

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18590826  
 研究課題名（和文）心血管病の先進医療—HDL 治療の確立に向けた各種病態の分子機構の解明とその応用  
 研究課題名（英文）Advanced medical technology on cardiovascular disease- Elucidation of the molecular mechanism and the application on various pathological conditions for the establishment of HDL therapy  
 研究代表者  
 朔 啓二郎（SAKU KEIJIRO）  
 福岡大学・医学部・教授  
 研究者番号 40183371

## 研究成果の概要：

合成 (r) HDL は、強力なコレステロール引き抜き能を有し、native HDL の作用を増強することが示唆された。また、rHDL の抗動脈硬化作用以外の多面的効果では、マウス下肢虚血モデルにおける血流改善作用、ラット心筋虚血再灌流不整脈モデルにおける抗不整脈作用、ラット心筋梗塞モデルにおける心リモデリング抑制作用が認められた。rHDL は、その主作用のみならず多面的効果により、今後、心血管疾患の新たな治療手段として期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：合成 HDL、コレステロール引き抜き能、血流改善作用、抗不整脈作用、心リモデリング抑制

## 1. 研究開始当初の背景

低高比重リポ蛋白コレステロール (HDL-C) 血症は、大規模臨床研究から冠動脈疾患 (CAD) の主要な負の危険因子であることが証明されている。HDL は、末梢細胞に沈着したコレステロールを引き抜き肝臓へ運び、胆汁として体外に排出する、いわゆる、コレステロール逆転送 (RCT) 系が主な作用といわれている。また、私たちは、HDL には RCT 系以外の多面的作用、すなわち、抗酸化・抗炎症、抗血小板凝集、アポトーシス抑制などの様々な作用があることを基礎及び臨床研究

で段階的に報告してきた。

CAD 発症に対する一次・二次予防における脂質異常症治療の原則は、スタチンなどによる低比重リポ蛋白 (LDL) コレステロール低下療法であるが、それだけでは心・血管疾患予防は不十分であり、HDL の効果を十分に発揮させることが注目されている。しかし、スタチンによる HDL 増加作用は弱く、他に開発中の薬剤としてコレステロールエステル転送蛋白阻害薬、peroxisome proliferator-activated receptor 刺激薬などがあるが、その効果は十分ではない。

## 2. 研究の目的

CAD の発症・再発抑制の方略として、遺伝子治療や再生療法が臨床に登場してきた。今回、HDL を心血管病の治療手段として捉え、HDL が有する臓器への多面的効果の分子機構解明、さらに遺伝子治療や再生医療に並ぶ HDL 治療という新たな治療概念の確立を目標とした。これまでの研究から、私たちが提唱する HDL 治療は、遺伝子治療や再生医療の分野においても応用可能で、それぞれの欠点を補いつつ、相互に発展していくことが期待されている。つまり、HDL をメインプレーヤーとしてとらえ、HDL 自身の多面的作用を維持しながら HDL に変わる合成 HDL (reconstituted (r) HDL、含、新規合成アポ A-I ペプチド) を用いた HDL 治療を研究テーマとした。さらに、本研究では、HDL 治療へ向けて、HDL、スフィンゴシンーリン酸 (S1P)、rHDL の臓器多面的効果の確認、さらに、どのような HDL の多面的効果が CAD 予防に有用であるかを分子機構解明とともに検討した。また、動物実験では、rHDL の抗動脈硬化、抗炎症・抗酸化作用および不整脈発症抑制効果、心筋梗塞領域減少効果の検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 1) キャピラリー電気泳動法による rHDL のヒト血漿に対する作用の解析

Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) 欠損患者や正常者の血漿を使用し、rHDL とインキュベーションした後、キャピラリー電気泳動法 (Beckman P/ACE MDQ system) により解析した。

