

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350969

研究課題名(和文) 血栓溶解促進作用を有する環状ペプチドの分子標的の解析と創薬への展開

研究課題名(英文) Analysis of molecular targets and development into drug discovery for cyclic peptides possessing thrombolysis-enhancing action

研究代表者

小泉 幸央 (KOIZUMI, Yukio)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80353465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞や心筋梗塞といった血栓性疾患の治療ならびに予防がきわめて重要である。これまで、*in vitro*血栓溶解活性評価系を用いて血栓溶解促進物質の探索を行なった結果、環状ペプチド、マルホルミンを見出してきた。本研究の目的はマルホルミンの作用機序を解明することである。今回、マルホルミンはRSK1の活性化を誘導し、ウロキナーゼの発現上昇を引き起こし、血漿中のプラスミノゲン活性化を介した線溶活性を促進することを明らかとした。本研究の結果から、マルホルミンの分子構造を基盤とした次世代型血栓溶解剤の創製が期待される。

研究成果の概要(英文)：Treatment and prevention of thrombotic diseases such as cerebral infarction and myocardial infarction are extremely important. As a result of searching thrombolysis-enhancing substances using *in vitro* thrombolytic activity evaluation system, we have discovered cyclic pentapeptide malformin. The purpose of this study is to elucidate the mechanism of action for malformin. In this study, we showed that malformin induces the activation of RSK1, raises the expression of urokinase and promotes fibrinolytic activity via plasminogen activation in plasma fluid. From the results of this study, it is expected to create the next generation thrombolytic agent based on the molecular structure of malformin.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：抗血栓薬 線溶系 マルホルミン RSK ウロキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年の食の欧米化に伴った脳梗塞や心筋梗塞といった血栓性疾患の発症の増加が認められることから、その治療ならびに予防がきわめて重要である。血栓性疾患の治療に用いられる抗血栓薬は、抗血小板剤、抗凝固剤、血栓溶解剤の3種類に分けられ、抗血小板剤と抗凝固剤は血栓の形成を抑制するのに対し、血栓溶解剤は形成された血栓を溶解する線維素溶解(線溶)系を亢進させる。現在、抗血小板剤と抗凝固剤には低分子医薬が臨床利用されているのに対し、血栓溶解剤には血栓の主成分であるフィブリンの分解酵素プラスミンの不活性前駆体プラスミノゲン(3-LysMA1)を活性化する組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)やウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)といった酵素製剤が用いられている。酵素製剤は血中の短い半減期、大量投与の必要性、全身性の出血傾向、緊急治療に限定、長期投与が不可といった問題点を有していることから、経口投与可能な低分子血栓溶解剤の開発が求められている。

申請者は、in vitro 血栓溶解活性評価系を用いて微生物資源(糸状菌や放線菌の培養抽出液)から血栓溶解促進物質の探索を行なった結果、糸状菌 *Aspergillus niger* が生産する分子内ジスルフィド結合を有する環状ペプタペプチド、マルホルミン A1 を見出した。マルホルミンの作用機序はこれまでの PA 製剤と異なり、uPA 産生細胞を介したプラスミン活性の増加を引き起こし、さらに、マルホルミンは MAP キナーゼ経路を介した RSK1 を活性化し、マルホルミンによる血栓溶解促進活性が RSK1 阻害剤により抑制されることも明らかとした。

2. 研究の目的

本研究ではマルホルミンの作用機序を解明することを目的に、ケミカルプローブを作成し、マルホルミンの分子標的の解析を進めることである。本研究の推進によって、細胞性血栓溶解を促進する新しい制御機構が解明され、さらにはマルホルミンの分子構造を基盤とした低分子型血栓溶解剤の創製が期待される。

3. 研究の方法

(1) マルホルミンアフィニティー担体の作成

マルホルミンアフィニティー担体は、固相ペプチド合成により作成したマルホルミンの L-Val→L-Lys 誘導体(3-LysMA1)を固相担体上に固定化することにより作成した。

