

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドによる持続的な抗アナフィラキシー効果の検証
フリガナ	サトウ アキラ
代表者名	佐藤 陽
所属機関 (機関名) (役職名)	医療創生大学 薬学部 衛生薬学部門 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	1. Akira Sato, Takahiro Fukase, Keiichi Ebina, Biotinylated peptides substituted with D-amino acids with high stability as anti-anaphylactic agents targeting platelet-activating factor, J. Pept. Sci. 2023; 28; e3412. 2. 大平 慎, 佐藤 元汰, 小川 裕大, 根本 妃奈, 矢吹 彩乃, 蝦名 敬一, 松本 司, 佐藤 陽, D-アミノ酸含有ビオチン化ヘプタペプチドの抗アレルギー薬としての有用性, 日本薬学会第 143 年会, 2023 年 3 月 27 日, 札幌.

研究結果要約

血小板活性化因子 (PAF) は、アナフィラキシーの発症に関わる生理活性脂質として知られており、その活性を阻害することで致死的なアナフィラキシーを改善できる。最近私達は、生体内安定性に優れ、PAF との特異的結合能を有しその活性を抑制する D-アミノ酸含有ビオチニル化ヘプタペプチドを見出した。本研究では、このペプチドのアナフィラキシー治療薬としての開発・実用化を目指して、疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性を検証した。その結果、今回用いた 3 種類のペプチド (peptide 1~3) のうち、N 末端側のアミノ酸 (1 個) を D 体化した peptide 2 は、L 体アミノ酸のみからなる peptide 1、N 末端側 C 末端側の両アミノ酸 (計 2 個) を D 体化した peptide 3 と異なり、アナフィラキシーによる体温低下を劇的かつ持続的に抑制した。さらに、peptide 2 は、アナフィラキシーの病態形成に関わるマスト細胞における IgE 依存および非依存性の脱顆粒やロイコトリエン遊離を劇的に抑制に関与した。以上の結果から、今回用いたペプチドのうち、peptide 2 は、PAF 活性阻害のみならず、マスト細胞の作用を抑制することにより持続的な抗アナフィラキシー効果を示すと考えられた。今後はこの抗アナフィラキシー効果のさらなる作用機序を解明していく予定である。

研究目的

血小板活性化因子（PAF）は、アナフィラキシーの発症に関わる生理活性脂質として知られており、その活性を阻害することで致死的なアナフィラキシーを改善できる。最近私達の見出した D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドが、PAF との特異的結合能を有し、動物試験において PAF 活性を劇的に抑制すること¹⁾、アナフィラキシーショックによる体温低下を劇的かつ持続的に抑制することがそれぞれ明らかになった²⁾。このペプチドのアナフィラキシー治療薬としての実用化を目指すためには、実際に疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性などを評価し、臨床試験につなげていく必要がある。そこで本研究では、D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドを用いたアナフィラキシー治療薬の開発・実用化を目指して、疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性を評価した。

現在、PAF に関連したアナフィラキシー治療薬は未だ実用化されておらず、PAF 分子を標的とした薬剤は私達のペプチドの他に見出されていない。従って、本ペプチドは、PAF 分子を標的とした全く新しいタイプのアナフィラキシー治療薬として期待できると考える。また本研究によって、D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドがアナフィラキシーショックの各症状に対して長時間の持続効果を有することが明らかになれば、副作用も少ないため、従来の L-アミノ酸のみからなるビオチニル化ペプチドよりも臨床における高い有用性が期待できる。

研究計画及び研究手法

（1）D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドの作製

当初の計画では、既に PAF 分子との直接的・特異的結合を有し、動物試験において劇的な抗 PAF 活性を有する 2 つの D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドの peptide 2 およびその類似ペプチドを作製する予定であった。しかし、本研究を行う途中で、ペプチドの生体内安定性向上の観点から、peptide 2 の他、その C 末端側のアミノ酸も D 体にした peptide 3 を作成し、その対照とし

