

Fig. 1 Yield of  $\phi 20-32 \mu\text{m}$  cationized gelatin using a 500 mL three-necked distillation flask.

The open bar shows the control (420 rpm) group, horizontal lined bar, the 570 rpm group and closed bar, the 25,000 rpm group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The yield in the 570 rpm group was significantly higher than that in the control group (\* $p < 0.001$  vs 420 rpm).

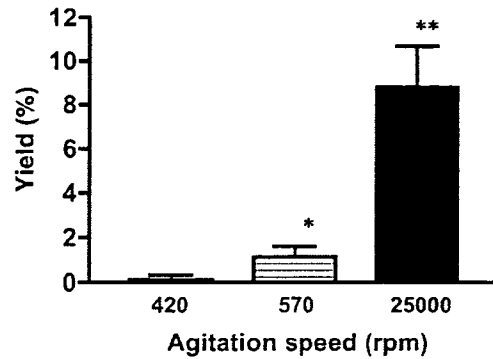


Fig. 2 Yield of  $\phi 20-32 \mu\text{m}$  cationized gelatin using a 300 mL three-necked distillation flask.

The open bar shows the 420 rpm group, horizontal lined bar, the 570 rpm group and closed bar, the 25,000 rpm group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The yield in the 570 rpm group was significantly higher than that in the 420 rpm group (\* $p < 0.001$  vs 420 rpm). The yield in the 25,000 rpm group was significantly higher than that in the other groups (\*\* $p < 0.0001$  vs other groups).

then dialyzed for 2 days with 16 changes of water. After the dialysis, this solution was freeze-dried for 4 to 7 days to afford cationized gelatin. The conversion rate of carboxyl groups to amino groups was measured by the TNBS method to characterize the product [13].

#### Microsphere production

In the conventional procedure, cationized gelatin aqueous solution and olive oil were placed in a three-necked distillation flask of 500 mL at 40°C, and centrifuged at 420 rpm for 10 minutes. This solution was stirred for 30 minutes at 0°C. Acetone was added, and the mixture was centrifuged. After centrifugation, the oil layer was removed, and acetone was added. This solution was centrifuged again, homogenized and sieved with  $\phi 20 \mu\text{m}$ ,  $\phi 32 \mu\text{m}$  and  $\phi 90 \mu\text{m}$  sieves (Test sieves, #JIS Z 8801, Tokyo Screen Co., Ltd., Japan). The microspheres were dried in a refrigerator overnight, and the yield of each fraction was determined.

In this experiment, we examined the effect of increasing the agitation speed to 570 rpm and 25000 rpm, and the effect of using a smaller three-necked distillation flask (300 mL) to obtain smoother mixing.

#### Cross-linking of cationized gelatin microspheres

Acetone and hydrochloric acid (7:3) were added to cationized gelatin microspheres, the crosslinking agent GA was added, and the reaction was allowed to proceed for 24 hours. After the reaction, centrifugation was performed and the supernatant was removed. Glycine solution (100 mM) was added to remove GA for one hour. After centrifugation, the supernatant was removed and cross-linked microspheres were cooled with liquid nitrogen, freeze-dried, and weighed.

#### Gene introduction with the newly developed cationized gelatin microspheres

Gene gelatin complex was prepared by mixing 2 mg

of cationized gelatin and 50  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  gene (GFP or luciferase). The complex was incubated with rat peritoneal macrophages for 14 days. Effective gene introduction was demonstrated by cellular expression of GFP or luciferase.

## RESULTS

#### Effect of agitation conditions on yield of cationized gelatin

In the conventional method (500 mL/420 rpm), the yield of the  $\phi 20-32 \mu\text{m}$  cationized gelatin was  $0.13 \pm 0.02\%$ , but when the agitation speed was increased to 570 rpm, the yield rose to  $1.22 \pm 0.52\%$  (\* $p < 0.001$  vs 420 rpm). The yield was further increased to  $2.30 \pm 0.47\%$  by increasing the agitation speed to 25000 rpm from 570 rpm, but this further increase was not statistically significant ( $p=0.136$ ) (Fig. 1). Next we used a smaller (300 mL) three-necked distillation flask with agitation at 420 rpm, 570 rpm and 25,000 rpm. When the agitation speed was increased to 570 rpm, the yield rose to  $1.12 \pm 0.49\%$  from  $0.11 \pm 0.01\%$  (\* $p < 0.001$  vs 420 rpm). The yield was markedly increased to  $8.80 \pm 1.90\%$  by increasing the agitation speed to 25,000 rpm from 570 rpm (\*\* $p < 0.0001$  vs 420 or 570 rpm) (Fig. 2).

The yields of different-sized microsphere fractions are summarized in Table 1. The use of the highest agitation speed and the smaller flask allowed us to obtain cationized gelatin microspheres of less than  $\phi 20 \mu\text{m}$ , which we had not been able to prepare with the conventional method, in addition to increasing the total yield of the cationized gelatin microspheres.

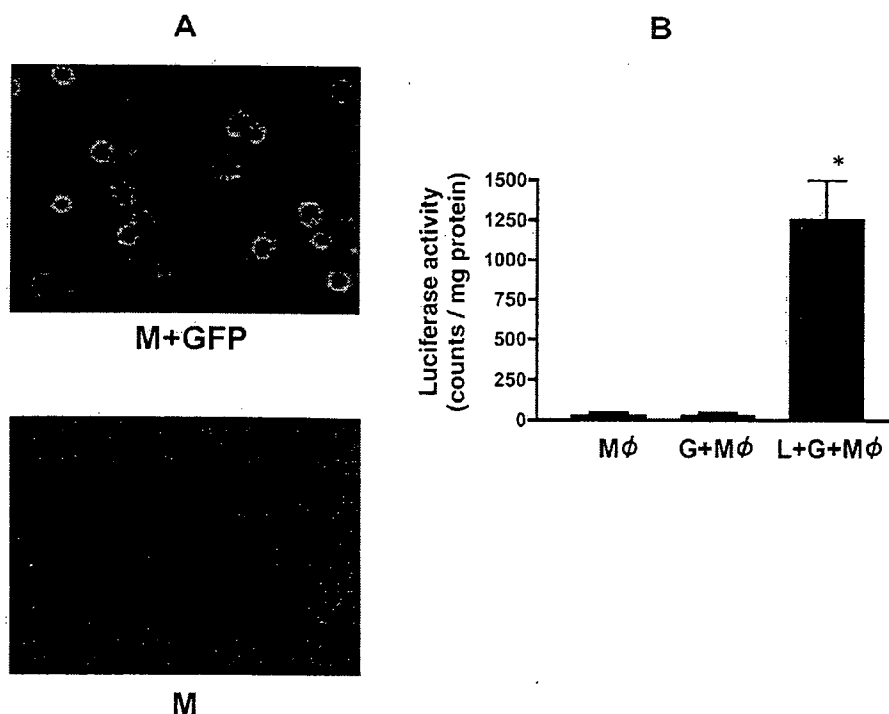
#### Gene introduction with the new cationized gelatin

We examined the efficiency of the new, smaller-sized cationized microspheres for gene introduction into rat peritoneal macrophages. As shown in Figure 3A, after coincubation of the macrophages and GFP

**Table 1** Yields of different-sized cationized gelatines (%).

Flask size (mL) / Agitation speed (rpm)	$> \phi 20 \mu\text{m}$	$\phi 20\text{-}32 \mu\text{m}$	$\phi 32\text{-}90 \mu\text{m}$	$\phi 90 \mu\text{m} >$
500/420	0	$0.13 \pm 0.02$	$15.1 \pm 3.21$	$14.0 \pm 5.30$
500/570	0	$1.22 \pm 0.52^*$	$13.2 \pm 3.52$	$14.1 \pm 6.13$
500/25000	0	$2.30 \pm 0.47$	$17.2 \pm 4.10$	$7.23 \pm 1.60$
300/420	0	$0.11 \pm 0.01$	$19.1 \pm 5.32$	$17.4 \pm 7.12$
300/570	0	$1.12 \pm 0.49^{**}$	$22.1 \pm 7.62$	$11.3 \pm 2.52$
300/25000	$2.12 \pm 0.21$	$8.80 \pm 1.90^{***}$	$32.2 \pm 11.0$	$9.10 \pm 2.10$

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.001$  vs 500/420, \*\*  $p < 0.001$  vs 300/420  
 \*\*\*  $p < 0.0001$  vs 300/420 or 300/570

**Fig. 3** Gene introduction into rat peritoneal macrophages with cationized gelatin.

A. Upper column: Peritoneal macrophages were coincubated with GFP gene-cationized gelatin complex (M + GFP) for 14 days. GFP was expressed in the cytoplasm of the macrophages. Lower column: Peritoneal macrophages were coincubated with cationized gelatin complex (M) for 14 days. GFP was not expressed in the macrophages.

B. Luciferase activity. Peritoneal macrophages were coincubated with luciferase gene-cationized gelatin complex (L + G + M $\phi$ , closed bar) or with cationized gelatin (G + M $\phi$ , horizontal lined bar) or with no additive (M $\phi$ , open bar) for 14 days. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The luciferase activity of L+G+M $\phi$  was significantly higher than that of M $\phi$  or G+M $\phi$  (\*  $p < 0.01$ ).

gene-cationized gelatin complex, the cells expressed GFP. Coincubation of the macrophages and cationized gelatin alone did not result in expression of GFP. As shown in Figure 3B, after coincubation of the macrophages and luciferase gene-cationized gelatin complex, the cells expressed luciferase activity of  $1251 \pm 257$  (counts/mg protein) on day 14, while the activity in the control group, in which macrophages were cultured alone, was only  $5 \pm 2$  (counts/mg protein) (\* $p < 0.01$ ). The luciferase activity was  $8 \pm 2$  (count/mg protein) in the macrophage + cationized gelatin group.

## DISCUSSION

In this study, we showed that the yield of cationized gelatin microspheres of  $\phi 20\text{-}32 \mu\text{m}$  increased with increasing agitation speed and with the use of a smaller three-necked flask for the agitation of cationized gelatin with olive oil. In addition, cationized gelatin microspheres smaller than  $\phi 20 \mu\text{m}$  could be prepared for the first time with the highest agitation speed and the smaller flask.

In the conventional method, 30% of cationized

gelatin finally formed microspheres, but almost all were larger than  $\phi 32 \mu\text{m}$  [9]. Gene introduction with cationized gelatin microspheres involves cellular phagocytic activity, which is inefficient for particles as large as  $\phi 30 \mu\text{m}$  [6]. By using a speed as high as 25,000 rpm and a smaller flask (300 mL), we were able to increase the yield of cationized gelatin microspheres of  $\phi 20\text{-}32 \mu\text{m}$  to 8.80%. Furthermore, we could manufacture cationized gelatin microspheres smaller than  $\phi 20 \mu\text{m}$ , which could not be obtained by the conventional method, in a yield of 2.12%.

Gedanken *et al.* succeeded in the production of nanoparticles from various chemicals by using ultrasonic irradiation [10]. However, when we used an ultrasonic homogenizer for agitating cationized gelatin and olive oil, the yield decreased to 1.30%.

