

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08528

研究課題名(和文)次世代型HDL模倣ペプチドの多機能性と安全性の検証

研究課題名(英文)Verification of the versatility and safety of next-generation HDL mimetic peptides

研究代表者

朔 啓二郎 (Saku, Kei-jiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40183371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：次世代型HDLペプチドとして、コレステロール引き抜き能が向上した改良型ApoA-I模倣ペプチドを作成した。抗炎症作用は、そのペプチドにより誘導されていた。また、抗アポトーシス作用は、改良型模倣ペプチドをHDLと前処理することによりCaspase-3活性化を有意に抑制していたが、HDL単独と効果は同様であった。血管新生作用は、模倣ペプチドをHDLと前処理すると従来型ペプチドよりも有意に血管新生を誘導した。また、改良型よりもさらにコレステロール引き抜き能が向上したペグ化模倣ペプチドも開発した。さらに、ドキシルビシン誘導心機能障害マウスモデルにてApoA-I模倣ペプチドが心機能障害を抑制していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化は、心血管病を引き起こすがその制圧は非常に重要である。しかし、その制圧は十分でない。そこで、新たな治療法が必要である。高比重リポ蛋白(HDL)は、末梢からコレステロールを引き抜き、動脈硬化を抑制するが、HDLコレステロールの量を増加させたり、機能を向上させる方法は十分でない。この次世代型HDLペプチドは、その機能を高める有用な方法となる可能性が高く、今後の研究次第では新規の有力な抗動脈硬化療法となる。

研究成果の概要(英文)：We verified the multi-functionality of the next-generation HDL mimetic peptide other than the inhibitory effect of arteriosclerosis. As a next-generation HDL peptide, an improved ApoA-I mimetic peptide with improved cholesterol extraction was prepared and used in the experiments. The anti-inflammatory effect was found to be induced by the improved mimetic peptide. In addition, in the anti-apoptotic effect, the improved ApoA-I mimetic peptide significantly suppressed Caspase-3 activation with HDL. The effect was superior to that of HDL alone. The angiogenic effect caused by the improved ApoA-I mimetic peptide significantly more angiogenesis than conventional mimetic peptides. We also developed a pegylated mimetic peptide with improved cholesterol extraction compared to the improved mimetic peptide. Furthermore, we created a mouse model of doxorubicin-induced cardiac dysfunction and found that the ApoA-I mimetic peptide suppresses cardiac dysfunction.

研究分野：動脈硬化

キーワード：ApoA-I模倣ペプチド 動脈硬化 抗炎症作用 血管新生作用 抗アポトーシス作用

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、心血管病を引き起こすためその抑制は非常に重要である。しかし、その抑制は十分でない。そこで、新たな治療法が必要である。高比重リポ蛋白 (HDL) は、末梢からコレステロールを引き抜き、動脈硬化を抑制するが、HDL コレステロールの量を増加させたり、機能を向上させる方法は十分でない。私たちは、HDL の主要構成成分であるアポ蛋白 A-I の模倣ペプチドを合成し、HDL よりも強力な内皮管腔形成・抗炎症作用を持つことを報告した。そこで、その機能を高める有用な方法として、最近、HDL の主要構成成分である ApoA-I の模倣ペプチド研究が盛んに行われている。

2. 研究の目的

次世代型 (改良型) HDL 模倣ペプチドにおける動脈硬化抑制作用以外の抗炎症作用、アポトーシス作用、血管新生作用といった多機能性を検証する。また、改良型 HDL 模倣ペプチドよりも強力なペプチドを開発する。

3. 研究の方法

(1) コレステロール引き抜き増強効果を各種単球・マクロファージ測定系により確定する。

(2) 抗炎症作用

細胞へ HDL 模倣ペプチドを投与し、炎症に関与する PAF レセプター - や PAF-AH、PON-1 の RNA 発現量をリアルタイム PCR にて定量化する。また、ケモカインにより誘導される接着因子の動脈硬化巣での発現増加に対して転写レベルで抑制的に働くかも検証する。

(3) アポトーシス作用

U937 細胞へ HDL 模倣ペプチドを投与し、アポトーシス作用は、Annexin-V-FITC 法や Apo-BRUD 法により測定する (U937 細胞は、ホルボ - ルエステルにてマクロファージ化させ使用)。

