

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790111

研究課題名（和文）

炎症標的化キメラペプチドの局所投与による炎症疾患新規治療方法の基礎検討

研究課題名（英文） Basic research of new local treatment for inflammatory diseases using molecular-targeting chimera peptide

研究代表者

河野 雅之（KOHNO MASAYUKI）

京都大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：00437203

研究成果の概要（和文）：

炎症性サイトカイン受容体等へ結合する配列と細胞を殺さずに膜へ粘着する配列とのキメラ化ペプチドにより強固に炎症を抑制する新規炎症疾患治療方法の基礎検討を実施した。

調査、検討の結果、分子標的を TNF、TLR4、TGF- $\beta$ 1 に絞込み、各種アンタゴニストペプチド及びそのキメラ化ペプチド候補を *in vitro* 評価系で選抜した。TNF アンタゴニスト配列は膜粘着配列とのキメラ化により拮抗作用増強がみられた。TGF- $\beta$ 1 アンタゴニストペプチドの肺局所噴霧により、プレオマイシン誘発肺線維化ラットモデルの肺組織の線維化因子等を低減させた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the possibility of new powerful therapy for inflammatory diseases using chimera peptides that have a binding sequence to inflammatory cytokine receptors and an adhesion sequence to cell membrane without cytotoxic activity.

As a result of pre-survey, we selected TNF, TLR4, and TGF- $\beta$ 1 as the target molecules, and determined the promising candidates among various antagonist peptides and chimera peptides by the *in vitro* assay systems. Inhibitory effect of TNF-antagonist peptide was increased by chimera conjugation with a membrane-adhesion sequence. Local treatment of TGF- $\beta$ 1-antagonist peptide by intratracheal nebulization decreased the levels of fibrotic factors in lung tissue in bleomycin-induced lung fibrosis rat model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計、ペプチド創薬、分子標的、局所投与、DDS

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室ではこれまで抗癌標的蛋白製剤であるイムノトキシンの研究を行ってきた。癌細胞高発現受容体を介し癌細胞特異的な

取り込みを担当する弾頭部と癌細胞を殺す爆薬部からなるキメラ型蛋白製剤が主である。蛋白製剤は遺伝子組換えから発現細胞への遺伝子導入、大量発現、精製等で多大な労

力、コスト及び時間を費やし、生体内では中和抗体産生等の問題も有している。一方、ペプチドは蛋白に比べ明らかに労力、コスト及び時間を抑制でき、ペプチドの化学合成、精製及び化学修飾、さらにはDDS (Drug Delivery System)の技術が飛躍的に向上した。さらに多彩な局所投与機器の開発、DDS併用によるペプチドの分解抑制、徐放作用等の今後の技術革新とともに、ペプチド創薬は今後大いに発展が期待できる領域である。また特定の分子、癌種へ特異的に結合するペプチド配列をスクリーニングする技術であるファージディスプレイ法により、癌細胞高発現受容体をはじめ多くのターゲットへの結合配列が見出されている。しかしながら、かつてペプチドは低分子化合物に比べ生体内での安定性が極度に悪く、合成、精製等が困難で高コストであり、製薬企業特に日本国内では敬遠され続けてきた経緯があった。その傾向は現在もあまり変わっておらずペプチド創薬は海外に先行されている状態にあり、このような国内状況を変革していく必要がある。

このようなペプチド創薬の現状及び魅力的な伸展を考慮し、イムノトキシンのペプチド化の可能性を調査・検討した。その結果として、これまでに薬剤耐性を受けにくい癌細胞膜崩壊性ペプチドを用いEGFR等の癌高発現分子への結合配列とキメラ化させた、革新的な分子標的抗癌剤「ハイブリッドペプチド」を設計することに成功した。

## 2. 研究の目的

「ハイブリッドペプチド」の手法を炎症免疫系疾患へ応用すべく、炎症性サイトカイン受容体等へ結合する配列と細胞を殺さずに膜へ粘着する配列とのキメラ化ペプチドにより強固に炎症を抑制する新規炎症疾患局所治療方法の基礎検討を実施した。

