

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310085

研究課題名(和文) Gタンパク質共役受容体キナーゼ応答型循環器疾患治療・診断システム

研究課題名(英文) Delivery system responding to the abnormal G protein-coupled receptor signaling for diagnosis and treatment of cardiovascular diseases

研究代表者

姜 貞勲 (KANG, JEONG-HUN)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50423512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,800,000円、(間接経費) 2,040,000円

研究成果の概要(和文)：循環器疾患細胞に過剰発現しているGタンパク質共役受容体関連シグナルに応答するナノ分子システムの開発を目的とした。細胞内シグナルに選択的な新規ペプチドの探索に成功し、ペプチドを側鎖とし、水溶性高分子ポリマーを主鎖とするナノ分子システムを構築した。ナノ分子システムによる細胞内への遺伝子導入実験で、過剰発現している細胞内シグナルに応答して遺伝子が発現することを確認し、システムの有効性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop the delivery system of therapeutic molecules responding to the abnormal G protein-coupled receptor signaling for diagnosis and treatment of cardiovascular disease. Novel peptide substrates with high affinity for abnormal cellular signals were identified. Delivery system consisted of hydrophilic neutral polymer as the main chain and peptide substrates as side chains. When the system/gene complex was transfected into cells, gene expression increased in abnormal cells overexpressing target signals, but very low expression was found in normal cell.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ化学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：Gタンパク質共役受容体 プロテインキナーゼ 細胞内シグナル ナノ・バイオサイエンス 循環器疾患 薬物送達

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は生命の基本単位であり、細胞間のコミュニケーションを通じて生命体の維持に必要な情報交換を行い、調和のとれた社会的ネットワークを形成している。細胞は外部からの情報を細胞表面の受容体を介して受理し、それをシグナルとして変換してから細胞内シグナル伝達経路という高度の伝達システムにより、処理する。これらの細胞内シグナル伝達経路は秩序正しくコントロールされることで、正常な細胞機能を保つことができる。もし、異常が発生した場合でも、異常シグナルの排除、原因タンパク質の分解、異常細胞の細胞死滅へ誘導といった処置を取るなどの細胞ならではの浄化能力と社会維持能力を持っている。しかし、細胞内シグナルが与えられた浄化能力と社会維持能力を超えて過剰発現または異常亢進されると、その細胞は疾病細胞へと転換して周りの情報システムを攪乱し始め、生命体全体に大きなダメージを与えることになる。この細胞内シグナルの暴走が疾病である。このように、細胞内シグナルは細胞の言葉であり、その言葉には疾病を事前に把握できる重要なメッセージが隠されている可能性が非常に高い。

プロテインキナーゼとプロテアーゼによる酵素反応は、標的となるタンパク質の一部しか利用しないことに着目し、プロテインキナーゼとプロテアーゼに選択的に認識する断片のアミノ酸配列であるペプチドの開発に精力的に取り組んできた。そして、癌細胞で過剰発現しているプロテインキナーゼ C $\alpha$  に特異的に応答するペプチドの開発に世界初めて成功した。このペプチドを担持したナノ分子素材は正常細胞では全く反応せず、癌細胞にのみ認識することも証明した。これまでの研究から、各疾患に特異的に過剰発現している細胞内シグナルに応答するシステムは、疾患選択的治療や診断に非常に有効であることが分かった。

## 2. 研究の目的

虚血性疾患、高血圧、心不全など、主な循環器疾患細胞は、正常循環器細胞では見られない過剰発現された G タンパク質共役受容体関連シグナル (例えば、GRK2、Rho キナーゼ) を有している。もし、過剰発現している循環器疾患特異的なシグナルに応答するシステムが存在すれば、正常細胞には全く影響を与えずに、循環器疾患細胞特異的な治療や診断が可能であると考えられる。本研究は、G タンパク質共役受容体関連シグナル応答型循環器疾患治療・診断システムの開発を目指している。このナノ分子マシンは細胞の言葉である細胞内シグナルに選択的に反応するものである。細胞内シグナルとの対話において受話器のような役目を担う物質として、各細胞内シグナルに応答するペプチドを探索・開発する。そのペプチドを細胞まで安全に運ぶキャリアーとして、ペプチドを担持した親水

性ポリマーを合成する。そのキャリアーに治療用遺伝子や薬と一緒に載せることで、疾患選択的な治療が可能である。また、蛍光タンパク質や蛍光物質を搭載すると疾患診断に利用可能である。