て、L 体アミノ酸のみからなる peptide 1 を作製した (図 1)。いずれのペプチドも、GL Biochem 社 (上海、中国) に合成をお願いした。

Peptide name	Sequence
Peptide 1	Lys(Biotinyl)-Trp-Tyr-Lys-Asp-Gly-Asp
Peptide 2	D-Lys(Biotinyl)-Trp-Tyr-Lys-Asp-Gly-Asp
Peptide 3	D-Lys(Biotinyl)-Trp-Tyr-Lys-Asp-Gly-D-Asp
YKDG	Biotin-Tyr-Lys-Asp-Gly
KKYG	Biotin-Lys-Lys-Trp-Gly
BP21	Biotin-Ile-Lys-Asn-Ala-Ser-Leu-Ser-Trp-Gly-Lys-Trp-Tyr-Lys-Asp-Gly-Asp-Lys-Asp-Ala-Glu-Ile

図1. 本研究で用いたビオチニル化ペプチドのアミノ酸配列

(2) アレルギーモデルマウスに対する全身性アナフィラキシーショックの誘導

卵白アルブミン (OVA) に特異的な IgE を恒常的に産生する遺伝子改変 BALB/c マウス (OVA-IgE マウス、雄性、8~12 週令、日本クレア株式会社より納入) に、アレルゲンのオボアルブミン (OVA) を注射して、全身性アナフィラキシーショックを誘導した。なお、本実験は遺伝子改変マウスを用いることから、申請者の所属機関の遺伝子組換え生物等委員会、動物実験委員会に本研究計画書などの書類を提出してそれぞれ審査・承認を受けた後、本学で定める規定に従って実施した。

(3) アナフィラキシーショックによる体温低下に対する D-アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドの有効性評価

上記 (2) で全身性アナフィラキシーショックを発症させたマウスに対し、当初の計画では各種ペプチド (100 nmol/mouse) を注射した後の体温、血圧および血管透過性を調べるとともに、既知 PAF 受容体拮抗薬との効果の比較を行う予定であったが、購入する予定だったマウスの価格の急騰により、マウスの購入匹数を大きく減らす必要があった。そこで今回は、アナフィラキシーショックによる体温低下に対するペプチドの効果を直腸温測定計を用いて調べた (アレルゲンの OVA 投与から 75 分間の直腸温を測定した)。ペプチドの持続的効果を調べる目的から、ペプチド (100 nmol/mouse) を投与してから 45 分後に OVA を注射して、上記と同様に、75 分間の直腸温を測定した。

さらに、ペプチドの生体内安定性を調べる目的から、Wistar 系ラット（雄性、8 週令、日本クレア株式会社より納入）の血漿を 37°C で 5 分間プレインキュベーションした後、peptide 1~3（各 135 μ mol/L）をそれぞれ混合して、さらに 37°C で各時間インキュベーションした後（in vitro での実験）、各時間後の血漿を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットを行った。具体的には、転写後のメンブレン上のペプチドを検出するため、ペプチド中のビオチンを HRP-ストレプトアビジンで標識化し、ECL 法により検出を行った。

（4）ビオチニル化ペプチドの抗アナフィラキシー効果の作用機序（メカニズム）の解析

この計画及び内容は、貴財団へ事前に研究内容変更の申請をし、承認を受けて行ったものである。具体的には、上記（3）における、アナフィラキシーショックによる体温低下に対するビオチニル化ペプチドの効果の作用機序を明らかにすることを目的として、アナフィラキシーショックなどの I 型アレルギーの病態形成に深く関与するマスト細胞における脱顆粒やロイコトリエン遊離に対するペプチドの効果を検討した。具体的には、ラット好塩基球性マスト細胞（RBL-2H3 細胞）に、各濃度のペプチド 1~3 を添加した後、細胞内外の β -ヘキソサミニダーゼの活性を測定することで脱顆粒の評価を行うとともに、ロイコトリエンの遊離を ELISA 法を用いて調べた。さらに、マスト細胞に対するペプチドの細胞毒性の有無については、Cell counting kit-8 (同仁化学研究所より購入)を用いて調べた。