実際にEGFR標的化癌細胞膜崩壊性ハイブリッドペプチドはヒト肺癌細胞株へのたった10分間の接触で十分な殺細胞効果を示し、癌細胞膜崩壊性ペプチド単独よりも明らかに速効性であった。この癌細胞膜崩壊性ペプチドはカチオンリッチなアミノ酸配列でありマイナスチャージの細胞膜成分に結合しやすい性質がある。キメラ化ペプチドは癌のみならず、局所投与により炎症疾患での効果も期待できるのではないかと考えられ、炎症性受容体アンタゴニストペプチドにカチオンリッチ配列をキメラ化したペプチドを考案した。カチオンリッチ配列部が細胞膜へのアンカーの役割を果たし、アンタゴニストペプチド単独よりも炎症を強く抑制できるのではないかと考えた。

いくつかの炎症標的受容体に結合する多数の配列候補からBiacore、培養細胞等のin

vitro評価系にてスクリーニングし、有望な候補ペプチドについては病変部局所投与による疾患動物モデルにて有効性を評価し、炎症抑制キメラ化ペプチドを用いた新規治療方法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症標的分子の調査、配列設計

既に当研究室で設計したいくつかのサイトカイン受容体結合配列の他に、文献調査等により炎症に深く関わる受容体等の有力な候補をピックアップし、また立体構造解析等により予測・デザインした。キメラ化のためのカチオンリッチな膜粘着配列の設計は、主に抗菌性ペプチドをベースに設計した。分子間結合に重要な役割を果たす有電荷アミノ酸を中心に置換した配列等について検討を加え、very bestな配列選抜を目指すために選択候補を広げた。ペプチドはsigma、invitrogen社において化学合成、精製されたものを実験に用いた。

### (2) 各種アゴニストに対応するbioassay系構築及びペプチドの拮抗効果評価

TNF 濃度依存的な細胞死を示すマウス線維芽細胞腫L929

96穴プレートに10000cells/wellで播種し、マウスTNF、アクチノマイシンD(3 $\mu$ M)及び阻害候補ペプチドを添加し、24時間培養後に生細胞測定試薬を添加して生細胞数依存的な発色をさせ、プレートリーダーにて吸光度450nmを測定して数値化、グラフ化した。

LPS濃度依存的にTNFを産生するマウスマクロファージ細胞株RAW264

96穴プレートに5000cells/wellで播種し、LPS及び阻害候補ペプチドを添加し、24時間培養後に各wellの培養上清10 $\mu$ LをL929-bioassay系へ添加して、以下同様に操作し、LPS濃度依存的なL929細胞応答を評価した。

IL-4添加時にTGF $\beta$ 1濃度依存的な増殖抑制を示すヒト赤白血病細胞株TF-1

96穴プレートに10000cells/wellで播種し、ヒトIL-4、TGF $\beta$ 1及び阻害候補ペプチドを添加し、24時間培養後に生細胞測定試薬を添加して生細胞数依存的な発色をさせ、プレートリーダーにて吸光度450nmを測定して数値化、グラフ化した。

### (3) BIACOREによる各種受容体蛋白とペプチドとの結合親和性評価

各種リコンビナント受容体をセンサーチップへ固定化し、数種類の濃度の候補ペプチドを反応させ、その結合応答性を評価した。

### (4) 肺線維化ラットモデルにおけるペプチド局所投与による抗線維化等評価

S Dラット (9週齢、雌) に肺線維化誘発剤のプレオマイシン (0, 5 mg/kg, n=5) をラット用気管内投与噴霧スプレー (Penn century 社製) で気管から肺へ投与し肺線維化を誘発させた。プレオマイシン投与翌日から週2回ペプチドの肺局所投与を行い、2週間後に解剖し、肺等の臓器重量測定、肺組織及び肺胞洗浄液の生化学的試験等を行い、抗線維化効果及び抗炎症効果を評価した。

