

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10248

研究課題名(和文) 5-ALAの細胞老化抑制効果を応用した閉塞性動脈硬化症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new therapy for the arteriosclerosis obliterans applying cellular senescence suppressive effect of 5-ALA

研究代表者

平林 葉子 (Hirabayashi, Yoko)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：90341106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性動脈硬化症(ASO)の原因である血管内皮細胞障害を抑える有効な治療薬は無い。5-アミノレブリン酸(ALA)はミトコンドリアにおけるエネルギー産生に必須で、細胞の老化に深く関わっている。最近ALAが酸化ストレスと臓器障害の発生を抑えることが示された。本研究はALAによる血管内皮障害と動脈硬化の抑制効果を示すことを目指した。動脈硬化モデルマウスにALAを与え、動脈硬化抑制効果を検証したが、血中コレステロール値、動脈硬化、血管内皮細胞障害に明らかな抑制効果は認めなかった。マウス血清中酸化LDL値を測定するため、酸化ホスファチジルコリンに対する抗体を用いた高感度ELISAシステムを導入した。

研究成果の概要(英文)：There is not the effective therapeutic drug suppressing the vascular endothelial cells injury which are a cause of the arteriosclerosis obliterans (ASO). 5-aminolevulinic acid (ALA) is indispensable to an energy production in the mitochondria and is concerned with cellular aging. It was shown that ALA held oxidative stress and the development of organ damage in check recently. This study aimed at showing that ALA suppress vascular endothelial injury and arteriosclerosis. We gave ALA to arteriosclerosis model mouse, and we tested it, but there was no arteriosclerosis suppression effect, blood cholesterol level, arteriosclerosis, vascular endothelial cells injury. We introduced the high sensitive ELISA system using the antibody for oxidation phosphatidylcholine to measure an oxidation LDL level.

研究分野：血管外科

キーワード：5-ALA

1. 研究開始当初の背景

【閉塞性動脈硬化症とその治療について】

閉塞性動脈硬化症(以下ASO)は動脈硬化により四肢末梢動脈が慢性的に狭窄、閉塞し循環障害を来す病態であり、高齢化社会や生活習慣病の増加に伴い本邦でも近年患者数が増加してきており、社会的問題となっている(杉本ら 閉塞性動脈硬化症の疫学-合併疾患、生命予後について 診断と治療 97(12): 2358-63 2009)。ASOが進行すると下肢の血流不全や壊死から止むを得ず下肢切断に至るケースも少なくない。

ASOの原因である動脈硬化の発症と病態進行の原因には血管内皮細胞の障害が深く関わっていることが報告されてきたが、これを抑制する有効な治療薬は開発されていない。現時点では血管拡張作動薬により虚血肢の末梢循環を維持し、抗血小板剤により血栓の発症を抑えて一時的に閉塞防止を図るに過ぎない。さらにASOの最も重要な症状である間歇性跛行に対しても臨床的に有効な薬剤はなく、動脈狭窄部に対して血管内バルンカテーテルを用いて拡張したり、外科的に血管バイパス手術を行うなどの治療が必要となる。間歇性跛行から病態が進行し安静時疼痛や潰瘍、壊死などを来す重症虚血肢患者の臨床経過は既存の薬物療法や外科的治療を行っても不良である。新規治療薬としてPGE1誘導体や血管新生療法の開発も期待されているが、いまだ有効な臨床試験の結果は報告されていない状況である。

【アミノレブリン酸の細胞老化防止効果について】

5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid, 以下ALA)は分子量131の型アミノ酸で、生体内において重要なヘムやクロロフィルの前駆体である。ミトコンドリアにおけるエネルギー産生において必須の物質であることから、細胞の老化とその防止に強く関わっていると考えられている(Aminolevulinic Acid, Science, Technology, and Application. I. Okura and T. Tanaka, eds., SBI ALA promo, Tokyo, 2012, ISBN978-4-7954-0229-4)。近年ではエイジングケア等の化粧品から健康食品分野、あるいは脳腫瘍の術中診断の医療分野まで広く応用されている。

東京工業大学におけるマウスを用いた動物実験では、ALAの経口摂取によりミトコンドリア酵素であるチトクロームcオキシダーゼの酵素活性が有意に増加することが示されている。チトクロームcオキシダーゼはミトコンドリアにおいて電子伝達系の最終酵素であり、動物細胞において全てのエネルギー産生を担っている。ALAはこのミトコンドリア酵素を活性化する事により、細胞の老化を防いでいると考えられている。今回の研究の基盤となる主要な作用メカニズムは、こういった研究成果により明らかとなってきた。また、脳腫瘍に診断的意義が認められ、ALA(塩酸塩)はアラベル®内用剤 1.5g(一般

