

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24810026

研究課題名(和文) コラーゲン3重らせんペプチドを利用したPEDF血管新生阻害の分子機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of angiogenesis inhibition by PEDF using collagen-like triple helical peptides

研究代表者

増田 亮 (Masuda, Ryo)

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：90632159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：血管上皮由来因子(PEDF)は血管新生を阻害するが、その機構は未解明である。近年、コラーゲン上のPEDF認識配列を同定し、それが血管新生促進因子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の認識配列とオーバーラップしていることがわかった。また、PEDFもコラーゲンのみならず、HSPGと相互作用することが知られている。

そこで、PEDFやHSPGのみに特異的に結合するコラーゲン様のペプチド、およびコラーゲンやHSPGのみに特異的に結合するPEDF変異体をデザイン・調製した。さらに、血管新生へ与える影響をin vitroで評価するための、創傷治癒モデルであるスクラッチアッセイの最適条件を決定した。

研究成果の概要(英文)：Although pigment epithelium-derived factor (PEDF) exhibits potent inhibitory activity against angiogenesis, its mechanism is unclear. Recently, our research group have identified the sequence on collagen which recognized PEDF. This sequence is also overlapped with heparan sulfate proteoglycan (HSPG)-recognizing sequence. In addition, PEDF interacts with not only collagen but also HSPG. We designed and synthesized collagen-like triple helical peptides which could specifically interact with PEDF or HSPG, and PEDF mutants which could specifically bind to collagen or HSPG. Furthermore, we optimized the condition of scratch assay as wound healing model to evaluate the effect of these compounds on angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：PEDF コラーゲン ヘパラン硫酸 血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

セリンプロテアーゼインヒビター (serine protease inhibitor, SEPRIN) は、アンチトロンピンやアンチトリプシンに代表されるプロテアーゼ阻害活性を有するタンパク質の他に、プロテアーゼ阻害活性を持たない non-inhibitory SEPRIN がある。Non-inhibitory SEPRIN の一種である PEDF は、神経分化能や神経保護能にくわえて、血管新生を阻害する作用が報告されている。血管新生は生理的条件において、胚発生時における脈管形成や創傷の治癒に寄与している。一方で血管新生は、低酸素状態にある腫瘍が、低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) とそれに続く血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) を発現することによって誘導される。その結果、腫瘍の転移や増殖が促進されるため、病態生理学的にも重要な現象である。PEDF による血管新生阻害作用は、黒色腫の増殖や転移を強く抑制するため、抗癌剤の創薬研究において、有望な標的の一つである。

PEDF の血管新生阻害作用の発現機序には、これまで3種類のタンパク質 (PNPLA2、37/67 kDa ラミニン受容体、F1-ATPase) の関与が報告されている。一方で、所属研究室では近年、コラーゲンの PEDF 認識配列 (KGXRGFXGL; X は任意のアミノ酸) を特定し、その配列が、血管新生促進因子であるヘパリンの認識配列 (KGHRG(F/Y)) と重複していることを示した (Fig. 1)。

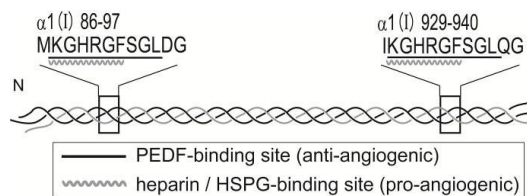


Fig. 1 HSPG/heparin/PEDF-recognizing motifs on collagen.

また、コラーゲン上には、様々な生体物質が相互作用する hot spot と呼ばれる領域が存在し、この領域はヘパリンや PEDF の他にも、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  等とも相互作用することが知られている。インテグリンもまた、血管新生の制御に関わる因子であり、HSPG-コラーゲン間の相互作用が、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  を介する細胞遊走に重要であることが報告された。細胞の遊走 (migration) は、血管新生に必要な不可欠な過程である。そのため、これらのシグナリングネットワークが生体内の血管新生を制御している可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

これまでの研究により、PEDF とコラーゲンとの相互作用が、血管新生阻害に寄与していることが知られている。また、HSPG の構

成要素であるヘパリンも、コラーゲンおよび PEDF と相互作用することが知られているが、これら三者がお互いにどのような影響を与えて、血管新生を制御しているかを解析している例はない。本研究では、所属研究室の過去の研究内容の発展を目的として、ヘパリン-PEDF-コラーゲンの三者間相互作用が血管新生に与える影響を検証する。さらに、血管新生における、これらの相互作用とインテグリンの関連性についても、あわせて検証する。

### 3. 研究の方法

(1) コラーゲン様ペプチド、および PEDF 変異体のデザインと調製

ヘパリンに特異的に結合するコラーゲンの模倣体として、コラーゲンのヘパリン認識配列を基にした、コラーゲン様ペプチドを調製する。また、PEDF への特異的な結合能を有するコラーゲン模倣体として、コラーゲン中の、ヘパリンへの相互作用のみに必須なヒスチジンを、他のアミノ酸に置換したコラーゲンフラグメントを調製する。インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  への特異的な結合能を有する変異体としては、既知ペプチドを用いる。