#### 4. 研究成果

炎症疾患に重要な分子標的、そのアンタゴニストペプチド配列及びその *in vitro*, *vivo* 評価系に関して調査を行い、そのいくつかの分子標的について実施した。そのうち、以下の3つの分子標的についての成果をまとめた。

##### (1) TNF アンタゴニストキメラ化ペプチド

関節リウマチ等で重要な分子の TNF に対する *in vitro* bioassay 評価系を構築した。マウス線維芽細胞腫 L929 は TNF 濃度依存的な細胞死を示した (図1)。

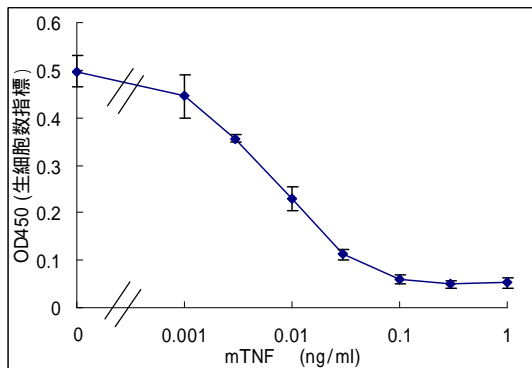


図1. L929細胞による TNF -bioassay  
TNF 濃度依存的な細胞死誘導

TNF アンタゴニストペプチドの候補リード配列について調査・検討し、いくつかの候補を見出し、L929bioassay 系で評価したところ TNF3 等の有望な拮抗作用を有するペプチドを確認できた (図2)。

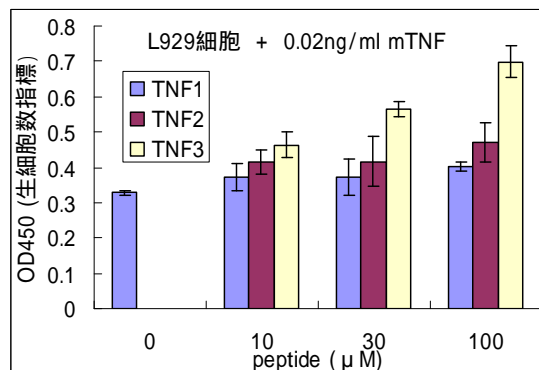


図2. 各種 TNF アンタゴニストペプチド候

#### 補の拮抗活性評価

さらにいくつかの変異ペプチドを合成して、recombinant TNF 蛋白に対する結合親和性を BIACORE 解析で選抜した。キメラ化するために、いくつかのカチオンリッチな細胞膜粘着型配列を設計しその細胞殺傷能がないことを確認した。それらと TNF3 配列を組み合わせて、*in vitro* 評価系においてキメラ化による拮抗効果増強がみられた (図3)。

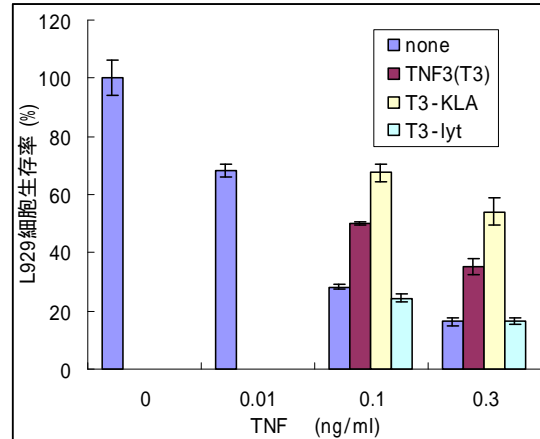


図3. TNF アンタゴニストペプチド TNF3 への膜粘着配列 KLA のハイブリッド化による拮抗活性増強

##### (2) TLR4 アンタゴニストペプチド

重症敗血症等の分子標的として、リポ多糖 (LPS) 等エンドキシンの受容体である TLR4 のアンタゴニスト候補品を見出すべく *in vitro* 評価系を構築した。マウスマクロファージ細胞株 RAW264 は LPS 濃度依存的に TNF を産生する。この培養上清を (1) の L929 細胞の TNF -bioassay に添加すると LPS 濃度依存的な L929 細胞応答がみられた (図4)。