結果と考察

（1）アナフィラキシーショックによる体温低下に対するビオチニル化ペプチドの効果

3 種類のビオチニル化ペプチド（peptide 1~3、図 1）を用いて、OVA によりアナフィラキシーショックを誘導したモデルマウス（OVA-IgE マウス）の体温低下に対するペプチドの効果を調べた。その結果、特に N 末端側の Lys を D 体化した peptide 2 が、L 体アミノ酸のみからある peptide 1、N 末端側の Lys と C 末端側の Asp の両方を D 体化した peptide 3 とは異なり、アナフィラキシーショックによる体温低下を劇的かつ持続的に抑制した（図 2）。さらに、この各種ペプチド（1~3）

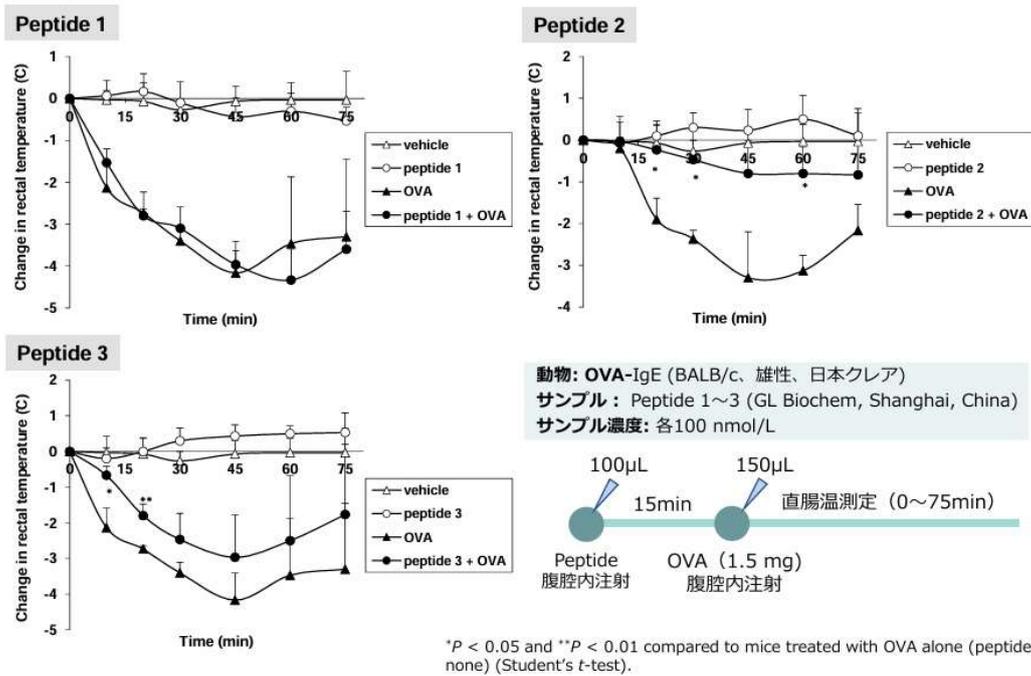


図2. アナフィラキシーによる体温低下に対するpeptide 1~3の効果

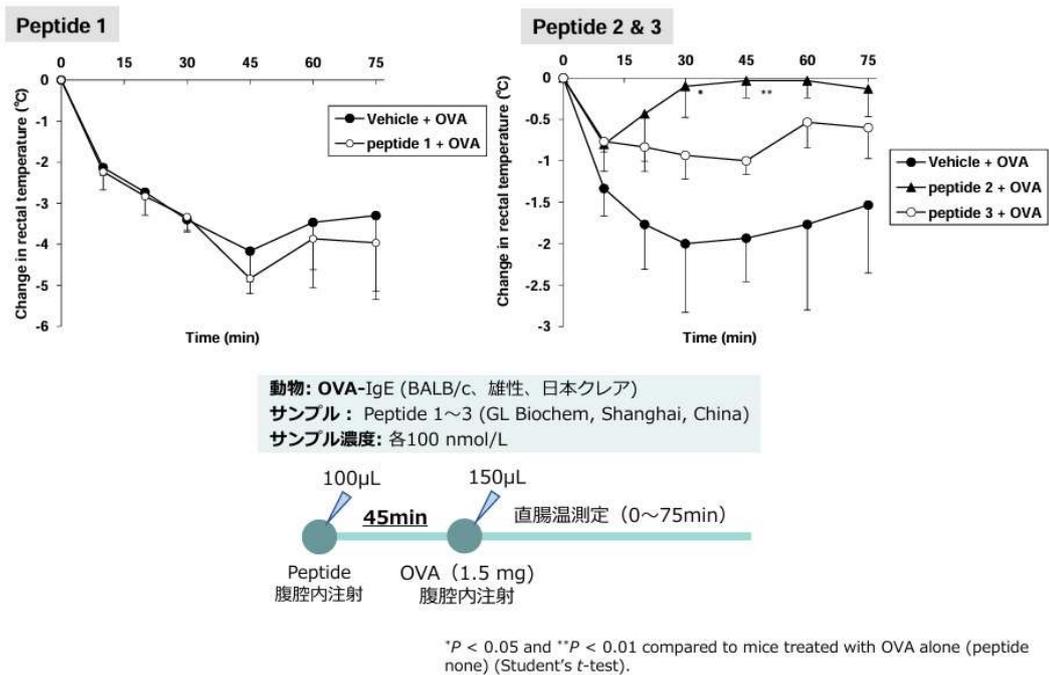


図3. アナフィラキシーによる体温低下に対するpeptide 1~3の持続的効果

を腹腔内へ投与してから45分後にアレルゲン OVA を投与することで、アナフィラキシーによる体温低下に対するペプチドの抑制効果の持続性を検討した結果、その体温低下に対し、特に peptide 2 は劇的に抑制したのに対し、peptide 3 はやや抑制する傾向にあり、peptide 1 は全く抑制しないことが明らかとなった (図3)。

さらに、上記に示したペプチドの持続的効果が、ペプチドの生体内安定性によるか否かを明らかにするため、これらペプチドの *in vitro* における血漿中安定性を調べた。その結果、各種ペプチドの血漿中安定性は、peptide 3 > peptide 2 > peptide 1 の順に高かった (図 4)。以上より、peptide 2 および peptide 3 の血漿中での高い安定性は、ペプチドに含まれる D 体アミノ酸の存在によると考えられた。