また、これまでの研究により、PEDF のヘパリン認識部位、およびコラーゲン認識部位が明らかにされており、それぞれの標的に特異的な PEDF 変異体が作製されている。この知見にもとに、ヘパリンとの相互作用能を欠損させた PEDF 変異体、およびコラーゲンとの相互作用能を欠損させた PEDF 変異体を、GST タグ融合タンパクとして調製する。

(2) 血管新生におけるヘパリン-PEDF-コラーゲン三者間相互作用とインテグリンの関連性の検証

細胞の遊走の度合いを評価可能な、創傷治癒モデルであるスクラッチアッセイを行う。スクラッチアッセイは、HUVEC が遊走した面積を定量的に測定することができるアッセイ法である。(1) で調製したコラーゲン様ペプチド、および PEDF 変異体を添加した条件でアッセイを行い、コントロールとなる野生型 (WT) の PEDF およびコラーゲンを添加した際の結果と比較する。

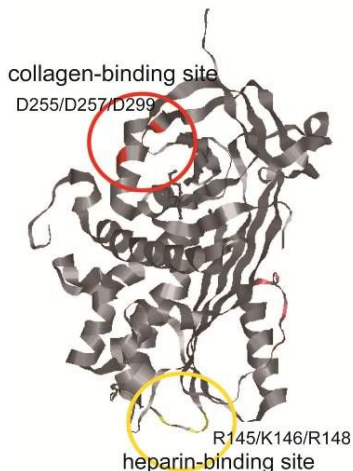
### 4. 研究成果

(1) ヘパリンおよび PEDF に特異的に結合するコラーゲン様ペプチドとして、以下のペプチドをデザイン、化学合成した。これらのペプチドは、host sequence と呼ばれる中央部にそれぞれの認識配列を、N 末端および C 末端側には、3 重らせん構造を安定化させるために POG の繰り返し配列を導入した (Table 1)。これらのペプチド鎖の合成は Fmoc 固相合成法によってなされ、精製は逆相 HPLC によって行った。

**Table 1** Sequences of collagen mutant fragments.

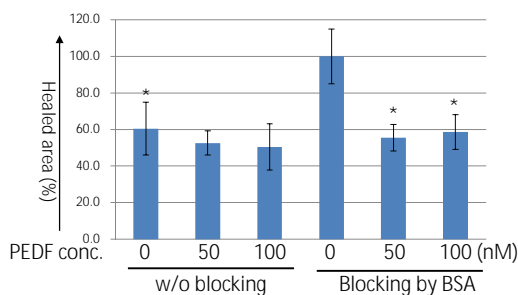
(POG) <sub>m</sub> - host sequence -(POG) <sub>n</sub>	
Target peptide	Host sequence
Heparin	VKGHRGYOGLDG
PEDF	PKGXRGFQGLG

また、PEDF の変異体は過去の報告をもとに、コラーゲン結合部位に存在するアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体(D255N, D257N, D299N)を、ヘパリン結合部位に存在する塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体(R145A, K146A, R148A)を、それぞれ GST タグ付きのタンパクとして得た (Fig. 2)。それらは glutathione sepharose beads を用いて精製され、GST タグは酵素 FactorXa を用いて切断した。系中に残る FactorXa は benzamidine beads によって処理した。



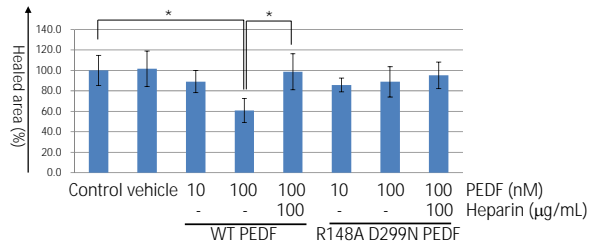
**Fig. 2** Interaction residues on PEDF.

(2) 創傷治癒モデルであるスクラッチアッセイの条件最適化を行った。まず、ブロッキングの条件を検討した。その結果、ブロッキング試薬として、BSA を用いた際に、PEDF による HUVEC の遊走阻害を観察することができたため、以下の実験系では BSA をブロッキング試薬として用いることとした(Fig. 3)。



**Fig. 3** Optimization of blocking reagent.

つづいて、PEDF 存在下において heparin が血管新生に与える影響を評価した。その結果、PEDF の細胞遊走阻害作用は heparin によって中和された。一方で、コラーゲンにも HSPG にも結合しない PEDF 変異体を用いると、細胞遊走阻害作用は確認されなかった。また、heparin の添加による促進作用も確認されなかった(Fig. 4)。



**Fig. 4** The relevance between PEDF and heparin.

さらに得られている知見として、heparin の中和剤である protamine を heparin とともに投与すると、細胞遊走に対して影響は与えなかった。一方で、protamine の単独投与によって、細胞の遊走は有意に阻害された。この結果は、細胞表面上に存在するヘパリン硫酸プロテオグリカンとコラーゲンの相互作用が、protamine によって阻害されたことを示唆するものである。

これらの結果は、PEDF-heparin-コラーゲンの三者間の相互作用が、血管新生の制御にかかわっていることを示唆するものである。今後は、上記した合成ペプチドや PEDF 変異体を用いて、これらの相互作用のさらなる精査を行っていく予定である。

## 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)

取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 亮 (MASUDA, Ryo)

早稲田大学・先進理工学部・助手

研究者番号：90632159