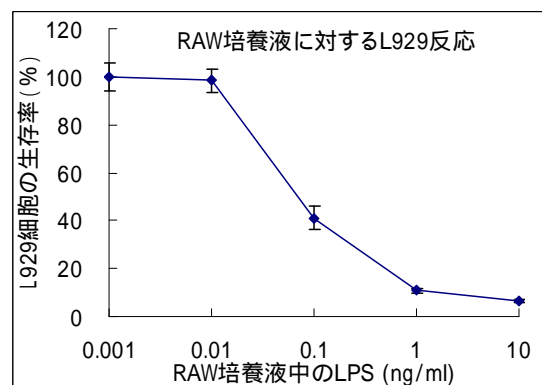


図4. LPS 刺激 RAW 培養上清添加による L929 細胞の LPS 濃度依存的反応

TLR4 アンタゴニストペプチドの候補リー

ド配列について調査・検討し、いくつかの候補を見出した。そのうち STM28 及びその N 末部分削除ペプチドを図 4 の系で評価したところ、ペプチド濃度依存的な拮抗作用を示した (図 5)。

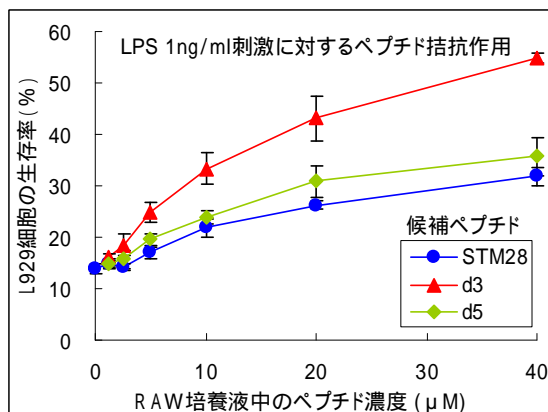


図 5. 各種 TLR4 アンタゴニストペプチド候補の拮抗活性評価

これらペプチドについて recombinant TLR4 蛋白に対する結合親和性を BIACORE 解析したところ、STM28 は TLR4 結合親和性を示したが、d5 では結合親和性を示さなかった (図 6)。