## 3. 研究方法

(1) 高感度かつ選択的な基質ペプチドの探索

基質ペプチドの設計は、天然のタンパク質由来のペプチド残基の元に、以下の三点に重点を置いて行った。1) 親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸に置換、2) 塩基性アミノ酸残基を中性アミノ酸に置換、3) 酸性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸に置換。

ペプチドは、標準的な Fmoc 法により合成した。TFA 切断の後、ペプチドは BioCAD クロマトグラフィシステムを用い、Intersil ODS-3 カラム (250 x 20 mm, 3.5  $\mu$ m) により精製した。このとき、溶出液 A として 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を用い、溶出液 B として 0.1% TFA アセトニトリル溶液を用いて、流速 8ml/分の A-B リニアグラジエントにより溶出を行った。このグラジエントは、30 分間かけてアセトニトリル/水を、10/90 から 30/70 にして行った。精製後の純度はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) により算出した。本研究では、純度 95% 以上のペプチドを用いて実験を行った

## (2) 基質ペプチドの評価

基質ペプチドにおけるリン酸化の検出を、MALDI-TOF/MS により行った。原則として 400 回のレーザーショットを平均化してシグナルノイズ比を高めた。全てのスペクトルは Data Explorer TM ソフトウェアを用いて分析した。酵素によるペプチドのリン酸化反応は、30  $\mu$ M のペプチドと種々の酵素濃度を含有する 50  $\mu$ l の緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100  $\mu$ M ATP、及び 10 mM MgCl<sub>2</sub>] 中で行った。反応温度は 37°C であり、反応時間は 60 分であった。リン酸化されたペプチドの相対強度 (%) はピークのインテンシティから算出した。

放射性同位元素 (ラジオアイソトープ) を用いたペプチドのリン酸化評価は、50  $\mu$ M のペプチドと 1~2.5  $\mu$ g/ml の酵素を含有する 25  $\mu$ l の緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM EGTA、0.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 ( $\beta$ -glycerophosphate)、0.01% Triton X-100、10 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 mM ジチオトレイトール、及び 200  $\mu$ M ATP と放射性同位元素 (32P) ラベルした ATP] 中で行なった。反応時間は 10~60 分、反応温度は 25°C であった。30% トリクロロ酢酸を 5  $\mu$ l 添加することで反応を止めた。各反応液 (24  $\mu$ l) をポリフッ化ビニリデン膜にスポットした。5% トリクロロ酢酸で三回洗浄を行い、アセトンで膜を乾かした。膜の放射性同位元素を液体シンチレーションカウンタ (liquid scintillation counting)

を用いて測定し、その結果をカウント毎分 [CPM(counts per minute)]として現した。

### (3) 高分子ポリマーの合成

アクリルアミドとペプチドを水で溶かし、5 分間窒素ガスで脱ガスを行った。重合反応のために過硫酸アンモニウムと N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを添加し、90 分間反応させた。透析膜 (分子量 50,000) を用いて 3 日間透析し、凍結乾燥した。元素分析からアミノ酸の濃度を計算した。

### (4) 細胞導入実験

細胞に酵素活性剤を添加することで、活性型細胞を作製した。コントロール細胞は非活性型細胞 (酵素活性剤の無添加細胞) を用いた。ポリマーのカチオン (N) に対する遺伝子のアニオン (P) の割合 (N/P 比) を有するポリマー/遺伝子のポリイオンコンプレックスを細胞へ添加し、37°C で 24 時間培養した。レポータープラスミド DNA (pDNA) はルシフェラーゼ遺伝子を有するものであった。24 時間後、ルシフェラーゼタンパク質の発現定量も行った。

細胞ライセット (破壊液) の作製は、回収した細胞を 0.2 ml の緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、250 mM スクロース、及び 10 mM MgCl<sub>2</sub>] に入れて超音波 30 秒で破壊した。溶液を遠心 (5000 g、10 分、4°C) し、上清をリン酸化反応に用いる。リン酸化条件は 30 μM のペプチドを含有する 50 μl の緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 μM ATP および 10 mM MgCl<sub>2</sub>] 中で行った。ペプチドにおけるリン酸化率は、上述した MALDI-TOF/MS 法により算出した。