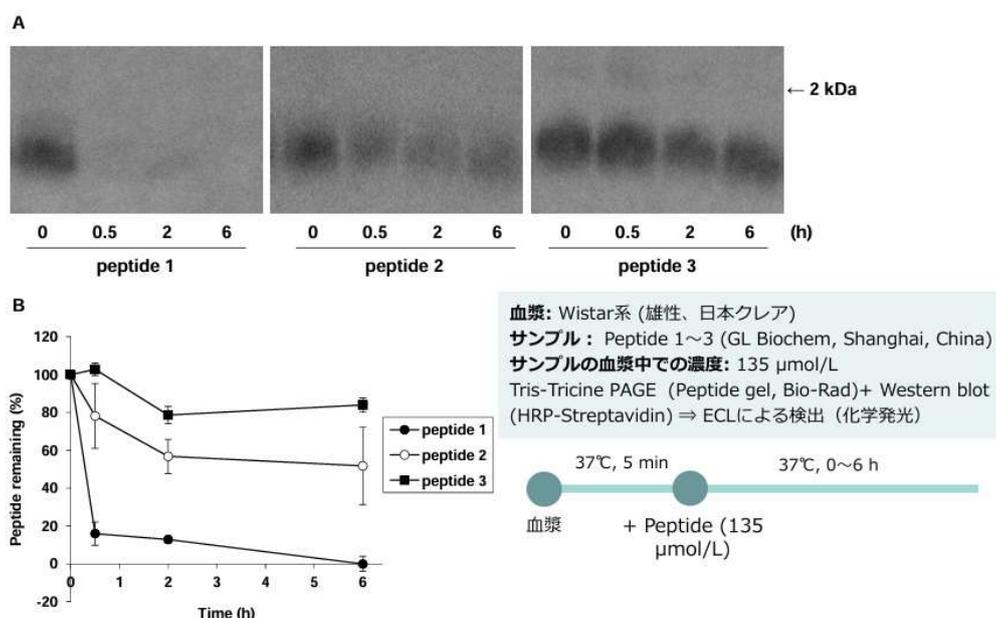


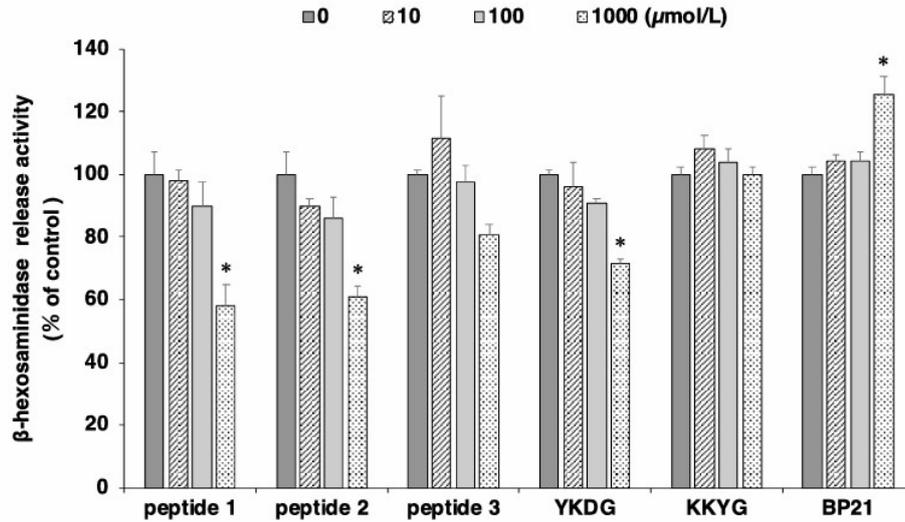
図4. ラット血漿中におけるpeptide 1~3の安定性 (*in vitro*での検討)

(2) ペプチドの抗アナフィラキシー効果の作用機序 (メカニズム) の解析

当初の研究計画では、モデルマウス (OVA-IgE) を用いて、アナフィラキシーショックによる体温低下のみならず、血圧低下や血管透過性に対するペプチドの効果を調べる予定であったが、モデルマウスの価格の急騰 (税抜 36,300 円/匹 \rightarrow 46,910 円/匹) により、ペプチドの抗アナフィラキシー効果の作用機序を調べる旨の研究内容変更を貴財団へ申請し、承認を受けた。

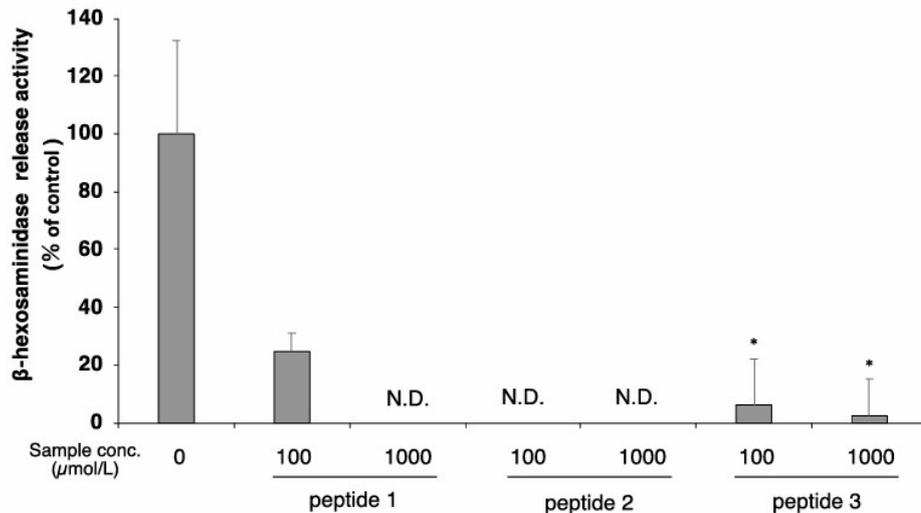
具体的には、アナフィラキシーショックの原因となるマスト細胞における IgE 依存および非依存性 (Compound 48/80) の脱顆粒およびロイコトリエン遊離に対するペプチドの効果をそれぞれ、 β -ヘキソサミニダーゼ活性を指標として、ELISA 法を用いて検討した。対照として用いたペプチドは、図 1 に示した。その結果、peptide 1~3 はいずれも、IgE 依存および非依存性 (Compound 48/80