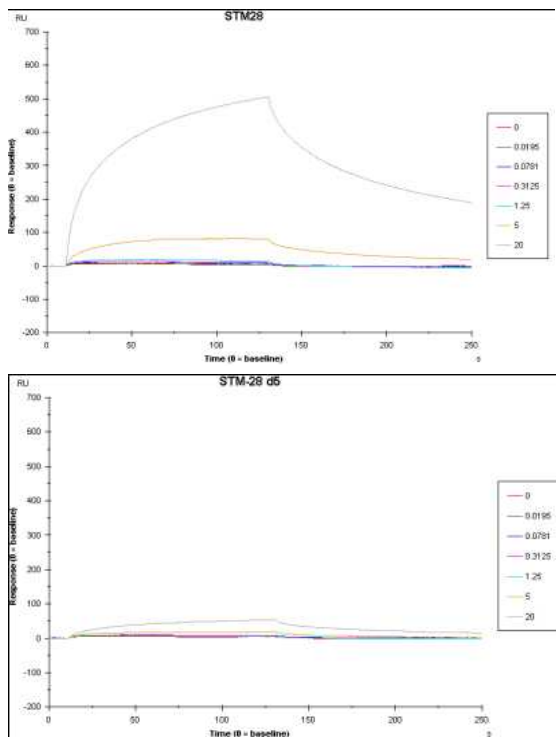


図 6. TLR4 蛋白に対する STM28 ペプチド (上) 及び d5(下)の Biacore 結合親和性解析

この候補ペプチドは RAW 細胞へ前処理するよりも、LPS と混合させてから RAW 細胞に添加する方がより強く LPS 刺激拮抗作用を示した (図 7)。

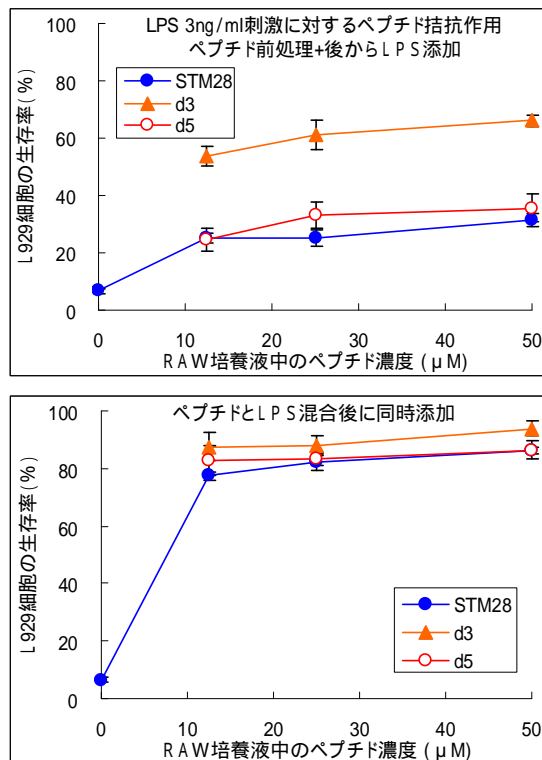


図 7. 各種 TLR4 アンタゴニストペプチド候補と LPS 及び TLR4 への反応性評価

この候補ペプチドは TLR4 へ結合するよりも LPS へ強く結合して、LPS 刺激によるマクロファージの TNF 産生阻害作用を示した。細胞膜粘着型配列とのキメラ化は困難であったが、十分に強い阻害作用を示した。

### (3) TGF-1 アンタゴニストペプチド

肺等の線維化に重要な TGF-1 に対する in vitro bioassay 評価系を構築した。

ヒト赤白血病細胞株 TF1 では IL-4 存在下において、TGF-1 濃度依存的な細胞増殖抑制がみられた (図 8)。

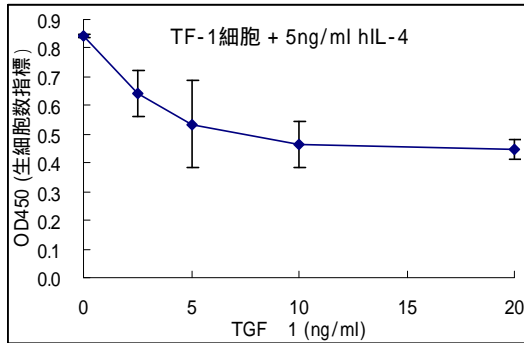
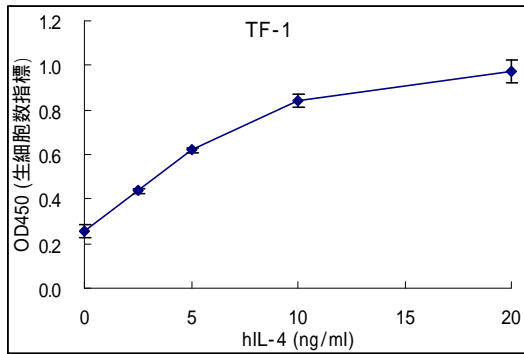


