

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 伊藤 千嘉子 印/署名

2. 養成カリキュラム名：細胞組織工学、バイオメディカル的アプローチによるヒト細胞を含む動物細胞を利用した新しいハイブリッド型人工臓器システムの研究

3. 養成カリキュラムの達成状況

本カリキュラムは、動物細胞（ヒト細胞を含む）を利用した実用化システムを開発することを目的として、肝細胞増殖因子の一つである FGF（繊維芽細胞増殖因子）の制御物質を解明することにより、その実用化を目指した研究開発を行った。

具体的には、FGF-5 の部分ペプチドが FGF-5 阻害作用を有し、新しいメカニズムに基づき脱毛症に効果があることが動物モデルで確認された。また、FGF-5 部分ペプチドをさらに検討し、この部分ペプチドより約 20 倍阻害作用の強いペプチドを得た。さらに得られたペプチドの作用を解析し、FGF-5 に対して特異性が強いこと、また、その阻害メカニズムは、FGF-5 のレセプターへの結合を阻害することにより FGF の細胞内シグナル伝達を阻害することにあることを明らかにした。

また、これら研究過程において、FGF 制御物質の新たな評価システムとして、レセプター結合活性とレセプターシグナル伝達の制御の測定系を構築した。

他、別の FGF-5 アンタゴニストペプチドの糖鎖付加体の FGF-5 阻害活性とプロテアーゼ抵抗性を検討し、糖付加により活性を低下させずにプロテアーゼに対する抵抗性を高められること、すなわち生体内での安定性を高められる可能性が得られた。

4. 成果（A4版3枚程度）

（1）まず、ハイブリッド型人工肝として応用の可能性の高いブタ肝臓実質細胞の増殖と機能発現を hepatocyte growth factor (HGF)、epidermal growth factor (EGF)、アスコルビン酸の作用より検討した。増殖は MTT 活性を指標とし、機能発現は、アンモニア代謝能、アルブミン産生能を検討した。EGF、HGF により、肝細胞は明らかに増殖し、その作用はアスコルビン酸により強められた。EGF、HGF の増殖作用の相加効果も認められた。アンモニア代謝能は、EGF、HGF にアスコルビン酸を加えることによりコラーゲンコートした 24 穴プレートで二週間安定だった。HGF によって誘導されたアルブミン産生は、DMEM 培地で細胞を培養した時 EGF には認められず、アスコルビン酸により増強された。Williams'E 培地で細胞を培養した場合は、EGF もアスコルビン

酸で増強されるアルブミン産生を誘導した。

アスコルビン酸により、EGF、HGF の増殖作用、機能発現の顕著な増強が認められること、HGF は EGF に比べて高い機能発現作用があることがわかった。

(2) 肝細胞増殖因子の一つである FGF (繊維芽細胞増殖因子) の作用を研究中、FGF は毛包細胞の成長を抑制し、そのアンタゴニストとして見出した FGF の部分ペプチドがこれを回復することを見いだしてきた (特許 2) (文献 1) in vivo でヒト FGF-5 による毛成長阻害をアンタゴナイズする部分ペプチド No.11 は、FGF-5 の過剰作用抑制という新しいメカニズムをもつため、従来では解決できなかった脱毛症に効果をもつことが期待される。そこで FGF-5 アンタゴニストを FGF-5 の部分ペプチド、低分子化合物から広く探索するために必要なペプチドの生体内での安定性、機能維持の向上、FGF-5 レセプター結合活性 (レセプターへの特異性) を調べることに、ペプチド No.11 の最適化を目的として以下の 5 点について検討した。

(I) 活性ペプチドの生体内での安定性、機能維持の向上を目的として、No.11 以外のアンタゴニストペプチド No.1 の糖付加体の機能とプロテアーゼ抵抗性を検討した。

