

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790710

研究課題名（和文） 下肢虚血、皮膚損傷後の治癒促進療法

研究課題名（英文） The new treatment of peripheral artery disease

研究代表者

得能 智武（TOKUNOU TOMOTAKE）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50567378

研究成果の概要（和文）：

ヘパリン結合部位を有する新しいインスリン様成長因子（IGF-1）蛋白を合成し、in vitro では新規 IGF-1 が細胞表面に長期間留まる事を示した。これは細胞膜上で負に荷電したヘパリン硫酸などのプロテオグリカンと弱く結合できようになったためと考えられた。下肢虚血（大動脈の結紮）モデルの実験では、投与した新規 IGF-1 の長期定着が見られず、今後、in vivo における薬剤デリバリーシステムを改善する必要があるが、今回の研究では薬剤の局所投与を行う上で新しい手法を提示できた。

研究成果の概要（英文）：

A novel Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which has heparin-binding domain was designed and purified. In vitro the novel IGF-1 binds with the surface of cell membrane, because heparin-binding domain can bind with negatively charged Proteoglycan. We checked the new IGF-1 effect with peripheral artery disease model, but we could not see the long time effect in vivo. We need to improve the drug delivery system in vivo. These results showed the new strategy of drug delivery system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：再生医学、循環器、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

傷害された組織の修復過程において、成長因子や、ケモカインが重要な役割を果たしていることが以前から数多く報告されている。組織の修復に有用といわれる増殖因子の一つとして、IGF-1 があげられる。多くの研究室で、筋肉や神経、軟骨などの修復に活用されているが、局所に留めることが難しく、効果が持続しないことが問題である。IGF-1 とい

う成長因子は細胞の肥大や増殖を促進し、細胞のアポトーシスを抑制することが知られている。一方で全身投与においては前立腺がんなど、がん細胞の増殖促進作用もあり、局所的な使用が勧められるタンパク質である。ただ、局所的な注入であっても、IGF-1 はすぐに組織中に浸透するため、一か所に留めておくことは難しく、効果も期待できないと言われている。私は、これまでにナノファイバ

ージュール(親水性と疎水性のアミノ酸を交互に並べたオリゴペプチドであり、生理的な pH や浸透圧の環境で 10nm のナノファイバーを形成する)を使用し、IGF-1 や Stromal cell derived factor-1(SDF-1)を、効率よく、傷害組織に留めることで、組織の修復を促進させることを報告した。

細胞表面に結合できる新規 IGF-1 蛋白を用い、局所における IGF-1 の長期定着をねらい、下肢虚血モデルでの血管新生促進効果を検討する。

2. 研究の目的

成長因子やケモカインを局所のみで使用することは全身的な副作用が少なく、また組織の修復に極めて有用な方法と考えている。投与した薬剤が局所に留まるシステムを開発する。

3. 研究の方法

合成、精製した新規 IGF-1 を使用する。新規 IGF-1 は N 端にヘパリン結合ドメインを備えたものである。ヘパリン結合ドメインは HB-EGF の配列を使用。大腸菌を用い、蛋白を発現、回収し、HPLC を用いて精製 (図 1)。

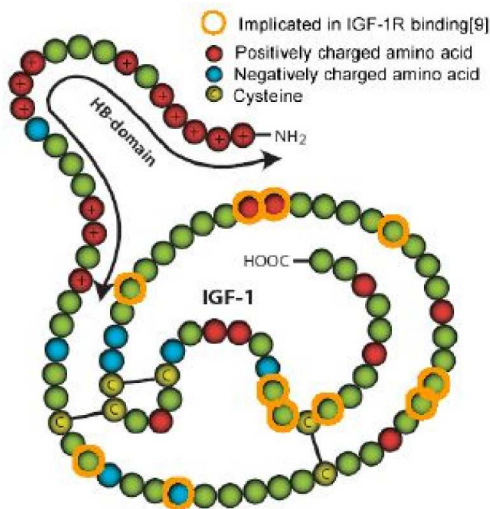


図 1. 新規 IGF-1 の構造

In vitro において、培養線維芽細胞(3T3 細胞)などを使用し、新規 IGF-1 が通常の IGF-1 と同様の活性を持っているか、Akt や IGF 受容体のリン酸化を Western blot 法で確認。また新規 IGF-1 を培養細胞とインキュベートし、細胞表面に結合できるかどうかを検討する。

