

研究テーマ：血清タンパク構造を利用した血栓溶解剤の創出	
研究代表者（職氏名）：教授 山田 學	連絡先 (E-mail等) : mannie@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者（職氏名）：教授 堀内 俊孝	

【研究の背景と目的】

本実験は、血清タンパクのマルチ機能としての血栓溶解作用に着目するもので、新たな血栓溶解物質開発を目指している。血清タンパクとしてはアルブミンとグロブリンを使用し、その血栓溶解機能（プラスミンおよびプラスミノゲンアクチベーターに対する作用増強効果、抑制効果）を測定、得られた結果からバイオインフォーマテックス技術によって機能と構造との関係を明らかにすると同時に人工的に合成したポリペプチドの血栓溶解作用を示す物質を確認することから、新規の医薬品や化粧品等の開発へと展開させたい。

【研究計画】

研究内容として以下の6項目について実施した。

- 1.線溶酵素に対する血清タンパクの効果
- 2.バイオインフォーマテックスによる血清タンパクの分解及び出現ペプチドのシミュレーション
- 3.合成ペプチドの線溶活性測定
- 4.線溶活性物質の反応性の確認
- 5.人工血栓を用いた線溶活性の評価

【これまでの研究成果】

1.線溶酵素に対する血清タンパクの効果

平成18年度実施した実験項目のうち、未実施であったtPAと血清タンパクとの関係について同様に検討した。血清タンパクとしては、ヒト・アルブミン、ヒト・ γ -グロブリン、IgG、IgMを用い、フィブリン標準平板法におけるtPA溶解能に対する血清タンパクの影響を測定した。その結果、アルブミンは前年度の試験と同様に抑制を、グロブリンでは γ -グロブリンとIgGが顕著にtPA活性を増強した。

2.血清タンパクの分解及び出現ペプチドのシミュレーション

本研究が血栓溶解促進物質の開発を主目標としていることから、血清タンパク類とプラスミン、tPA、UKに対する効果を検討してきたこれまでの結果について線溶増強効果という点からみると、グロブリン、IgGのtPAに対する効果が最も顕著であった。そこでグロブリンの血中濃度構成においてIgGが大半を占めているということも考慮し、IgGのアミノ酸構造をモデルとし、プラスミンによるIgG分解時に出現すると想定されるポリペプチドを表1に示した。しかし実際には、グロブリンが水に難溶であることや長鎖となることのために合成の難しいものが多数あり、今回はIgGの全てをカバーすることができなかった。

3.合成ペプチドの線溶

合成できた19種の濃度変化させたペプチド（ $1-10^{-7}$ mM）溶液と200 IU/mLのtPA溶液との同量混合液の線溶能をフィブリン標準平板法で測定し、最も活性が高かったところの活性値等を表1に示した。

表1 フィブリン標準平板法による合成ペプチドのt-PA活性に対する活性増強効果

ペプチド	最適終濃度 mM	ペプチド濃度 g/L	検体の溶解面積 mm ²	対照の溶解面積 mm ²	効果 %
PK-25	10 ⁻³	2.87	133.4±21.7	32.6±3.9	409.2
PK-11	10 ⁻⁶	1.23 x 10 ⁻³	95.7±16.1	45.8±14.7	209.0
QK-25	10 ⁻¹	272.68	128.9±31.4	40.3±9.7	319.9
LK-8	10 ⁻¹	85.51	170.1±13.7	36.4±10.1	467.2
AK-7	10 ⁻⁶	7.17 x 10 ⁻⁴	113.4±18.9	50.0±8.6	226.8
AK-10	10 ⁻³	0.99	111.2±25.0	39.5±12.1	281.5
QK-5	1	589.61	116.9±48.4	43.0±5.8	271.8
YK-15	10 ⁻⁵	1.74 x 10 ⁻⁵	111.7±20.2	35.8±9.9	312.0
SK-18	10 ⁻⁴	2.04 x 10 ⁻³	117.8±20.5	48.0±6.9	245.4
AK-3	10 ⁻³	3.16 x 10 ⁻³	109.6±18.3	42.6±4.8	257.3
RK-25	10 ⁻¹	281.4	124.3±39.8	61.9±17.5	200.8
GK-22	10 ⁻²	25.64	117.2±26.3	40.1±8.1	292.3
GK-11	10 ⁻³	1.28	123.9±12.6	52.6±5.5	235.5
GK-12	10 ⁻¹	118.64	118.7±20.0	49.0±7.4	242.2
SK-14	10 ⁻¹	126.45	186.6±25.8	99.3±29.9	187.9
SK-25	10 ⁻⁶	2.62 x 10 ⁻⁵	185.6±28.8	93.9±14.6	197.7
PK-5	10 ⁻⁴	5.46 x 10 ⁻²	172.7±15.6	89.3±22.1	193.4
VK-4	10 ⁻²	4.89	174.7±26.9	77.3±21.2	225.9
VK-4-1	10 ⁻⁶	4.72 x 10 ⁻⁴	168.6±20.1	73.2±16.3	230.3