名:アミノレブリン酸塩酸塩、5-ALA HCl)として、悪性神経膠腫の腫瘍摘出術中における腫瘍組織の可視化を効能・効果とする経口投与による体内診断薬として2013年8月保険収載されている。また、さらに現在いくつかの臨床試験が進行している。

【アミノレブリン酸を用いた動脈硬化と閉塞防止について】

ALAは生体内で加齢に伴い減少していくことから、ミトコンドリアのエネルギー生産能力が低下し、全身での新陳代謝能の減退や臓器機能の老化を引き起こす原因の一つになると推定されている。細胞レベルではALAの減少でミトコンドリアの機能が低下することにより、活性酸素が増加し、血管内皮細胞の障害が進むと考えられている(Sugiyama Y, Ogura S. et al. ALA-Porphyrin Science Vol.11 p17-21, 2012)。近年高知大学の寺田、井上らにより、ラットを用いた薬物誘発腎障害モデルにおいて、体外から投与されたALAがHeme oxygenase (HO)-1の発現を誘導することにより、臓器障害の発生を抑えることが報告された(Terada Y. et al PLOS ONE Vol8(12) 2013)。ALAが分子レベルでの酸化ストレスを抑制し、血管障害を抑制する可能性が示唆された。

これらの知見から、体外からALAを補う事により動脈硬化の進行を抑え、さらに予防もできるのではないかと考えた。生体内でミトコンドリアにおけるエネルギー産生を維持し、血管内皮障害を防ぐことにより、動脈硬化の予防や進行抑制に期待のできる物質としてALAに着目した。

2. 研究の目的

【動脈硬化マウスを用いたALAによる動脈硬化抑制効果の証明】

ALAによる動脈硬化の抑制効果を示すため、國友らにより確立された動脈硬化モデルマウス(Yamaguchi Y, Kunitomo M. et al. J.Pharmacol. Toxicol. Methods, 30,169-175,1993)を用いる。本モデルではリノール酸などの不飽和脂肪酸含有量の高い油脂を付加した高コレステロール食をマウスに与えると飼育14週後には高い血清コレステロール値、血清中過酸化脂質(Thiobarbituric acid reactive substances:TBARS)を示し、組織学的に大動脈弁に脂質沈着を伴う動脈硬化像を示す。この高s dコレステロール食による動脈硬化モデルマウスに対して、ALAを同時に摂取させることにより、動脈硬化および血管閉塞の抑制効果を検証する。ALA投与群とコントロール群間において血中コレステロール、LDL、HDL、リポタンパクおよび酸化LDLの測定を行う。病理学的には大動脈への脂質沈着と血管内皮細胞の障害度を検索する。

動脈硬化モデルにより、ALAによる動脈硬化抑制効果が明らかになれば、その分子生物学的機構の解明を行う。ALAにより、ミトコン

ドリア酵素であるチトクローム c オキシダーゼの酵素活性が有意に増加することにより、血管内皮の酸化ストレスが抑制されると考えられている。ALA は、多くの動物実験を経て、現在では人体においても安全性が十分に確立されている製剤である。動植物生体内に含まれるアミノ酸の一種であり臨床応用するに至っては副作用も少なくスムーズに臨床応用可能な新規治療薬となり得る可能性が高い。現時点では ALA と血管内皮細胞、動脈硬化との関連は未だ報告されていない。ALA による動脈硬化予防や血管閉塞の進行抑制を証明できれば、ASO に対する画期的で安全な新規治療法として早期に臨床応用の可能性が広がると考えられる。

3. 研究の方法

【動脈硬化マウスを用いた ALA による動脈硬化抑制効果】

ALA による動脈硬化の抑制効果を示すため、國友らにより確立された動脈硬化モデルマウスを用いる。不飽和脂肪酸含有量の高い油脂を付加した高コレステロール食をマウスに与えると飼育 14 週後には高い血清コレステロール値、血清中過酸化脂質 (TBARS) を示し、組織学的に大動脈弁に脂質沈着を伴う動脈硬化を来することが知られている。高コレステロール動脈硬化モデルをコントロール群とし、ALA を連日摂取させる群と既存の高脂血症治療薬を摂取させる群を設定して、経時的に血清脂質濃度測定を行う。14 週で病理学的解析を行い、動脈への脂肪沈着・動脈硬化、血管内皮細胞の障害度および血管閉塞の抑制効果を検証する。

【ALA による動脈硬化抑制効果と酸化ストレスの関連】

ALA による動脈硬化抑制効果について、その分子生物学的機構の解明を行う。ALA がミトコンドリアにおけるチトクローム c オキシダーゼを活性化することが報告されており、これによって血管内皮の酸化ストレスを抑制することにより細胞障害を抑え、動脈硬化を防止すると考えられる。

