

機関番号：32202

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590887

研究課題名 (和文) エリスロポエチン受容体アゴニストの抗動脈硬化作用に関する研究

研究課題名 (英文) Anti-atherosclerotic effects of an erythropoietin receptor agonist

研究代表者

上羽 洋人 (UEBA HIROTO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80316546

研究成果の概要 (和文)：エリスロポエチン(EPO)は造血促進作用以外に細胞保護効果を有することが明らかとなり注目を集めているが、その血栓症惹起作用が臨床使用を困難にしている。本研究では動脈硬化・心筋梗塞を自然発症する WHHLM I ウサギを用いて副作用を有しない EPO 受容体アゴニスト (EPORA) の抗動脈硬化作用を検討した。EPORA はアポトーシス抑制・抗炎症作用を示し、WHHLM I ウサギの冠動脈病変の進展を有意に抑制した。EPORA にはスタチンのような多面的効果が認められ、新しい動脈硬化治療薬として臨床応用が期待される。

研究成果の概要 (英文)：Erythropoietin (EPO) has been shown to have nonhematopoietic, tissue-protective effects, including suppression of atherosclerosis. However, prothrombotic effects of EPO hinder its clinical use in non-anemic patients. In the present study, we examined anti-atherosclerotic effects of an EPO receptor agonist (EPORA) that does not have adverse effects of EPO using myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLM I) rabbits. EPORA demonstrated anti-apoptotic and anti-inflammatory effects and significantly suppressed the progression of coronary atherosclerotic lesions in WHHLM I rabbits. Because EPORA has pleiotropic effects just like statins, it may be a promising candidate for a novel anti-atherosclerotic agent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科学

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：エリスロポエチン、アゴニスト、動脈硬化、血管内皮細胞、アポトーシス、シグナル伝達、WHHLM I ウサギ

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化性疾患はわが国における死因の上位を占め、その病態の根幹を成す動脈硬化の発症・進展を抑制する新しい治療法を開発するこ

とは現代医学における重要なテーマの一つである。動脈硬化のリスクファクターには高脂血症、糖尿病、高血圧症などがあり、最近ではこれらのリスクファクターを複数有するメタボリックシンドロームが問題となっ

ている。高脂血症に対してはスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) が臨床で広く用いられており、コレステロール低下作用の他に抗炎症作用や血管内皮機能改善作用などのいわゆる pleiotropic effects を有することが知られているが、肝機能障害や腎機能障害のある患者では使用が制限され、横紋筋融解症など重篤な副作用も報告されている。最近、我々は糖尿病治療薬であるピオグリタゾンがメタボリックシンドロームの患者において冠動脈ステント留置後の新生内膜過形成を抑制することを血管内超音波による検討で明らかにした (Am Heart J. 2007;153:762e1-762e7.)。ピオグリタゾンが高リスクの2型糖尿病患者において心血管イベントを有意に抑制することは PROactive Study で報告されており (Lancet. 2005;366(9493):1279-89.)、新しい動脈硬化治療薬の一つとして有望であるが、現在のところ糖尿病患者にしか使用できず、心不全および重篤な肝機能障害・腎機能障害には禁忌である。

このような現況を踏まえて、我々は米国 Warren Institute の Cerami らのグループと共同研究を行い、動脈硬化の発症・進展における重要な因子である血管内皮細胞のアポトーシスおよび単球/マクロファージによる炎症性サイトカインの産生を抑制する新しいペプチドの探索を行ってきた。当初、Cerami らはエリスロポエチン (EPO) の細胞保護作用に注目し、EPO がラット心筋梗塞モデルの心機能を改善することを示した (Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(8):4802-6.)。EPO 受容体にはホモダイマーとヘテロダイマーの2種類があり、ホモダイマーはエリスロポエチン受容体が2量体を形成しており、赤血球系前駆細胞の増殖促進作用に必要な受容体と考えられている。一方、ヘテロダイマーは顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 受容体、インターロイキン3受容体およびインターロイキン5受容体に共通する情報伝達サブユニットである共通 β 受容体とEPO受容体が2量体を形成したものであり、このヘテロダイマーを介するEPOの作用には造血促進作用はみられず、アポトーシス抑制作用を中心とした細胞保護作用のみ認められることが明らかになった (Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(41):14907-12.)。Cerami らはこのヘテロダイマーにのみ結合し、ホモダイマーには結合しない性質を有するカルバミル化EPOの開発に成功し、ラット心筋梗塞モデルに投与したところ、ヘマトクリット値を上昇させることなく梗塞後の心機能を改善させることが分かった (Science. 2004;305(5681):239-42.)。このカルバミル化EPOの受容体結合部位と相同な小分子ペプチド (EPO受容体アゴニスト: 以下 EPORA と表