図 8. TF-1 細胞による TGF-1 bioassay  
hIL-4 存在下で TGF-1 濃度依存的な細胞増殖抑制

ヒト赤白血病細胞株 TF-1 を用いた in vitro 評価系において、recombinant TGF-1 刺激による応答を TGF-1 アンタゴニスト候補ペプチドは濃度依存的に抑制した (図 9)。

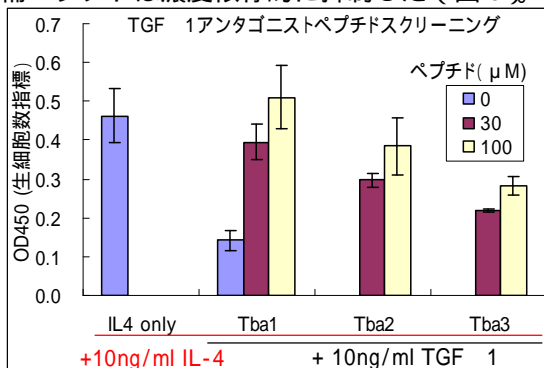


図 9. 各種 TGF-1 アンタゴニストペプチド候補の拮抗活性評価

ブレオマイシン誘発肺線維化ラットモデルに対して、肺噴霧スプレーにより Tba1 を 0.3、1.0mg/kg で週 2 回計 4 回投与したところ、肺組織中の線維化指標の hydroxyproline 及び肺重量を低減させた (図 10)。

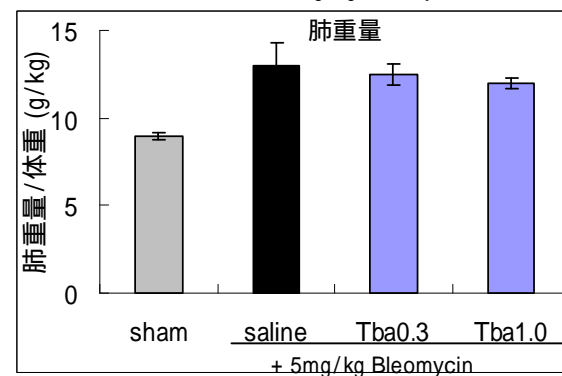
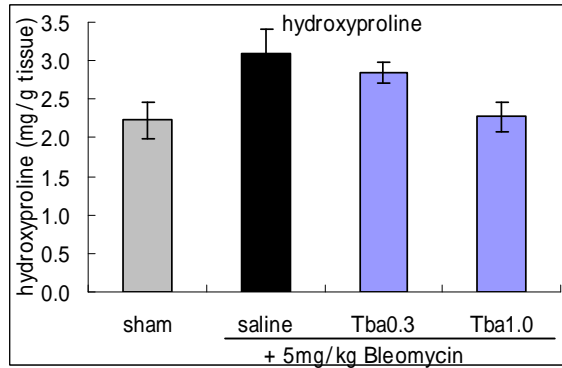


図 10. 肺線維化ラットモデルへの Tba1 ペプチド肺噴霧による薬効評価

TGF-1 アンタゴニストペプチド候補品を短く改変してから、(1)での膜粘着型配列とキメラ化して薬効を増強させる検討を行う予定である。

## 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 1 件)

Kohno M, Horibe T, Haramoto M, Yano Y, Ohara K, Nakajima O, Matsuzaki K, Kawakami K. A novel hybrid peptide targeting EGFR-expressing cancers. Eur J Cancer. 2011;47:773-83. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Masayuki Kohno, Tomohisa Horibe, Yoshiaki Yano, Katsumi Matsuzaki, and Koji Kawakami. A novel EGFR-targeted hybrid peptide can overcome the resistance of cancer cells to tyrosine kinase inhibitors. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 23 日、大阪国際会議場

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 雅之 (KOHNO MASAYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・客員研究員  
研究者番号：00437203

(2)研究分担者  
なし ( )

(3)連携研究者  
なし ( )

(4)研究協力者  
堀部 智久 (HORIBE TOMOHISA)  
京都大学・大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号：20467468