### 2) マウス下肢虚血モデルにおける rHDL の効果

マウス下肢虚血モデルを作製した。経静脈的に rHDL を投与し、下肢血流や capillary density を測定した。

### 3) 新型 rHDL の効果

①従来型 rHDL に S1P を加え、新型 rHDL の POPC/S1P/A-I を作製した。

②コレステロールの引き抜き能は、<sup>3</sup>H-cholesterol をマクロファージとインキュベーションし、細胞内へ取り込ませ、合成 HDL などによる引き抜き能を測定した。

③細胞増殖試験は、ヒト冠動脈内皮細胞を 96well プレートで培養し、合成 HDL などに加え、Tetrazolium 化合物を利用した MTS assay により測定した。

④冠動脈内皮細胞管腔形成は、マトリックスゲルの上に内皮細胞を播き、種々の試薬を加え 18 時間培養後、管腔形成の写真をコンビ

ューターに取り込みを解析した。

⑤ウェスタンブロッティングについて、細胞培養後、種々の試薬を加えた後細胞を可溶化し、電気泳動のサンプルとしました。そして ERK (Extracellular signal-regulated kinase) や Akt の活性、S1P の各受容体の発現量を測定した。

⑥冠動脈内皮細胞に各 S1P 受容体のセンス、アンチセンス、スクランブルプライマーを導入し、合成 HDL などによる ERK 活性および管腔形成の変化を検討した。

### 4) rHDL の不整脈抑制効果

①rHDL を Wister ラットに静脈内投与し、心電図変化、血圧、脈拍、心エコーによる心機能変化を経時的に観察した。

②rHDL による虚血再灌流製不整脈抑制効果、nitric oxide (NO) 産生効果及びその機序の検討を行った。Wister ラットを以下の 10 群に分け、合成 HDL および阻害薬投与後の虚血再灌流性不整脈を観察した。i) コントロール群、ii) 合成 HDL 群、iii) 合成 HDL+PI3 kinase (phosphatidylinositol 3 kinase) 阻害薬である wortmannin 投与群、iv) 合成 HDL+ERK 阻害薬である PD98059 投与群、v) 合成 HDL+L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) 投与群。vi) wortmannin 群、vii) PD98059 群、viii) L-NAME 群、ix) ApoA-I 群、x) POPC 群。麻酔したラットに阻害薬及び PBS (コントロール群)、rHDL (rHDL 群)、ApoA-I (ApoA-I 群)、POPC (POPC 群) を静脈内投与した後、気管挿管し開胸を行った。心臓の冠動脈を 5 分間結紮し、解除後 3 分間不整脈を記録した。その後採血し血漿 NO 濃度を測定した。また、再灌流後の心臓組織の免疫染色を行い e-NOS と p-eNOS の発現を調べた。

③Wister ラットに合成 HDL を静脈内投与後の in vivo での HDL 変化を、採血後にキャピラリー等速度電気泳動法で観察した。

④ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCECs) 及び ATP-binding cassette transporter (ABC) A1, ABCG1、SR-BI をトランスフェクションした 1d1A7 細胞を使い、合成 HDL による ERK、Akt、eNOS のリン酸化をウェスタンブロット (WB) 法により測定した。また、その活性化が wortmannin、PD98059、L-NAME により阻害されるかを検討した。

### 5) rHDL の心筋梗塞に対する効果

ラットを無作為に sham-operated 群、心筋梗塞後にプラセボとして PBS を週に 1 回、4 週間、尾静脈から投与した群 (MI 群)、心筋梗塞後に合成 HDL 6mg/kg を週に 1 回、4 週間、尾静脈から投与した群 (MI+rHDL 群) の 3 群に分割した。心筋梗塞は左冠動脈結紮を行い