We previously showed that our gelatin microsphere-gene complexes were introduced into cells by phagocytosis. Since the efficiency of cellular phagocytotic activity is greater for smaller particles, the development of smaller-sized cationized gelatin microspheres is expected to increase the efficiency of gene introduction via phagocytosis. Further, Kaul *et al.* showed that gene introduction into fibroblasts, which exhibit endocytosis but not phagocytosis, was possible by using nanoparticles of polyethylene glycol [11]. Therefore, if our method can be extended to obtain cationized gelatin microspheres in the nano size range, the variety of cells to which they would be applicable may be considerably extended. It is still the case that a gene introduction method with adequate safety and efficiency for clinical application is not yet available [12]. The ingredient, gelatin, used in this study is already in clinical use, and is considered to be safe. Cationized gelatin microspheres cannot be used to introduce genes into all types of cells, and the efficiency of gene introduction is lower than that of viral vectors. However, the use of cationized gelatin microspheres to introduce a gene into endothelial progenitor cells did have an apparent and prolonged therapeutic effect [5, 6]. The smaller cationized gelatin microspheres developed in this study may provide increased efficiency of gene introduction into various cells.

In conclusion, we have improved the preparation of cationized gelatin microspheres for gene transduction, obtaining a greater yield, as well as smaller microspheres, which may have clinical potential.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from Tokai University School of Medicine Research Aid in 2004 and 2005, the research and study program of Tokai University Educational System General Research

Organization and Kanagawa Nanbyou foundation in 2004, as well as a Grant-in-Aid for Scientific Research in 2003 (No. 15659285) and 2005 (No. 17659375) from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan and Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Human Genome, Tissue Engineering Food Biotechnology in 2003 (H15-saisei-003). Health and Labour Sciences Research Grants for comprehensive Research on Cardiovascular Diseases in 2004 (H16-*kyunkannki*(seishuu)-009).

#### REFERENCES

- 1) Pfeifer A, Verma IM.: Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 177-211, 2001.
- 2) Kay MA, Glorioso JC, Naldini L.: Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7: 33-40, 2001.
- 3) Ferber D.: Gene therapy. Safer and virus-free? *Science* 294: 1638-42, 2001.
- 4) Schakowski F, Buttgerit P, Mazur M, Marten A, Schotker B, Gorschhuter M, Schmidt-Wolf IG.: Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. *Genet Vaccines Ther* 2: 1, 2004.
- 5) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N, Sato E, Sakamoto H, Tabata Y, Ando K, Iseki H, Shinozaki Y, Kimura K, Kuwabara E, Koide S, Nakazawa H, Mori H.: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 41: 1056-62, 2003.
- 6) Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H.: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 108: 889-95, 2003.
- 7) Cascone MG, Lazzeri L, Carmignani C, Zhu Z.: Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *J Mater Sci Mater Med* 13: 523-6, 2002.
- 8) Kittlick PD, Engelmann D.: The glycosaminoglycans in cultures of stimulated rat peritoneal macrophages. 2. Gel chromatographic studies and the behaviour of heparan sulfate. *Exp Toxicol Pathol* 45: 87-92, 1993.
- 9) Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y.: Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J Control Release* 80: 333-43, 2002.
- 10) Gedanken A.: Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrason Sonochem* 11: 47-55, 2004.
- 11) Kaul G, Amiji M.: Cellular interactions and in vitro DNA transfection studies with poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles. *J Pharm Sci* 94: 184-198, 2004.
- 12) Tomanin R, Scarpa M.: Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther* 4: 357-72, 2004.
- 13) Rabinovich-Guilat L, Couvreur P, Lambert G, Goldstein D, Benita S, Dubernet C.: Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. *Chem Phys Lipids* 131: 1-13, 2004.

## Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse

Takako GOTO<sup>\*1</sup>, Naoto FUKUYAMA<sup>\*2</sup>, Akira AKI<sup>\*1</sup>, Kazuo KANABUCHI<sup>\*1</sup>, Koji KIMURA<sup>\*1</sup>,  
Hiroyuki TAIRA<sup>\*1</sup>, Etsuro TANAKA<sup>\*3</sup>, Noriaki WAKANA<sup>\*3</sup>, Hidezo MORI<sup>\*4</sup> and Hiroshi INOUE<sup>\*1</sup>

*Departments of <sup>\*1</sup>Surgery and <sup>\*2</sup>Physiology, Tokai University School of Medicine*

*<sup>\*3</sup>Department of Nutritional Sciences, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan*

*<sup>\*4</sup>Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan*

(Received June 26, 2006; Accepted July 19, 2006)

**Objective:** Stable animal models for refractory peripheral arterial disease are not established. A standardized animal model of hind-limb ischemia is required upon searching effective treatment for this condition. The aim of the study is to verify previously used hind-limb ischemia models to find a standard method.

**Methods:** Using Balb/ca mice six various methods of inducing hind-limb ischemia were applied and two weeks after operation degree of ischemic damage were examined. Six methods include V group, A group, AV group, A-strip group, AV-strip group and Prox-A group (refer the text).

**Results:** Degree of ischemia was evaluated macroscopically by judging toes, foot, knee, and total hind-limb necrosis. We found that severity of damage was markedly different among different methods. Furthermore the severity of necrosis was not uniform even in the same method group.

**Conclusions:** The A-strip group in which the femoral artery from the bifurcation of the deep femoral artery to the saphenous artery was stripped appears to be suitable as a stable severe ischemia model. The A group in which the femoral artery were cut just below the bifurcation of the deep femoral artery appears to be suitable as a chronic mild ischemia model.

**Key words:** angiogenesis, animal model, blood vessels, femoral artery, hind-limb ischemia

### INTRODUCTION

Refractory peripheral arterial disease is becoming an important therapeutic target since its incidence has been markedly increasing due to the increase in aged population and patients with diabetes mellitus. Consequently various therapeutic approaches including angiogenic treatment with growth factors or cell transplantation have been attempted using mouse hind-limb ischemia models [1-4]. Scrutinizing these studies we found that experimental methods to create hind-limb ischemia are not standardized. Method of occluding artery varies from ligation, or cutting, to excision of the artery. The targeted artery varies also from the iliac artery [1], the femoral artery [2-4], or the femoral with saphenous artery [5-9]. In some cases, both the femoral artery and vein were occluded. Strangling of the thigh itself was attempted in some studies [10, 11]. As the severity of ischemic damage cannot be uniform in different experimental methods, the comparison of effect among various therapies becomes very difficult.

Another important problem in previously used animal models is lack of data on blood flow when hind-limb is lost. In case of severe ischemic damage in mouse necrosis and loss of hind-limb often occur within three days but in patients of peripheral artery disease ischemia is chronic and acute necrosis is seldom seen. In these patients the improvement of blood flow is one of the key indices in determining effective treatments. Therefore it is mandatory to have an animal model in which chronic hind-limb ischemia

is present but necrosis seldom occurs and sequential evaluation of blood flows is possible in order to evaluate various therapies.

In the present study, firstly we examined six methods for inducing hind-limb ischemia in Balb/ca mice and evaluated the severity of ischemic change to search for a stable severe ischemia model. Secondly we selected three methods with mild ischemic changes among six methods which do not produce severe necrosis and examined degree of ischemia by measuring CPK release, muscle weight, and histological changes to find an appropriate mild ischemia model.

### MATERIALS AND METHODS

#### Animals

Seventy-five male Balb/ca mice (12 weeks old, 20 to 30 g, Japan Clea Inc, Ishibe) were used. All operations and measurements were performed under general anesthesia (1.0 to 1.5% isoflurane, 60% dinitrous monoxide, and 40% oxygen). The operation was performed, by only one investigator (T.G.), under a microscope (Konan Operation Microscope 707, Konan Keeler Co. LTD, Japan). To create ischemia, the vessels were cut or resected after ligation of the stumps with sterilized 6-0 silk suture (Azwel Inc, Osaka). The investigation conforms with The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

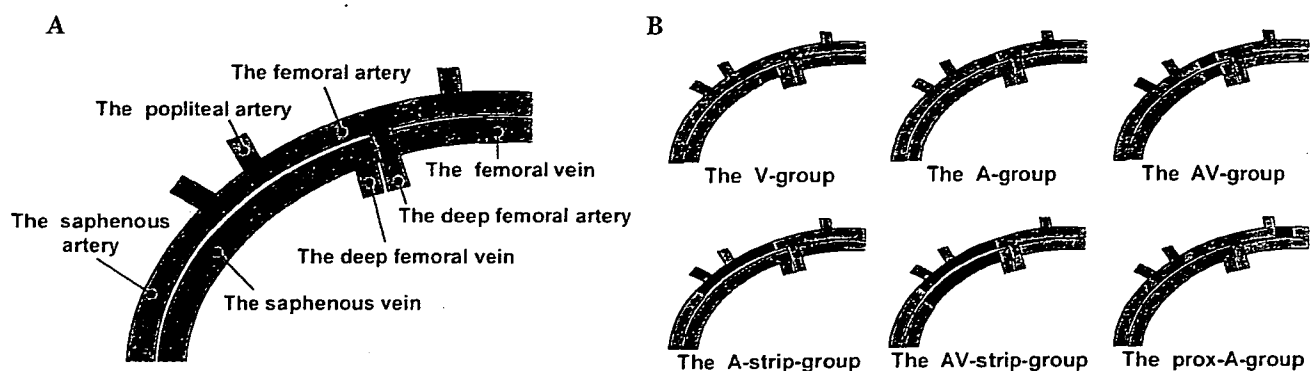


Fig. 1 (A) Schematic illustration of vascular anatomy in the mouse lower limb. (B) Schematic illustrations of surgical procedures in the six groups. The black bar indicates the cut or stripped sites of the vessels.

## EXPERIMENTAL PROTOCOLS

### 1. The six hind limb ischemia models (n = 60)

The following six types of ischemia were created in the right lower limbs of 60 mice (schematic illustrations are presented in Fig. 1). These included, (1) cutting the femoral vein at the distal site of the bifurcation of the deep femoral vein (V-group, n = 10), (2) cutting the femoral artery just below the bifurcation of the deep femoral artery (A-group, n = 10), (3) cutting both the femoral artery and vein (AV-group, n = 10), (4) resection of the femoral artery from the distal site of the bifurcation of the deep femoral artery to the saphenous artery (A-strip-group, n = 10). By dissecting the femoral artery as was shown in the Fig. 1B, branches including the popliteal artery were also obstructed and retrograde flows from these branches were completely avoidable. (5) resecting both the femoral artery and vein from the distal site of the bifurcation of the deep femoral artery to the saphenous artery (AV-strip-group, n = 10), and (6) cutting the femoral artery at the proximal site of the bifurcation of the deep femoral artery (Prox-A-group, n = 10).

### 2. Macroscopic evaluation of ischemic severity

Two weeks after the operation, the ischemic limb was macroscopically evaluated by using graded morphological scales for necrotic area; grade 0: absence of necrosis, grade I: necrosis limiting to toes (toes loss), grade II: necrosis extending to a dorsum pedis (foot loss), grade III: necrosis extending to a crus (knee loss), grade IV: necrosis extending to a thigh (total hind-limb loss).

### 3. Blood flow measurement

Calf blood flows on both sides were measured below a patella with a noncontact laser Doppler flowmeter (FLO-N1, Omegawave Corporation, Tokyo) before the operation, just after the operation, and two weeks post operatively, and were expressed as the ratio of the flow in the ischemic limb to that in the normal limb.

### 4. CPK release, muscle weights and histological evaluation in three mild ischemia groups

In additional mice of V-, A-, and AV-groups (n = 5 each) blood samples were obtained from the

Table 1 Degree of Ischemic Damage in 6 Groups.