記) を合成してその生物学的活性を調べたところ、抗アポトーシス作用などの細胞保護作用および抗炎症作用はEPOと同等であることが判明した。

ここで注目すべき点は、この EPORA は GM-CSF 受容体と共通の β 受容体とEPO受容体のヘテロダイマーを介して作用するということである。GM-CSF に関しては、Shindo らが家族性高コレステロール血症の動物モデルである WHHL ウサギを用いた検討で、GM-CSF が血管平滑筋細胞のアポトーシスを促進することにより動脈硬化病変の進行を阻止することを報告している (Circulation. 1999;99:2150-2156.)。また、Inoue らはやはり WHHL ウサギを用いた検討で、マクロファージコロニー刺激因子がマクロファージの機能に影響を及ぼして動脈硬化病変の進行を抑制することを報告している (Atherosclerosis. 1992;93:245-254.)。我々は *in vitro* の検討で、EPO が血管内皮細胞の一酸化窒素 (NO) 産生を促進することを確認しており、これらの報告と合わせて考慮すると、今回新しく合成された EPORA が抗動脈硬化作用を有する可能性は高いと考えられた。

2. 研究の目的

最近、我々は C-反応性タンパク質 (CRP) が *in vitro* で血管内皮細胞のアポトーシスを惹起することを示し、さらに CRP が単球による炎症性サイトカインの産生と動脈硬化病変における粥腫の破裂に関与しているマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) の産生を促進することを明らかにした (Atherosclerosis. 2008;196(1):129-35.)。この系を用いて preliminary study を行ったところ、EPORA は CRP による内皮細胞のアポトーシスおよび単球での炎症性サイトカイン産生を抑制することが分かった。そこで本研究では、EPORA の *in vivo* における抗動脈硬化作用を調べるために、動脈硬化・心筋梗塞を自然発症する WHHLMI ウサギに EPORA を投与して動脈硬化病変の進行が抑制されるか否かを冠動脈病変と大動脈病変について検討した。また、EPORA の抗動脈硬化作用のメカニズムを調べるために、上述の *in vitro* 実験系を用いて、血管内皮細胞における NO 産生能やアポトーシス抑制に関与するシグナル伝達系が EPORA によってどのような影響を受けるかを評価し、さらに炎症性サイトカインや MMP-9 の動脈硬化病変における発現についても検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 実験

神戸大学医学部附属動物実験施設の塩見准教授の協力を得て WHHLMI ウサギの飼育は同施設において行った。2月齢の WHHLMI ウ

サギ 16 匹を 2 群に分け、EPORA 群では 30 μ g/kg の EPORA を 3 回/週、32 週間皮下投与した (n=8)。コントロール群では同量の control peptide を同様に皮下投与した (n=8)。餌、水は不断給仕とし、毎月 1 回採血を行って血算、総コレステロール値、中性脂肪値を測定し、実験開始時と終了時には血清 TNF- α と CRP の測定を行った。32 週間飼育後、ペントバルビタール麻酔下で sacrifice して冠動脈および大動脈を採取し、10%ホルムアルデヒドにて固定した。冠動脈硬化病変の評価は連続パラフィン包埋切片を作製して平均内径狭窄率および有意狭窄病変 (>75%) 保有率で行い、大動脈病変に関してはイメージアナライザーを用いて内膜表面の病変面積 (%) を計算して両群間で比較した。また、冠動脈病変については TNF- α と MMP-9 の発現を免疫組織染色により評価し、内皮細胞のアポトーシスを in situ TdT assay を用いて検討した。

(2) in vitro 実験

①血管内皮細胞における NO 産生能に及ぼす EPORA の影響：CRP は動脈硬化惹起物質であり、CRP による内皮傷害に対する EPORA の影響をみることは EPORA の抗動脈硬化作用を評価する上で意義がある。そこで、既報のずり応力負荷実験系 (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:1512-16.) および NO assay 系 (Atherosclerosis. 2005;183(1):35-9.) を用いて CRP によるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における NO 産生障害を EPORA が抑制するか否か調べた。

②血管内皮細胞のアポトーシスに対する EPORA の効果：既報の実験系を用いて (Atherosclerosis 2008 196(1) 129-35.)、CRP によって惹起される内皮細胞のアポトーシスに対する EPORA の抑制効果をフローサイトメトリーによって評価し、さらにウェスタンブロット法を用いてそのシグナル伝達系について検討した。

③単球における TNF- α と MMP-9 の産生に対する EPORA の影響：上記の実験系を用いて、CRP がヒト単球系細胞 (THP-1) において TNF- α と MMP-9 を産生することを ELISA 法にて確認後、これらに対する EPORA の産生抑制効果の評価した。

データは平均 \pm SEM で示し、検定は 2 群間においては Student' s t tests または Mann-Whitney U test、3 群間以上は ANOVA または Kruskal-Wallis test を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) EPORA による WHHLMI ウサギにおける冠動脈硬化病変の抑制効果

