

## C 実験結果

#44 抗体は 0.01 mg/ml 投与において明瞭な皮下色素漏出が計測された。また、C5a 阻害ペプチドの同時投与においては明瞭な色素漏出阻害は計測されなかった。

## D 考察

モルモットの皮下への、モルモット DAF に対する機能阻害抗体#44 の投与は 補体副経路の活性化により誘導されるアナフィラトキシンによる血管透過性亢進が起こり、その結果として色素漏出が観察された。この生体内に誘導されるアナフィラトキシンの活性阻害を試みたが今回は安定した実験系を組むに至らなかったため、さらに条件を検討して、モルモットでの肺炎症状などへのアナフィラトキシンの関与およびその制御の効果についての検証を進めることが必要であると考えている。

## E 結論

補体反応がブタなどの大動物と近い関係にあると推察されているモルモットやスナネズミをモデル動物として用いてアナフィラトキシン研究を進める事は、今後の補体反応系阻害薬に限らず、感染症などに対する薬剤開発における重要な視点であり、有用なモデル動物になると期待している。

## G 研究発表

### 1 論文発表

1 Farkas, I., Varju, P., Hrabovszky, E., Okada,

N., Okada, H., Liposits, Z. Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochemistry Int.* 2008, 52: 846-856

2 Ohi, H., Tamano, M., Okada, N. Low CR1 (C3b receptor) level on erythrocytes associates with poor prognosis in hemodialysis patients. *Nephron Clinical Practice* 2008, 108: c23-c27

3 Hau, L., Campbell, W., Okada, H., Calpio, C., A., D., Imai, M., Okada, N. Designing complementary peptides with a genetic algorithm to a 10 amino acid peptide of the c-terminal of C5a anaphylatoxin. *Nagaya Med. J.* 2008, 49: 219-233

4 今井優樹、岡田則子 相補性ペプチドによる炎症の制御 *臨床検査* 52: 917-920 (2008)

### 2 学会発表

1 Okada, H., Ono, F., Terao, K., Okada, A., Asai, S., Campbell, W., Mizue, Y., Suzuki, K., and Okada, N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. XXII international Complement Workshop Sept.28-Oct.2, 2008 Basel Molecular Immunology 45:4113, 2008

2 Tokodai, K., Goto, M., Imura, T., Kurokawa, Y., Okada, N., Okada, H.,

Satomi, S.

C5a inhibitory peptide AcPepA is a clinically available candidate for preventing rapid loss of intraportally transplanted islets. XXII international Complement Workshop Sept.28-Oct.2, 2008 Basel Molecular Immunology 45:4151, 2008

3 Okada, N C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. 12<sup>th</sup> Microbiology and Immunology conference of the Lioning Medical Association Oct.18-20, 2008 Donjuan 12: 2, 2008

4 岡田則子 アンチセンスペプチド理論の応用により創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチドの研究 第59回名古屋市立大学医学会総会講演要旨 59:13(2008)12/7 名古屋 特別講演

#### H 知的財産権の出願登録状況

##### 1 特許取得

『アナフィラトキシンC5aを不活性化するペプチド』特許権者：岡田秀親、岡田則子  
特許第4106691号 平成20年4月11日

##### 2 実用新案、その他

なし

## サル局所脳虚血後再灌流モデルにおけるアナフィラトキシン阻害ペプチドの効果

名古屋市立大学大学院 医学研究科 脳神経外科

間瀬光人

### 要旨

本年度は動物モデル作成法の確立を行った。脳血管内手術手法を用い、低侵襲なカニクイザル局所脳虚血再灌流モデルを作成した。全例で大脳基底核に、また一部の動物では側頭葉にも梗塞巣を認め、MRIにより非侵襲的に梗塞範囲を経時的に評価可能であった。

### 研究目的

現在、脳梗塞の急性期治療は血流再開療法と脳保護療法に大きく分けられる。血流再開療法は t-PA 静注による血栓溶解療法が導入され解決されたかに見えたが、その適応症例は全脳梗塞の数%に過ぎず、依然脳梗塞治療の中心は虚血周囲組織（ペナンブラ）を少しでも多く生存させるための血流維持および脳保護療法である。その際問題となるのが脳虚血後に二次的に引き起こされる炎症性反応をはじめとする種々の組織障害カスケードであり、その制御は脳梗塞後遺症の重症度や社会復帰を含めた予後を左右する。しかしながら虚血後二次性細胞障害を抑制し、ヒトで有効性が認められた薬剤はほとんどない。本研究の目的は霊長類（カニクイザル）の局所脳虚血後再灌流モデルを用い、虚血後二次性障害に対するアナフィラトキシン阻害ペプチドの組織保護作用と脳梗塞治療薬（予後改善薬）としての可能性を検討することである。

### 研究方法

カニクイザルを用い、全身麻酔、調節呼吸下に以下の手技で脳梗塞を作成する。まず右大腿動脈経由のセルジンガー法による脳

血管撮影を行う。次いで右内頸動脈にガイディングカテーテルを留置し、脳血管内手術用マイクロカテーテルを中大脳動脈に留置して血流遮断することにより脳虚血を作成し、カテーテルを引き抜くことにより再灌流（血流再開）する。虚血時間は3時間とし、虚血開始2時間後からアナフィラトキシン阻害ペプチド(AcpepA)の投与を開始する。虚血中、虚血後経時的にMRIを施行し、脳浮腫及び虚血範囲を測定し、組織学的検討を行う。対照としてコントロール群にはvehicle投与を行う。

### 結果

本年度はカニクイザルの再現性のある局所脳虚血再灌流モデル作成法の確立を行った。マイクロカテーテルを中大脳動脈M1-2分岐部に留置することにより、大脳基底核には定常的に、一部の動物では側頭葉皮質にも梗塞巣を認めた。

### 考察

再現性のあるモデルの作成法とMRIによる梗塞巣範囲の評価法（体積計算）はほぼ確立することができた。来年度は薬剤投与実験を行い、効果判定を行う予定である

新生児敗血症モデルにおける Complement 5a(C5a) inhibitor のサイトカイン、  
フリーラジカルの減少効果と延命効果に関する研究

研究分担者 戸 莉 創 名古屋市立大学大学院医学研究科教授 (病院長)