Group	Grade				
	0	I	II	III	IV
V group	10				
A group	7	3			
AV group	5	5			
A-strip-group	1	9			
AV-strip-group		6	3	1	
Prox-A-group		3			7

0: no change, I: toes necrosis, II: foot necrosis, III: knee necrosis, IV: total necrosis

orbital plexus before the operation and 1, 2, and 7 days thereafter and concentrations of creatine phosphokinase (CPK) were measured. At two weeks after the operation, the animals were sacrificed under an overdose of sodium pentobarbital and the anterotibial, gastrocnemius, and soleus muscles were dissected out and weighed. Histological analysis (HE staining) was performed in each muscle [12].

## RESULTS

### 1) Severity of ischemic change in the six groups

Two weeks after the operation necrotic changes were macroscopically evaluated (Table 1). In the V-group, no macroscopic change was observed throughout the experimental period. In other 5 groups tissue necrosis appeared at either toes, dorsum pedis, crus or thigh. The position of necrosis was not uniform even in one group. Loss of total hind-limb was observed only in the Prox-A-group (7/10 mice). The order of necrosis severity among groups were Prox-A-group, AV-strip-group, A-strip-group, AV-group and A-group. The necrosis occurred as early as three days after the operation when it happens.

### 2) Changes in calf blood flow in the six groups

Just after the operation, calf blood flows were decreased to 30-35% of the pre-operative value without significant differences among the six groups except for the V-group (V-group:  $98.5 \pm 1.7$ , A-group:  $34.1 \pm 12.8$ , AV-group,  $34.4 \pm 9.9$ , A-strip-group:  $31.4 \pm 3.6$ , AV-strip-group:  $32.9 \pm 5.0$  and Prox-A-group:  $31.3 \pm$

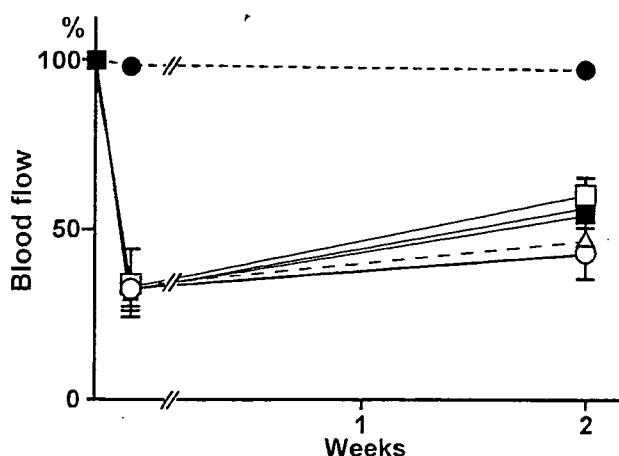


Fig. 2 Blood flow changes in 6 groups. Blood flow is expressed as a ratio of that in the ischemic limb to that in the opposite limb. V-group: closed circles, A-group: open circles, AV-group: open triangles, A-strip-group: closed triangles, AV-strip group: open squares, Prox-A-group: closed squares. Measurement of blood flows was available only in intact hind-limb or in stable data in case of toes necrosis.

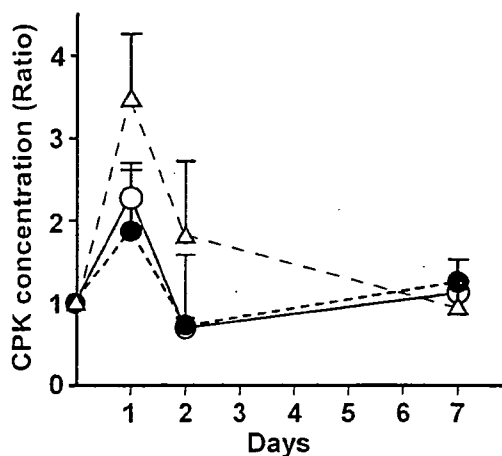


Fig. 3 Concentrations of serum creatine phosphokinase (CPK) in three groups. The concentration is expressed as the value relative to that before the operation. V-group: closed circles, A-group: open circles, AV-group: open triangles.

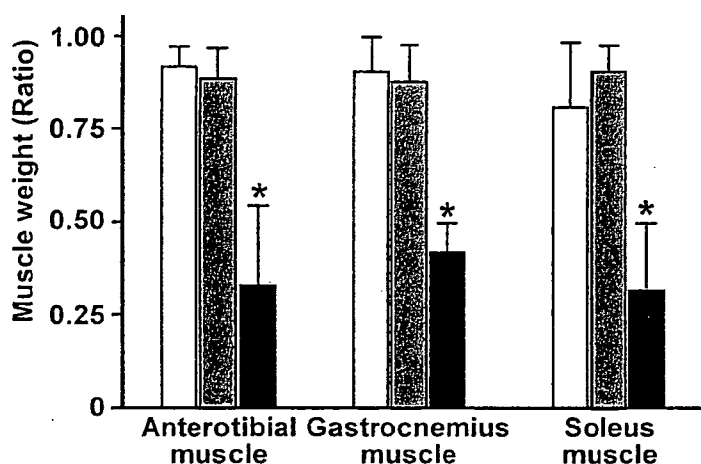


Fig. 4 Muscle weights in the ischemic limb at 14 days after the operation. The weights of the three muscles are expressed as the value relative to those of the same muscles in the opposite limb. V-group: open bar, A-group: grey bar, AV-group: black bar. ( $p < 0.05$  vs A- and V-groups, ANOVA).

6.5%, respectively, Fig. 2). Two weeks after the operation, calf blood flows had recovered to 45-55% of the pre-operative value (V-group:  $97.8 \pm 1.2$ , A-group:  $44.7 \pm 8.9$ , AV-group,  $48.0 \pm 9.0$ , A-strip-group:  $54.0 \pm 6.2$ , AV-strip-group:  $57.0 \pm 7.3$  and Prox-A-group:  $59.8 \pm 5.1$ , respectively). The blood flow measurement was applicable only in mice in which calf was well preserved. We found difficulty to obtain stable calf blood flow in some mice with toes necrosis even though their calf was preserved and unstable measurements were omitted. Namely blood flow could be measured in 10 mice in the V group, 10 mice in the A group, 8 mice in the AV-group, 8 mice in the A-strip-group, 7 mice in the AV-strip-group, 3 mice in the Prox-A-group. At two weeks there were no significant differences among the six groups except for the V-group.

### 3) CPK release, muscle weights and histological evaluation in three mild ischemia groups

As we found that ischemic changes were too severe in A-strips, AV-strip and Prox-A-groups, we selected

V-, A- and AV-groups as mild ischemia models. Blood CPK concentrations were significantly elevated one day after the operation in V-, A- and AV-groups ( $p < 0.05$  vs pre-operation, ANOVA, Fig. 3). Two days after the operation, CPK values had returned to baseline in the A- and V-groups but were still high in the AV-group ( $p < 0.05$  vs pre-operation, ANOVA). Seven days after the operation, CPK values had returned to baseline in all groups.

Two weeks after the operation, weight loss in the calf muscles was observed only in the AV-group. The values relative to those of the same muscles in the opposite limb were anterotibial:  $0.32 \pm 0.22$ , gastrocnemius:  $0.42 \pm 0.08$ , and soleus muscles:  $0.32 \pm 1.8$  (Fig. 4). HE staining of the gastrocnemius muscle in the V-group disclosed that there was not obvious changes in the V-group compared with that in the normal limb (Figs. 5A and B). On the other hand, in the A- and AV-groups, microscopic features of necrotic changes such as cell size inhomogeneity, cellular wall degeneration, denucleation, and edema were observed (Figs. 5C

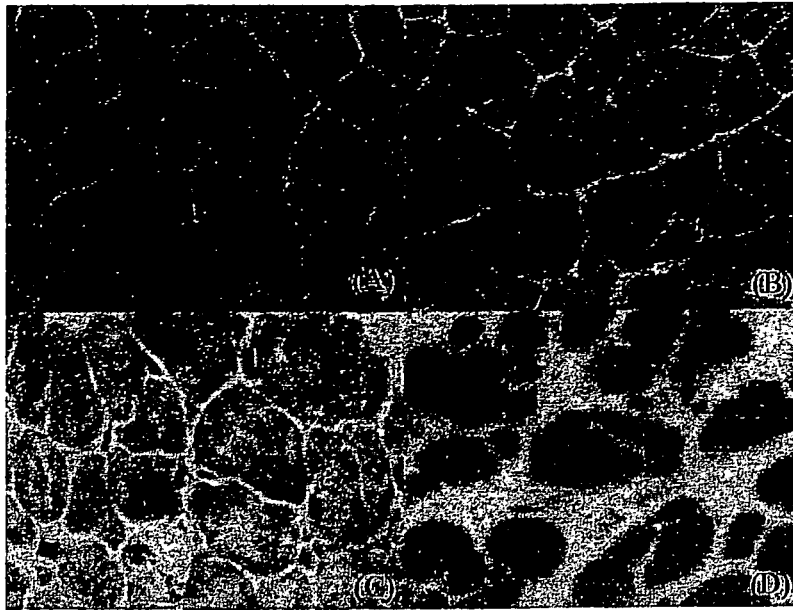


Fig. 5 There was not obvious changes in the V-group compared with that in the normal limb. In the A- and AV-groups, microscopic features of necrotic changes such as cell size inhomogeneity, cellular wall degeneration, denudation, and edema were observed.

and D). These changes were more severe in the AV-group than in the A-group.

#### DISCUSSION

The mouse hind-limb has a well-developed innate collateral system and is shown to have remarkably high resistance to ischemia, e.g., a simple ligation of the femoral artery is known to produce no severe ischemic change [1]. This is because the hind-limb would be nourished by collateral circulation via the deep femoral artery and other branches (Fig. 1). As was shown in the Fig. 1A, there are several small branches including the popliteal artery and simple ligation of the femoral artery (A-group) results in obstruction of forward flow, but collateral flows via the deep femoral artery from these branches can retrogradely enter the distal portion of the femoral artery. In contrast, when the site of ligation is proximal, the deep femoral arterial flow will be also interrupted. Similarly in the A-strip group collateral flows from branches cannot enter the distal portion of the femoral artery. When site of ligation is proximal or includes several branches, collateral flow reduces and ischemic change becomes severe. However degree of ischemic damage would not be the same even in the site of ligation because richness and course of collateral vessels differ markedly among individual animals.

As was expected, this study revealed that the degree of ischemic damage varies markedly in six models of mouse hind-limb ischemia. Another important finding of this study is that even in the one model the ischemic damages were not uniform ranging from toes necrosis to knee necrosis as such in the AV-strip-group or from toes necrosis to total hind-limb necrosis in the Prox-A-group (Table 1). Only the A-strip-group showed relatively uniform ischemic damage: 9 toes necrosis and

one no change.

On examining effect of various therapies including angiogenic treatments with growth factors or cell transplantation we have to use stable and uniform ischemic damage model, but previous studies used various degree of ischemic damage [1-9]. In this study we showed that A-strip method appears to be most appropriate as a mild ischemia model. The Prox-A method can be utilized when very severe ischemic damage model is necessary.

Regarding mild ischemia model simple ligation of the vein without treatment of the artery (V-group in protocol 2, Fig. 5B) produced only very weak edematous change and this is not an ischemic model. However, obstruction of venous return appears to have additional effects because damage became more serious in the AV-group than that in the A-group (Table 1 and Fig. 5). For example, edematous changes were seen by the histological analysis in the AV-group, and the AV-group showed muscle weight reduction in all anterotibial, gastrocnemius and soleus muscles (Fig. 5). Since venous obstruction is not associated with peripheral arterial disease, pathology under AV-group cannot be consistent with patients suffering from peripheral arterial disease. Although blood flow measurements were possible in both A- and AV-groups, severity of ischemic damage was relatively stable in the A-group, which resembles to the degree of ischemia seen in patients (7 mice showed no necrosis and three had toes necrosis). Taken together, the A-group appears to be the most suitable as a chronic mild ischemia model.