作製した。心筋梗塞発症 1 週後と 4 週後には、心臓超音波で各群の心機能評価（心室中隔厚、左室後壁厚、左室拡張末期径、左室収縮末期径、駆出率測定など）を行った。4 週後には、各群の心臓病理標本を観察し、各群の線維化領域、心筋細胞の肥大の程度、vWF 染色による血管新生の評価を NIH image を用いて定量した。摘出した心臓を用いて、リモデリングのシグナルに重要な左室の p38, JNK (Jun N-terminal kinase), ERK といった MAP (mitogen-activated protein) キナーゼファミリー発現を WB 法にて評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) rHDL の HDL に対する効果

rHDL は、フォスファジルコリンをアポリポ蛋白 A-I (POPC/A-I) に加えディスク状にしたものを使用した。この rHDL と正常者の全血漿をインキュベーションした後、キャピラリー電気泳動法にて解析したところ、fast(f)-と intermediate(i)-migrating HDL や f-と slow(s)-アポリポ蛋白 A-I のピークの減少、sHDL ピークの増加を認めた。そのピークは、LCAT 活性を阻害しても変化を認めなかった。rHDL は apoB を除いた血漿において、コレステロールの fractional esterification rate を増加させていた。したがって、rHDL は、LCAT 活性非依存性に、fHDL と iHDL を sHDL へリモデリングしていることがわかった (Zhang B et al. *Atherosclerosis*. 2006)。

##### 2) rHDL の LDL に対する効果

ヒト血漿中の LDL は、キャピラリー電気泳動法にて解析したところ、sLDL と fLDL の 2 つのピークとなった。正常な LDL では、fLDL のピーク（軽度に酸化された LDL）は低かった。脂質異常症患者からの中等度に酸化された LDL では、fLDL のピークが増加、さらに新たなピーク (very-fast-migrating (vf) LDL) が出現した。fLDL や vfLDL では、small-dense LDL の割合が多くなっていった。ヒト血漿 ( $d > 1.019$  g/ml、triglyceride-rich lipoproteins を排除) と rHDL をインキュベーションさせたところ、vfLDL が減少し、sLDL が増加した。

rHDL は、small-dense LDL ( $d = 1.040-1.063$  g/ml) において、fLDL、フリーコレステロール濃度、platelet-activating factor acetylhydrolase activity を減少させ、LDL サイズを増加させた。rHDL は、ヒト血漿において、fLDL を sLDL にリモデリングして、陰性電荷を持った LDL を減少させていた (Zhang B et al. *J Lipid Res*. 2006)。

##### 2) rHDL の下肢虚血に対する効果

rHDL は、マウス下肢虚血モデルにおける虚血肢の血流を改善し (図 1)、capillary density も増加していた。また、rHDL により、bone marrow-derived cells が虚血部へ増加していた。Peripheral mononuclear cells において rHDL は、Akt をリン酸化し、peripheral mononuclear cells を endothelial progenitor cells へ分化させた。この効果は、phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬により抑制された。この rHDL の虚血改善効果は、endothelial (e) NO-deficient マウスでは認められなかった。したがって、rHDL は、phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 経路を介して、endothelial progenitor cell の分化を誘導し、虚血部の血流改善をもたらしていることが考えられた (Sumi M. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007)。

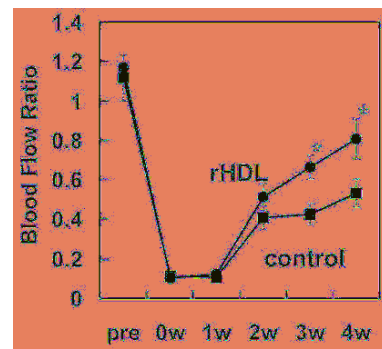


図 1. マウス下肢虚血モデルにおける血流量  
\* $p < 0.05$  vs. control.

##### 4) 新型 rHDL の効果

In vitro において新型 rHDL は、従来型 rHDL と同等のコレステロール引き抜き能を示し、冠動脈内皮細胞の細胞増殖を促進した (図 2)。新型 rHDL は、内皮細胞管腔形成を促進し、その効果は Akt、ERK、eNOS 阻害薬により抑制された。新型 rHDL は、Akt や Ras 非依存性に ERK を活性化し、その S1P による ERK 活性化は S1P2 や S1P3 を介し、内皮細胞管腔形成を促進させていた。したがって、新型 rHDL は、内皮細胞表面の S1P2 や S1P3 受容体を介して ERK を活性化し、管腔形成促進作用を示すことがわかった (Matsuo Y et al. *Atherosclerosis*. 2008)。