研究要旨

新生児敗血症モデルでの C5a inhibitor による研究的治療を行った。

A. 研究目的

新生児医療の進歩にもかかわらず、新生児・特に早産における低出生体重児では敗血症の死亡率は高いままである

敗血症における新しい治療法は細菌性毒素自体をターゲットとしたものや細菌毒素に対する補体系などの免疫反応を抑える事が考えられている。

我々は C5a inhibitor (AcPepa) が全身の炎症を抑制し臓器障害を抑える作用により新生児敗血症モデル cecal ligation and perforation(CLP) model における生命予後を改善するという仮説を立てた。

B. 研究方法

21 匹の子豚を対象に実験を行った。生後 3 日の子豚を麻酔し人工換気を行った。

7 匹は CLP 群とし、7 匹は CLP を起こした 30 分後より C5a inhibitor (AcPepa) による治療を行った群(以下 AcPepa 群)。さらに 7 匹をコントロール群とした。

(倫理面への配慮)

実験は National Institutes of Health guidelines on the use of experimental animals に準拠して行われた。また実験計画は名古屋市立大学倫理委員会により承認を得ている

C. 研究結果

AcPepa 群とコントロール群共に 6 時間と 9 時間で高い平均動脈圧と酸素飽和度、塩基過剰、ヘマトクリット、血液 pH となった。しかし 1 時間と 3 時間では心拍数と 1 時間での

TH 値、3 時間と 6 時間での IL-6 値、3 時間と 9 時間での HMGB-1 値、9 時間での IFN- $\gamma$  値、1, 3, 6, 9 時間での TNF- $\alpha$  値では CLP 群より低かった。

唯一 AcPepa 群では 6 時間と 9 時間での IL-10 の値が CLP 群、コントロール群両群よりも低値であった。

平均動脈圧、酸素飽和度、塩基過剰、ヘマトクリット、血液 pH、TH、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  では AcPepa 群とコントロール群間には差は認めなかった。

生存時間は AcPepa 群では CLP 群に比較し長時間であった (19.3hrs $\pm$ 2.7hrs vs 9.9hrs $\pm$ 0.7hrs, P<0.005)

D. 考察

AcPepa はフリーラジカルの抑制し HMGB-1 と IL-6 の上昇を遅延させ、TNF- $\alpha$  の上昇を抑制する。それにより平均動脈圧を保ち、血液ガスの増悪を防ぐ事ができ結果として新生児 CLP モデルでの生存時間の延長効果をもたらすと考えられた。

E. 結論

AcPepa は新生児敗血症治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田則子	アンチセンスペプチド理論の応用により創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチドの研究	現代医学	55	247-254	2007
今井優樹 岡田則子	相補性ペプチドによる炎症の制御	臨床検査	52	917-920	2008

## 綜 説

アンチセンスペプチド理論の応用により創出した  
アナフィラトキシン阻害相補性ペプチドの研究

岡 田 則 子\*

## 内 容 紹 介

アンチセンスアミノ酸の存在意義を検証するためにコンピュータプログラム ANTIS を用いてセンス-アンチセンスペプチド関係を検討した。自然界に存在するタンパク質の分子内にはセンス-アンチセンス関係にあるペプチドが集積した部分が存在し相互作用する事が明らかとなりその部分をアンチセンスホモロジーボックス (AHB) と称した。さらに標的アミノ酸配列に相互作用を示す相補性ペプチドをアンチセンスアミノ酸を指標に加えて人為的に創出するコンピュータプログラム MIMETIC を作成した。ANTIS/MIMETIC を用いて任意のタンパク質の標的ペプチド部分に結合してその生物活性を制御できる相補性ペプチドを創出して創薬の可能性を探っている。現在、補体系の活性化中間産物であるアナフィラトキシン C5a 制御を目

指して、C5a 活性阻害を示す相補性ペプチドの解析を行い敗血症などの補体過剰反応に起因する病態の治療に向けての研究を進めている。

## は じ め に

1984年に Blalock & Smith によってアンチセンスアミノ酸の概念が提唱されてより、多くの実験系でのセンスペプチド-アンチセンスペプチド相互作用が立証されてきた。しかし、その反応機構などの詳細な解析が待たれている現状でもある。アンチセンスアミノ酸の存在意義を検証するために相互にアンチセンス部分になっている部分を検索するコンピュータプログラム ANTIS を作成して、同一分子内でセンス-アンチセンスペプチド関係を検索した結果、自然界に存在するタンパク質の分子内にはセンス-アンチセンス関係にあるペプチドが集積して存在する事が明らかとなった。そこで、標的アミノ酸配列に相互作用を示す相補性ペプチドを人為的に創出するコンピュータプログラム MIMETIC を作成した。MIMETIC を用いて任意のタンパク質の標的ペプチド部分に結合してその生物活性を制御できる候補相補性ペプチドを創出し、その中からより反応性の優れた制御ペプチドを選出して創薬の可能性を探ってい

## —Key words—

アンチセンスアミノ酸、相補性ペプチド、  
アナフィラトキシン、C5a、補体、敗血症

\*Noriko Okada:

名古屋市立大学大学院医学研究科免疫学分野

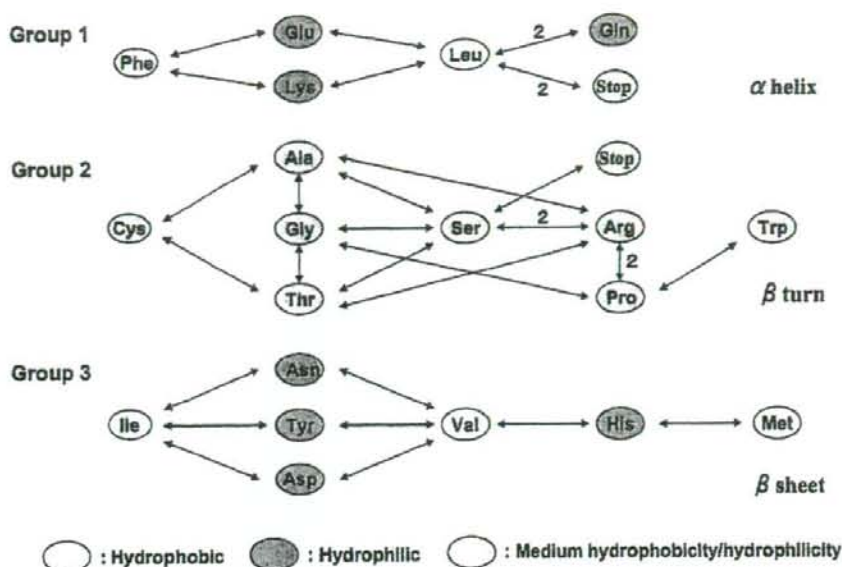


図1 アンチセンスアミノ酸のグループ分類. コドンに基づいた全てのアンチセンスアミノ酸は3つのグループに分類され、お互いに他のグループとはセンス-アンチセンスの関係は成立しない。二次構造上の特徴を示すグループを形成する。Kyte-doolittleのhydrophobic scaleではArgは親水性が高いとされているが、比較的長い炭素鎖の疎水性を加味すると中間値群に入る。またTyrは同様に考察して疎水性群に入ると判断される。文献2より一部改変して引用した。