刺激) による脱顆粒やロイコトリエン遊離を劇的かつ濃度依存的に抑制することがわかった (図 5~7)。また、peptide 1~3 はいずれも 1000 $\mu\text{mol/L}$ の濃度までは、マスト細胞に対する細胞毒性を示さなかった (図 8)。以上より、本ペプチドによる抗アナフィラキシー効果は、マスト細胞の脱顆粒や、ロイコトリエン遊離の阻害によって行われている可能性が考えられた。



* $P < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{mol/L}$ (ANOVA followed by post-hoc test).

図5. マスト細胞におけるIgE/Ag刺激による脱顆粒 (β -hexosaminidase遊離) に対するペプチドの効果



* $P < 0.05$ compared to 0 $\mu\text{mol/L}$ (ANOVA followed by post-hoc test).

図6. C48/80刺激によるマスト細胞の脱顆粒 (β -hexosaminidase遊離) に対するペプチドの効果

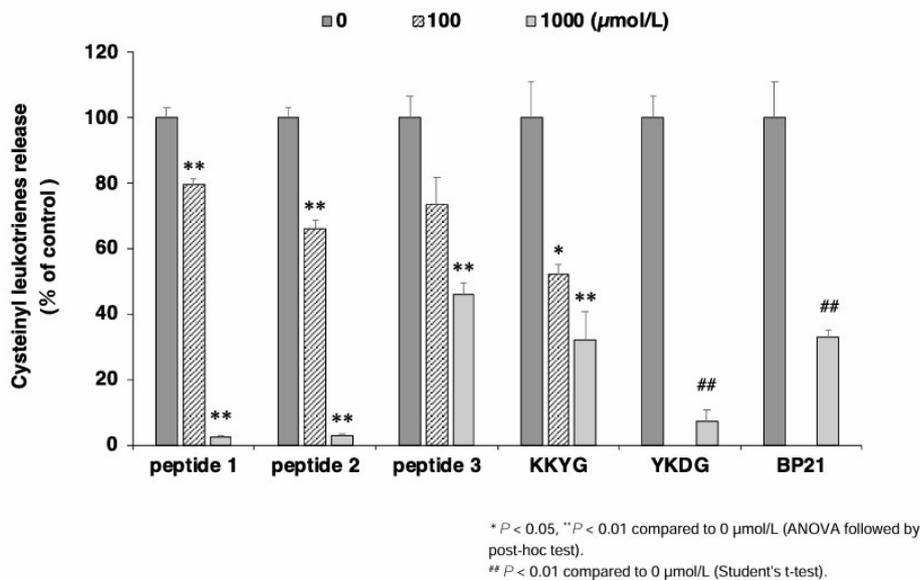


図7. マスト細胞におけるIgE/Ag刺激によるロイコトリエン遊離に対するペプチドの効果

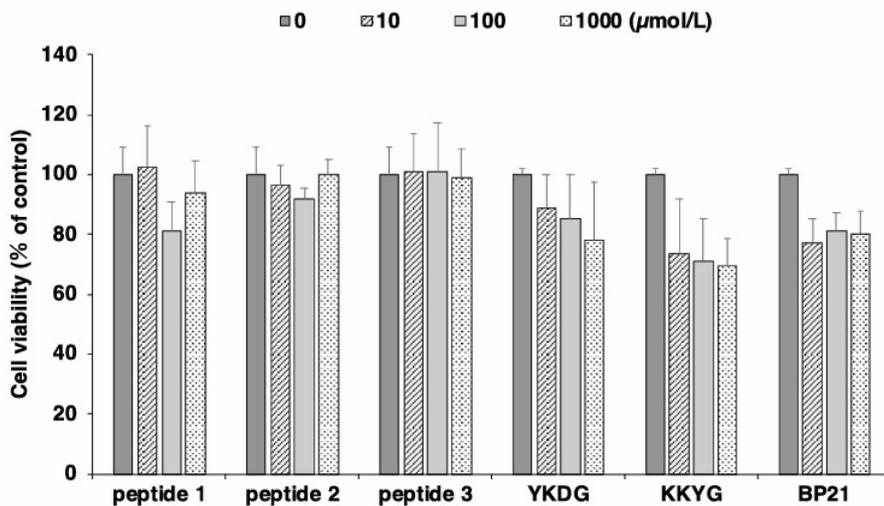


図8. マスト細胞におけるペプチドによる細胞毒性の検討

(3) 助成期間後に残された課題

今回、モデルマウス (OVA-IgE) の価格の高騰により、当初の計画通りの実験を行うことができなかった。それにより、ペプチドは、アナフィラキシーによる体温低下に対して有意かつ劇的な阻害効果が得られたものの、血圧低下や血管透過性亢進に対する効果についてはまだ不明なままである。さらに、アナフィラキシーショックの発症に重要なマスト細胞における脱顆粒などに対するペプチドの効果を調べた結果、ペプチドは今回行ったマスト細胞により起こるアレルギー反応のい

れも抑制した一方で、マスト細胞の膜安定化の可能性やヒスタミン拮抗作用の有無など調べるべき点が多く残されている。

(4) 学会や論文発表等の予定

