

抗菌ペプチドと血管新生

中神 啓徳¹ 金田 安史¹ 森下 竜一²

要 旨：抗菌ペプチドは広範囲な抗菌活性を有する15～45個程度のアミノ酸からなる短いペプチドで、自然免疫の一翼を担っているとされている。これまで報告された抗菌ペプチドの種類は数百にも上るが、cathelicidinとdefensinが最も代表的な抗菌ペプチドである。興味深いことにcathelicidinの中には副次的に血管新生能を有するペプチドも存在している。われわれは遺伝子機能スクリーニングの中で偶然に新規の抗菌ペプチドを同定し、現在創傷治療薬としての応用を目指している。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 437-440)

Key words: antimicrobial peptide, angiogenesis, endothelial cells, cathelicidin, defensin

抗菌ペプチドは広範囲な抗菌活性を有する20～40個程度のアミノ酸からなる短いペプチドで、自然免疫の一翼を担っている。種を超えて保存されており、皮膚や好中球などに存在して外敵に対するfirst-line defenseとして機能しているとされている。これまで報告された抗菌ペプチドの種類は数百にも上るが、cathelicidinとdefensinが最も代表的な抗菌ペプチドである。興味深いことにcathelicidinの中には副次的に血管新生能を有するペプチドも存在している^{1,2)}。本総説では、血管新生能を有するcathelicidinに関して概説し、さらにわれわれが同定した新規抗菌ペプチドに関して紹介する。

血管新生能を有する抗菌ペプチド

抗菌ペプチドの構造的特徴として、positive chargeのアミノ酸を多く配する一方でhydrophobic sideとhydrophilic sideの両面を有する、いわゆる両親媒性という特徴がある。代表的な抗菌ペプチドであるcathelicidin(LL-37)の構造も、cationicなアミノ酸とhydrophobicなアミノ酸が偏在する両親媒性構造をとる(Fig. 1)。ブタの皮膚・好中球から単離されたcathelicidinはprorine/arginine (PR)-39と命名され³⁾、ヒト由来のものはhcap18/LL-37と名付けられた⁴⁾。LL-37の発現は皮膚の炎症部位に多いことも観

察された。このLL-37はCAMP遺伝子由来でprocessingによって産生されるペプチドである。LL-37の前駆体からneutrophil proteinase-3によってprocessingされ、活性化型の抗菌ペプチドとなることが分かっている。これらの抗菌活性の機序としては主として細菌の細胞膜破壊と考えられている。興味深いことに、アトピー性皮膚炎患者ではLL-37の産生量が低いことなども報告されている。

LL-37は抗菌活性に加えて機能ホルモンのような多面的な作用として、好中球・単球・Tリンパ球の遊走への関与あるいは血管新生作用が知られている。これらの作用は自然免疫の一翼としての機能と考えられている。

次世代血管新生因子の探索によるAG-30の発見

われわれは次世代の血管新生関連因子の探索的研究として、遺伝子機能スクリーニングを行った。HVJ-Eを用いたわれわれの方法では、パッケージング細胞や特別なコンストラクトを必要としないため非常に簡便である特徴を有する。従来のレトロウイルスベクターを用いた方法は染色体ゲノムの中に遺伝子挿入ができるため長期遺伝子発現が可能なベクターとしてゲノムライブラリーのスクリーニングに汎用されてきた。しかし、パッケージング細胞や特別なゲノムコンストラクトが必須であ

¹大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

²大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学

2008年5月30日受理

What is Antimicrobial peptide?

1. Small molecular weight proteins with broad spectrum antimicrobial activity against bacteria, viruses, and fungi.
2. Effector molecules of the innate immune system with antimicrobial and proinflammatory activities, serving as a first-line defense system, located in skin, neutrophil etc,
3. Some antimicrobial peptides are folded into an amphipathic α -helix with positively charged residues separate from hydrophobic residues

<p>Defensin structure: beta-sheet T cell chemotaxis Increase TNF-α and IL-1</p>

<p>Cathelicidins (i.e. LL-37, PR-39) structure: α-helix or β sheet wound healing angiogenesis mast cell chemotaxis</p>

Figure 1 The characteristics of antimicrobial peptides are described in this figure.