N=5,

表 1 に示した結果のうち、最も強い活性を示したLK-8 の濃度による活性変化は試験を行った $1-10^{-7}$ mMの全ての濃度で多少の溶解面積に差はあるが、対照とは明確な有意差が認められた。この傾向は全ての被検ポリペプチドで認められたことから、t-PA活性増強効果の発揮には全ポリペプチドに共通する構造があると考えられ、その共通性とはC末端側のリジンにあると推測される。

3. 合成ポリペプチドの相同性

これまでの試験結果から、t-PA の増強効果の高かったヒト・ヘモグロビンのβ鎖をモデルに合成したポリペプチド3種と今回合成したペプチドとのアミノ酸構成上の相同性について LALIGN/PLALIGN (FASTA program by W.R. Pearson & U of Virginia) を用いて検討した。活性の最も高かったLK-8でみると、比較対照とした3種のヒト・ヘモグロビンβ鎖由来の合成ポリペプチドとの間に相同性あるいは類似性が認められ、このアミノ酸組成は他の合成ペプチドとの比較において、出現することはなかった。LK-8以外にもSK-18、RK-25、SK-25にも類似する構造を認めたが、いずれもt-PA増強効果が顕著なペプチドではないので、t-PA増強機能と関連するものではないと思われた。

4. 人工血栓を用いた線溶活性の評価

血栓溶解剤の開発には、その薬効を端的に評価する試験法が必要であるが、簡便で精度の高い方法がないのが現状である。特に、ポリペプチドは体内変化を受けやすい物質と考えられており、出来る限り体内環境に近い試験法でなければ説得力がない。本試験において多量のサンプルを評価するには、本試験中に新たな評価法を開発を組み込まなければならなかった。今回検討したガラス管—ピペットチップ法の加温時間が18時間の場合の試験結果を示した。被検溶解物質はt-PAとLH25である。また、LH25の反応性がCaCl₂の存在で影響を受けるかという点についても検討した。本試験法では血塊重量の変化から算出する溶解率(%)、血塊が測定時間内にピペットチップ内を移動する距離(mm)、溶解液中のヘモグロビン量(g/dL)の3項目での評価を試験した。結果は表2に示したが、LH25とt-PAでは溶解率(%)、移動距離(mm)、ヘモグロビン量(g/dL)の全ての評価項目において溶解を示した。しかし、CaCl₂を加えた場合は、溶解率と移動距離に有意差は認められなかった。この傾向は加温時間を短縮すると更に顕著になったことから、ヘモグロビン量と他の2つの評価法との間には、血塊溶解に何らかの差のあることが考えられたことから、走査型顕微鏡による形態学的な検討を行い、フィブリン線維径の太さが切断時間と関係することを明らかにした。

表 2 ガラス管—ピペットチップ法における血塊溶解能の評価と比較

Reagents	Lysis rate (%)	Moved distance (mm)	Hb volume (g/dL)
Saline	18.50±6.65	2.43±0.28	0.77±0.55
CaCl ₂	21.54±15.31	3.26±1.08	1.28±0.62
LH25	31.65±10.69 *	3.38±0.67 *	3.07±0.98 *
LH25+CaCl ₂	36.28±19.44	3.31±0.63	3.35±0.89 *
t-PA	52.84±17.05*	5.41±1.44**	4.96±1.62 **

LH25 : 10-11 g/L, CaCl₂ : 2 mM (Final concentration), tPA : 200 IU/mL

* p<0.05, ** p<0.01, Incubation time: 18 hrs

【結論】

ヒト血清タンパクの線溶系への影響について検討した。アルブミンは強い抗Pln作用を、グロブリンは線溶増強作用を特徴としていたことから、本実験では最終目的である血栓溶解性物質を見出すということに主眼を置いて、平成19年度は線溶増強作用に着目して試験を進めた。中でもγ-グロブリンとIgGがtPAの作用を増強することが判明したことから、構造が明らかとなっているIgGとtPAの関係を集中して検討した。その結果、C末端がリジンで、構造中に特定のアミノ酸の組み合わせを持つものが、tPAの作用増強に効果的であった。また、血栓溶解剤の評価試験法として今回開発したガラス管—ピペットチップ法はこれまでにない多くの利点を持った測定法と判明したので、合成したポリペプチドの評価に、利用できることが明らかとなった。以上の結果より、アルブミンおよびグロブリン分子が線溶機能に影響を示すことが明らかとなり、特に合成ペプチドのtPA活性増強機能に特定のアミノ酸配列があること、血栓溶解剤のin vitroでの新たな評価法を開発しえたことで、本年度の研究目標はほぼ達成できたと考えている。

【今後の計画と見通し】

本研究の結果から明らかになった血塊溶解におけるフィブリン線維径の影響、血塊の構造的特徴については、平成20年度の当研究室の研究課題として実施中である。今回の研究成果のうち、t-PA活性増強機能を示した特定のアミノ酸配列の特異性については、速やかに検討して結論を出さねばならない。新たに開発した血栓溶解剤のin vitroでの評価法については、共同研究者とも合意できたので、公表準備中である。また、本法を用いて合成ペプチドの有効性も検討しなければならない。合成ペプチドの機能については、t-PA以外の線溶剤との機能的関係についても更に精査する必要がある。