マウス血清中の酸化 LDL を直接測定するために、抗酸化 LDL モノクローナル抗体を用いて抗アポ B 抗体と組み合わせたサンドイッチ ELISA や競合 ELISA 法、ヒト血中の酸化 LDL の自己抗体の ELISA 法などが行われている。近年 Itabe らは粥状動脈硬化巣を免疫源として得た酸化ホスファチジルコリンのモノクローナル抗体 DLH3 を用いた ELISA 法により酸化 LDL の高感度測定法を開発した。同 ELISA 法を用いて、血清中の酸化 LDL と組織学的な動脈硬化を比較することにより、ALA による動脈抑制効果と酸化ストレスの関係を解明する。

4. 研究成果

5-アミノレブリン酸 (ALA) による動脈硬化の抑制効果を示すため、動脈硬化モデルマウ

スの確立と投与 ALA 量の設定を行った。動脈硬化モデルマウスは、これまで報告されている通り不飽和脂肪酸含有量の高い高コレステロール食により、高い血清コレステロール値を示し、組織学的に大動脈弁に脂質沈着を伴う動脈硬化像を示した。

動脈硬化モデルマウスに ALA を摂取させ、動脈硬化および血管閉塞の抑制効果を検証した。高コレステロール食による動脈硬化モデルをコントロール群とし、同時に 5-20 mg/kg の ALA 連日摂取群 (ALA 群) と既存の高脂血症治療薬群 (エパデル群) を設定した。4 週目、8 週目、12 週目に血中コレステロール、LDL、HDL、リポタンパクの測定を行ったところ、8 週目および 12 週目のエパデル群では血中コレステロール値がコントロール群に比べて抑制される傾向にあったものの、ALA 群では血中コレステロール、LDL、HDL、リポタンパク値に有意な差は認められなかった。病理学的解析においても、動脈への脂肪沈着・動脈硬化、血管内皮細胞の障害度に明らかな病理学的抑制効果を認めることはできなかった。ALA の投与量については 5, 10, 20 mg/kg の 3 群を設定したが、用量依存的な高脂血症抑制効果と動脈硬化抑制効果を示すことはできなかった。

本動脈硬化モデルを用いて、ALA や既存の高脂血症治療薬による動脈硬化抑制効果における分子生物学的機構の解析を行った。動脈抑制効果と酸化ストレスの関係を解明するため、抗酸化 LDL モノクローナル抗体を用いた ELISA 法によりマウス血清中の酸化 LDL 値の測定を試みたが、有意な酸化 LDL 値の変動を検出することができなかった。現在酸化ホスファチジルコリンのモノクローナル抗体 DLH3 を用いた高感度 ELISA システムを導入し、血清中の酸化 LDL 測定系の確立を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

森田一郎、平林葉子、磯田竜太郎、近藤健介、渡辺ゆう、杭ノ瀬昌彦、猶本良夫：生命予後からみた下腿血行再建指南．第 58 回日本脈管学会総会．2017 年 10 月 20 日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

平林葉子、森田一郎、吉田将和、湯川拓郎、深澤拓也、杭ノ瀬昌彦、猶本良夫：両下肢深部静脈血栓症、下大静脈血栓、肺塞栓賞を認めた症例に対し下大静脈フィルターを留置と抗凝固療法で加療した 1 例．第 37 回日本静脈学会総会．2017 年 6 月 16 日，あわぎんホール（徳島県徳島市）

平林葉子、森田一郎、磯田竜太郎、湯川拓郎、猶本良夫：当院における深部静脈血栓症に対する血栓除去術施行症例の検討．第 44 回日本血管外科学会学術集会．2016 年 5 月 26 日，ホテルグランパシフィック LE DAIBA（東京都港区）

平林葉子、森田一郎、磯田竜太郎、吉田将和、湯川拓郎、深澤拓也、猶本良夫：一次性下肢静脈瘤血管内レーザー治療の合併症と対策．第 116 回日本外科学会定期学術集会．2016 年 4 月 16 日，大阪国際会議場（大阪府大阪市）

平林葉子、森田一郎、磯田竜太郎、猶本良夫：下肢静脈瘤血管内レーザー焼灼術後の再疎通症例の検討．第 43 回日本血管外科学会学術総会．2015 年 6 月 5 日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

平林葉子、森田一郎、磯田竜太郎、深澤拓也、猶本良夫：一次性下肢静脈瘤における小伏在静脈レーザー焼灼術の治療成績．第 115 回日本外科学会．2015 年 4 月 16 日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 葉子（HIRABAYASHI, Yoko）
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：90341106

(2) 研究分担者

森田 一郎（MORITA, Ichiro）
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30200413

山辻 知樹（YAMATSUJI, Tomoki）
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40379730

高岡 宗徳（TAKAOKA, Munenori）
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50548568

(3) 連携研究者 なし