(4) 血管新生作用

冠動脈内皮細胞をマトリックスゲル上に蒔き、HDL 模倣ペプチドを投与し管腔形成作用を観察する。容量依存性、最適濃度の設定をする。野性型、ドミナントネガティブ型や持続活性型の Ras が発現された HCECs においても管腔形成の効果を観察する。

(5) 改良型 HDL 模倣ペプチドよりも強力なペプチドを開発するためにペグ化ペプチドを開発する。

(6) ドキソルピシン誘導心機能障害マウスモデルを作成した。

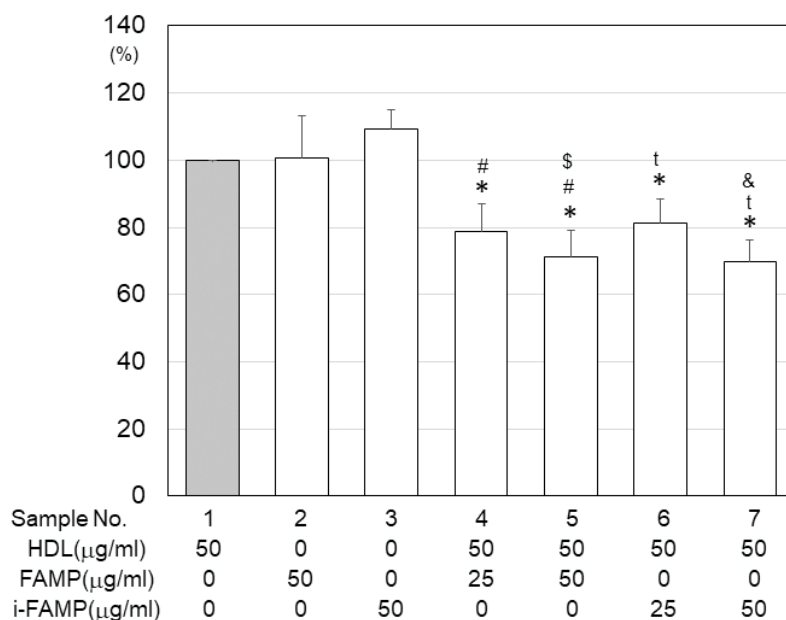
4. 研究成果

(1) 改良した模倣ペプチド (改良型 ApoA-I 模倣ペプチド) を合成し、それらの作用が従来型模倣ペプチドより強力であるかを検討し、改良型が従来型よりもマクロファージからのコレステロール引き抜き作用が強力であることを確認した。

(2) 抗炎症作用として、ヒト冠動脈内皮細胞 (HCECs) などを使用し、細胞からの monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) と interleukin-6 (IL-6) の分泌抑制作用を検討した。抗炎症

作用として、細胞からの monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)と interleukin-6 (IL-6)の分泌抑制作用を検討した。

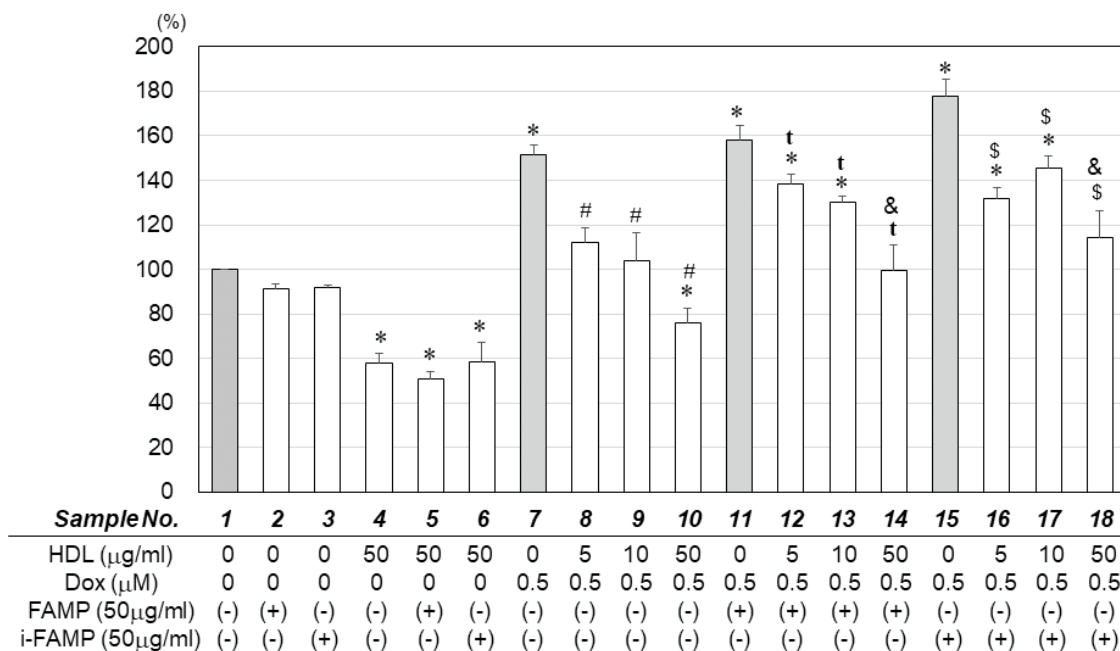
MCP-1 secretion under the various treatment in HCECs



