

受賞者

松下 健二

国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部

研究テーマ

エクソサイトーシス制御を基盤とした新しい脳血管障害治療薬の開発

### 1. 緒言

血管内皮細胞はフォンビルブランド因子 (vWF)、P-selectin および interleukin-8 (IL-8) などを内包した分泌顆粒 (Weibel-Palade 小体) を有し、同顆粒は hypoxia、thrombin 等の刺激で放出される。Weibel-Palade 小体に内包される分子群は、血管の炎症と血栓形成を強力に惹起するため、そのエクソサイトーシス (分泌) の制御は血栓形成を制御に有用で可能性がある。我々は、NSF が血管内皮におけるエクソサイトーシスを制御することを明らかにした (Matushita K et al., Cell 115:139-150, 2003)。本研究では、NSF の特異的阻害ペプチドをデザインし、エクソサイトーシスに対する同ペプチドの効果を検討した。

### 2. 方法

- 1) ペプチド: NSF の活性中心をカバーする 5 種類のポリペプチドを合成した。ついで、同ペプチドを human immunodeficiency virus (HIV) の transactivating regulatory domain (TAT) の protein transduction domain (PTD) と連結したキメラペプチドを作成した。同時にこれらのペプチドを FITC でラベルし、細胞への同ペプチドの導入効率を評価した。陰性対照として、TAT-NSF57、TAT-NSF222、TAT-NSF254、TAT-NSF700 のアミノ酸残基をそれぞれランダムに配列したペプチド (TAT-NSF57scr、TAT-NSF222scr、TAT-NSF254scr、TAT-NSF700scr) を合成し、実験に供試した (Table 1)。
- 2) 細胞培養および vWF の測定: ヒト動脈血管内皮細胞 (HAEC) に TAT-NSF ペプチドを 20 分間前処理し、洗浄した後 1U/ml の thrombin でさらに 1 時間刺激した。その後、上清中の vWF 濃度を ELISA で調べた。
- 3) ATPase 活性の測定: NSF の ATPase 活性は、以前報告した方法により行った (Matushita K et al., Cell 115:139-150, 2003)。
- 4) NSF 解離活性の測定: NSF の解離活性は以前報告した方法によって行った (Matushita K et al., Cell 115:139-150, 2003)。

### 3. 結果

まず、血管内皮のエクソサイトーシスに対する TAT-NSF ペプチドの効果を検討した。その結果、TAT-NSF ペプチドは濃度依存性に VWF の放出を抑制した (Figure 1)。TAT-NSF ペプチドが血管内皮細胞内へ導入効率を FITC 標識 TAT-NSF ペプチドを用いて調べた結果、約 75% の血管内皮細胞に 20 分以内に TAT-NSF ペプチドが導入されることが明らかになった (Figure 2)。

NSF の ATPase 活性および SNARE 解離活性に対する TAT-NSF ペプチドの効果をそれぞれ検討した結果、TAT-NSF81 と TAT-NSF700 は用量依存性に強く NSF の ATPase 活性を抑制した (Figure 3)。また、TAT-NSF81 と TAT-NSF700 は 1 $\mu$ M 以上で NSF による SNARE 解離を阻害した (Figure 4)。

次に、TAT-NSF ペプチドのin vivo における効果を検討した。まず、マウスの出血時間に対するTAT-NSFペプチドの効果調べた結果、TAT-NSF81, TAT-NSF700接種マウスにおいて、出血時間の顕著な延長が認められた (Figure 5)。

#### 4. 考察

本研究の結果から、我々の作成した新規のキメラペプチドがエクソサイトーシスを阻害することを明らかになった。TAT-NSF ペプチドは血管内皮細胞内に浸透し、特異的に NSF の活性を阻害してエクソサイトーシスを阻害した。脳虚血によって低酸素状態に陥った血管ではエクソサイトーシスが活性化され、vWF、P-セレクトリンなどの因子が瞬時に放出される。これらの分子は、血小板の血管壁への付着を促して、血栓形成を惹起する。TAT-NSF ペプチドは、血管内皮細胞からのエクソサイトーシスを抑制し、vWF や P-セレクトリン等の放出を調節して、血栓形成、血流障害、炎症反応を制御している可能性が考えられる。現在、血管内皮細胞への特異的導入を目指した新たな DDS を考案し、in vitro の有効性を検討している。

エクソサイトーシスは多様な疾患の病態に深く関わっている。従って、TAT-NSF ペプチドは、その発症病理に過剰なエクソサイトーシスが関わる様々な疾患の新しい治療薬として有効である可能性がある。今後、同ペプチドの可能性を多面的に検討する予定である。

#### 5. 発表論文

(発表論文)

- 1) Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Imamura T, Maruyama I, Noguchi T, **Matsushita K**: Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontol** 80:1511-1517, 2009.
- 2) Inomata M, Into T, Nakashima M, Noguchi T, **Matsushita K**: IL-4 alters expression patterns of storage components of vascular endothelial cell-specific granules through STAT6-and SOCS-1-dependent mechanisms. **Mol Immunol** 46:2080-2089, 2009.
- 3) Yamakuchi M, Ferlito M, Morrell CN, **Matsushita K**, Fletcher CA, Cao W, and Lowenstein CJ: Exocytosis of Endothelial Cells is Regulated by N-ethylmaleimide Sensitive Factor, Ed. Andrei Ivanov in: **Methods in Molecular Biology** 40:203-216, 2008.
- 4) Into T, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Häcker H, **Matsushita K**: Regulation of MyD88-dependent signaling events by S nitrosylation retards toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. **Mol Cell Biol** 28:1338-1347, 2008.
- 5) Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, **Matsushita K**: Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signaling. **Cardiovasc Res** 77:221-730, 2008.
- 6) Into T, Kanno Y, Dohkan JI, Nakashima M, Inomata M, Shibata KI, Lowenstein CJ, **Matsushita K**. Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. **J Biol Chem** 282:8134-8141, 2007.