In conclusion, the relatively severe stable ischemia model is created by stripping the femoral artery from the distal site of the bifurcation of the deep femoral artery to the saphenous artery and the mild ischemic model should be made by cutting the femoral artery

just below the bifurcation of the deep femoral artery.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Ms. Y Shinozaki for technical assistance. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (15390066, 15659285, 16790761) from the MECSST; The Science Frontier Program of MECSST; Industrial Technology Research Grant Program in '03 from NEDO of Japan; The Research Grants for Cardiovascular Disease (H16C-6), Health and Labour Sciences Research Grants (nano-001, genome-005 and Saisei-003) from the MHLW; the Promotion Fundamental Studies in Health Science of the OPSR, Japan; Tokyo University of Agriculture Soken-Project Research Aid.

#### REFERENCES

- 1) Skjeldal S, Groggaard B, Reikeras O, Muller C, Torvik A, and Svindland A. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res* 1991; 23: 355-365.
- 2) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, *et al*: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3422-3427.
- 3) Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, *et al*: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002; 105: 732-738.
- 4) Milia AF, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Madeddu P, Trevisani M, *et al*: Protease-activated receptor-2 stimulates angiogenesis and accelerates hemodynamic recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ Res* 2002; 91: 346-352.
- 5) Chatterjee BD and Chakraborti CK: Ischaemic mouse thigh model for evaluation of pathogenicity of non- clostridial anaerobes. *Indian J Med Res* 1989; 89: 36-39.
- 6) Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, *et al*: Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101: 2567-2578.
- 7) Kanno S, Oda N, Abe M, Saito S, Hori K, Handa Y, *et al*: Establishment of a simple and practical procedure applicable to therapeutic angiogenesis. *Circulation* 1999; 99: 2682-2687.
- 8) Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, *et al*: Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 1999; 154: 355-363.
- 9) Byun J, Heard JM, Huh JE, Park SJ, Jung EA, Jeong JO, *et al*: Efficient expression of the vascular endothelial growth factor gene in vitro and in vivo, using an adeno-associated virus vector. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 295-305.
- 10) Wiersema AM, Oyen WJ, Dirksen R, Verhofstad AA, Corstens FH, and van der Vliet JA: Early assessment of skeletal muscle damage after ischaemia-reperfusion injury using Tc-99m-glucarate. *Cardiovasc Surg* 2000: 186-191.
- 11) Messina LM, Brevetti LS, Chang DS, Paek R, and Sarkar R: Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: invited commentary. *J Control Release* 2002; 78: 285-294.
- 12) Kuwabara E, Furuyama F, Ito K, Tanaka E, Hattan N, Fujikura H, *et al*: Inhomogeneous vasodilatory responses of rat tail arteries to heat stress: evaluation by synchrotron radiation microangiography. *Jpn J Physiol* 2002; 52: 403-408.
- 13) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N, Sato E, Sakamoto H, Tabata Y, *et al*: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1056-1062.



# 特発性心筋症の原因解明と治療法開発に向けた構造生物学的アプローチ

Structural biological approaches for idiopathic cardiomyopathy

盛 英三 武田壮一 五十嵐智子 柴田洋之

Hidezo MORI, Soichi TAKEDA, Tomoko IGARASHI and Hiroyuki SHIBATA

国立循環器病センター研究所心臓生理部

◎肥大型心筋症と一部の拡張型心筋症にはサルコメア(筋節)構成蛋白の遺伝子異常が多く認められる。βミオシン重鎖に次いで、トロポニンT(全体の約15%)に高頻度である。近年、放射光を用いたX線回折法により原子レベルの解像度で、ヒト心筋トロポニンのコアドメインの構造が決定された。収縮調節の詳細な機構解明の端緒となるとともに、構造に基づく創薬から特異的な治療法の開発も期待できる。本稿では、心筋トロポニンの構造から期待される心筋症の病因の解明と治療法の開発の可能性について述べてみたい。合わせて、構造に基づく創薬の成功例についても概説する。



Key word : 構造生物学, 構造に基づく薬剤設計, 特発性心筋症, テーラーメイド医療

肥大型心筋症は常染色体性優性遺伝の形式で伝搬する家族性発症の疾患として知られている。筋原線維の収縮単位であるサルコメア(筋節)構成蛋白の遺伝子異常が多く、βミオシン重鎖に次いでトロポニンTに高頻度の遺伝子異常(全体の約15%)が認められる。一部の拡張型心筋症にも筋節構成蛋白の遺伝子異常が認められる。近年、放射光を用いたX線回折法の発達により、原子レベルの解像度で蛋白結晶の構造を決定できるようになった。この方法によりヒト心筋トロポニンのコアドメインの構造が決定され、収縮調節の詳細な機構解明の端緒が得られつつある<sup>1)</sup>。

本稿では心筋トロポニンの構造から、将来の心筋症の病因の解明と治療法の開発の可能性について述べてみたい。

## ヒト心筋トロポニンの構造と収縮調節機構

心筋収縮を調節する心筋トロポニンの中核部分(コアドメイン)の構造は、武田と理化学研究所の

前田らによって解析された<sup>1)</sup>。これに基づき、トロポニンの筋収縮調節メカニズムについて以下に述べる<sup>2)</sup>。

筋収縮はアクチンとミオシンの滑り運動による。アクチンフィラメントはアクチン、トロポニン、トロポミオシンを含む複合体であり、それらの3分子は7:1:1の存在比をもつ。トロポニンの存在下でアクチンとミオシンはカルシウムイオン濃度に応じた収縮と弛緩を行う。

図1-Aに心筋トロポニンのコアドメインの構造を示す。トロポニンはTnC(図中赤色)、TnI(図中青色)、TnT(図中黄色)とよばれる3つのポリペプチド鎖からなる。これまでの研究により、TnIは収縮抑制因子、TnCは脱抑制因子、TnTはTnCの脱抑制を弱める因子(カルシウム濃度依存性の付加因子)であることが示されている<sup>3)</sup>。

トロポニンのコアドメインは機能的に調節頭部とITアームの2つのサブドメインに分かれる。調節頭部はカルシウムイオンとの結合を通じて、

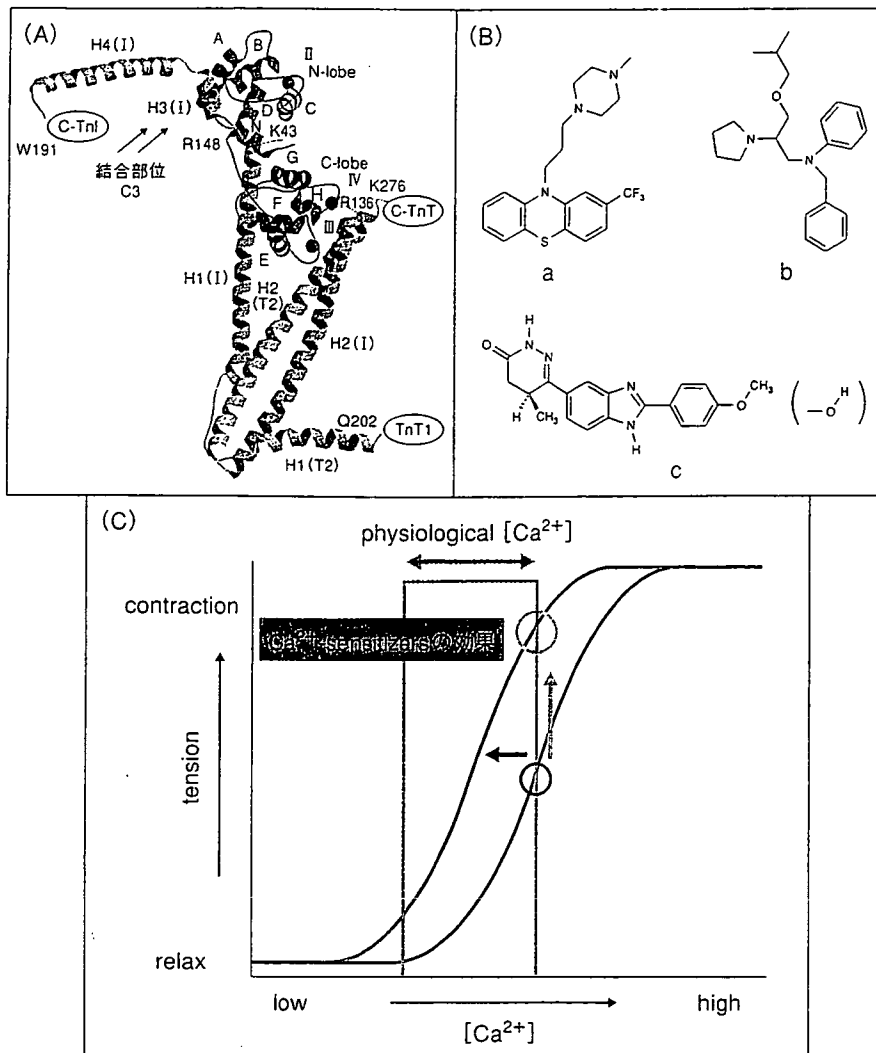


図 1 トロポニンコアダメインの構造とカルシウムセンシタイザー  
(文献<sup>1)</sup>より改変)  
A: トロポニンコアダメインの構造, B: カルシウムセンシタイザー, C: 薬剤によるカルシウム感受性の亢進.

トロポニンの構造変化とそれに基づくアクチンとミオシンの滑り運動に対するスイッチの役割を果たす。IT アームは剛性を有するコイルドコイル構造からなる。TnC は N 末端側と C 末端側の 2 つの球状部が  $\alpha$  ヘリックスで連結された構造をもつ。カルシウム濃度にかかわらず C 末端側球状部は TnI に結合し、TnC をトロポニン分子内に常につなぎとめている。一方、TnC の N 末端側球状部は、細胞内カルシウム濃度が上昇した場合のみ構造が開き、TnI の両親媒性  $\alpha$  ヘリックス (H3) を結合する (図中結合部位)。これにより TnI の調節領域 (トロポミオシンをアクチンに結びつけている部分) 全体 (H3, H4 から C-TnI までを指す) がトロポミオシン/アクチンより解離し、アクチンとミ

オシンの滑り運動がはじまる。

肥大型心筋症 (図 2-A 左側) ではトロポニンの遺伝子変異によりカルシウム感受性が亢進することが発病に関連する可能性が示唆されている。同患者の遺伝子解析によると約 15% の患者に TnT の遺伝子変異が認められる。大槻ら<sup>3)</sup>によれば、トロポニンがアクチン/トロポミオシンと直接接触する部分 (TnT1, C-TnT, TnI 調節領域) に変異が多く認められ、コアダメインには変異は少ないという (図 2-B)。変異 TnT の交換導入を行った心筋スキンドファイバーを用いた研究で、カルシウムイオン濃度-張力関係の左方シフト、すなわちカルシウム感受性の亢進が認められた (図 2-C 赤色のグラフ)。この結果から TnT などのサルコメア蛋