る。現在、アナフィラトキシンC5aの活性阻害を示す相補性ペプチドの解析を進め、治療薬としての応用研究を進めている。

### I. アンチセンスペプチドの分子間認識

二本鎖DNAのうち、negative strand DNAに相補的なRNAを鋳型として人工的に合成したペプチドが、相対するpositive strand DNAに由来するペプチドと特異的に相互作用をするという考え方が、1984年にBialock JEら<sup>1)</sup>によってアンチセンスアミノ酸の概念として提唱された。それ以降、それを示す知見が多数継続的に報告されている。アミノ酸をコードするコドンに相補的なコドンによってコードされるアミノ酸であるアンチセンスアミノ酸は疎水性あるいは親水性が各々逆になっていることが特徴

として挙げられる。1つのアミノ酸をコードするコドンは複数存在する。従ってその複数のコドンを基にすると1個のアミノ酸に対して複数個のアンチセンスアミノ酸が存在する。センス-アンチセンスアミノ酸は3グループに分けられ、各々のグループに属するアミノ酸は同じグループのアミノ酸とのみセンス-アンチセンス関係にある。その各グループは、 $\alpha$  helix,  $\beta$  turn,  $\beta$  sheetの2次構造をとりやすいアミノ酸がグループを形成している(図1)。そして、センス-アンチセンスアミノ酸間でのhydrophobic scoreは符号が逆であり絶対値があまり変わらない関係になっている<sup>2)</sup>。さらに特徴としてアンチセンスmRNAを3'-5'方向に翻訳してできるペプチドは5'-3'方向に翻訳してできるペプチドではアミノ酸配列は全く異なるにも拘

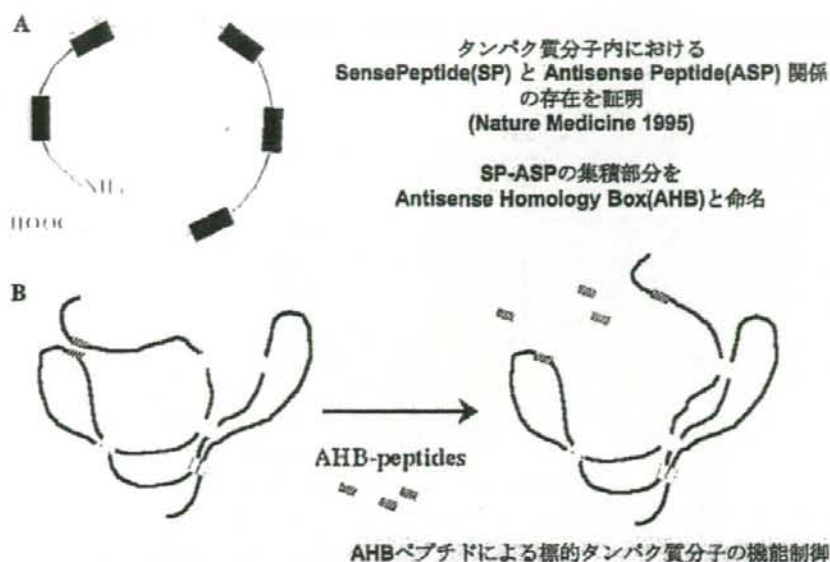


図2 タンパク質分子内のセンサー-アンチセンス関係。

- A. タンパク質分子内にはセンスペプチドに対してアンチセンスペプチド関係となっている部分が存在しており、集積部分をアンチセンスホモロジーボックス (AHB) と称する。
- B. AHB ペプチドは標的タンパク質に反応してタンパク質の機能を修飾できる。文献6より引用した。

らず hydrophobic score がほぼ同様となることが挙げられ、アンチパラレルアンチセンスペプチドと称しており、センスペプチドと相互作用を示すことを検証している。これらアンチセンスペプチドの分子間認識の重要な要素に hydrophobicity が関与することが検証されてきた<sup>3)</sup>。

タンパク質が mRNA より翻訳されて相互作用をすることにより、すべての生命現象は統御されている。タンパク質が対応するタンパク質やペプチドを一組として認識できることが、生命の根源的な意味をなすものであり、タンパク質のセンスペプチドとアンチセンスペプチドが相互作用するという事象は極めて意味深いものがあると考えられる。

## II. アンチセンスホモロジーボックス (AHB) の発見

アンチセンスペプチドの相互反応性に着目した研究が、リガンドに対応するレセプターの同定や、精製あるいは結合部位の同定にも応用されている。この場合、特徴としてペプチドの amphiphilic structure が重要な要素である事も知られた。センサー-アンチセンス関係は鍵と鍵穴関係と考えられる。センスペプチドおよびアンチセンスペプチド各々に対する抗体は、抗原ペプチドと反応するのみならず抗体同士も反応し、この反応は抗原ペプチドで阻害される事が知られており、この抗体結合は idiotypic/anti-idiotypic の関係が成立している<sup>4)</sup>。アミノ酸には複数個のアンチセンスアミノ酸が存在するの



