

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08090

研究課題名（和文）ナノバブル化アポA-I模倣ペプチドと超音波による新規動脈硬化治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Atherosclerosis Treatment Using Nanobubbled ApoA-I Mimetic Peptide and Ultrasound

研究代表者

今泉 聡 (Imaizumi, Satoshi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：60609478

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：アポ蛋白A-I模倣ペプチドFAMPの抗動脈硬化作用を増強させる方法を検証した。FAMPとナノバブルを同時にマウス大動脈に作用させることで、ナノバブルが動脈硬化病変へ集積することが明らかとなった。またFAMPには、動脈硬化の原因となり得る炎症性サイトカインを抑制する作用があることを明らかにし、ナノバブルと併用する事でその作用が増強されることを示した。FAMPを構成するアミノ酸の一部を変えることにより、コレステロール引き抜き作用がより強いペプチドを作成し、その抗動脈硬化作用を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管疾患は日本人の死因の第2位であり、その原因となる動脈硬化の発症予防、治療が重要である。本研究では、善玉といわれるHDLの機能を増強させる作用をもつアポ蛋白A-I模倣ペプチドFAMPを改良し、その抗動脈硬化作用を高める方法を検証した。本研究で明らかとなったFAMPとナノバブル併用の効果、FAMPの抗炎症作用、改良型FAMPの抗動脈硬化作用から、動脈硬化性疾患の克服に向けた新たな治療薬への開発へ繋がっていくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated methods to enhance the anti-atherosclerotic effects of the apoprotein A-I mimetic peptide FAMP. It was revealed that nanobubbles accumulated in atherosclerotic lesions in the aorta of mouse when FAMP and nanobubbles were applied simultaneously. We demonstrated that FAMP has the effect of suppressing inflammatory cytokines, which can potentially cause atherosclerosis, and that this effect is enhanced when used in combination with nanobubbles. By altering some of the amino acids that make up FAMP, we created a peptide with stronger cholesterol efflux capacity and demonstrated its anti-atherosclerotic effect.

研究分野：動脈硬化

キーワード：アポ蛋白A-I模倣ペプチド ナノバブル 抗動脈硬化作用 抗炎症作用

### 1. 研究開始当初の背景

(1) スタチンで LDL (低比重リポ蛋白) コレステロール値を低下させても、心血管病のリスクは 30%程度しか減らず、HDL (高比重リポ蛋白) が重要だと考えられるようになってきた。HDL にはコレステロール引き抜き作用の他、抗炎症作用、抗酸化作用、血管弛緩作用といった多面的効果 (機能) があることが分かっている。また、HDL のコレステロール引き抜き作用が高いほど冠動脈疾患が少なく、心血管イベントの発生が少ないとの報告がなされている。しかし、現在臨床応用されている薬で、HDL 機能を増強させるものは存在しない。申請者らはコレステロール引き抜き作用を有し、HDL の機能を増強させるアポ蛋白 A-I 模倣ペプチド FAMP (Fukuoka University ApoA-I Mimetic Peptide) の開発に成功した。FAMP は抗動脈硬化作用、下肢虚血改善作用、虚血再灌流障害抑制作用を有している。

(2) 近年、バブルと超音波照射の併用によって、細胞への薬物、遺伝子のデリバリーが可能なが報告されている。生体にほとんど影響を与えない超音波をバブルと併用すると、バブルの崩壊によって細胞膜表面に微細な穴があき、遺伝子や薬物を細胞内に導入することができる。このシステムは、体外からの超音波照射によって、目的組織にのみ低侵襲的な薬物・遺伝子デリバリーを可能とする新たなドラッグデリバリーシステムとして期待されている。

### 2. 研究の目的

FAMP をナノバブル化し超音波と併用することによって、その抗動脈硬化作用を高めると同時に、超音波で狙った部位に集中して作用させることができる、まったく新しい動脈硬化治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