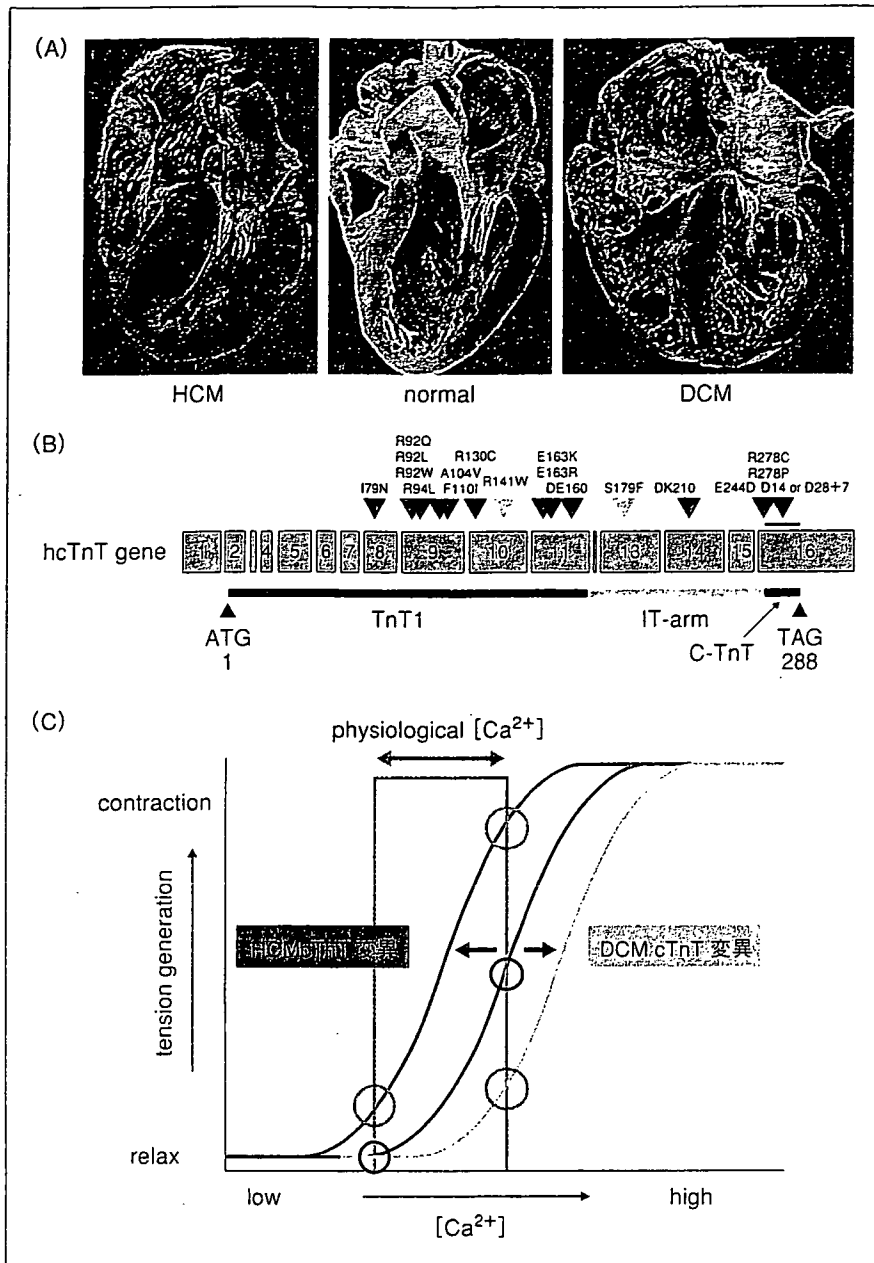


図 2 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋カルシウム感受性  
心筋症の遺伝子変異は TnT1, c-TnT に多く、肥大型ではカルシウム感受性の亢進、拡張型では低下を引き起こす。

白の部分変異によりカルシウム感受性が亢進し、収縮増加と弛緩不全という肥大型心筋症に特有の症状が発症するという有力な仮説が生まれる。TnT の変異によるカルシウム感受性亢進のメカニズムを原子構造で解明することができれば、肥大型心筋症を特異的に治療する薬剤の設計が期待できる。原因となる遺伝子変異ごとに異なる構造の薬剤を設計し、各病型に特異的な治療が可能となる。このような心筋トロポニンの変異に基づく肥大型心筋症の治療法の開発はテーラーメイド医療

のモデルケースとなる可能性がある。

カルシウム感受性の調節は TnC を介して調節することも可能である。TnC の N 末端側球状部にカルシウムセンシタイザー(図 1-B)が結合すると同球状部は開いた構造をとり、TnI の両親媒性  $\alpha$  ヘリックス(H3)が結合しやすくなる(図 1-A 赤のドメイン)。すなわち、TnC による TnI の脱抑制が起こりやすくなる。前述のように TnT は TnC の脱抑制作用にカルシウム濃度依存性を付加することができるので、TnC と TnT の制御を組み

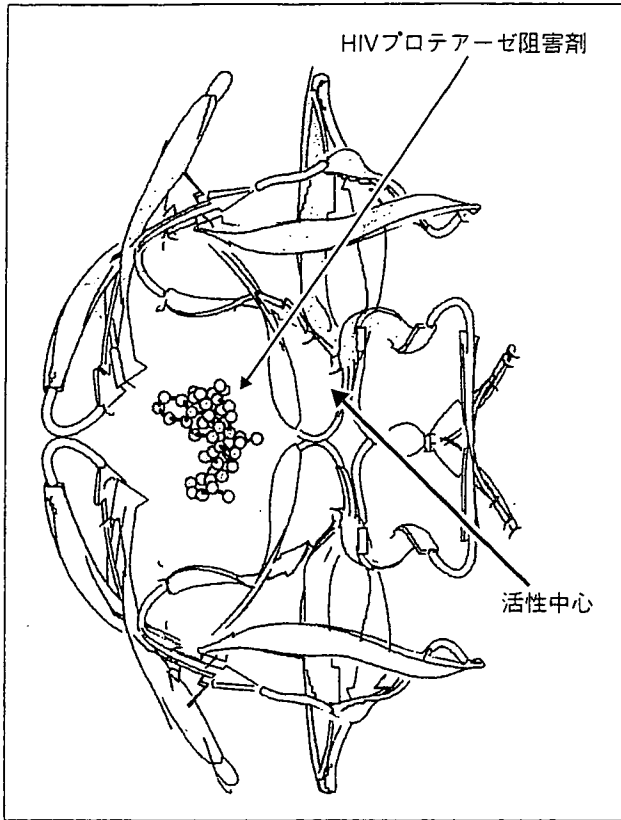


図3 蛋白構造に基づくHIVプロテアーゼ阻害薬の作用機構

合わせることで段階的な筋収縮の増強を実現できるかもしれない。肥大型心筋症の治療薬としてだけでなく、心疾患一般に適用できる強心剤とし

ても、TnCを介したカルシウム感受性の調節薬は期待がもてる。ジギタリス以来、これを超える強心剤が生まれていない。従来の強心剤は細胞内カルシウムイオン濃度を高めて強心作用を誘導するために、細胞に対する負荷(カルシウム overload)が不可避であった。1980年代後半に開発されたカルシウムセンシタイザーとよばれた薬剤群はカルシウムイオン濃度-張力関係を左方にシフトさせることにより(図1-C)低い細胞内カルシウムイオン濃度で高い収縮力を得ることができる理想的な強心剤ではないかと期待された<sup>4)</sup>。しかし、これらの薬剤の臨床使用経験から、短期的に心筋収縮力は高まるものの、心不全患者の長期予後の改善に役立つことはなかった。これらのカルシウムセンシタイザーは phosphodiesterase の阻害作用も合わせもっており、細胞内 cyclicAMP の増加によって筋小胞体からのカルシウムイオン放出が増加し、ついにはカルシウム overload となる可能性や<sup>5)</sup>、構造が類似した他の蛋白と相互作用があるなど、薬剤としての標的特異性が低いことが原因として考えられる。拡張型心筋症例では、すくなくとも一部の症例でカルシウム感受性の低下と収縮不全の関連が示唆されている(図2-C黄色のグラフ)。これらの事実は TnC や TnT を特異的に制御

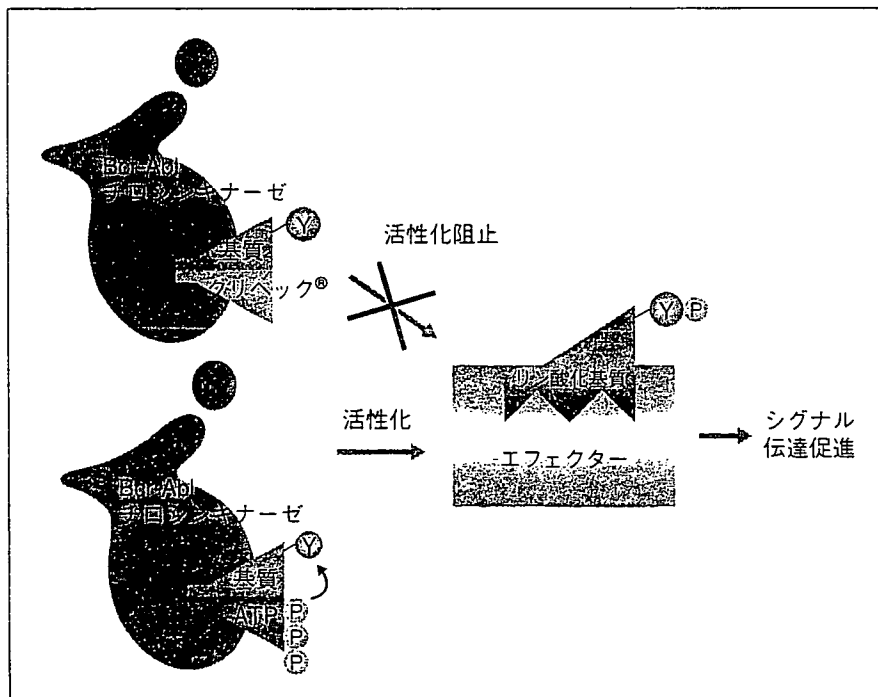


図4 慢性白血病治療薬(グリベック®)の蛋白構造に基づく作用機構

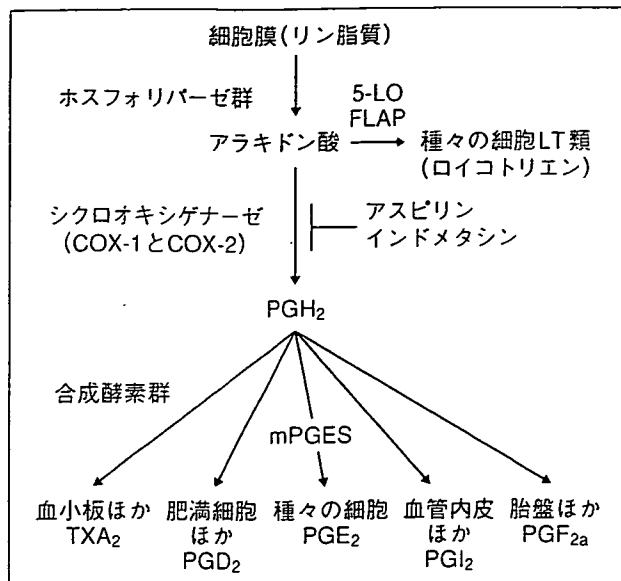


図 5 プロスタグランジン産生系

する化合物の設計により、あらたな強心剤を開発できるという可能性を示している。

### 構造解析が創薬に結びついた実例

構造に基づく薬剤設計の具体的な成功例として、AIDS 治療薬(HIV プロテアーゼ阻害薬)と白血病治療薬(グリベック®)について以下に述べる。

AIDS ウィルス、HIV は活性化外殻蛋白 gp120 により CD4 陽性 T リンパ球に感染し、自己増殖をする。その際、自己由来のプロテアーゼによって前駆体蛋白から活性化外殻蛋白を得る。この HIV プロテアーゼの構造に基づいて設計され、その活性中心を選択的に阻害する目的で設計された薬剤が HIV プロテアーゼ阻害薬である(図 3)。本剤は AIDS の発症を遅らせることに貢献した<sup>6)</sup>。