り、精製操作が必要になるなど極めて煩雑性が高く、候補遺伝子の同定のためにはPCRで断片を増幅し再度ベクターに組み込み濃縮操作を10~100サイクル繰り返す必要がある。一方、HVJ-EベクターへのcDNAライブラリーの封入は極めて簡便かつ迅速(10分程度)であり、速やかに細胞に遺伝子導入を行った後、細胞増殖能などのアッセイを行い活性の著しいwellの細胞よりプラスミドDNAを抽出できる。プラスミドDNAが染色体に組み込まれずに維持されるため、大腸菌に形質転換するだけの簡単な作業で単一コロニーにできる簡便さを有する(Fig. 2)。近年よく用いられているマイクロアレイによるスクリーニングでは病態における遺伝子発現の増減は分かっても個々の遺伝子の機能については改めて検討する必要があり、治療用遺伝子の探索という点ではわれわれのシステムは極めて迅速である⁹⁾。

われわれはこの方法を用いて血管内皮細胞の増殖に関与する遺伝子のスクリーニングを行った。成人ヒト心臓由来のcDNAライブラリーをHVJ-Eベクターに封入後、96wellの培養皿にseedingしたヒト大動脈由来の培養血管内皮細胞に遺伝子導入しMTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)アッセイを用いて細胞増殖能を検討し、増殖能の高いwellよりプラスミドDNAを単離することで増殖促進候補遺伝子群を得た。増殖活性と比例して活性化

することが知られているc-fosプロモーター活性を用いて絞り込みを行った結果、活性の高い候補遺伝子を得た(Fig. 2)。

われわれは上記のスクリーニングで得られた候補分子に対して更なる解析を加えて、最終的に血管新生作用を有する30個のアミノ酸からなるペプチドを発見するに至った。このアミノ酸配列は新規なものであり、50%以上の相同性を有する分子はなかったため、われわれはこのペプチドをAG (angiogenic peptide)-30と命名した。このペプチドを血管内皮細胞に添加すると、濃度依存性に細胞増殖能(MTSアッセイ)の増加、細胞遊走能(Boyden chamber法)の亢進、管腔形成(線維芽細胞との共培養系)の増加が認められた。さらにマウスの皮下にマトリゲルに封入したAG-30を投与したところ、対照群に比し著明な血管新生が確認された。このペプチドの構造予測解析では、alpha-helix構造を呈しながらhydrophobicなアミノ酸とpositive chargeのアミノ酸がそれぞれ偏在するユニークな構造が予想され、興味深いことにこれらは抗菌ペプチドに極めて特徴的な構造であった。

構造から抗菌ペプチドであることが予想されたため、われわれは様々な細菌に対する抗菌活性の評価を試みた。すると、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、さらには真菌(カンジダ)に対しても抗菌活性を有する極めて広範囲の活性を有することが分かった。

Functional gene screening based on HVJ-E

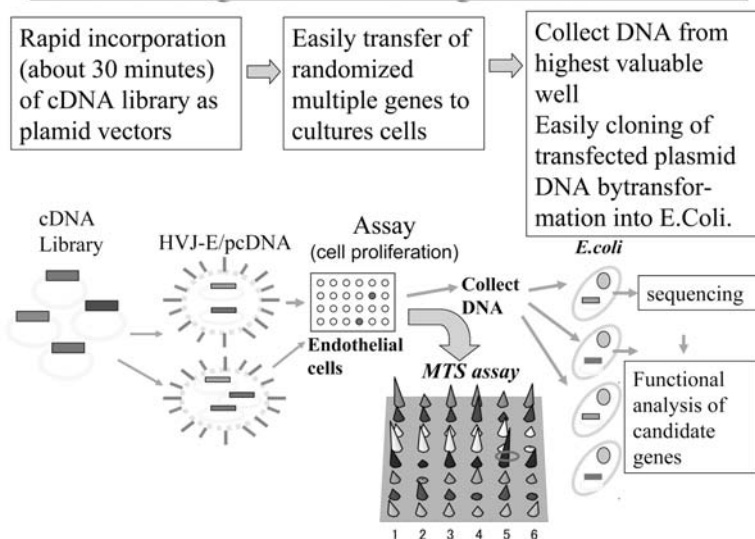


Figure 2 Scheme of functional gene screening based on HVJ-E.