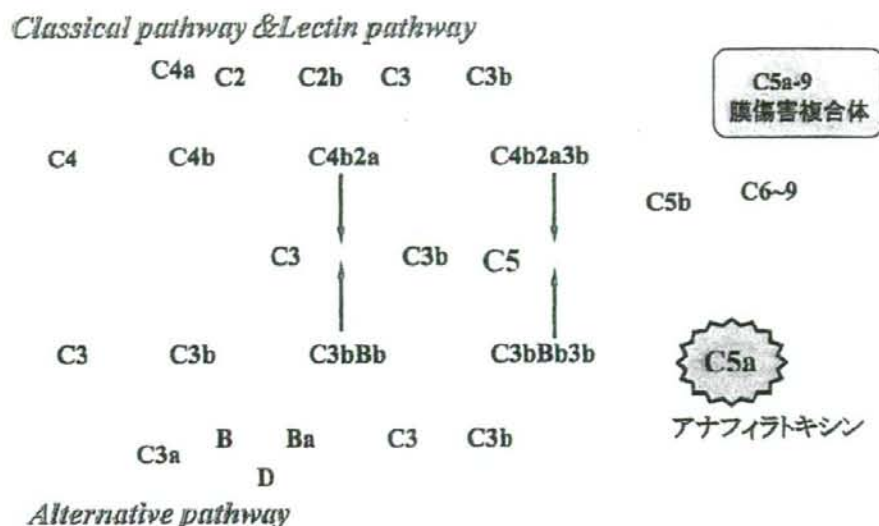


図3 補体活性化概略とアナフィラトキシン C5a 産生。補体系の3活性化経路を介して C5 が活性化分断されてアナフィラトキシン C5a が産生され、白血球活性化を誘導する。マスト細胞の活性化はヒスタミンの放出を促してショック症状を引き起こす。

で、このような関係をアンチセンスホモロジー (AH) と称するが、この AH を検索するコンピュータプログラム ANTIS を作成して、タンパク質における AH の存在様式を検索した。例えば、TCR 複合体と MHC 分子間での AH 解析により多点的に各構成タンパク質に AH が存在している事が知られた<sup>5)</sup>。特に AH が集積して存在している部分が存在する事が見いだされ、AH ボックス (AHB) と称している<sup>6)</sup>。この AHB の存在する部分はタンパク質の機能や高次構造に関連した部位あるいはその近傍に集積している事が明らかとなった (図2)。さらに関連するタンパク質間には共通する AHB が存在する。つまり共通のタンパク質より進化し、遺伝子重複などにより派生したタンパク質にも AHB が受け継がれており、この AHB が保存されている事実はその部位が機能発現や高次構造に重要であることを示す<sup>7)</sup>。

### Ⅲ. アナフィラトキシン C5a-C5aR の相互作用と AHB

ANTIS および相補性ペプチド自動設計コンピュータプログラム MIMETIC を用いて候補ペプチドの設計を行い、タンパク質の作用を阻害/制御できる相補性ペプチドを創出してきた。例えば、HIV 逆転写酵素 (reversetranscriptase) の酵素活性阻害、TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) の活性阻害、Thrombomodulin の thrombin 補助作用の阻害、および C5a anaphylatoxin の活性阻害などである。各々標的ペプチドに対して反応性を検討したところ試作相補性ペプチドの有効率は約 30% となっている。

C5a および C5aR の AHB 解析の結果より、各 AHB 部位の合成ペプチドを用いて、C5aR 機能への影響を解析した結果、複数の部位の

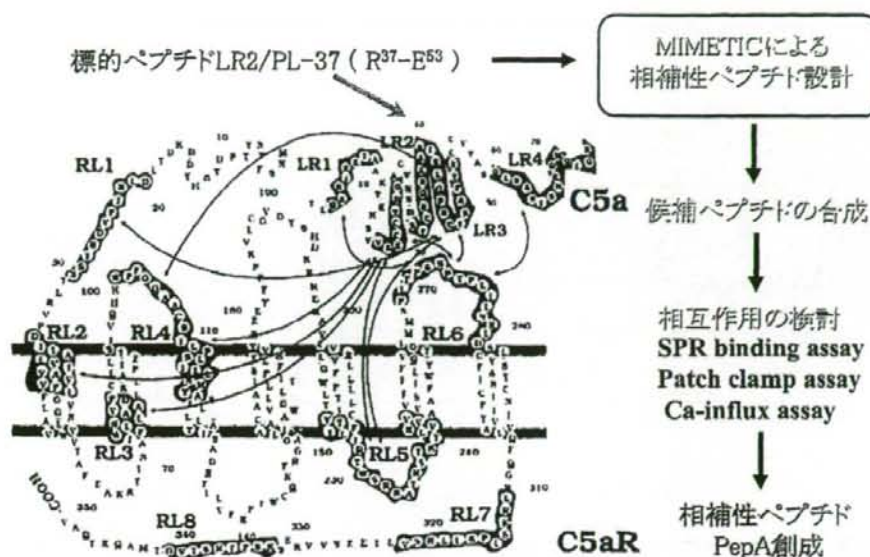


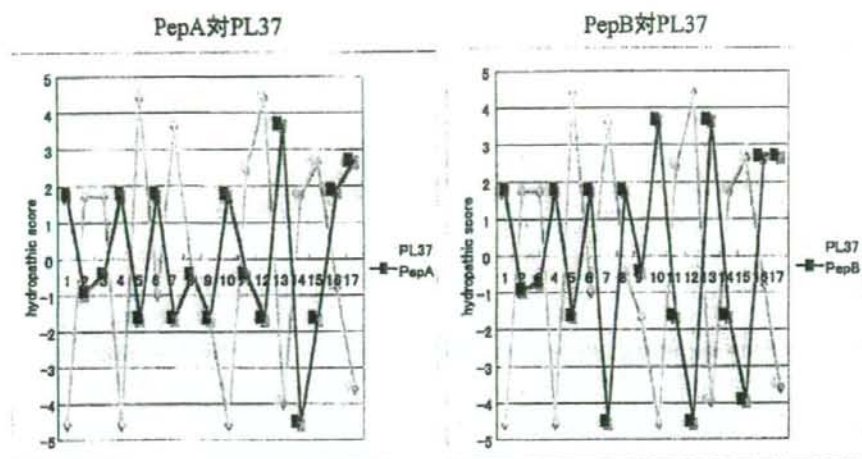
図4 C5a-C5aRにおけるセンス-アンチセンスペプチド関係と相補性ペプチド設計。AHBペプチドであるPL37に対する相補性ペプチド候補を設計合成した。候補ペプチドを用いてC5aへの結合性をSPR (BIACORE)にて解析, さらにC5aによる好中球のC5aR活性化に伴うCa-influx反応をARGUSにて解析, パッチクランプ法による細胞内電位変化の解析などのin vitro解析およびラットを用いてのLPS感作後の抗Crry抗体投与とショック死の実験系においてC5a活性阻害効果を検証した。相補性ペプチドPepAが創出された。