(2) レンチウイルス CRISPR/Cas9 ノックアウト

RSK アイソフォーム 1~3 と PRDX1 に対する sgRNA を挿入した lentiCRISPRv2 ベクター、エンベロープベクター、パッケージングベクターの3種のベクターを 293FT 細胞

に遺伝子導入し、レンチウイルスを作成した。回収したレンチウイルスを U937 細胞に感染後、薬剤選別を行い、sgRNA/Cas9 組み込み細胞を作成した。

(3) in vitro 血栓溶解活性評価系

in vitro 血栓溶解活性は、¹²⁵I-フィブリンノーゲンコートした 96 穴プレートにトロンピンで処理し、U937 細胞とヒト血漿を添加。3 時間の反応後、上清に遊離した ¹²⁵I-フィブリン分解物を γ -カウンターで測定することにより評価した。

4. 研究成果

(1) マルホルミン高親和性タンパク質の同定

マルホルミンアフィニティー担体を用いた、マルホルミン高親和性タンパク質の同定を行った。はじめに、固相ペプチド合成により 3-LysMA1 を作成し、固相担体上に固定化することによりマルホルミンアフィニティー担体を作成した(図1)。次に、アフィニティー単体と uPA 産生細胞である U937 細胞の細胞溶解液を反応させ、洗浄後、還元剤入り溶出液によりマルホルミン高親和性タンパク質を溶出した。つづいて、電気泳動によってマルホルミンアフィニティー担体特異的に検出された高親和性タンパク質のバンドを検出し、質量分析によるタンパク質同定を行った。その結果、マルホルミン結合タンパク質として PRDX1 を同定した(図2)。

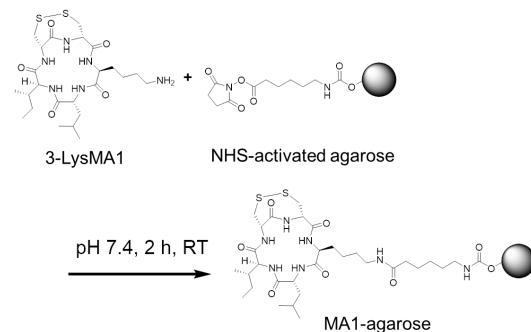


図1 マルホルミンアフィニティー担体の生成

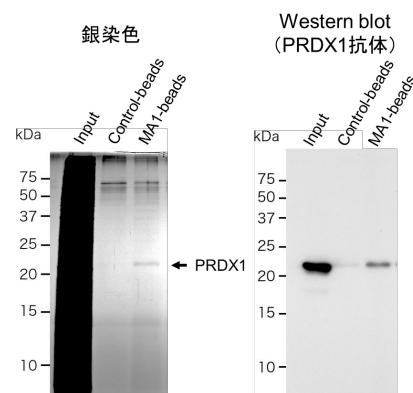


図2 マルホルミン高親和性タンパク質の同定

(2) RSKs と PRDX1 のノックアウトの影響
 マルホルミンの活性発現に關与することが示唆される RSK アイソフォームや PRDX1 のノックアウト細胞を作成し、マルホルミンの活性発現に対する影響を調べた。ノックアウト細胞は、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を利用したレンチウイルスノックアウト(KO)システムにより作成した。レンチウイルス感染細胞で RSK1,2 と PRDX1 の部分的な KO が観察されたにも関わらず(図 3A) マルホルミンの線溶促進活性には影響を及ぼさなかった(図 3B)。

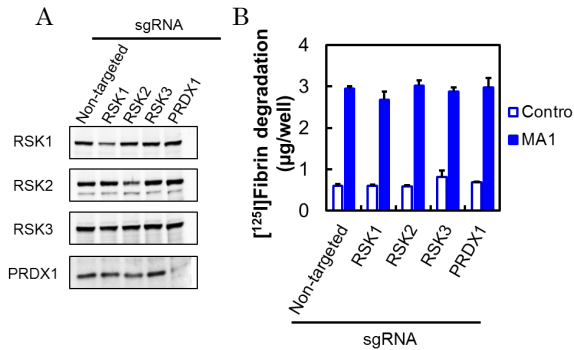


図 3 RSKs と PRDX1 のノックアウトの影響
 A) RSKs と PRDX1 ノックアウト U937 細胞の WB。 B) マルホルミンの線溶活性促進に対する RSKs と PRDX1 ノックアウト細胞の影響。