< 方法 > (1) アミノ酸 15 個から成るペプチド No.1 は、ペプチド合成機で合成後 HPLC で分取し、収率 39% でペプチドを得た。N-グリコシドペプチドのうち、GlcNAc-15AA は、Fmoc-Gly-Resin 0.25 mmol、Fmoc-(trio-acetyl GlcNAc)-Asn 0.25 mmol、その他のアミノ酸 1.0 mmol、Tyr (GlcNAc-Asn の次)のみダブルカップリングでペプチド合成機を用いて合成し HPLC で分取し、収率 21% で糖ペプチドを得た。11suger-15AA は、GlcNAc-15AA 25.8 mg に Lys-Val-Ala-[complex type sugar chain]-Asn-Lys-Thr (太陽化学より購入) 316 mg と Endo M (キリンビールより供与) 73 mU を 0.06M K-phosphate, pH 6.25/0.05M EDTA の条件で 37 °C、1 時間反応後 HPLC 分取し、収率 55% で糖ペプチドを得た。O-グリコシドペプチドのうち、GalNAc-15AA は、Fmoc-Gly-Resin 0.25 mmol、Fmoc-(tri-O-acetyl GalNAc)-Ser 0.25 mmol、その他のアミノ酸 1.0 mmol、Ala (GalNAc-Ser の次)のみダブルカップリングでペプチド合成機で合成後 HPLC で分取し、収率 28% (133 mg) の糖ペプチドと脱アセチル化の不十分な副産物 28 mg を得た。GalGalNAc-15AA は、Gal-β-pNP 75 mg、GalNAc-15AA 95 mg、レコンビナント β-Galactosidase (Bacillus circulans, 70 U/ml) 57 μl (5 U) を 0.1M K-phosphate, pH 6.0/10% DMF の条件で 37 °C、1.5 時間反応後 HPLC 分取し、収率 8% (11.5 mg) で糖ペプチドを得た。なおこの時、未反応の GalNAc-15AA が 71.6 mg 回収された。SAGalGalNA-15AA は、CMP-NANA 10.2 mg、β-2,3-(O)-sialyltransferase (rat liver) 0.04 U、Gal-GalNAc-15AA 10.0 mg を 0.05M Cacocylate, pH 6/(1 mg/ml) BSA/0.1% Triton X の条件で 37 °C、1.5 時間反応後加熱処理により酵素を失活させ、HPLC 分取し、収率 8.0% で糖ペプチドを得た。

(2) 合成したペプチドとその糖付加体の FGF-Receptor1c を強制発現させた Ba/F3 細胞 (R1c/Ba/F3 細胞) の FGF-5 による増殖促進に対する阻害としてアンタゴニスト活性は、R1c/Ba/F3 細胞 5×10^4

cells/well、recombinant human FGF-5 1.5×10^{-9} M、heparin 5 μ g/ml、peptides $\sim 10^{-3}$ M /100 μ l を 96 穴プレートで 3 日間培養し、Cell Counting Kit-8 (Wako) で FGF-5 による細胞増殖促進活性を測定して、各糖ペプチドによる阻害率を求めた。なおコントロールとして、FGF-5 の代わりに recombinant mouse IL-3 3.3×10^{-18} M による細胞増殖促進活性に対する阻害活性を求めて比較した。

(3) 5 種のプロテアーゼ (エラスターゼ、Protease VIII、Proteinase K、ロイシンアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ) による糖ペプチドの加水分解は、ペプチド 75 μ l とプロテアーゼ 37.5 μ l を混合して 37 $^{\circ}$ C、0、0.5h、1.0h、3.0h、6.0h、24h 反応後に 10 μ l づつサンプリングしてプロテアーゼを加熱により失活させ、10 μ l の水を足してマイレックスフィルターでろ過後、HPLC で測定して求めた。

< 結果 > Ba/F3 細胞の FGF-5 による増殖促進に対して、いずれの糖付加ペプチドも元のペプチドと同等以上のアンタゴニスト活性を示した。また、5 種のプロテアーゼ (エラスターゼ、Protease VIII、Proteinase K、ロイシンアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ) による加水分解の受け易さを比較したところ、*N*-および *O*-グリコシド型糖ペプチドの双方の糖ペプチドで、糖鎖が長くなるとともに加水分解を受けにくくなることが明らかになった。

(II) FGF-5 アンタゴニスト活性を測定する実験系として、BALB/c3T3 繊維芽細胞株 A31 の DNA 合成の FGF-5 による促進活性のアンタゴニズ活性測定系、FGF レセプター (FGFR1c) を強制発現させた Ba/F3 細胞の FGF-5 による増殖促進活性のアンタゴニズ活性測定系のみならず、ペプチド、化合物アンタゴニストの FGF-5 レセプター結合活性 (レセプターへの特異性) を調べるために、FGF-5 結合活性のあるリコンビナント FGF レセプター-FGFR1c をコートしたプレートを用いたアンタゴニスト活性測定系を新たに構築した。

< 結果・結論 > FGFR1c 反応活性のある FGF-1、FGF-2 結合活性が検出される FGF-5 レセプター結合活性測定系が構築された。FGF-5 部分ペプチドのみならず、FGF-5 による細胞増殖阻害活性のある低分子化合物の FGF レセプターに対する特異性の評価が可能になった。(特許 3)