慢性骨髄性白血病では、フィラデルフィア染色体に由来する BcrAbl チロシンキナーゼが恒常的な増殖シグナル伝達系の活性化を通じて、発症の原因になると考えられている。同酵素は ATP と基質に結合し、ATP から切り離したリン酸基で基質のチロシン残基をリン酸化する。グリベック®は BcrAbl チロシンキナーゼの ATP 結合部位の詳細な構造に基づいて設計され、基質のチロシンリン酸化を構造特異的に阻害して白血病化を防ぐ<sup>7)</sup>(図 4)。このような構造に基づく薬剤設計をトロポニンを標的として行うことにより、肥大型心筋症に対する創薬を期待することができる。

### 創薬標的としてのプロスタグランジン合成酵素群の構造解析

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、プロスタグランジン(PG)を生合成する律速酵素として知られている(図 5)。2 種類のアイソザイムが存在する。COX-1 は constiutive enzyme よばれ、ほとんどの細胞で常時発現しており、生体の安定性を維持する役割を果たす。一方、COX-2 は、inducible enzyme として単球、線維芽細胞、滑膜細胞などの炎症にかかわる細胞で発現し、炎症性サイトカインなどによって誘導される。従来の非ステロイド系抗炎症剤は COX-1 と COX-2 の両方を阻害するために、炎症巢の PG だけでなく、胃粘膜や腎での PG(とくに PGE<sub>2</sub>)産生を抑制し、胃や腎の副作用を合併する。そこで、炎症に深く関与していると考えられる COX-2 だけを選択的に阻害する薬剤の開発が進められてきた。このようにして開発された COX-2 阻害薬は胃潰瘍を起こしにくい鎮痛剤として好んで投薬されていた。しかし、2004 年末、アメリカ政府はこれらの COX-2 選択的阻害薬の 3 剤は心筋梗塞や脳梗塞の危険性を高めるおそれがあるとして、心臓病患者への処方や多量の長期使用を避けるよう勧告した。COX-2 の下流に位置するプロスタサイクリン合成酵素の作用も抑制するために、同酵素に由来する抗血栓性作用や血流増加作用が損なわれることが原因ではないかと考えられている<sup>8)</sup>。

図 5 に示したように COX-2 の下流には多くの合成酵素があり、それぞれの作用を有する蛋白を合成している。個々の合成酵素を選択的に阻害する薬剤の開発が次世代の創薬の標的として注目される。PGE<sub>2</sub>の産生にかかわる mPGES を阻害する薬物の開発は、血管内血栓形成を伴わない理想的な抗炎症剤となる可能性がある。TXA<sub>2</sub>産生を阻害する薬剤の開発は、血管内血栓形成の予防、局所血流増加作用を通じて脳梗塞、心筋梗塞の予防薬や治療薬として期待できる。PGI<sub>2</sub>はすでに、難病といわれた原発性肺高血圧症の治療に有効であることも知られている。

### おわりに

国立循環器病センター内に構造生物学ラボを立

ち上げ、分子特異的な治療薬の開発をめざしている。トロポニンの構造解析は肥大型心筋症治療法開発の可能性を有する。肥大型心筋症ではトロポニンのさまざまな部位に遺伝子変異が確認されており、これらに対応する構造の薬剤を開発することはテーラーメイド医療の先駆けとなると考えられる。

謝辞：本稿の執筆および英文作成に協力していただいた東本弘子女史、松尾千重女史に感謝します。

## 文献

- 1) Takeda, S. et al. : Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca<sup>2+</sup> saturated form. *Nature*, **424** : 35-41, 2003.
- 2) 前田雄一郎・他：トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム. 蛋白質・核酸・酵素, **48** : 500-512, 2003.
- 3) 大槻啓男：筋収縮カルシウム受容調節の分子機構と遺伝性機能障害. 日本薬理学雑誌, **118** : 147-158, 2001.
- 4) Lee, J. A. et al. : Effects of pimobendan, a novel inotropic agent on intracellular calcium and tension in isolated ferret ventricular muscle. *Clin. Sci.*, **76** : 609-618, 1989.
- 5) Authors/task force members, Markku, S. et al. : Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure : The task force on acute heart failure of the European society of Hcardiology. *Eur. Heart J.*, **26** : 384-416, 2005.
- 6) Patick, A. K. et al. : Activities of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease inhibitor nelfinavir mesylate in combination with reverse transcriptase and protease inhibitors against acute HIV-1 infection *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41** : 2159-2164, 1997.
- 7) Drucker, B. J. et al. : Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, **2** : 561-566, 1996.
- 8) Mukherjee, D. et al. : Risk of cardiovascular events associated with selective cox-2 inhibitors. *JAMA*, **286** : 954-959, 2001.

### ●お知らせ●

#### ■第 57 回日本電気泳動学会総会

1. 会期：平成 18 年 10 月 27 日(金), 28 日(土)
2. 会場：アクトシティ浜松コンgresセンター  
(〒430-7790 静岡県浜松市板屋町 111-1,  
TEL 053-451-1111)
3. 行事予定：
  - ①特別講演「拡大するユビキチンの世界：基礎から病態へ」  
田中啓二(東京都臨床医学総合研究所・分子腫瘍学研究部門)
  - ②教育講演「臨床検査領域での分離分析(仮題)」  
菅野剛史(浜松医療公社)
  - ③シンポジウム「エピジェネティクスと RNA ワールド」  
“胚発生と DNA メチル化, エピジェネティクスの世界”  
岡野正樹(理化学研究所, 発生・再生科学総合研究センター)  
“ヒストンメチル化修飾と疾患の世界”  
眞貝洋一(京都大学ウイルス研究所 感染症モデル研究センター)  
“RNA 修飾の世界”  
鈴木 勉(東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学)  
“アンチセンス RNA の世界”  
船渡忠男(京都大学医学部保健学科・検査技術科学専攻・情報理工医学)  
追加発言 “It's a microRNA World” 水谷隆之(B-Bridge)
  - ④ワークショップ「臨床検査値に異常を及ぼす体液成

分一発見から報告の仕方まで」

⑤ランチョンセミナー、テクニカルセミナー

⑥第 45 回日本電気泳動学会児玉賞受賞講演

4. 総会参加費：5,000 円(学生 2,000 円)

5. 一般演題の申込要領：日本電気泳動学会ホームページ(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jes1950/>)から所定の抄録記入用ファイル(Microsoft Word ファイルでファイル名 summary.doc)をダウンロードし、所定の書式に従って申込先宛(agata@hama-med.ac.jp)にメール添付で平成 18 年 7 月 15 日(土)までにお送り下さい。

6. 第 57 回日本電気泳動学会総会事務局

〒431-3192 浜松市半田山 1-20-1

浜松医科大学医学部臨床検査医学

阿形初代(事務担当)

連絡先 TEL (053) 435-2788

連絡先 FAX (053) 435-2096

E-mail : agata@hama-med.ac.jp

常設事務局 URL : <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jes1950/>

7. 入会方法および問い合わせ先

一般演題での発表者は本学会会員に限りませんが、連名発表者は非会員でも可能です。

演者で非会員のほうは申込と同時に入会手続きを行ってください。

学会事務局：〒229-8501 相模原市淵野辺 1-17-71

麻布大学内日本電気泳動学会

TEL/FAX042-769-2293,

E-mail : honjo@azabu-u.ac.jp

## ナノレベルイメージングによる 分子構造と機能の解析

盛 英三<sup>1</sup> 望月直樹<sup>1</sup> 武田壮一<sup>1</sup>  
井上裕康<sup>2</sup> 中村 俊<sup>3</sup> 土屋利江<sup>4</sup>

### Nano-level imaging for analyzing protein structure and function

<sup>1</sup>Hidezo Mori, <sup>1</sup>Naoki Mochizuki, <sup>1</sup>Soichi Takeda,

<sup>2</sup>Hiroyasu Inoue, <sup>3</sup>Shun Nakamura, <sup>4</sup>Toshie Tsuchiya

<sup>1</sup>National Cardiovascular Center Research Institute

<sup>2</sup>Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University

<sup>3</sup>National Center of Neurology and Psychiatry

<sup>4</sup>National Institute of Health Sciences

### Abstract

The present manuscript outlines the nano-level imaging project, which is under promotion by the three national research institutes and supported by a research grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (nano-001). This research project targets collecting fundamental information regarding comprehensive understanding of cardiovascular, neurological and the other disorders, developing new diagnostic and therapeutic methods by visualizing protein structure and function in atomic (sub-nano level) or molecular (nano-level) resolution. The results of the current projects will be extended into drug design, clinical diagnostic technology and medical materials in near future.

**Key words:** nano-technology, structural biology, drug design, protein crystallography, tailor-made medicine

### はじめに

21世紀の医療の社会的課題として提唱されているテーラーメイド医療の達成には、標的となる蛋白の構造を患者ごとに確定し(分子診断)、最適な薬剤の構造を選択し(分子治療)、薬剤と生体蛋白の相互作用を分子レベルで観察する(分子評価)などの医療基盤技術の育成が求められる。ナノレベルイメージングプロジェクトでは、蛋白分子の構造と機能の解析を通じてテー

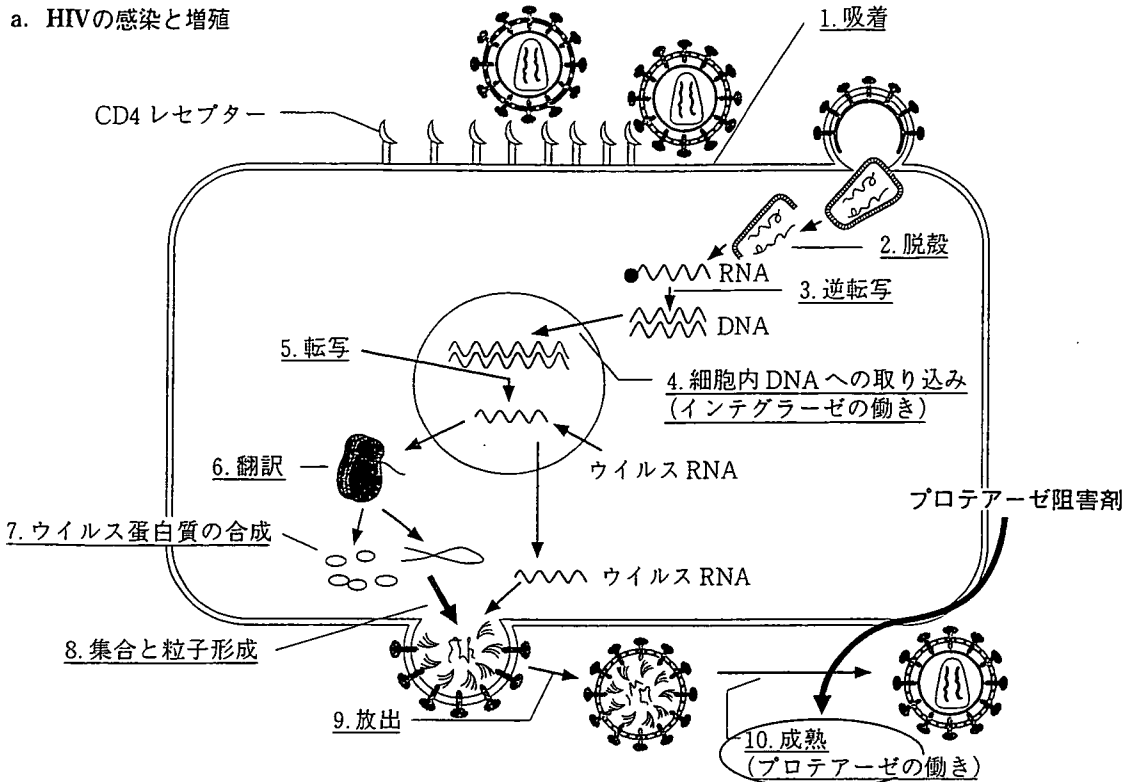
ラーメイド医療実現のための基盤技術の形成を目指している。

本稿では蛋白構造イメージングを中心に概説する。

### 1. 創薬に貢献した分子構造イメージング

近年、放射光を用いたX線回折法の発達により原子レベルの解像度で蛋白結晶の構造を決定できるようになった。構造に基づく薬剤設計の具体的な成功例として、AIDS治療薬(HIVプロ