## 4. 研究成果

### (1) 基質ペプチド探索

高感度かつ選択的な基質ペプチドの設計において最も重要な情報はコンセンサス配列であるが、GRK2 のコンセンサス配列に関する報告はまだない。そのため、GRK2 のシグナル伝達に関わるタンパク質のアミノ酸配列情報を基に、GRK2 に反応する最適なコンセンサス候補配列の同定を試みた。17 種類のタンパク質のアミノ酸配列分析から、GRK2 に最も適した三つのコンセンサス配列、(D/E)X(1-3)(S/T)、(D/E)X(1-3)(S/T)(D/E)、及び (D/E)X(0-2)(D/E)(S/T) を発見した。また、GRK2 の研究のために広く用いられる標準ペプチドである RESA ペプチド (RRREEEEEESAAA) よりも 5 倍以上高感度を示すチューブリンタンパク質由来のペプチドの探索にも成功した。このペプチドは、別の GRK グループである GRK5 に対しては反応性が非常に低く、GRK2 に特異的なペプチドであることも分かった (図 1)。さらに、このペプチドを改良した 3 種類のペプチドを用意し、

リン酸化反応を行った結果、より高い反応性を示す新規ペプチドの同定にも成功した。

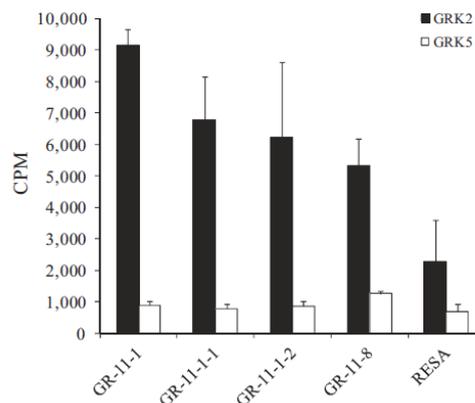


図 1 GRK2 と GRK5 酵素による基質ペプチドのリン酸化。新規ペプチド (GR-11-1) は GRK2 に特異的なペプチドであった。

また、G タンパク質共役受容体シグナルの一種である Rho キナーゼに反応するペプチドの探索と評価も行った。136 個の配列候補から Rho キナーゼに対する高感度かつ選択的なペプチドの探索に成功した。Rho キナーゼに最適したコンセンサス配列は (R/K)X(1-2)(S/T) であった。

### (2) 細胞破壊液との反応

酵素活性剤を添加して作製した活性型細胞を用いてライセットを作り、基質ペプチドとのリン酸化反応を行った。反応開始から 1 時間後に MALDI-TOF/MS を用いて分析した結果、リン酸化されたペプチドのピークが検出された。

### (3) 高分子ポリマーの合成と評価

細胞内酵素応答型高分子ポリマーは、基質ペプチドを水溶性高分子であるポリアクリルアミド主鎖に導入することで合成した。アニオン性アミノ酸残基が多い GRK2 の場合は、遺伝子との結合のために、N-末端に八つのアルギニンを導入したペプチドを合成した。カチオン性基質ペプチドを持つ高分子ポリマーはアニオン性遺伝子と安定なポリイオンコンプレックスを形成することを確認した (N/P 比=2 及び 4)。ポリイオンコンプレックスのサイズは 110 nm 以下であり、ゼータ電位 (mV) は 14 であった。血清成分によるポリイオンコンプレックスの安定性の変化を調べるために、牛胎児血清 (FBS、20%) を反応液に添加した。牛胎児血清存在下で、フリーの pDNA は分解されたが、ポリイオンコンプレックスを形成した pDNA は分解されなかった (図 2)。これらの結果から、血清成分存在下でも、ポリイオンコンプレックスは安定に維持されていることが分かった。

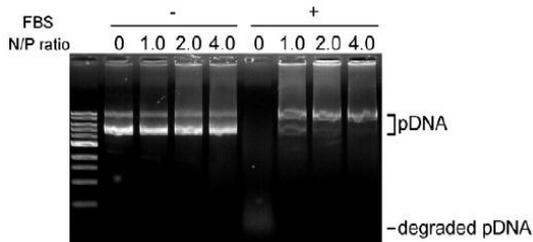


図2 牛胎児血清添加によるポリイオンコンプレックスの安定性の変化

しかし、標的酵素の存在下で、ポリイオンコンプレックスの側鎖にある基質ペプチドがリン酸化されると、アニオン荷電の導入により、ポリイオンコンプレックスは時間の経過とともに弱体化した (N/P 比=2)。一方、N/P 比が 4 の場合は、ポリイオンコンプレックスの形成が強かったため、標的酵素の存在下でも崩壊は確認できなかった (図 3)。

