大が抑制された。大動脈瘤組織中の炎症性タンパク発現量は、saline 群に比べ rSLPI 投与群で IL-1 β 、IL-6、TNF- α が有意に低下した。MMP-2、MMP-9 に有意差はなかった。組織学的所見では、rSLPI 投与群で elastin 減少が抑制された。また、蛍光免疫染色では、瘤組織に局在する M1/M2 比が、saline 群に比べ rSLPI 群で有意に低下した。シグナル伝達経路の検討では、rSLPI 投与群は JNK および NF- κ B のリン酸化タンパクの発現量が有意に低下した。JNK と NF- κ B は炎症を引き起こす細胞内情報伝達として重要な役割を果たす。したがって、rSLPI 投与によってこれらシグナル経路の発現レベルが低下したことで抗炎症に働き、大動脈瘤の進展拡大を抑制したと考えられた。これら結果から、rSLPI 投与による大動脈瘤進展抑制効果が示唆された。
- (2) In Silico: SLPI アミノ酸配列をリファレンスとしたペプチドの探索
Pos. cont. (図1 オレンジバー) と同程度の NO 産生量を示す 3 残基ペプチド (図1 赤色バー) がいくつか見つかった。しかし、blank (図1 黒色バー) との差が 1.5 倍と小さく、効果判定に疑問が生じたため、NO による評価方法の見直しが必要であることが判明した。そのため、マクロファージの培養条件を見直し、次の検討を行なった。

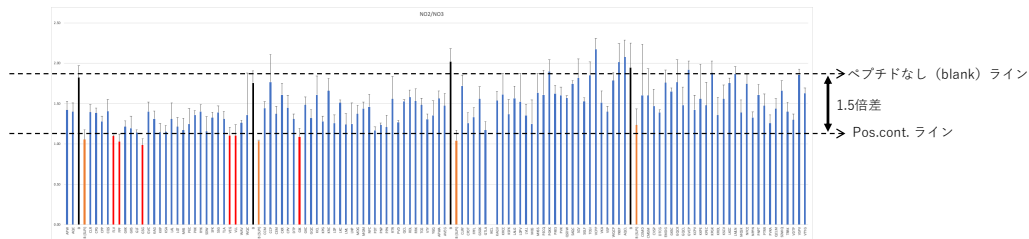


図1 ペプチドアレイによるペプチド探索

- (3) In vitro: マクロファージ一酸化窒素 (NO) 産生促進のための培養条件の確立

- ① TNF- α 群と IFN- γ 群は、neg. comt. 群の NO 産生量と同程度だった。一方、LPS 群、LPS+TNF- α 群および LPS+IFN- γ 群は、day1 では NO 産生量が増加しなかったが、day2 で最も NO 産生量が増加した (図2)。
したがって、LPS+TNF- α または LPS+IFN- γ で 2 日間培養の刺激条件が最適であるとした。

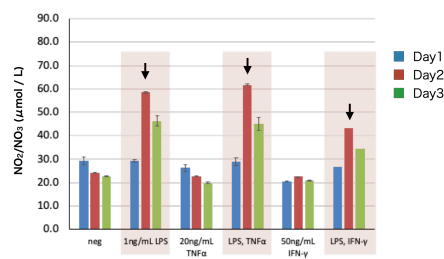


図2 マクロファージ刺激因子の培養条件検討

- ② LPS 単独では濃度に関係なく細胞増殖に大きな影響はみられなかったが、LPS+IFN- γ では顕著な細胞増殖の低下が見られた (図3A)。一方、LPS+TNF- α では濃度依存的な細胞増殖能を示した (図3B)。

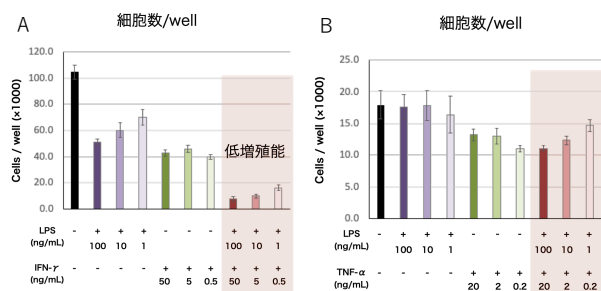


図3 マクロファージ刺激因子の濃度による細胞増殖能の変化

NO 産生量は、LPS+IFN- γ は neg. cont. 群と比べて濃度依存的に約 3 倍に増加した (図 4A)。一方、LPS+TNF- α の産生量は約 4 倍に増加した (図 4B)。培養日数、増殖能および NO 産生量の結果から、マクロファージ刺激条件には LPS+TNF- α を用いることが推奨された。

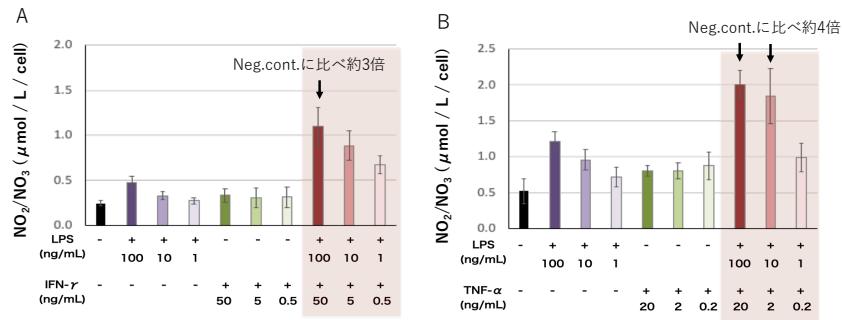


図4 マクロファージ刺激因子の濃度によるNO産生量の変化

③ In vitro: rSLPI 添加による NO 産生量の検討

10 μ g/mL rSLPI で pre-treatment したマクロファージは、LPS+TNF- α 群に比べ NO 産生量が有意に低下した。しかしながら、SLPI の濃度や処理時間などの条件の最適化が必要であると考えられた。

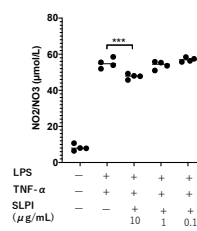


図5 SLPIによるNO産生抑制

以上の結果から、rSLPI は大動脈瘤の拡大抑制効果を示し、細胞レベルにおいても抗炎症作用をもたらすことが判明し、SLPI を模倣したペプチド医薬創出の可能性が示された。しかしながら、SLPI 模倣性ペプチドを作成するためには、培養評価系の確立を見直す必要が生じた。加えて、3 残基では効果が弱い可能性もあり、残基数など In silico での設計の見直しもする必要があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緒方藍歌、成田裕司、藤本和朗、碓氷章彦
2. 発表標題 リコンビナントタンパクPGRNとSLPIを用いた大動脈瘤に対するタンパク治療効果
3. 学会等名 第41回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 緒方藍歌、成田裕司、藤本和朗、六鹿雅登、碓氷章彦
2. 発表標題 リコンビナントタンパク(Progranulin, Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor)による大動脈瘤治療
3. 学会等名 第73回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荏原 充宏 (EBARA Mitsuhiro) (10452393)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・グループリーダー (82108)	
研究分担者	宇都 甲一郎 (UTO Koichiro) (30597034)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・独立研究者 (82108)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 竜司 (KATO Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	成田 裕司 (NARITA Yuji) (60378221)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	緒方 藍歌 (OGATA Aika) (70718311)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	蟹江 慧 (KANIE Kei) (80636407)	名古屋大学・創薬科学研究科・助教 (13901)	
研究分担者	六鹿 雅登 (MUTSUGA Masato) (80447820)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関