(1) マウス大動脈へのナノバブルの集積を超音波イメージング装置で観察し、ex vivo での定量評価を行った。野生型 (WT) マウスと apoE ノックアウト (apoE KO) マウスより大動脈を摘出し、マウス大動脈用の超音波ゲルパッド内に留置して回路を作成した。最初に溶媒を回路内に還流させて reference (baseline) 画像を取得した。その後、FAMP あり・なしのナノバブルを含有した溶媒の注入を開始し、大動脈を還流しながら高分解能超音波イメージング装置による超音波造影画像のスキャン (録画) を行った。当初は内腔の time intensity curve (TIC) や video intensity curve (VIC)% を基準として大動脈へのナノバブルの集積を評価していたが、効果的に定量化できず、全実験共通の縫合糸への集積を基準にすることへ変更した。超音波画像上の 4 点を抽出して、その時間的変化の特徴を含めて、ナノバブルの大動脈への集積と FAMP の効果を VIC% のグラフで解析した。

#### (2) FAMP 含有ナノバブルの作成

FAMP・ナノバブルの材料を軽量容器 Vial に分注し、超高速振動装置を用いて“8”の字に激しく振ることにより、ナノバブルを作成した。粒子径計測システム NanoSight を使用して、できたバブルのサイズを確認した。

(3) FAMP を構成するアミノ酸の一部を変えることにより、4 つの改良型 FAMP (i-FAMP) を合成し、A172 細胞に対するコレステロール引き抜き作用が最も強いもの (i-FAMP-D1) を同定した。HDL を FAMP もしくは i-FAMP-D1 とインキュベーションし、アガロースゲル電気泳動と、抗 ApoA-I 抗体を用いたウェスタンブロッティングによるリポ蛋白プロファイル解析を行った。

CETP トランスジェニック (CETP Tg) マウスを用いて、コレステロール逆転送系に対する FAMP および i-FAMP-D1 の効果を検討した。高コレステロール食を 3 週間摂取させた後、FAMP 群、i-FAMP-D1 群、コントロール (生理食塩水) 群に分けた。<sup>3</sup>H-コレステロールでラベルした J774 マクロファージを腹腔内に注入した後に、それぞれの群におけるコレステロール逆転送系を検討した。

高脂肪食を与えた ApoE KO マウスに、FAMP、i-FAMP-D1 または生理食塩水を週 3 回腹腔内投与した。16 週間後に大動脈を採取し、オイルレッド O で染色し、動脈硬化病変の面積を比較した。

(4) J774 マクロファージに FAMP と LPS (リポポリサッカライド) を添加し、LPS により誘導される炎症性サイトカイン抑制の有無、またその程度の検証を行った。培養条件、LPS や FAMP の濃度、添加時間、添加のタイミングでどの程度炎症性サイトカインの抑制が得られるか、最適な実験条件の検討を行った。培地でナノバブルを作製し、ナノバブル併用の有無及び FAMP の有無で、TNF- $\alpha$  の産生にどのような違いがあるのかを検証した。超音波照射を組み合わせ FAMP、ナノバブルの効果を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) マウスの大動脈に対するナノバブルの集積を、超音波イメージング装置で検出する実験を行った。図1はナノバブルの集積をVIC%で表している。WTマウスの大動脈に対するナノバブルの集積は、縫合糸 (surgical suture) よりも少ない (図1)。WTマウスと apoE KOマウスの大動脈に対する、ナノバブルの集積を図2に示す。この実験より、動脈硬化病変を有する apoE KOマウスの大動脈に対するナノバブルの集積は、WTマウスより多いことが明らかとなった。さらに、異なる濃度の FAMP 併用の有無で、ナノバブルの集積がどのように変化するかを検証した。FAMP そのものは、超音波では検出できない。図3のピンクの棒グラフに示すように、FAMP を加えることで大動脈に集積するナノバブルは (基準となる青と比較して) 増加し、この効果は動脈硬化を有する apoE KOマウスにおいてより顕著であることが明らかとなった。またこの効果は、FAMP の濃度を上げることで増強されることが明らかとなった。これらの結果より、FAMP を併用することで、ナノバブルが大動脈の動脈硬化病変へ集積することが考えられた。これは FAMP 自体が動脈硬化病変へ集積することを示すと同時に、超音波照射とそれによるバブルの崩壊によって、FAMP を狙った部位に作用させる可能性を示唆する結果である。