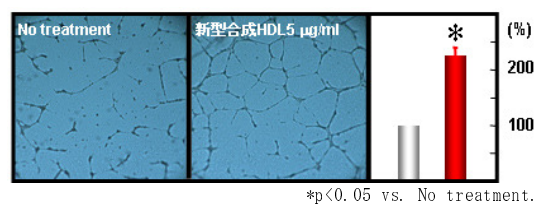


図 2. 内皮細胞管腔形成作用  
\* $p < 0.05$  vs. No treatment.

### 5) rHDL の不整脈抑制効果

ラット虚血再灌流性不整脈モデルにおいて rHDL が内皮細胞における Akt/ERK/eNOS 経路を介し、NO 産生により不整脈を抑制することを証明した(図 3)。この効果は、合成 HDL の構成成分である ApoA-I や POPC のみでは認められなかった。また、キャピラリー等速度電気泳動法による解析結果では、rHDL 投与 5 分後には、コレステロール引抜き能が高い pre-β HDL が増加していることを示し、rHDL が速やかに効果をあらわすことを示した。また、従来 HDL の受容体としては SR-BI が考えられていたが、ABCA1、ABCG1 トランスポーターを介して働いている可能性も示した (Imaizumi S et al. *J Am Coll Cardiol.* 2008)。

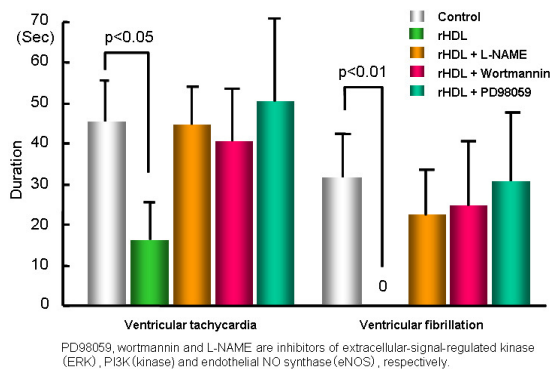


図 3. 不整脈抑制効果

### 6) rHDL の心筋梗塞に対する効果

MI 群において著明な左室内腔拡大と左室機能低下を認めたのに対して、MI + rHDL 群においては、左室駆出率の有意な改善、左室収縮末期径の有意な短縮と左室拡張末期径の短縮傾向を認めた(図 4)。

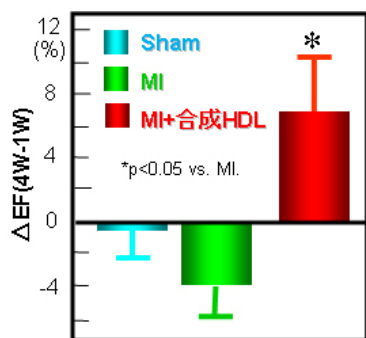


図 4. 左室駆出率 (EF) の変化量

さらに、心臓病理標本において、MI+rHDL 群は MI 群と比較して左室の線維化領域を著明に減少させていた。一方で、MI+rHDL 群の左室の心筋細胞の肥大や血管新生の増加は認められなかった。また、左室の MAP キナーゼ

の発現を調べたところ、p38 や JNK (Jun N-terminal kinase) の発現は各群とも変わりがなかったが、ERK においては、MI+rHDL 群が他の群と比較して有意に強く発現していた。In vitro における検討では、過酸化水素で細胞死を誘導させた心筋細胞において、rHDL は濃度依存性に細胞死を抑制した。さらにその効果は、ERK 阻害薬である PD98059 を加えることにより阻害された。以上より、心筋梗塞発症後の rHDL 投与は、左室の線維化を抑制するとともに収縮能を改善し、左室リモデリングを抑制することが示唆された。(Kiya Y et al. *Atherosclerosis.* 2009)。