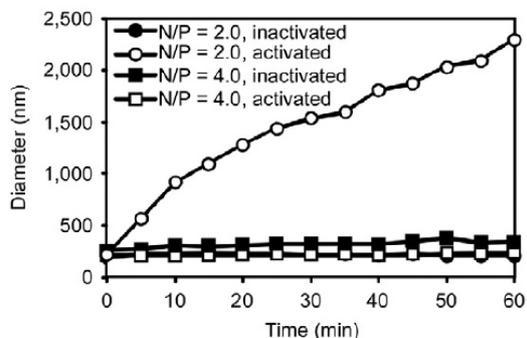


図3 活性型及び熱不活性型酵素の添加によるポリイオンコンプレックス (N/P 比=2 及び 4) のサイズの変化

#### (4) 細胞導入実験

酵素活性剤 (LPA) を添加して作製した活性型細胞は、コントロール細胞 (酵素活性剤の無添加細胞) と比べ、アクチンストレスファイバーの形成が亢進していることが明らかになった (図 4)。

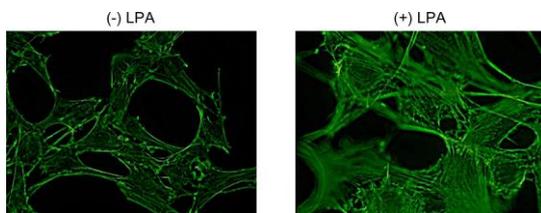


図4 酵素活性剤 (LPA) の添加によるアクチンストレスファイバーの形成の亢進。

この活性型細胞を用いてポリイオンコンプレックスの細胞内への導入実験を行った。ポジティブポリマー (反応性ポリマー) を導入した細胞は、ネガティブポリマー (非反応性ポリマー) を導入した細胞と比べ、ルシフェラーゼタンパク質の発現量が有意に増加したが、酵素阻害剤を添加すると、両ポリマー群における発現量の差は見られなかった

(N/P 比=2)。一方、N/P 比が 1 の場合はポリイオンコンプレックスの形成が弱かったため、ネガティブポリマーでも高い発現量が検出された。N/P 比が 4 の場合はポリイオンコンプレックスの形成が強かったため、両ポリマー群におけるルシフェラーゼタンパク質の発現量は抑制された (図 5)。

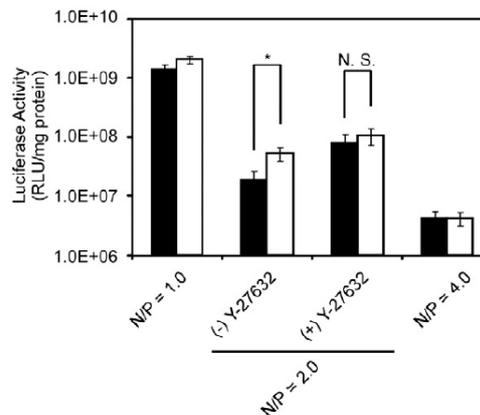


図5 ポリイオンコンプレックスの細胞導入実験。細胞は酵素活性剤 (LPA) を添加して作製した活性型細胞を使用した。ポリイオンコンプレックスの N/P 比は 1、2、及び 4 であった。白はポジティブポリマー (反応性ポリマー) によるルシフェラーゼの発現量を、黒はネガティブポリマー (非反応性ポリマー) による発現量を示したものである。Y-27632、酵素阻害剤; \*, P < 0.05; N.S.、有意差なし。

#### (5) 今後の展開

実用化に向けた更なる高分子ポリマーの改良と工夫により、循環器疾患の診断・治療に有効な材料として活用されることが期待できる。

#### 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 10 件)

- ① A. Tsuchiya, J.H. Kang, D. Asai, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama. Transgene regulation system responding to Rho associated coiled-coil kinase (ROCK) activation. J. Control. Release, 査読有, Vol. 155, 2011, pp. 40-46. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.002.
- ② T. Tomiyama, R. Toita, J.H. Kang, H. Koga, S. Shiosaki, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama. Effect of the introduction of chondroitin sulfate into polymer-peptide conjugate responding to intracellular signals. Nanoscale. Res. Lett., 査読有, Vol. 6, 2011, pp. 532. doi: 10.1186/1556-276X-6-532.