AHBペプチドがレセプター機能に影響を及ぼす事が確認された。それらのうちで最も強い活性を示したのはC5aリガンド部分のLR2/PL37(アミノ酸番号R37-E53)であった。これまでにC5aのC5aR活性化に関与する部位はC末端部位とN末端付近の2カ所が報告されていたが, このAHB解析によってLR2/PL37部分がC5a-C5aR相互作用で重要な反応部位であることが明らかとなった<sup>8)</sup>。AHB検索がタンパク質の機能保持や発現に重要な情報を提供するツールとなりうる事が証明された。

#### IV. アナフィラトキシンC5aを阻害する相補性ペプチド

C5aは補体活性化反応の中間産物であり微量

で白血球活性化などの生物活性を発揮する(図3)。補体系の過剰反応や持続活性化が起こると, C5aRの発現上昇が誘導されるとともに, 炎症性サイトカインの産生も高まるので, 過度の反応は敗血症や多臓器不全などの重篤な病態の要因になると考えられる。現在, C5aの作用を制御する方法として, C5aR阻害剤が数種類開発検討されている。C5aRは炎症時には発現増強が起こる事や, C5aR阻害剤は阻害効果と刺激効果の解離が明瞭でない事などの問題点が指摘されている。そこでC5aに作用して活性を阻害できるペプチドの創成を試みた。C5aのPL37部分がAHBとしてC5aRの活性化に関与することが確認できたので, PL37を標的ペプチドとして相互作用を示すペプチドをMIMETICを用いて創成した。MIMETICはANTIS



標的ペプチドは菱印で相補性ペプチドは角印で表す。

図5 C5a阻害活性を示す相補性ペプチドPepAと標的ペプチドPL37のhydrophobicity関係。標的ペプチドと相補性ペプチド間でのhydrophobic scoreは逆相関(ミラーイメージ)となる。

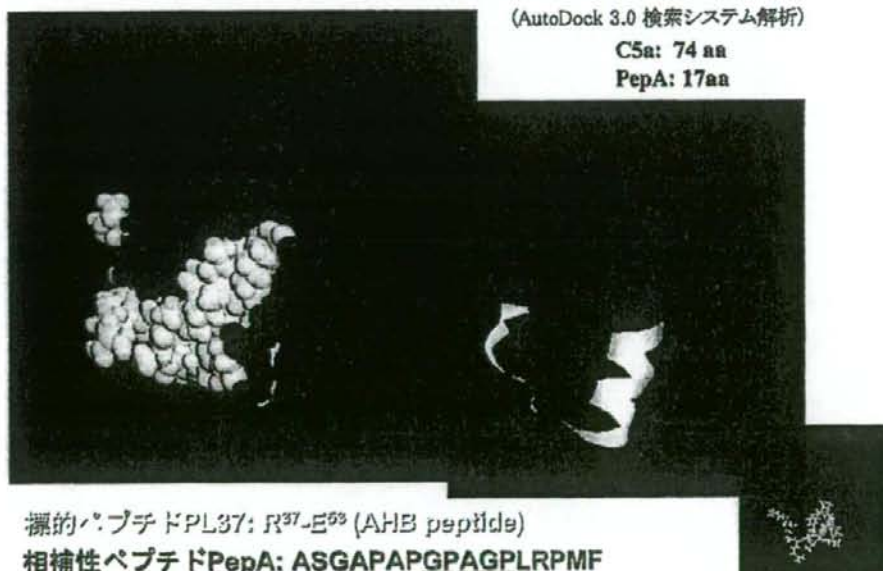


図6 相補性ペプチドPepAのアナフィラトキシンC5aへの結合モデル。C5a立体構造に対して3次元構造的にフィットできるペプチドであるかをMorris, GM等のAutoDock3.0システムを用いて解析した結果、相補性ペプチドPepAの中央部分のアミノ酸(アンダライン部分)が結合に重要であることが推測された。

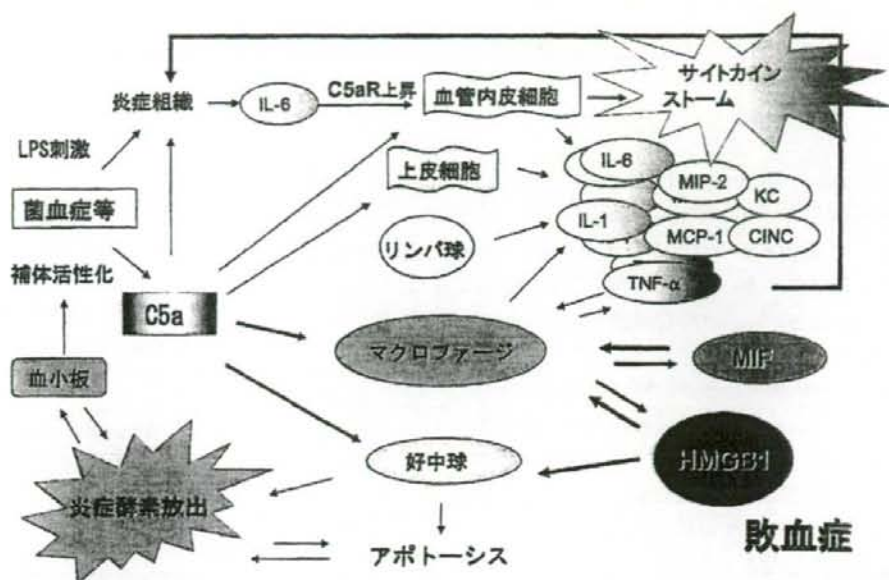


図7 C5a アナフィラトキシンの敗血症ショックにおける役割。C5aは細菌感染やLPSなどによる補体活性化にともない放出される。C5aRはLPSやC5aなどにより発現上昇が誘導される。血液細胞や血管内皮細胞が炎症反応に乗じてサイトカインストームを誘発する。反応拡大により炎症後期反応因子HMGB1、MIFなどが放出されて、致命的な敗血症へと誘導される。C5a阻害相補性ペプチドはHMGB1などの放出を阻止して敗血症性のショックを回避させ救命できると推察される。

での情報をもとに開発された、アンチセンスアミノ酸を指標に加えて相互作用が可能であろうペプチドを自動設計するコンピュータプログラムである<sup>9)</sup>。その結果、候補ペプチド19個のうち7個でC5aR活性に影響を与えるペプチドが検出され、特にC5aR活性阻害効果の高い相補性ペプチドPepAの検討を進めてきた<sup>10)</sup>(図4)。PepAは相補性ペプチドの特性としての両親媒性および標的ペプチドに対してhydrophobicityの逆相関性を示すペプチドである(図5)。また、C5a高次構造モデルを用いた3D docking手法においてもPepAは高いフィットネスを示した(図6)。PepAはBiacoreを用いたSPR解析に於いて、C5aに特異的に結合する事も確認された。さらにPepAは1:10のモル