Angiogenic and anti-bacterial effect of AG-30

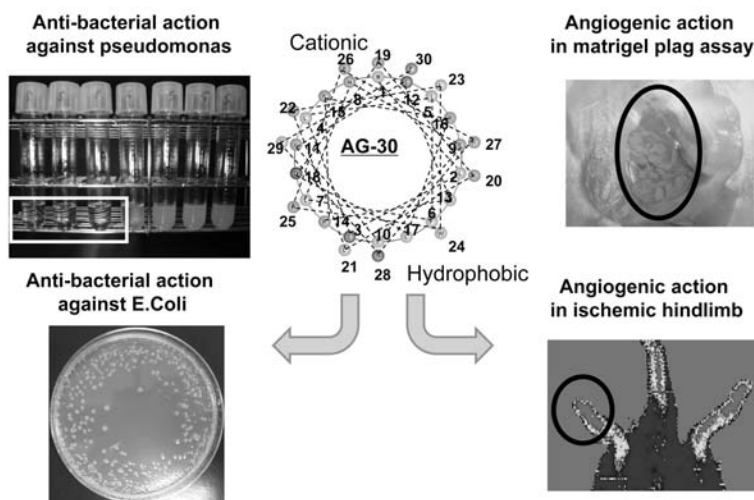


Figure 3 AG-30 possesses angiogenic and anti-bacterial action.

AG30の生体での血管新生作用の詳細な検討として、京都大学再生医科学研究所の田畑泰彦らが開発した生体分解性ゼラチンにAG30を封入したslow releaseの系を構築し、マウスの下肢虚血モデルの虚血患部に注入した。結果、AG30封入ゼラチン投与によって、下肢血流の有意な増加と微小血管数(capillary density)の増加が認められた⁶⁾(Fig. 3)。

AG-30を用いた臨床応用の展望

抗菌ペプチドの創薬化開発に関しては一般にこのような短いペプチドは体内で分解されやすいという特性もあり、全身投与可能な抗生剤の開発は困難であったが、近年外用薬、例えばががい薬や目薬などの局所投与の試みによる抗菌ペプチドを用いた創薬開発を目指した臨床

試験がいくつか試みられている。22個のアミノ酸からなる抗菌ペプチドmagaininを改変したpexiganan(Genaera, Plymouth Meeting, PA, USA)を外用剤として製剤化し、糖尿病性皮膚潰瘍の患者(835人)に既存の抗生剤であるofloxacin(タリビッド)の経口投与との併用でのPhase III試験を行い、90%の患者に対して改善を認めている⁷⁾。他にも、HIV患者に対し抗菌ペプチドのhistatinをうがい薬として用いて、カンジダ感染予防を調べた試験ではPhase I/IIを終了している⁷⁾。このような従来の臨床研究開発を参考に、今回われわれも外用剤として応用することで標的組織への作用を最大限にするとともに、もし体内に吸収されたとしても容易に分解されることでより高い安全性が得られると考えると、適応疾患を絞り込んでいる。その中でも感染あるいは血流不全は創傷治癒遅延の大きな要因であり、この両者を併せ持つAG-30ペプチドは創傷治癒に対して非常に高い治療効果が期待できると考えている。

文 献

- 1) Izadpanah A, Gallo RL: Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*, 2005, **52**: 381–390.
- 2) Boman HG: Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 2003, **254**: 197–215.
- 3) Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C et al: An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*, 2003, **111**: 1665–1672.
- 4) Li J, Post M, Volk R et al: PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med*, 2000, **6**: 49–55.
- 5) Nishikawa T, Nakagami H, Matsuki A et al: Development of high-throughput functional screening of therapeutic genes, using a hemagglutinating virus of Japan envelope vector. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**: 470–475.
- 6) Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, et al: Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Med*, 2009 (in press).
- 7) Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM: A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res*, 2005, **30**: 505–515.

Anti-microbial Peptide and Angiogenesis

Hironori Nakagami,¹ Yasufumi Kaneda,¹ and Ryuichi Morishita²

¹Division of Gene Therapy Science, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Division of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Key words: antimicrobial peptide, angiogenesis, endothelial cells, cathelicidin, defensin

Antimicrobial peptides are small molecular weight proteins with broad-spectrum antimicrobial activity against bacteria, viruses, and fungi. We identified a novel antimicrobial peptide with angiogenic property, named angiogenic peptide-30 (AG-30). AG-30 induced endothelial cell viability, migration, tube formation, and neovascularization, and its predicted structure was similar to antimicrobial peptide. Indeed, AG-30 showed the antimicrobial activity with a broad spectrum. AG-30 may be of clinical utility in promoting angiogenesis and antibacterial effect. (*J Jpn Coll Angiol*, 2008, **48**: 437–440)