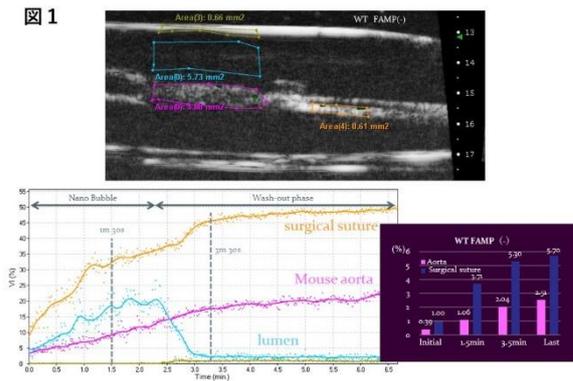


図2

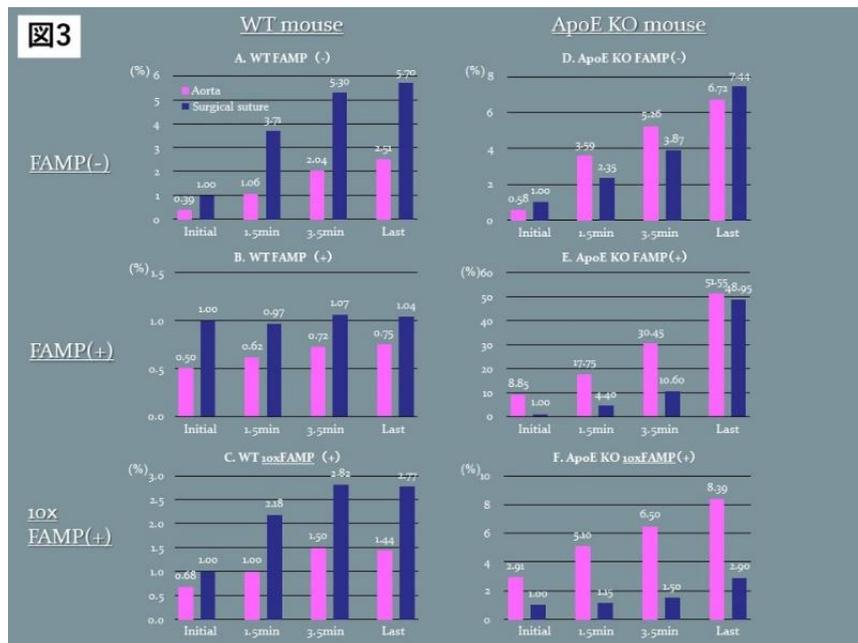
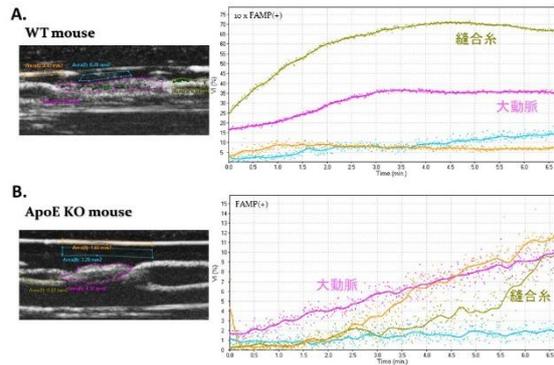
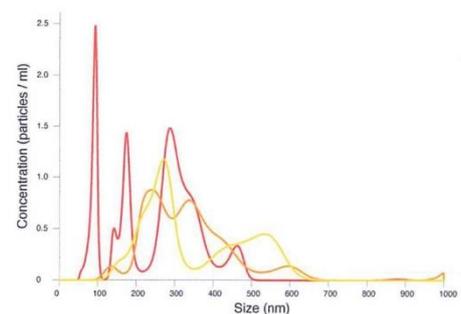