### 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 7 件)

1. Kiya Y, Miura S, Imaizumi S, Uehara Y, Matsuo Y, Abe S, Jimi S, Urata H, Rye KA, Saku K. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates postinfarction left ventricular remodeling in rats. *Atherosclerosis.* 2009;203:137-144. 査読有
2. Imaizumi S, Miura S, Nakamura K, Kiya Y, Uehara Y, Zhang B, Matsuo Y, Urata H, Ideishi M, Rye KA, Sata M, Saku K. Anti-arrhythmogenic effect of reconstituted high-density lipoprotein against ischemia/reperfusion in rats. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1604-1612. 査読有
3. Uehara Y, Tsuboi Y, Zhang B, Miura S, Baba Y, Higuchi MA, Yamada T, Rye KA, Saku K. POPC/apoA-I discs as a potent lipoprotein modulator in Tangier disease. *Atherosclerosis.* 2008;197:283-289. 査読有
4. Matsuo Y, Miura S, Kawamura A, Uehara Y, Rye KA, Saku K. Newly developed reconstituted high-density lipoprotein containing sphingosine-1-phosphate induces endothelial tube formation. *Atherosclerosis.* 194:159-168:2007. 査読有
5. Sumi M, Sata M, Miura S, Rye KA, Toya N, Kanaoka Y, Yanaga K, Ohki T, Saku K, Nagai R. High-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and

enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:813-818:2007. 査読有

6. Zhang B, Uehara Y, Hida S, Miura S, Rainwater DL, Segawa M, Kumagai K, Rye KA, Saku K. Effects of apoA-I/phosphatidylcholine discs on charge-based LDL subfractions as characterized by capillary isotachopheresis. *J Lipid Res.* 48:1175-1189:2007. 査読有
7. Zhang B, Miura S, Fan P, Kumagai K, Takeuchi K, Uehara Y, Rye KA, Saku K. ApoA-I/Phosphatidylcholine discs remodel fast-migrating HDL into slow-migrating HDL as characterized by capillary isotachopheresis atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 188:95-101:2006. 査読有

[学会発表] (計4件)

1. Iwata A, Zhang B, Imaizumi S, Miura S, Saku K. Intravenous ApoA-I mimetic peptide (ETC-642) discs inhibit the progression of atherosclerosis in myocardial infarction-prone Waranabe-heritable hyperlipidemic (WHHL-MI) rabbits. The 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.20-32. 2009, Osaka, Japan.
2. 木谷嘉博、三浦伸一郎、朔啓二郎。合成 HDL はラットにおける心筋梗塞後左室リモデリングを抑制する。第12回日本心血管内分泌代謝学会、2008年11月28-29日、熊本。
3. Uehara Y, Iwata A, Zhang B, Miura S, Saku K. Low HDL-C: Role of lipid transporter and apoA-I mimetic peptide. シンポジウム、第40回日本動脈硬化学会総会、2008年7月10-11日、大阪。
4. Miura S, Imaizumi S, Kiya Y, Sata M, Rye KA, Saku K, Uehara Y. RECONSTITUTED HDL THERAPY FOR CARDIOVASCULAR DISEASE. The 77th Congress of the European Atherosclerosis Society, 2008. 4. 26-29, Istanbul, Turkey.

[図書] (計2件)

1. 杉原充、三浦伸一郎、朔啓二郎。最新 狭心性診療の実際 (分担)、28. 脂質異常症を合併する狭心症患者の治療、文光堂、2009:249-259。
2. 三浦伸一郎、朔啓二郎。急性冠症候群のエ

キスパートをめざして (分担)、4章: 急性冠症候群の再発をいかに防ぐか。F. スタチン製剤の重要性、中山書店 2009、(印刷中)。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

朔 啓二郎 (SAKU KEIJIRO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号 40183371

### (2) 研究分担者

太田 孝夫 (OTA TAKAO)  
琉球大学・医学部・教授  
研究者番号 70185271

岩本 隆宏 (IWAMOTO TAKAHIRO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号 20300973

三浦 伸一郎 (MIURA SHINICHIRO)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号 20343709