(III) FGF-5 のアミノ酸配列を基にペプチド No.11 周辺の FGF-5 部分ペプチドのアンタゴニスト活性をさらに詳しく検討した。その結果、No.11 より細胞増殖阻害活性、レセプター結合阻害活性において IC₅₀ で約 20 倍以上阻害活性の強いペプチドを得ることができた。(特許準備中)

(IV) FGF-5 アンタゴニストペプチドの FGF-5 阻害活性の特異性を検討する目的で、アンタゴニストペプチドの PDGF (血小板由来増殖因子) や EGF (上皮細胞成長因子) による NIH/3T3 細胞増殖活性に対する阻害活性を検討した。

< 方法 > NIH/3T3 細胞 (8×10^4 cells/ml) 200 μ l を 48 穴プレートで 24 時間培養し接着した細胞を洗浄し、0.1% BSA/DMEM 培地で 24 時間 serum starvation 後、recombinant human FGF-5 (1.5

$\times 10^{-9}\text{M}$)あるいは PDGF($3.7 \times 10^{-9}\text{M}$)、EGF($3.3 \times 10^{-9}\text{M}$)と heparin $5 \mu\text{g/ml}$ を加え、さらに 48 時間培養し、細胞増殖活性を Cell Counting Kit-8 (Wako)で測定して、各々ペプチドによる阻害率を求めた。

<結果> 50-200 μM でペプチドは、FGF-5 に対して 43-58%の阻害活性を示した。一方 PDGF、EGF に対しては 200 μM まで本ペプチドはまったく阻害活性を示さなかった。

<結論> 以上の結果から得られたペプチドは FGF-5 に対して特異性の高いアンタゴニストであることがわかった。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

1. Chikako Ito, Yuko Saito, Yasuko Fujita, Yoshimitsu Yamazaki, Toru Imamura, Syuichi Oka, and Satoshi Suzuki. "A decapeptide with fibroblast growth factor(FGF)-5 partial sequence inhibits hair growth suppressing activity of FGF-5": *Journal of Cellular Physiology* 197:272-283 (2003)
2. Katsumi Ajisaka, Mariko Miyasato, Chikako Ito, Yasuko Fujita, Yoshimitsu Yamazaki, and Syuichi Oka. "Linkage of sugar chains to a fragment peptide of FGF-5S by a chemoenzymatic strategy and changes in the rate of proteolytic hydrolysis": *Glycoconjugate J.*, 18(4)301-308 (2001)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

1. Chikako Ito, Toru Imamura, and Syuichi Oka "Biological activity of fibroblast growth factor(FGF)-5 antagonist." *New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach* (国際シンポジウム)
2. 伊藤千嘉子、今村亨、宮里真理子、鰐坂勝美、児玉亮、岡修一 「糖鎖付加による FGF-5 アンタゴニストペプチドへのプロテアーゼ抵抗性の付与」 第 75 回日本生化学会 (10. 2002 京都)
3. Ajisaka K., Ito C. and Oka S. "Chemoenzymatic synthesis of sialyl T-antigen-linked pentadeca-peptide and characterization." 第 21 回 International Carbohydrate Symposium (7. 2002 オーストラリア)
4. 岡村愛、芝良昭、楊大為、小山寿恵、伊藤千嘉子、児玉亮 「アスコルビン酸 2 - リン酸存在下における肝実質細胞に対する増殖因子の影響」 第 9 回肝細胞研究会 (7. 2002 秋田)
5. 伊藤千嘉子、藤田康子、鶴田明稚、山崎幸苗、今村亨、浅田眞弘、米田敦子、斎藤優子、

鈴木聡、岡修一 「FGF-5 (繊維芽細胞増殖因子-5) の一次構造中の活性ペプチドの同定」
第 74 回日本生化学会 (10. 2001 京都)

6. 斎藤優子、鈴木聡、今村亨、伊藤千嘉子、藤田康子、岡修一 「FGF-5 の部分ペプチドは FGF-5 による毛成長阻害作用を antagonize する。」 第 74 回日本生化学会 (10. 2001 京都)
7. Saitoh Y., Suzuki S., Imamura T., Ito C., Fujita Y. and Oka S. “ The partial peptide of FGF-5 antagonizes the inhibitory effect of FGF-5 on the hair growth. ” 第 26 回日本研究皮膚科学会 (9. 2001 愛媛)

(3) 特許等 : 3 件