【図表】

Table 1 NSF polypeptides.

ID	Position	NSF Sequence	Rationale
TAT-NSF57	57-77	GSVAFSLPQRKWAGLSIGQE	R67E SNAP binding
TAT-NSF81	81-101	ALYSFDKAKQCGTMTIEID	C91 NO Target
TAT-NSF222	222-243	LDKEFNSIFRRAFASRVFPPE	Disassembly
TAT-NSF254	254-274	KGILLYGPPGCGKTLARQIG	C264 disassembly Comatose mutant G260
TAT-NSF700	700-720	LLDYVPIGPRFNSNLVQLALLVL	Hexamerization mutants

All TAT-NSF fusion polypeptides contain the TAT domain YGRKKRRQRRR followed by a linker GGG followed by a unique NSF domain. The NSF domains were selected based upon studies of the structure and function of NSF.

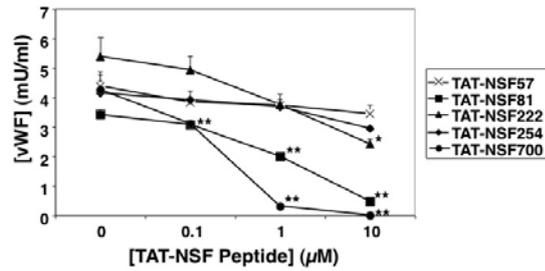


Figure 1. TAT-NSF peptide inhibition of exocytosis. HAEC were pre-treated with TAT-NSF peptides for 20 min, and then treated with thrombin, and the amount of vWF released into the media was measured by an ELISA (n = 3 ± S.D. \*P < 0.05 vs. 0 μM, \*\* P < 0.01 vs. 0 μM).

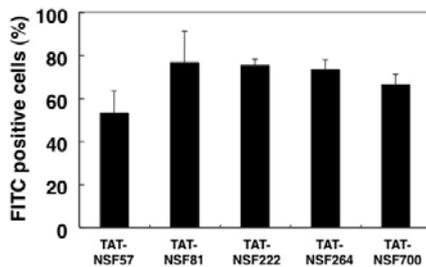


Figure 2. TAT-NSF peptide entry into cells. Cells were incubated with 10 μM FITC labeled TAT-NSF peptides for 20 min, treated with ethidium bromide to quench extracellular FITC, and imaged by FACS (n = 3 ± S.D.).

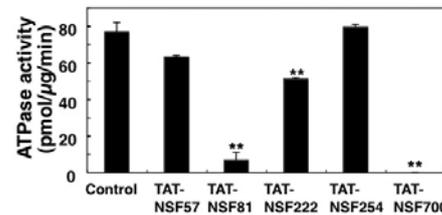


Figure 3. TAT-NSF peptide inhibition of NSF ATPase activity. A colorimetric assay was used to measure the ATPase activity of recombinant NSF that had been treated with 10 μM TAT-NSF peptides (n = 3 ± S.D. \*\* P < 0.01 vs. Control).

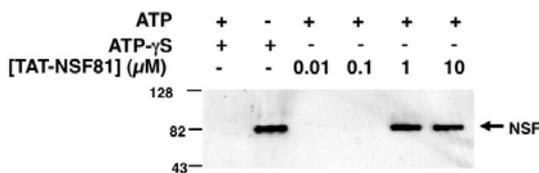


Figure 4. TAT-NSF peptide inhibition of NSF disassembly activity. (A) TAT-NSF81 inhibits NSF disassembly activity. Increasing amounts of recombinant NSF were pre-treated with TAT-NSF81 for 20 min, mixed with α-SNAP and SNARE fusion polypeptides as above. ATP was added, SNAREs were precipitated as above, and the precipitant was analyzed for the co-precipitation of NSF.

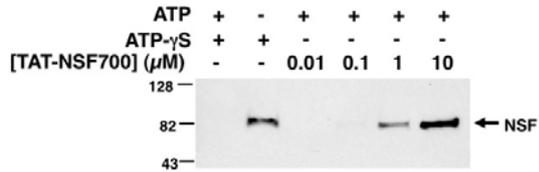


Figure 4. TAT-NSF peptide inhibition of NSF disassembly activity. (B) TAT-NSF700 inhibits NSF disassembly activity. Increasing amounts of recombinant NSF were pre-treated with TAT-NSF700 as above, and NSF disassembly activity was assayed as above.

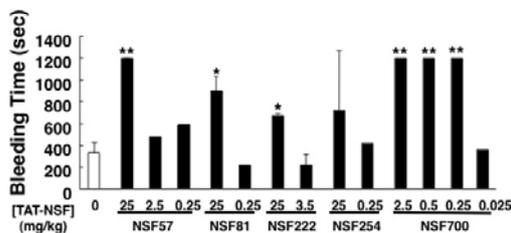


Figure 5. Effect of TAT-NSF peptides on bleeding time in mice. Mice were injected intravenously with PBS or the TAT-NSF peptides, and after 45 min the distal tip of the tail was amputated and the bleeding time was measured (n = 3 ± S.D. \*P < 0.05 vs. 0 mg/kg, \*\* P < 0.01 vs. 0 mg/kg). Bleeding longer than 20 min was scored as 20 min.