*p<0.05 vs. No. 1. #p<0.05 vs. No. 2. †p<0.05 vs. No. 3. §p<0.05 vs. No. 4. &p<0.05 vs. No. 6.

(3) 抗アポトーシス作用として、H9C2 細胞にて、カスパーゼ活性化抑制作用も測定した。H9C2 細胞における HDL によるカスパーゼ活性化抑制作用を認めたが、模倣ペプチドではその作用を増強してはいなかった。

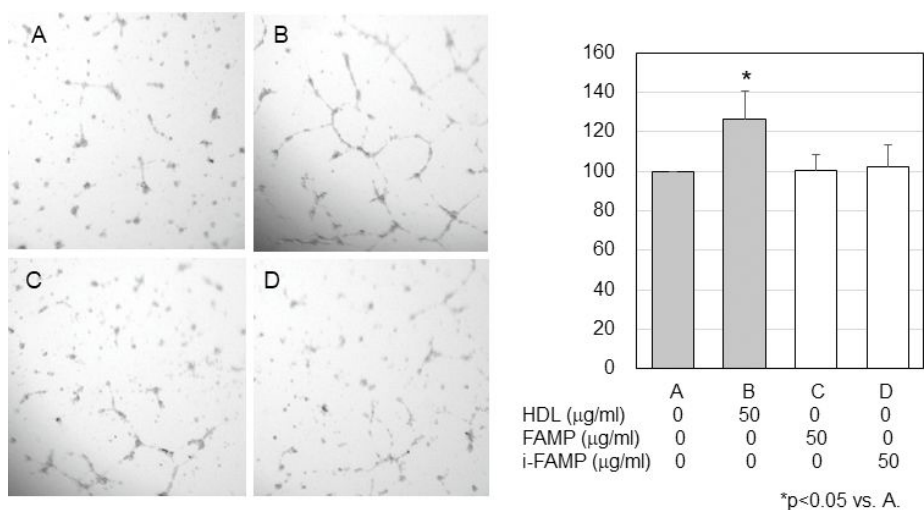
Caspase 3/7 activities under the various treatment in H9C2 cells



*p<0.05 vs. No. 1. #p<0.05 vs. No. 7. †p<0.05 vs. No. 11. §p<0.05 vs. No. 15. &p<0.05 vs. No. 10.

(4) HCECs を使用し、その増殖能および管腔形成作用を測定した。内皮細胞管腔形成作用も改良型が従来型よりも強力であった。

Effects of HDL, FAMP and i-FAMP on HCEC tube formation



HDLは、内皮細胞管腔形成作用や抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有しているが、模倣ペプチドにて、それらの作用を増強させる場合とそうでない場合があり、かつ、改良型が従来型よりもそれらの作用が強力な場合とそうでない場合があることがわかった。今後は、更なる細胞なシグナル伝達の違いを検討する必要性を認めた。

(5) 改良型模倣ペプチドよりもさらにレステロール引き抜き能が向上したPEG化模倣ペプチドを開発した。

(6) In vivoの実験として、ドキソルビシン誘導心機能障害マウスモデルの作成に成功し、改良型 ApoA-I 模倣ペプチドが心機能障害を抑制することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 三浦伸一郎、松尾佳野
2. 発表標題 改良型アポ蛋白A-I模倣ペプチド による多面的作用
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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 Shinichiro) (20343709)	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
---------	---------