In vivo において、心筋梗塞モデル、下肢虚血(大腿動脈の結紮)モデルを作成し、虚血

部位に新規 IGF-1 を単回投与(コントロール: PBS 群、通常 IGF-1 群)。新規 IGF-1 の長期的な薬剤効果による血管新生促進を検討する。

4. 研究成果

培養 3T3 細胞を使用した。新規 IGF-1 もしくは通常の IGF-1 を下記の濃度で 2 時間インキュベート。IGF-1 を含んだ培養液を PBS で十分に洗浄後に細胞から蛋白を回収し、Western Blot 施行し、IGF-1 を同定。新規 IGF-1 は濃度依存性に回収した細胞から IGF-1 抗体で同定することが出来たが、通常の IGF-1 とインキュベートした群ではほとんど同定出来なかった(図 2)。このことは通常の IGF-1 は PBS の洗浄によりほとんど洗い流されてしまうが、新規 IGF-1 は細胞表面に結合出来ており、洗浄によっても結合がはずれないことを示唆する。

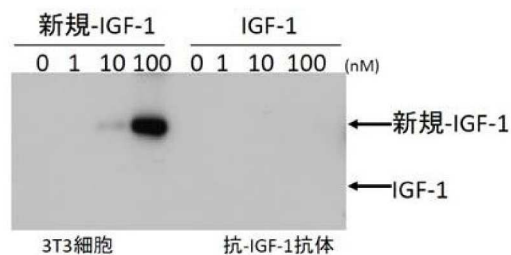


図 2. 新規 IGF-1 は細胞表面に結合する。

同様に培養細胞において、新規 IGF-1 と IGF-1 でそれぞれ 20 分の刺激を行い、細胞から蛋白を回収し、Western blot を行った。図 3 に示すように新規 IGF-1 は IGF-1 と同様に濃度依存的に IGF 受容体と Akt をリン酸化した。このことから、新規 IGF-1 は通常の IGF-1 と同様に IGF-1 受容体から Akt 経路を活性化させることが分かる。

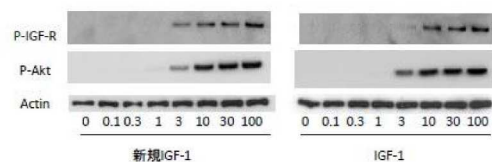


図 3. 新規 IGF-1 は濃度依存性(nM)に IGF 受容体、Akt を活性化する。

In vivo ではラット心筋梗塞モデルやマウス下肢虚血(大腿動脈を結紮除去)モデルを作成した。下肢虚血は健側をコントロールとし、ドップラー使用して血流差を確認。新規 IGF-1 療法(下肢筋肉内への IGF-1 単回投

与)により、PBS 群や、IGF-1 群よりも血管新生亢進を期待したが、新規 IGF-1 の組織内長期定着が十分ではなく(抗 IGF-1 抗体による免疫染色で確認)、血管新生促進効果も見られなかった。図 4 は左心室筋層へ新規 IGF-1(10 μ M)を注入し、IGF-1 その後の定着量を比較したものである。新規 IGF-1 が長期に組織に留まる事を期待したが、IGF-1 抗体(赤色)での免疫染色では時間経過でどちらの IGF-1 も発現量が減り、3 日目にはほとんど同定出来なかった。両蛋白間には明らかな有意差なかった。