次にシングルセルクローニングを行い、RSK1,2 KO 細胞のシングルセルクローニングを行った(図 4A)。その結果、RSK2 KO クローンではマルホルミンの血栓溶解促進活性に影響がなかったのに対し、RSK1 KO クローンではマルホルミンの促進活性が阻害された(図 4B)。この結果から、マルホルミンの線溶促進活性発現には RSK1 が必須であることがわかった。

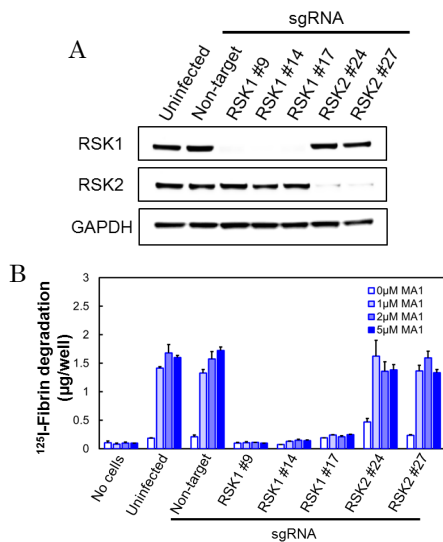


図 4 RSK1/2 ノックアウトクローンの影響
 A) RSK1/2 ノックアウト U937 細胞クローンの WB。 B) マルホルミンの線溶活性促進に対する RSK1/2 ノックアウト細胞クローンの影響。

(3) マルホルミン誘導体による RSK1 リン酸化に対する影響

構造活性相関研究で合成したマルホルミン誘導体による RSK1 のリン酸化に対する影響を調べた(図 5A)。活性型のマルホルミン誘導体はマルホルミン同様、RSK1 のリン酸化を上昇させたが、不活性誘導体は RSK1 のリン酸化に変化を示さないことから、マルホルミンの生物活性と RSK1 のリン酸化誘導に相関が確認された(図 5B)。

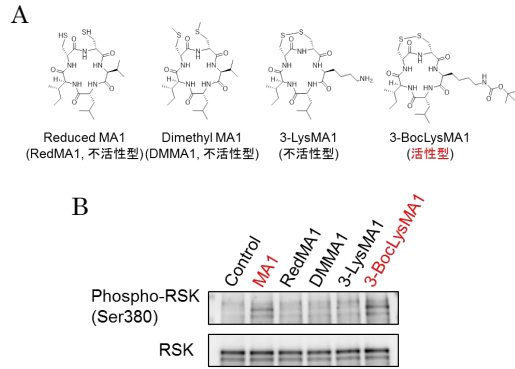


図 5 マルホルミン誘導体による RSK1 リン酸化に対する影響

A) マルホルミン誘導体。 B) マルホルミン誘導体による RSK1 のリン酸化(Ser380)に対する影響。

(4) 線溶因子に対するマルホルミンの影響

マルホルミンが誘導する RSK1 活性化に続く、線溶因子の遺伝子発現の変動を調べた結果、uPA と uPA 受容体の発現の上昇が確認された(図 6A)。また、マルホルミン処理による uPA の分泌の増加も確認された(図 6B)。

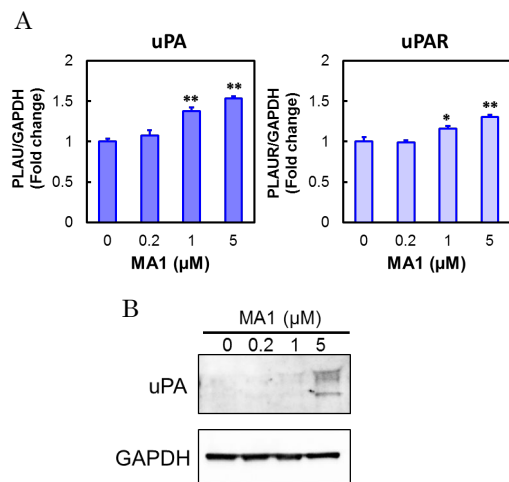


図 6 線溶因子に対するマルホルミンの影響
 A) uPA および uPA 受容体 mRNA の real-time qPCR。 B) 培養上清中へ分泌される uPA の WB。