比において、ヒト好中球のC5aR刺激によるCa-influxを阻害できた。同様にPatch Clamp法によるC5aR発現TGR細胞を用いて、C5aの細胞内電位変化をPepAは阻害した。これらのin vitroの結果より、相補性ペプチドPepAのC5a阻害活性が確認された。さらに、ラットを用いてのエンドトキシン誘発ショック死モデル実験においても救命効果を発揮しており、補体活性化依存性病態において、PepAのC5a阻害効果によるエンドトキシン病態の改善が期待される。ペプチドは生体内に存在するペプチターゼなどによる分解を速やかに受けるために半減期が短いという難点がある。そこで生体内での安定性を高めるためにN末端をアセチル化したAcPepAを作成して検討した結果、

期待通りに, PepA より優れた阻害効果が得られている<sup>11)</sup>.

## ま と め

現在, カニクイサルを用いての AcPepA の効果を検討している. サルに 4 mg/kg の LPS を投与してエンドトキシンショック死を100%誘発する実験系において, LPS 投与後30分からの AcPepA 2 mg/kg/hr の持続投与により, 7例全例において, その救命に成功している. 血漿中での TNF 産生などの抑制は顕著ではないが, 特に, 敗血症ショックに於ける反応因子として注目されている HMGB1 や MIF の血漿中への放出を阻止できる事が確認されている. 重篤な敗血症患者の救命に C5a 阻害ペプチド AcPepA が有用であると推察され, 敗血症などの治療薬としての開発研究を進めている (図7). 相補性ペプチドが臨床病態に於ける重要な因子を制御する戦略に於いて幅広く応用されるようになり, さらに多くの疾患における有効な治療剤としての相補性ペプチドの研究開発が進む事を期待している.

## 謝 辞

アンチセンスペプチドの研究は主に Lajos Baranyi 博士, William Campbell 博士および岡田秀親名誉教授らとの共同研究ならびに研究指導のもとに推進されました. また, 相補性ペプチドの研究は岡田秀親前教授 (生体防御学) のもと大学院生今井優樹氏, 藤田恵美子氏, 朝井鈴佳氏, 堀田彩氏, 河村嗣至氏, 細川雅人氏, Lewis Hau 氏らの研究協力のもとに推進された成果であり, 関係諸氏に深く感謝の意を表します.

## 文 献

1) Blalock J E, Smith E M : Hydropathic anti complementary of amino acids based on the

genetic code. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 121 : 203, 1984.

- 2) Blalock J E, Complementarity of peptides specified by Sense and Antisense strand of DNA. *Trends in Biochemistry* 8 : 140, 1990.
- 3) Fassina G, Cassini G : Design and recognition properties of a hydrophatically complementary peptide of human interleukin 1  $\beta$ . *Biochem. J.* 282 : 773, 1992.
- 4) Bost K L, Blalock J E : Production of antiidiotypic antibodies by immunization with a pair of complementary peptides. *J. Mol. Recognition* 1 : 179, 1989.
- 5) Campbell W, Okada H : Antisense seruense of antigenic peptides are found in MHC class II molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 175 : 207, 1991.
- 6) Baranyi L, Campbell W et al : The antisense homology box : A new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nature Med* 9 : 894, 1995.
- 7) Okada H : The possible role of sense and antisense peptide interactions in the generation and maintenance of the tertiary structure of a protein. *Anticancer Res* 18 : 3927, 1998.
- 8) Baranyi L, Campbell W et al : Antisense homology boxes in C5a receptor and C5a anaphylatoxin. A new method for identification of potentially active peptides. *J. Immunol* 157 : 4591, 1996.
- 9) Campbell W, Kleiman L et al : A novel Genetic algorithm for designing mimetic peptides that interfere with the function of a target molecule. *Microbiol. Immunol* 46 : 211, 2002.
- 10) Fujita E, Farkas Imre et al : Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a. *J. Immunol* 172 : 6382, 2004.
- 11) Okada N, Asai S et al : Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. *Microbiol. Immunol* 51 : 439, 2007.

## 相補性ペプチドによる炎症の制御

今井優樹<sup>1)</sup>/岡田則子<sup>2)</sup>

(KEYWORDS) 相補性ペプチド, アナフィラトキシン C5a, 炎症

### 1. はじめに

生物は、細菌やウイルスなどの微生物の体内への感染・侵入に対して、補体や Toll-like receptor (TLR) に代表される自然免疫系の生体内防御機構を活性化させ、それらを体内からすばやく排除する仕組みを備えている。自然免疫がひとたび病原体の感染を感知すると、免疫応答に必要な炎症性サイトカインが産生され、生体内で炎症反応を引き起こし、免疫系にかかわる細胞を、感染局所に動員して病原体を排除する。しかし一方で、これらの防御反応の異常亢進により、アレルギーや自己免疫疾患が誘発されたり、重症化した場合には敗血症、播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC)、多臓器不全 (multiple organ failure : MOF) などの全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response

syndrome : SIRS) 病態へと進展する。現在まで、様々な敗血症の動物実験モデルが作られ、またいくつもの薬剤の臨床試験が行われてきたが、いまだに臨床場における敗血症などの過剰な炎症反応に起因する致死的病態を改善する薬剤は登場していない。

本稿では過剰な炎症反応を制御することを目的に創出された相補性ペプチド (complementary peptide) について概説するとともに、相補性ペプチドの今後の可能性について述べる。

### 2. 相補性ペプチド

ポリペプチド鎖から構成される蛋白質では、分子内でアミノ酸配列自身が情報化され、分子内にセンスペプチド・アンチセンスペプチドの関係によって、相互に対応する配列情報をもつ部分が散在することが、1995年 Baranyi らにより見いだされ<sup>1)</sup>、この部分をアンチセンスホモロジーボックス (antisense homology box : AHB) と命名した。アンチセンスペプチドはその特徴としてセン