- ③ J.H. Kang, D Asai, A Tsuchiya, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama. Peptide substrates for Rho-associated kinase 2 (Rho-kinase 2/ROCK 2). PLoS ONE, 査読有, Vol. 6, 2011, pp. e22699. doi: 10.1371/journal.pone.0022699.
- ④ J.H. Kang, R. Toita, C.W. Kim, Y. Katayama. Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. Biotechnol. Adv., 査読有, Vol. 30, 2012, pp. 1662-1672. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.07.004.
- ⑤ A. Tsuchiya, D. Asai, J.H. Kang, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama. Correlation between phosphorylation ratios by MALDI-TOF MS analysis and radioactivities by radioactive assay. Anal. Biochem., 査読有, Vol. 421, 2012, pp. 773-775. doi: 10.1016/j.ab.2011.08.035.
- ⑥ J.H. Kang, R. Toita, D. Asai, T. Yamaoka, M. Murata. Liver cell-specific peptides derived from the PreS1 domain of human hepatitis B virus. J Virol Methods, 査読有, Vol. 201, 2014, 20-23. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.013.
- ⑦ D. Asai, R. Toita, M. Murata, Y. Katayama, H. Nakashima, J.H. Kang. Peptide substrates for G protein-coupled receptor kinase 2. FEBS Lett., 査読有, Vol. 588, 2014, pp. 2129-2132. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.038.
- ⑧ J.H. Kang. Protein kinase C (PKC) isozymes and cancer. New J. Sci., 査読有, Vol. 2014, 2014, pp. 231418. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/231418>
- ⑨ J.H. Kang, R. Toita, D. Asai, T. Yamaoka, M. Murata. Reduction of inorganic phosphate-induced human smooth muscle cells calcification by inhibition of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. Heart Vessels, 査読有, In press.
- ⑩ J.H. Kang, R. Toita, M. Murata. Liver cell-targeted delivery of therapeutic molecules. Crit. Rev. Biotechnol., 査読有, In press.

[学会発表] (計 4 件)

- ① J.H. Kang, Y. Tachibana, W. Kamata, A. Mahara, M. Harada-Shiba, T. Yamaoka.

Liver-targeted siRNA delivery system and its in vivo application. 第60回高分子学会年次大会、2011年5月25日、大阪。

- ② 姜貞勳、橘洋一、鎌田和加子、小比賀聡、斯波真理子、山岡哲二。ApoB siRNA 肝臓選択的送達システムによる血中 LDL 値の安定化。第27回日本DDS学会、2011年6月10日、東京。
- ③ J.H. Kang, T. Yamaoka. Tissue or disease-targeted gene delivery systems. Japan Society of Gene Therapy 2011 17<sup>th</sup> annual Meeting, July 17, 2011, Fukuoka.
- ④ J.H. Kang, A. Tsuchiya, D. Asai. Gene delivery system responding to small G protein kinase activated by G protein-coupled receptors. The 40<sup>th</sup> international symposium on nucleic acid chemistry, 2013, November 14, Kanagawa.

[図書] (計 3 件)

- ① R. Toita, Y. Katayama, J.H. Kang. Nanotechnological strategies for tumor-targeted delivery of drugs or genes. In: Advances in Nanotechnology. Vol. 8, Chapter 8, Nova Science Publishers, 2012, pp 317-338.
- ② J.H. Kang, T. Riki, M. Murata. Diagnostic and therapeutic nanomaterials that respond to cellular environments. In: Nanotechnology; Diagnostics and Therapeutics. Vol. 7, Chapter 17, Studium Press LLC, 2013, pp 353-378.
- ③ A. Tsuchiya, J.H. Kang, Stimulus-responsive nanomaterials for delivering therapeutic molecules. In: Biomaterials. Vol. 11, Chapter 18, Studium Press LLC, 2014, pp 419-441.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: リポソーム組成物及び治療薬

発明者: 姜 貞勳

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-011515

出願年月日: 2014年1月24日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姜 貞勲 (KANG JEONG-HUN)  
独立行政法人国立循環器病研究センター  
研究所・室長  
研究者番号：50423512

(2) 研究分担者

山下 敦 (YAMASHITA ATSUSHI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター  
研究所・研究員  
研究者番号：50572666

(3) 連携研究者

なし