図4

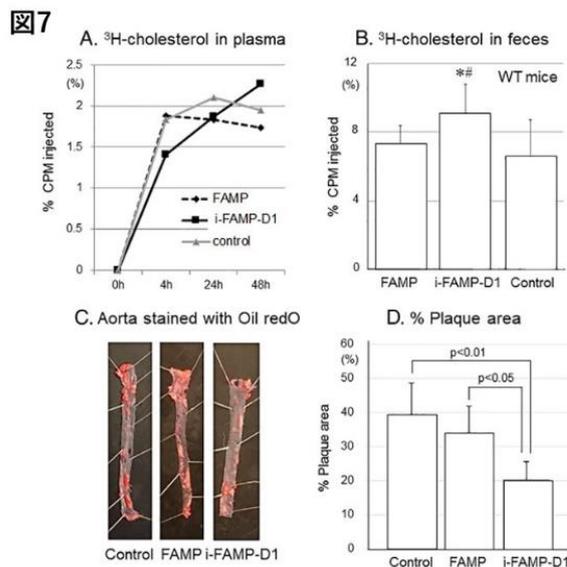
(2) 条件を変えながら作成したバブルの粒子径や濃度を測定し (図4)、FAMP をナノバブル化するための条件検討を行った。しかし、FAMP を溶媒に完全に溶解させるとほとんどナノバブルができず、最終的に FAMP のナノバブル化は困難であると判断した。そのため、その後の実験では FAMP とナノバブルの併用効果を検証した。



(3) 図5に示す改良型FAMP (i-FAMP) のうち、i-FAMP-D1のみ、FAMPよりも強いコレステロール引き抜き能を有していた。HDLとFAMPまたはi-FAMP-D1とのインキュベーションにより、 $\alpha$  HDLのバンドはpre- $\beta$  HDLの位置へシフトした(図6)。抗ApoA-I抗体を用いたウェスタンブロット解析では、低用量のi-FAMP-D1においても、pre- $\beta$  HDLの位置にApoA-Iを検出した。これらの結果より、FAMPまたはi-FAMP-D1により、 $\alpha$  HDLがpre- $\beta$  HDLへと変化することが考えられた。

CETP Tgマウスのコレステロール逆転送系に対するFAMPおよびi-FAMP-D1の効果を、図7ABに示す。3群間で血漿中の $^3$ H-コレステロール量には違いがなかったが、i-FAMP-D1群では、FAMP群およびコントロール群と比較し、糞便中の $^3$ H-コレステロール量が増加していた。

高脂肪食を与えたApoE KOマウスにFAMP、i-FAMP-D1または生理食塩水を16週間投与した後、大動脈を採取し、オイルレッドOで染色した(図7C)。i-FAMP-D1群の動脈硬化病変の面積は、コントロール群およびFAMP群と比較して有意に抑制されていた(図7D)。



4) 体外から有効な超音波照射が可能で、FAMPの効果を最大限引き出すことができるモデルとして、頸動脈の不安定プラークモデルマウスの作成を試みた。しかし、作製したモデルマウスの病理組織を詳細に検討したところ、プラークの部分には平滑筋細胞が多く、不安定プラークに特徴的なTCFA (thin cap fibroatheroma)やlipid richな部分は少なかった。そのため、より簡便にFAMP、ナノバブルと超音波の効果、in vitro及びin vivoで確認できる方法の検討を行った。

これまでの研究で、FAMPを動脈硬化モデルマウスに投与するとCRPやIL-6などの炎症性蛋白が低下することが分かっていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。IL-6やTNF- $\alpha$ は動脈硬化の原因となる炎症性サイトカインであり、IL-6を阻害し全身性の炎症を抑えることで動脈硬化性疾患の発症抑制を目的としたモノクローナル抗体の治験も現在進行中である。一方で、アポ蛋白A-Iには抗炎症作用があり、その作用機序の一つとして、炎症性物質と結合し中和することが分かっている。そこで、FAMPにも同様の作用があるかをin vitroで検討した。その結果を図8に示す。FAMPの用量依存的に、LPSにより誘導したTNF- $\alpha$ とIL-6の産生が抑制されていた。