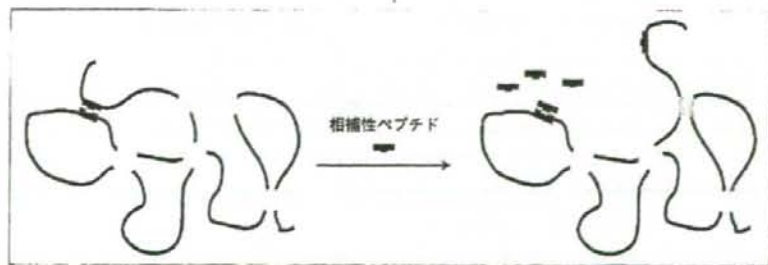


図1 AHB ペプチドによる標的蛋白質分子の機能制御

1) IMAI Masaki 名古屋市立大学大学院医学系研究科病態医学講座免疫学分野・講師

2) OKADA Noriko 同分野・教授

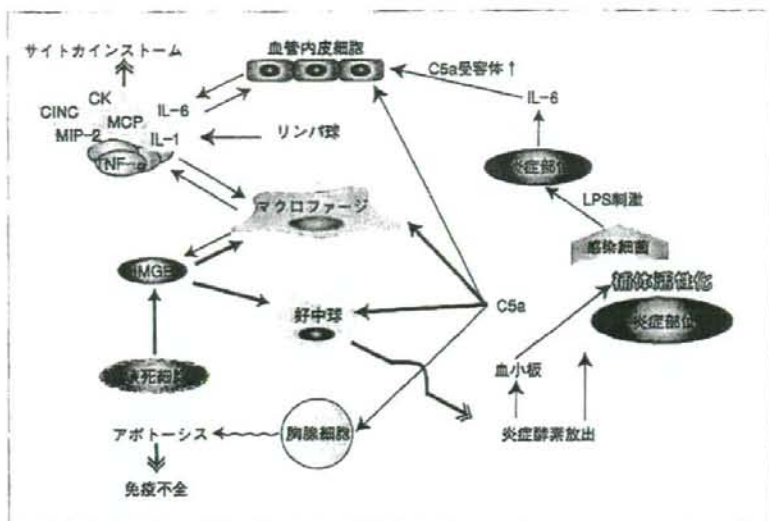


図2 C5a アナフィラトキシンの敗血症ショックにおける役割

スベプチド間でのヒドロキシが逆相関値となることが知られている。AHBは対応するセンスベプチド間で相互作用することにより、高次構造の形成と維持に重要な働きをしているであろうことが推察された(図1)。そこでわれわれは、AHBに対応する相補性ペプチドを設計、合成して作用させることにより、蛋白質の機能制御が可能となることを立証してきた。相補性ペプチドとは、標的ペプチドに対して、疎水性パターンが逆値になって相補性になっていること、対応する位置のアミノ酸側鎖の容積(bulkiness)が対応性でアミノ酸同士のα炭素が0.5 nm以内に接近できること、ペプチド骨格のバックボーン並列性(backbone alignment)の一致性などを指標にして作成するペプチドであり、われわれは相補性ペプチドを自動設計するコンピュータプログラムMIMETICを独自に開発することに成功した<sup>2)</sup>。現在までに、MIMETICで設計合成した相補性ペプチドの約30%が標的蛋白質の機能を制御する活性をもち、相補性ペプチドの蛋白質機能制御の有効性が検証できており<sup>3-5)</sup>、これらの中から最適な炎症過反応制御性ペプチドを選出して解析を進めている。

### 3. アナフィラトキシン C5a の機能

C5a (fifth component of complement) は補体活

性化反応の中間産物であり、アナフィラトキシン(anaphylatoxin)と称されるごとく、血管透過性を高めてショック症状を引き起こす。また、極微量(pgオーダー)で単球やマクロファージを活性化して炎症局所に遊走集積させ、interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-αなどの炎症性サイトカインを分泌する。一方で、肥満細胞や好塩基球を活性化し、アレルギー性の炎症を引き起こすヒスタミンやセロトニンなど種々のメディエーターを放出させる。さらに、C5aは血管内皮細胞に直接作用し、P-セレクチンなどの接着分子を発現させる。C5a刺激によりマクロファージから放出されたIL-1β, TNF-αは血管内皮細胞表面にintercellular adhesion molecule (ICAM)-1やE-セレクチンを、IL-6はC5aレセプターの発現を増強させる。通常ではこのような免疫応答で炎症を引き起こされた後、炎症性サイトカインやそれらを放出するマクロファージ、好中球は時間の経過とともに沈静化されるが、過剰な炎症反応ではマクロファージや好中球、血管内皮細胞から大量の炎症性サイトカインが放出され、サイトカイン・ストームを誘発する(図2)。敗血症などにおいては、細菌により宿主の正常な免疫応答力が阻害された免疫不全の状態にも陥り、DICやMOFなどの重篤な病態に進行

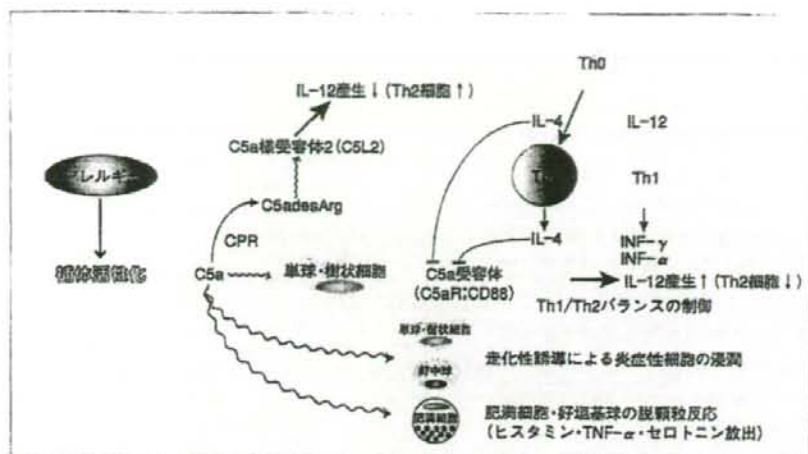


図3 アレルギー症状発症における C5a アナフィラトキシンの役割

すると考えられる<sup>6)</sup>。

#### 4. C5a に対する相補性ペプチドのエンドトキシンショックに対する治療効果

Baranyi らは C5a と C5a 受容体に対する分子間 AHB を検索し、AHB ペプチドが C5a 刺激による細胞内へのカルシウムイオンの流入を抑制することを見だし、C5a-C5a 受容体の相互作用に影響を及ぼすことを証明した<sup>7)</sup>。その中で最も強い阻害活性を示した C5a の AHB ペプチドである PL37 に対する相補性ペプチドを MIMETIC で検索し、C5a に反応してその相互作用を阻害する相補性ペプチド PepA を創出した。LPS (lipopolysaccharide: リポ多糖) 投与によるラットエンドトキシンショック実験モデルにおいて、コントロールでは生存率 0% であったのに対し、4 mg/kg の PepA を静脈注射すると全例を救命できた<sup>8)</sup>。ペプチド剤は蛋白分解酵素の作用を受け、速やかに分解されるため半減期が短いという欠点がある。そこで、PepA の N 末端アミノ酸をアセチル化した AcPepA を作成して検討した結果、AcPepA はさらに強力な効果を発揮することが確かめられた<sup>9)</sup>。さらに AcPepA は、致死量の LPS を投与したエンドトキシンショック病態のカニクイザルを救命できることも証明されており、臨床応用への道が開かれつつある。