<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所 <sup>2</sup>奈良女子大学生活環境学部 <sup>3</sup>国立精神神経センター <sup>4</sup>国立医薬品食品衛生研究所



b. HIVプロテアーゼの構造と阻害剤の設計

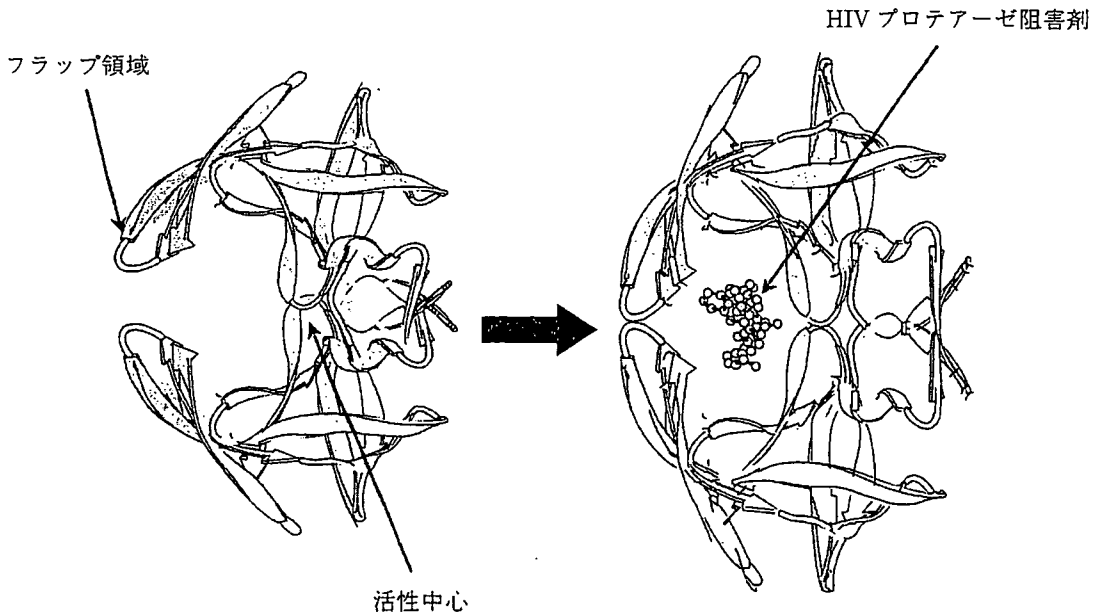


図1 AIDSウイルスの増殖過程と蛋白構造に基づくHIVプロテアーゼ阻害薬の作用機構

テアーゼ阻害薬), 白血病治療薬(グリベック)について以下に述べる。

AIDSウイルス, HIVは活性化外殻蛋白 gp120によりCD4陽性Tリンパ球に感染し, 自己増殖をする。その際自己由来のプロテアーゼによって前駆体蛋白から活性化外殻蛋白を得る(図1-

a). このHIVプロテアーゼの構造に基づいて設計され, その活性中心を選択的に阻害する目的で設計された薬剤がHIVプロテアーゼ阻害薬である(図1-b)。本剤はAIDSの発症を遅らせることに貢献した<sup>1)</sup>。

慢性骨髄性白血病ではフィラデルフィア染色



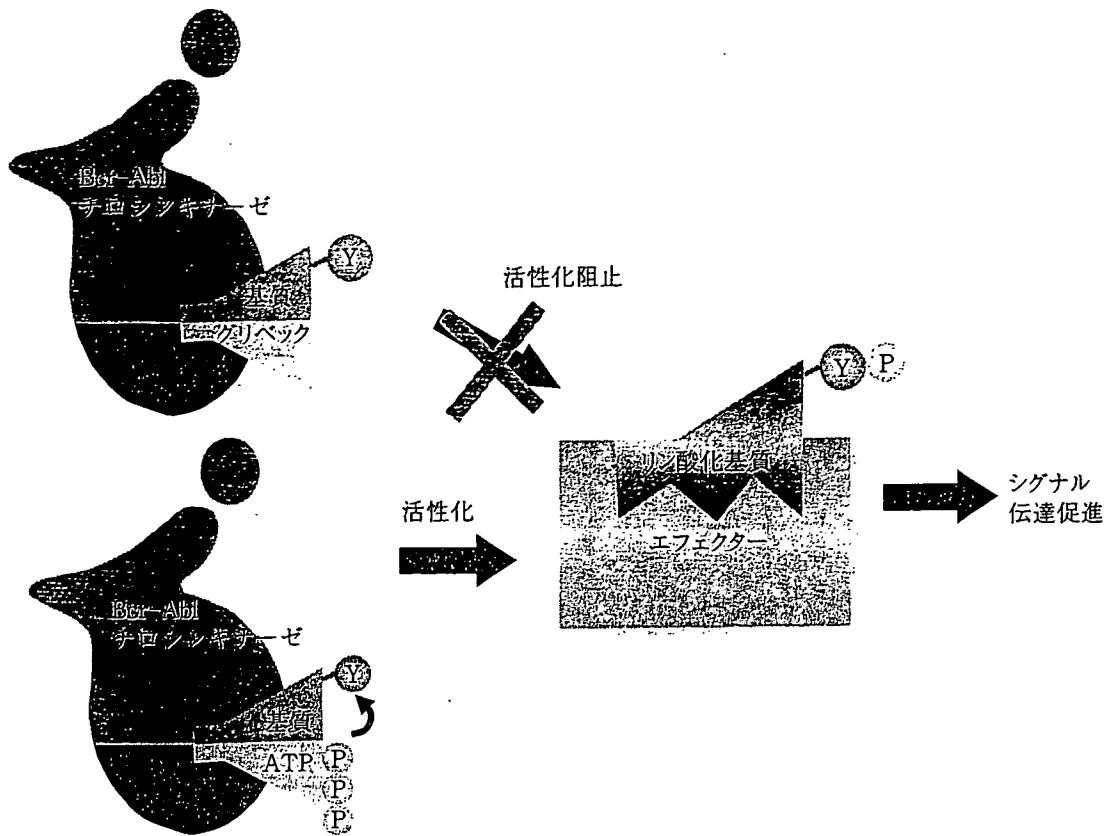


図2 慢性白血病治療薬(グリベック)の蛋白構造に基づく作用機構

体に由来する Bcr-Abl チロシンキナーゼが恒常的な増殖シグナル伝達系の活性化を通じて慢性骨髄性白血病発症の原因になると考えられている。同酵素は ATP と基質に結合し、ATP から切り離れたリン酸基で基質のチロシン残基をリン酸化する。グリベックは Bcr-Abl チロシンキナーゼの ATP 結合部位の詳細な構造に基づいて設計され、基質のチロシンリン酸化を構造特異的に阻害して白血病化を防ぐ(図2)<sup>2)</sup>。

このような構造に基づいて薬剤設計を行うことで標的蛋白との結合の特異性を高め、副作用を減少させることを期待できる。

## 2. ヒト心筋トロポニンの構造解析とそれに基づく創薬の可能性

心筋収縮を調節する心筋トロポニンの中核部分(コアダメイン)の構造は分担研究者である武田と理化学研究所の前田らによって解析され、Nature 誌に報告された(Vol 424, 2003)<sup>3)</sup>。前田らの総説<sup>4)</sup>に基づき、トロポニンの筋収縮調節

メカニズムについて述べる。

筋収縮はアクチンとミオシンの滑り運動による。アクチンフィラメントはアクチン、トロポニン、トロポミオシンを含む複合体であり、それらの3分子は7:1:1の存在比をもつ。トロポニンの存在下でアクチンとミオシンはカルシウムイオン濃度に応じた収縮と弛緩を行う。

図3に心筋トロポニンのコアダメインの構造を示す。トロポニンは TnC, TnI, TnT と呼ばれる3つのポリペプチド鎖からなる。これまでの研究により、TnI は収縮抑制因子、TnC は脱抑制因子、TnT は TnC の脱抑制を弱める因子(カルシウム濃度依存性の付加因子)であることが示されている<sup>5)</sup>。

トロポニンのコアダメインは更に調節頭部と IT アームの2つのサブドメインに分かれる。調節頭部はカルシウムイオンとの結合を通じてトロポニンの構造変化とそれに基づくアクチンとミオシンの滑り運動に対するスイッチの役割を果たす。IT アームは剛性を有するコイルドコイ