以上の結果から、マルホルミンは RSK1 の活性化を誘導することによって、ウロキナーゼの発現上昇を引き起こし、血漿中のプラスミンを介した線溶活性の促進を誘導することが明らかとなった。

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9件)

Koizumi Y., Nagai K., Hasumi K., Kuba K., Sugiyama T. Structure-activity relationship of cyclic pentapeptide malformins as fibrinolysis enhancers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, **26**, 5267-5271, 査読有.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.09.045

Furukawa T., Fukuda T., Nagai K., Uchida R., Tomoda H. Helvafuranone produced by the fungus *Aspergillus nidulans* BF0142 isolated from hot spring-derived soil. *Nat. Prod. Commun.* 2016, **11**, 1001-1003, 査読有.

Ishijima H., Uchida R., Ohtawa M., Kondo A., Nagai K., Shima K., Nonaka K., Masuma R., Iwamoto S., Onodera H., Nagamitsu T., Tomoda H. Simplifungin and valsafungins, antifungal antibiotics of fungal origin. *J. Org. Chem.* 2016, **81**, 7373-7383, 査読有.
DOI: 10.1021/acs.joc.6b00952

Ishikawa K., Mochizuki Y., Hirayama S., Nemoto T., Nagai K., Itoh K., Fujii H. Synthesis and evaluation of novel opioid ligands with a C-homomorphinan skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, **24**, 2199-2205, 査読有.
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.03.040

Yamashita Y., Asakura M., Mitsugi R., Fujii H., Nagai K., Atsuda K., Itoh T., Fujiwara R. MicroRNA expression in the vildagliptin-treated two- and three-dimensional HepG2 cells *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2016, **31**, 201-209, 査読有.
DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.02.004

Zhou X., Koizumi Y., Zhang M., Natsui M., Koyota S., Yamada M., Kondo Y., Hamada F., Sugiyama T. Cadmium-coordinated supramolecule suppresses tumor growth of T-cell leukemia in mice. *Cancer Sci.* 2015, **106**, 635-641, 査読有.
DOI: 10.1111/cas.12651

Fukuda T., Nagai K., Kurihara Y., Kanamoto A., Tomoda H. Graphiumins, graphiumins I and J, new thiodiketopiperazines from the marine-derived fungus *Graphium* sp.

OPMF00224. *Nat. Prod. Sci.* 2015, **24**, 255-260, 査読有.
DOI: 10.20307/nps.2015.21.4.255

Fukuda T., Shinkai M., Sasaki E., Nagai K., Kurihara Y., Kanamoto A., Tomoda, H. Graphiumins, new thiodiketopiperazines from the marine-derived fungus *Graphium* sp. OPMF00224. *J. Antibiot.* 2015, **68**, 620-627, 査読有.
DOI: 10.1038/ja.2015.41

Nakashima T., Iwatsuki M., Ochiai J., Kamiya Y., Nagai K., Matsumoto A., Ishiyama A., Otoguro K., Shiomi K., Takahashi Y., Omura S. Mangromicins A and B: structure and anti-trypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* 2014, **67**, 253-260, 査読有.
DOI: 10.1038/ja.2013.129

〔学会発表〕(計1件)

2017年3月 日本農芸化学会 2017年度大会(京都)「ゲノムワイド CRISPR/Cas9 ノックアウトライブラリーを用いた細胞毒性耐性遺伝子スクリーニングの試み」小泉 幸央、福島 淳、夏井 美幸、門脇 歩美、山口 智和、今井 由美子、久場 敬司

6. 研究組織

(1)研究代表者

小泉 幸央 (KOIZUMI, Yukio)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80353465

(2)研究分担者

長井 賢一郎 (NAGAI, Kenichiro)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：30321649