#### 5. C5a に対する相補性ペプチドの抗アレルギー効果

炎症性疾患の一つである喘息などのアレルギー病態にも、C5a アナフィラトキシシンが深く関与している。Th2 細胞より放出されたサイトカインが B 細胞を刺激し、IgE 抗体を産生させる。IgE 抗体は好酸球や肥満細胞の受容体に結合し、そこに抗原が結合すると、ヒスタミンやセロトニンなどのメディエーターを放出させ炎症を引き起こす。アレルギー反応が補体系を活性化するメカニズムとして、アレルギーが糖鎖構造をもっている場合は直接レクチン経路または第二経路で、アレルギー-抗体複合体形成の場合は古典経路で活性化されることが知られている。補体の活性化により生じた C5a は好中球、単球、好酸球、肥満細胞、好塩基球や T 細胞などの炎症性の細胞に認識され、それらの細胞を炎症局所に集積させ、単球を樹状細胞へ分化誘導や、サイトカインおよびヒスタミンなどを放出させる。さらに、近年 C5a が抗原提示細胞を介して、T 細胞の Th1/Th2 反応を制御していることが明らかになってきた<sup>10)</sup>。C5a は単球や樹状細胞上に発現している C5a 受容体に結合し、IL-12 を産生することにより Th1 反応を誘導するのだが、アレルギー症状のような Th2 優位の際は、Th2 細胞から産生される IL-4 により、単球や樹状細胞の C5a 受容体の発現を



低下させる。また、C5a からアルギニンがとれた一次代謝物である C5adesArg がその受容体である C5L2 (C5a-like receptor 2: C5a 様受容体) に結合すると、IL-12 の産生を抑制するように働く (図 3)。これらの報告から、アレルギー反応における C5a の制御はその症状を緩和するのに有効な方法の一つであると考えられる<sup>10)</sup>。濱らはヒト肺組織を用いた喘息モデルにおいて、AcPepA が肥満細胞から放出されるメディエーターの一つ CysLTs の産生を強力に抑制することを明らかにしており<sup>11)</sup>、相補性ペプチドの抗喘息薬としての可能性も検討されている。

#### 6. おわりに

現在、C5a 阻害相補性ペプチド AcPepA はブタ新生児を用いた CLP (cecal ligation and puncture: 腸管穿孔モデル) 実験においても著明な延命効果やサイトカインの過剰放出抑制効果が認められている。その結果を基に、敗血症や SIRS などの患者の救命効果を臨床治療実験で明らかにするトランスレーショナルリサーチへと進めることが可能であると考えている。また、相補性ペプチド創出技術を用いて、サイトカインストームの進行で形成される TNF- $\alpha$  や HMGB1 などほかの起炎性因子に対する相補性ペプチドも創出し、病態が進行した患者も救命できる治療薬としての開発を目指している。ペプチド剤は蛋白質分解酵素の作用を受けて速やかに分解されるため、蓄積毒性などの副作用リスクが少ないと考えられる。これらの特性を生かし、将来的には、相補性ペプチドが臨床病態における重要な因子を制御する戦略に幅広く応用されることになり、さらに多くの疾患における有効な治療薬の開発手段として発展して

いくことを期待している。

#### 文 献

- 1) Baranyi L, Campbell W, Ohshima K, et al: The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nat Med* 1: 894-901, 1995
- 2) Campbell W, Kleiman L, Barany L, et al: A novel genetic algorithm for designing mimetic peptides that interfere with the function of a target molecule. *Microbiol Immunol* 46: 211-215, 2002
- 3) Shimomura Y, Kawamura T, Komura H, et al: Modulation of procarboxypeptidase R (ProCPR) activation by complementary peptides to thrombomodulin. *Microbiol Immunol* 47: 241-245, 2003
- 4) Fujita E, Farkas I, Campbell W, et al: Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a. *J Immunol* 172: 6382-6387, 2004
- 5) 岡田則子: アンチセンスペプチド理論の応用により創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチドの研究. *現代医学* 55: 247-254, 2007
- 6) Ward PA: The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 4: 133-142, 2004
- 7) Baranyi L, Campbell W, Okada H: Antisense homology boxes in C5a receptor and C5a anaphylatoxin: a new method for identification of potentially active peptides. *J Immunol* 157: 4591-4601, 1996
- 8) Okada N, Asai S, Hotta A, et al: Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. *Microbiol Immunol* 51: 439-443, 2007
- 9) Hawlisch H, Wills-Karp M, Karp CL, et al: The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. *Mol Immunol* 41: 123-131, 2004
- 10) Guo RF, Ward PA: Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23: 821-852, 2005
- 11) 濱寛, 小野信文, 阿部正義: ヒト肺炎モデルの作成とその薬理学的応用. *Yakugaku Zasshi* 127: 721-727, 2007

## MEDICAL BOOK INFORMATION

## 医学書院

### 二級臨床検査士・緊急臨床検査士資格認定試験問題集 [2002-2006年版]

編纂 日本臨床検査同学院

◎B5 頁240 2007年  
定価3,980円(本体3,800円+税5%)  
[ISBN978-4-280-00479-4]

1954年以来、臨床検査技師の技術・学識研鑽の象徴である資格認定試験問題集待望の刊行。至近の5年間(第90～94回、2002-2006年)の、微生物(寄生虫含む)、病理(細胞診検査含む)、臨床化学、血液、免疫血清、循環生理、神経生理、呼吸生理の各科目の問題・解答を全文掲載。受験者にとって利便性が高く、国家試験受験者にとっても、あるいは生涯学習用テキストとしても十分に役立つ問題集。