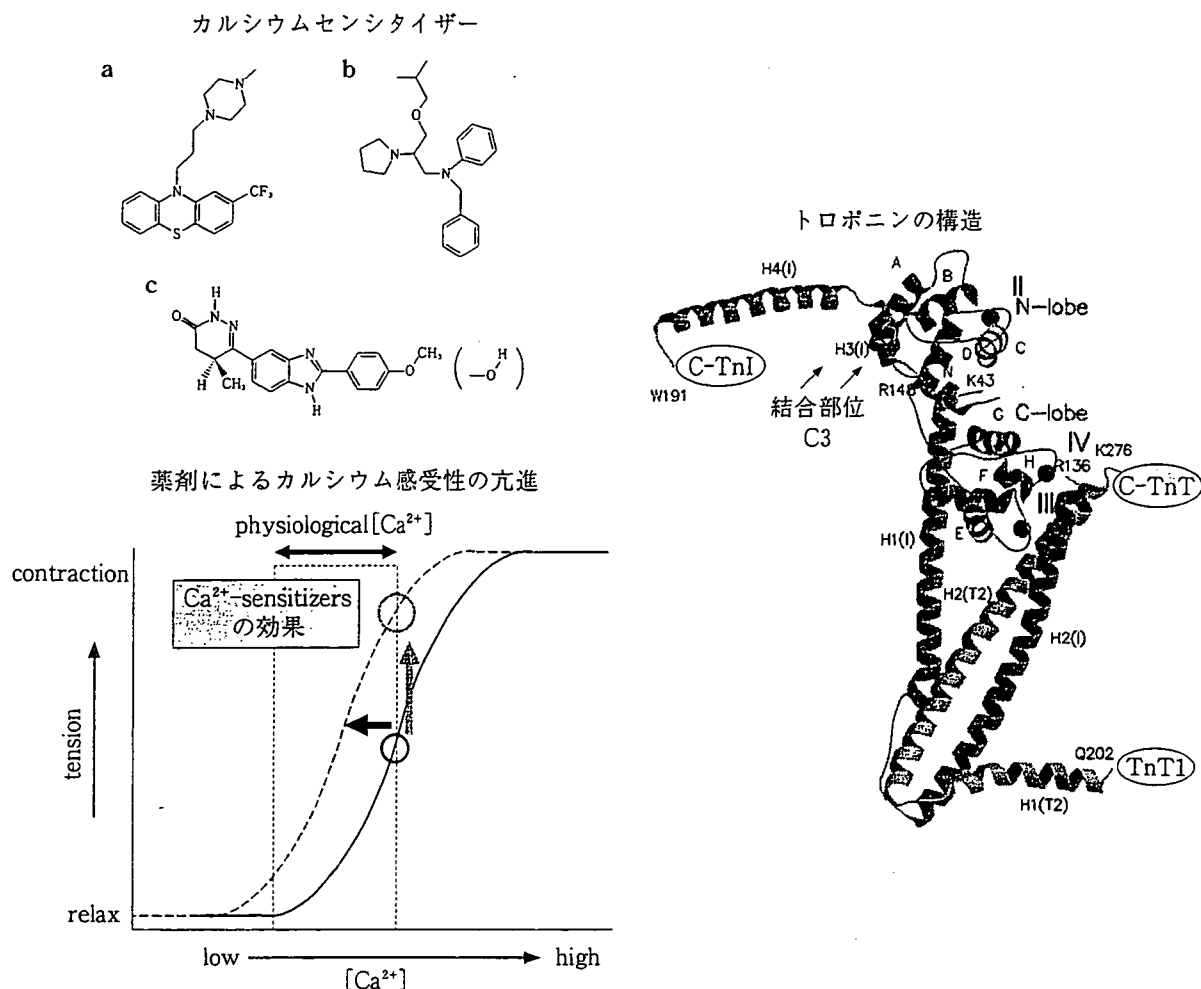


図3 トロポニンCドメインの構造(文献<sup>3)</sup>より改変引用)

ル構造からなる。TnCはN末端側とC末端側の2つの球状部が $\alpha$ ヘリックスで連結された構造をもつ。カルシウム濃度にかかわらずC末側球状部はTnIに結合し、TnCをトロポニン分子内に常につなぎとめている。一方、TnCのN末端側球状部は細胞内カルシウム濃度が上昇した場合のみ構造が開き、TnIの第二結合部位(両親媒性 $\alpha$ ヘリックスH3)を結合する。これにより、TnIの調節領域全体がトロポミオシン/アクチンより解離し、アクチンとミオシンの滑り運動が始まる。

TnCのN末端側球状部にカルシウムセンシタイザーが結合すると、同球状部は開いた構造をとりTnIの第二結合部位を結合しやすくなる。すなわち、TnCによるTnIの脱抑制が起こりやすくなる。前述のようにTnTはTnCの脱抑制作用にカルシウム濃度依存性を付加することが

できるので、TnCとTnTの制御を組み合わせることで段階的な筋収縮の増強を実現できるかもしれない。近年循環器領域では血管作動性薬剤で優れた新薬が数多く開発されてきたが、ジギタリス以来、これを超える強心剤が生まれていない。従来の強心剤は細胞内カルシウムイオン濃度を高めて強心作用を誘導するために、細胞に対する負荷(カルシウム overload)が不可避であった。1980年代後半に開発されたカルシウムセンシタイザーと呼ばれた薬剤群はカルシウムイオン濃度-張力関係を左方にシフトさせることにより、低い細胞内カルシウムイオン濃度で高い収縮力を得ることができ理想的な強心剤ではないかと期待された<sup>6)</sup>。しかしながら、これらの薬剤の臨床使用経験から、短期的に心筋収縮力は高まるものの、心不全患者の長期予後の改善に役立つことはなかった。これらのカ

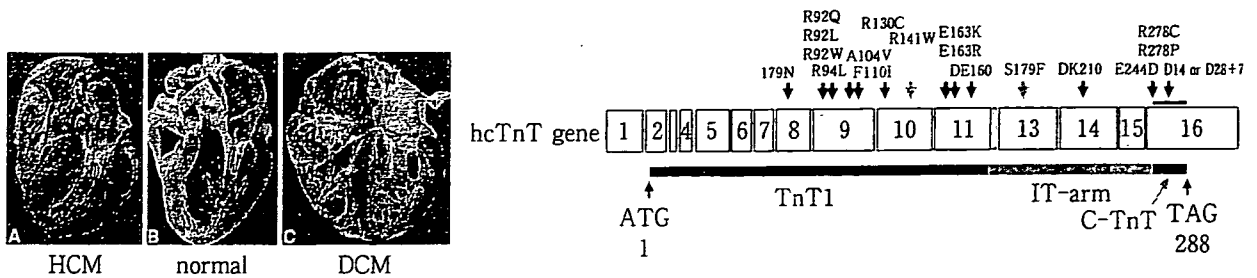


図4 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋カルシウム感受性  
心筋症の遺伝子変異は TnT1, C-TnT に多く、筋カルシウム感受性を修飾する。

ルシウムセンシタイザーは phosphodiesterase の阻害作用も併せてもっており、細胞内 cyclic-AMP の増加によって筋小胞体からのカルシウムイオン放出が増加し、ついにはカルシウム overload となる可能性や<sup>7)</sup>、構造が類似した他の蛋白と相互作用があるなど、薬剤としての標的特異性が低いことが原因として考えられる。拡張型心筋症例では、少なくとも一部の症例でカルシウム感受性の低下と収縮不全の関連が示唆されている。これらの事実は TnC や TnT を特異的に制御する化合物の設計により、新たな強心剤の開発の可能性を示している。

一方、肥大型心筋症 (HCM) ではトロポニンの遺伝子変異によりカルシウム感受性が亢進することが発病に関連する可能性が示唆されている。同患者の遺伝子解析によると、約 15% の患者に TnT の遺伝子変異が認められる。大概らによれば<sup>5)</sup>トロポニンがアクチン/トロポミオシンと直接接触する部分 (TnT1, C-TnT, TnI

調節領域) に変異が多く認められ、コアドメインには変異は少ないという (図 4)。変異 TnT の交換導入を行った心筋スキンドファイバーを用いた研究で、カルシウムイオン濃度-張力関係の左方シフト、すなわちカルシウム感受性の亢進が認められた。この結果から TnT の変異により、カルシウム感受性が亢進し、収縮増加と弛緩不全という肥大型心筋症に特有の症状が発症するという有力な仮説が生まれる。TnT の変異によるカルシウム感受性亢進のメカニズムを原子構造で解明すると、肥大型心筋症に特異的に作用する薬剤の設計を期待できる。原因となる遺伝子変異ごとに構造が異なる薬剤設計が求められる可能性もある。言い換えれば、心筋トロポニンの変異に基づく肥大型心筋症の治療法の開発はテーラーメイド医療のモデルケースとなる可能性がある。

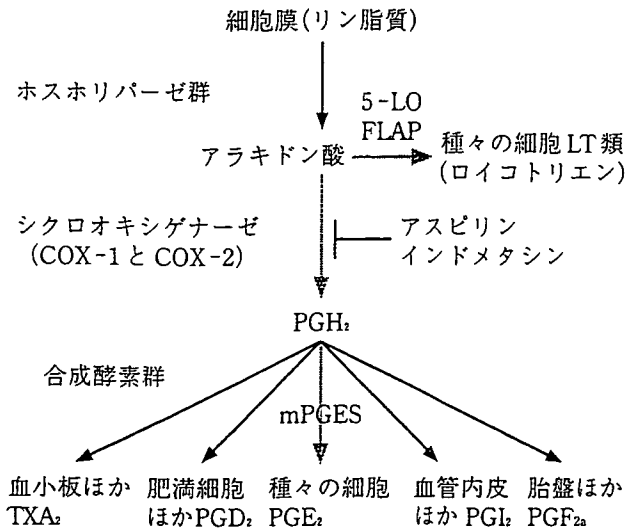


図5 プロスタグランジン産生系

### 3. 創薬の標的として注目されている プロスタグランジン合成酵素群の 構造解析

シクロオキシゲナーゼ(COX)はプロスタグランジン(PG)を生合成する律速酵素として知られている(図5)2種類のアイソザイムが存在する。COX-1はconstitutive enzymeと呼ばれ、ほとんどの細胞で常時発現しており、生体の安定性を維持する役割を果たす。一方、COX-2はinducible enzymeとして、単球、線維芽細胞、滑膜細胞などの炎症にかかわる細胞で発現し、炎症性サイトカインなどによって誘導される。従来の非ステロイド系抗炎症剤は、COX-1とCOX-2の両方を阻害するために炎症巢のPGだけでなく、胃粘膜や腎でのPG(特にPGE<sub>2</sub>)産生を抑制し胃や腎の副作用を合併する。そこで、炎症に深く関与していると考えられるCOX-2だけを選択的に阻害する薬剤の開発が進められてきた。このようにして開発されたCOX-2阻害薬は胃潰瘍を起こしにくい鎮痛剤として好んで投薬されていた。しかしながら、2004年末、米政府は、これらのCOX-2選択的阻害薬の3剤を心筋梗塞や脳梗塞の危険性を高める恐れがあるとして、心臓病患者への処方や多量の長期使用を避けるよう勧告した。COX-2の下流に位置するプロスタサイクリン合成酵素の作用も

抑制するために、同酵素に由来する抗血栓性作用や血流増加作用が損なわれることが原因ではないかと考えられている<sup>8)</sup>。図5に示したようにCOX-2の下流には多くの合成酵素があってそれぞれの作用を有する蛋白を合成している。個々の合成酵素を選択的に阻害する薬剤の開発が次世代の創薬の標的として注目される。PGE<sub>2</sub>の産生にかかわるmPGESを阻害する薬物の開発は血管内血栓形成を伴わない理想的な抗炎症剤となる可能性がある。TXA<sub>2</sub>産生を阻害する薬剤の開発は血管内血栓形成の予防、局所血流増加作用を通じて脳梗塞、心筋梗塞の予防薬や治療薬として期待できる。PGI<sub>2</sub>は既に難病といわれた原発性肺高血圧症の治療に有効であることが知られている。PG関連薬剤の開発は構造に基づく創薬の最大の標的の一つになっており、ナノメディスンプロジェクトでも複数の関連酵素の構造解析に取り組んでいる。

### 4. ナノメディスンプロジェクトの そのほかの研究

本プロジェクトでは分子構造イメージングに関連して上記のほかに、細胞内イオン環境や、血管新生にかかわる蛋白など幾つかの蛋白構造についても研究を進めている(国立循環器病センター研究所)。国立精神神経センターではin-silicoスクリーニング法によるParkinson病の治療薬探索に蛋白構造情報を応用する研究を進めている。国立医薬品食品衛生研究所では原子間力顕微鏡を用いて蛋白表面の詳細な構造を解析することなどを通じて、医用材料作成に向けた応用研究に取り組んでいる。

一方、分子機能イメージングの領域では、国立循環器病センターの望月らが増殖因子(EGF)刺激に伴うRas分子の活性化をFRET法で可視化できることをNature誌に報告した<sup>9)</sup>。ナノメディスンプロジェクト開始後も血管内皮の走化運動にかかわるRap1蛋白の可視化に関する研究などにFRET法による分子イメージングを展開している。国立精神神経センターの研究グループでは分子機能イメージング技術を応用してシナプス機能、プリオン蛋白質の機能の評価に