次に、FAMPの抗炎症効果に対するナノバブルとの併用効果を調べる実験を行った。ナノバブルの有無及びFAMPの有無で、TNF- $\alpha$ の産生にどのような違いがあるのかを、様々な条件下で検証した。その結果の一部を図9に示す。ナノバブルとFAMP (5 $\mu$ g/ml)の併用はFAMP単独と比較して、よりTNF- $\alpha$ の産生を抑制する可能性があることが明らかとなった。さらに、ナノバブル自体にも抗炎症効果を有することが示唆された。

図5

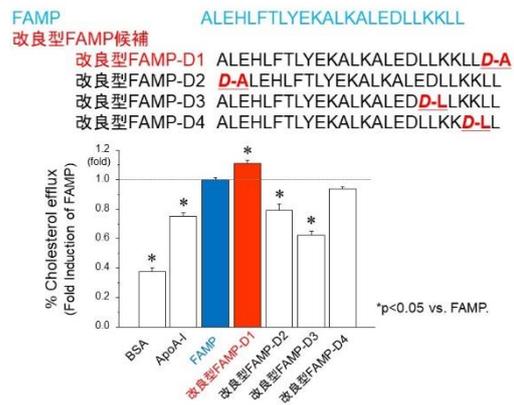
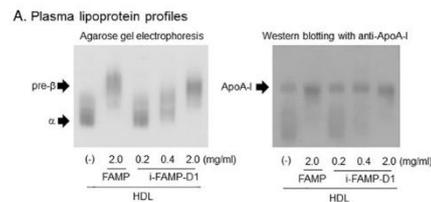


図6



引き続き、超音波照射を組み合わせる FAMP、ナノバブルの抗炎症効果を検証する実験を行った。しかし、超音波による FAMP、ナノバブルの効果増強は認められなかった。

図8

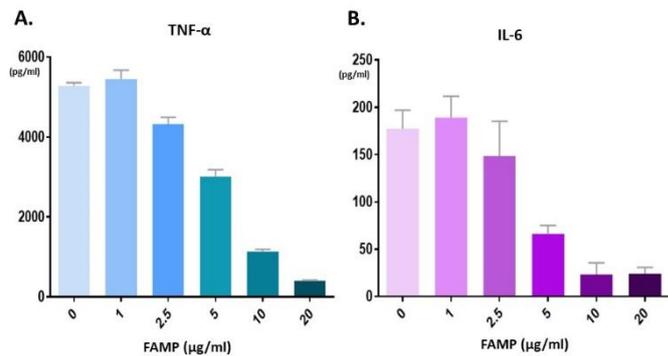
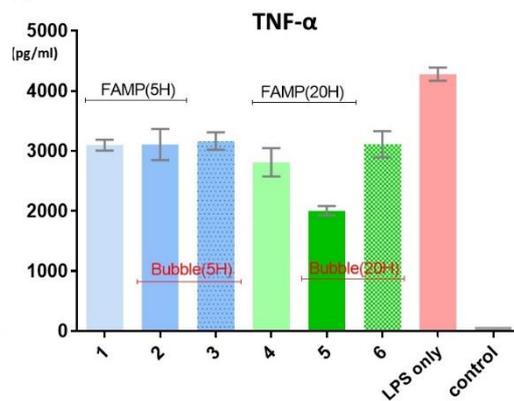