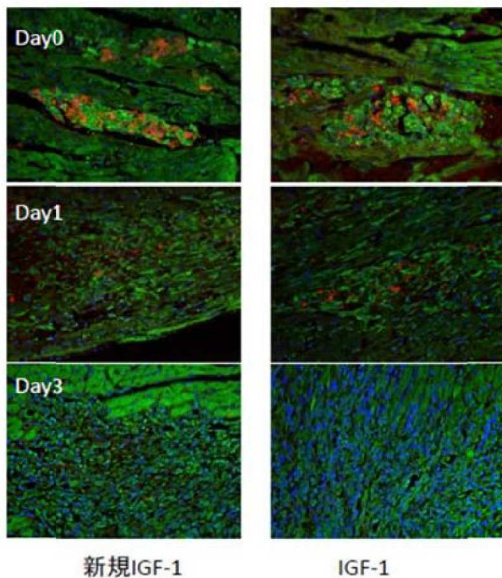


図 4. ラット心筋組織へ新規 IGF-1 と IGF-1 を注入。組織定着量を抗 IGF-1 抗体(赤)での時間経過。

同様にラットの心臓に新規 IGF-1 と IGF-1 をそれぞれ、注入(組織中で約 400nM)し、同様の時間経過(0, 1, 3 日後)で組織から蛋白を回収し、western blot および、ELISA にて評価した(図 5, 6)。

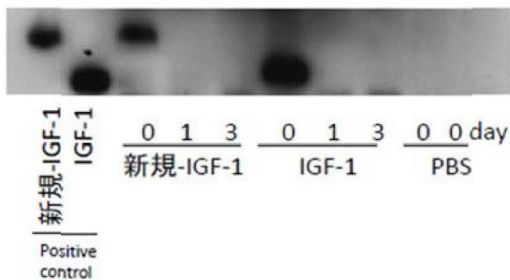


図 5. ラット心筋組織へ新規 IGF-1 と IGF-1、PBS を注入。組織定着量を抗 IGF-1 抗体での時間経過(Western blot 法)。

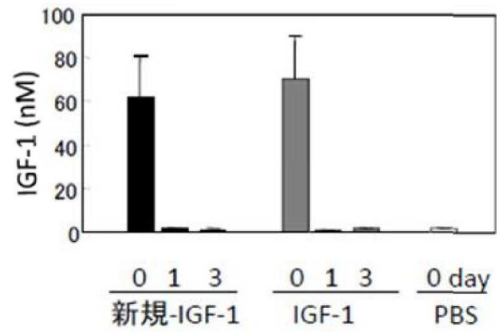


図 6. ラット心筋組織へ新規 IGF-1 と IGF-1、PBS を注入。ELISA により、IGF-1 残量を定量。

図 5, 6 の結果から、新規 IGF-1、IGF-1 両者とも心筋へ注入直後は同定できるものの、翌日になると、測定感度以下になることが分かった。ELISA の結果からも両者において、明らかな有意差は見られなかった。組織内においては新規 IGF-1 の長期定着は認めなかった。

以上のように、ヘパリン結合配列を含む新規 IGF-1 は in vitro の実験においては細胞膜に結合することが示唆される結果であった。このことは、新しい薬剤デリバリーの1つのシステムとなりうる結果だと考える。この結果から、in vivo においても新規 IGF-1 が局所に長期間留まる事が期待されたが、今回施行した実験の範囲では通常の IGF-1 と明らかな違いはなく、付加価値は見いだせなかった。組織においては注入した蛋白質の degradation が起こっている可能性もあり、ナノファイバージェルなど蛋白を保護するような薬剤デリバリーシステムを追加する必要があると思われた。この新規 IGF-1 は細胞膜上のプロテオグリカンと結合するため、軟骨組織のようなプロテオグリカンを多く含む組織においては、より大きな効果が期待される。

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 2 件)

- ① Ichiki T, Miyazaki R, Kamiharaguchi A, Hashimoto T, Matsuura H, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K. Resveratrol Attenuates Angiotensin II-Induced Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells. *Regul Pept.* 査読有 2012. (in press)

- ② Matsuura H, Ichiki T, Ikeda J, Takeda K, Miyazaki R, Hashimoto T, Narabayashi E, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K. Inhibition of prolyl hydroxylase domain-containing protein downregulates vascular angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 査読有 58; 386-393, 2011.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 池田次郎、松浦広英、井上恵利子、上原口亜矢、三小椿周弘、得能智武、北本史朗、市来俊弘、砂川賢二：飽和脂肪酸によって惹起されるマクロファージの小胞体ストレスおよびアポトーシスに対する PPAR γ 作動薬の効果. 第 7 回西日本血管・機能研究会. 2011 年 8 月 6 日、福岡.

[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

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003973/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

得能 智武 (TOKUNOU TOMOTAKE)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：50567378

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：