本研究成果については、2022年10月、この成果の内容の一部をまとめた論文「Biotinylated peptides substituted with D-amino acids with high stability as anti-anaphylactic agents targeting platelet-activating factor」が Journal of Peptide Science に掲載されるとともに（実際には、本研究助成の採択を頂く前に論文を投稿している）、2023年3月には、さらに研究成果をまとめて、日本薬学会第143年会（札幌）でポスター発表を行った。現在、このペプチドによる抗アナフィラキシー効果のメカニズムについて、複数の他大学との共同研究を進めており、新たな研究成果が得られつつある。今後はこれらの研究成果をまとめて、対外的な発表（学会・論文発表など）を行いたい。

今後の研究活動について

前述4.の通り、現在、D体アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドによる抗アナフィラキシー効果のメカニズムについて、複数の他大学との共同研究を進めている。具体的には、アナフィラキシー以外の複数のI型アレルギー疾患のモデル動物や関連細胞を用いて、ペプチドによる抗アレルギー効果を調べており、新たな研究成果が得られつつある。一方、本研究の当初の計画であった、アナフィラキシーショックによる血圧低下や血管透過性亢進に対するペプチドの効果についても調べて行く必要がある。今後、私達はペプチドの抗アナフィラキシー薬としての実用化を目指して、私達、そして他大学との共同研究により、このペプチドの抗アナフィラキシー薬としてのさらなる有用性を明らかにしたい。

また、本研究成果について日本薬学会以外の学会（日本アレルギー学会など）、各種イベントでの出展（例えば、イノベーション・ジャパン、BioJapanのような企業・他研究機関とのマッチングイベント）などを通じて対外的に発表することも検討しているところである。

参考文献

- 1) Sato A, Yokoyama I, Ebina K. Biotinylated heptapeptides substituted with a D-amino acid as platelet-activating factor inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2015 Oct;764(1-3):202-7.
- 2) Sato A, Ebina K. A biotinylated peptide, BP21, as a novel potent anti-anaphylactic agent targeting platelet-activating factor. *J Pept Sci.* 2017 Sep;23(9):727-35.

以上