図9



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miura SI, Suematsu Y, Imaizumi S, Yahiro E, Kuwano T, Uehara Y, Saku K.	4. 巻 Sep;1(2)
2. 論文標題 Apolipoprotein A-I Mimetics for Treatment of the Residual Risk of Cardiovascular Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardiometab Syndr J.	6. 最初と最後の頁 135-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suematsu Y, Kawachi E, Idemoto Y, Matsuo Y, Kuwano T, Kitajima K, Imaizumi S, Kawamura A, Saku K, Uehara Y, Miura S.	4. 巻 297
2. 論文標題 Anti-atherosclerotic Effects of an Improved Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 111-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijcard.2019.08.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Y, Iwata A, Futami M, Yamashita M, Imaizumi S, Kuwano T, Ike A, Sugihara M, Nishikawa H, Zhang B, Yasunaga S, Saku K and Miura SI.	4. 巻 97
2. 論文標題 Impact of von Willebrand factor on coronary plaque burden in coronary artery disease patients treated with statins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e0589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.000000000010589.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoko Kamizono, Yuhei Shiga, Yasunori Suematsu, Satoshi Imaizumi, Hitomi Tsukahara, Keita Noda, Takashi Kuwano, Kanta Fujimi, Keijiro Saku, Shin-ichiro Miura.	4. 巻 97
2. 論文標題 Impact of cigarette smoking cessation on plasma -klotho levels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e11947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.000000000011947.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imaizumi S, Shiga Y, Ogawa M, Sako H, Nagata Y, Matsunaga A, Shirohani T, Hoshino F, Yahiro E et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 Randomized trial of An increased dose of Calcium channel blocker or Angiotensin II type 1 receptor blocker as an add-on intensive DEpressor therapy in type 2 diabetes Mellitus patients with uncontrolled Essential hypertension: the ACADEMIE Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart Vessels.	6. 最初と最後の頁 698-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1286-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eiji Shigemoto, Atsushi Iwata, Makito Futami, Yuta Kato, Motoki Yamashita, Satoshi Imaizumi, Takashi Kuwano, Amane Ike, Makoto Sugihara, Keiji Saku, Shin-ichiro Miura.	4. 巻 34
2. 論文標題 Influence of chronic kidney disease on coronary plaque components in coronary artery disease patients with both diabetes mellitus and hypertension.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart Vessels.	6. 最初と最後の頁 1065-1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-01334-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita M, Iwata A, Kato Y, Futami M, Imaizumi S, Kuwano T, Ike A, Sugihara M, Nishikawa H, Zhang B, Yasunaga S, Saku K and Miura SI.	4. 巻 33
2. 論文標題 Impact of the triglyceride level on coronary plaque components in female patients with coronary artery disease treated with statins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Vessels.	6. 最初と最後の頁 1175-1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1173-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiiba M, Zhang B, Miura SI, Ike A, Nose D, Kuwano T, Imaizumi S, Sugihara M, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Shirai K, Yasunaga S, Saku K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Association between discordance of LDL-C and non-HDL-C and clinical outcomes in patients with stent implantation: from the FU-Registry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Vessels.	6. 最初と最後の頁 102-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-017-1036-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takata Kohei, Imaizumi Satoshi, Iwata Atsushi, Zhang Bo, Kawachi Emi, Miura Shin-ichiro, Ogawa Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Associations of High-Density Lipoprotein Functionality with Coronary Plaque Characteristics in Diabetic Patients with Coronary Artery Disease: Integrated Backscatter Intravascular Ultrasound Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1278 ~ 1278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13091278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川内絵未、今泉聡、渡邊晶子、辻山理加、岡崎優子、西川宏明、上原吉就、三浦伸一郎、朔啓二郎、立花克郎
2. 発表標題 超音波/ナノバブルによるアポA-I模倣ペプチドの多面的機能促進
3. 学会等名 第5回超音波分子診断治療研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三浦 伸一郎  (Miura Shin-ichiro)  (20343709)	福岡大学・医学部・教授   (37111)	
研究分担者	朔 啓二郎  (Saku Keijiro)  (40183371)	福岡大学・医学部・教授   (37111)	
研究分担者	立花 克郎  (Tachibana Katsuro)  (40271605)	福岡大学・医学部・教授   (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------