EPORA 群ではコントロール群に比して冠動脈病変の進行が有意に抑制された (図 1)。また、有意狭窄病変 (>75%) 保有率に関しても、EPORA 群で明らかな減少がみられた (コン

ロール 17.9 \pm 6.2%、EPORA 3.7 \pm 2.5%)。

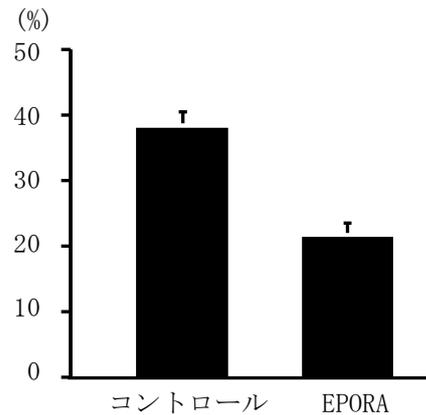


図 1. 冠動脈内径狭窄率

これに対して、大動脈病変においては 2 群間で有意差は認められなかった (動脈硬化病変面積：コントロール 79.6 \pm 3.5%、EPORA 81.4 \pm 2.4%)。この原因に関しては、EPORA の抗動脈硬化作用を伝達する共通 β 受容体の発現が冠動脈病変と大動脈病変で異なっている可能性があり現在比較検討中である。

次に、冠動脈病変における TNF- α の産生に及ぼす EPORA の効果を検討したところ、図 2 の如く EPORA 群において TNF- α の産生が顕著に抑制されていた (TNF- α 陽性病変面積：コントロール 6.3 \pm 1.5%、EPORA 0.9 \pm 0.2%)。MMP-9 の産生には両群間で有意差は見られなかった (MMP-9 陽性病変面積：コントロール 6.8 \pm 2.4%、EPORA 6.0 \pm 3.1%)。

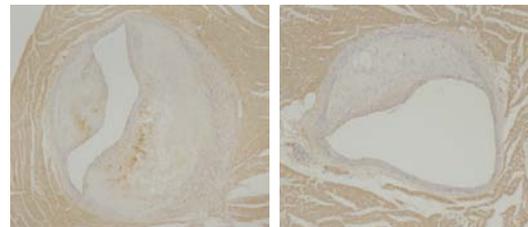


図 2. TNF- α 陽性病変 (褐色領域)

さらに、冠動脈病変における内皮細胞のアポトーシスについても EPORA 群で有意に抑制されていることが明らかになった (アポトーシス陽性内皮細胞：コントロール 2.3 \pm 0.2%、EPORA 0.4 \pm 0.1%)。

総コレステロール値、中性脂肪値、血清 TNF- α 値、CRP 値およびヘモグロビン値に関しては両群間で有意差を認めなかった。

(2) 血管内皮細胞における EPORA の NO 産生促進作用とアポトーシス抑制効果

ずり応力によって内皮細胞から産生される NO が抗動脈硬化作用を有することは周知の通りであり、我々は既報において CRP がず

り応力による NO 産生を阻害することを明らかにしている (Atherosclerosis 2008 196(1) 129-35.)。この実験系に EPORA を投与すると、CRP により減少した NO 産生が有意に回復することが分かった (図 3)。

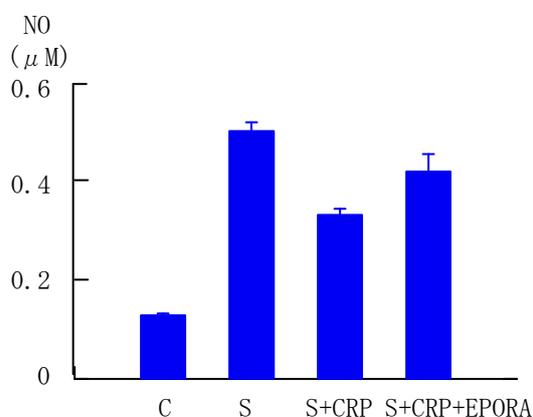


図 3. EPORA の NO 産生促進作用 (C: コントロール、S: ずり応力)

また、EPORA は CRP によって誘導される HUVEC のアポトーシスも顕著に抑制し、その効果は EPO よりも強力であった (アポトーシス陽性細胞: コントロール $1.8 \pm 0.3\%$ 、CRP $3.1 \pm 0.3\%$ 、CRP+EPO $2.8 \pm 0.2\%$ 、CRP+EPORA $2.2 \pm 0.2\%$)。ウェスタンブロット法による内皮細胞のシグナル伝達系の検討では、EPORA は EPO と同様に Akt および ERK1/2 を活性化することが分かり、さらに siRNA 法を用いた阻害実験によりアポトーシスの抑制には Akt が重要な役割を演じていることが明らかとなった。

(3) 単球における EPORA による TNF- α および MMP-9 の産生抑制効果

CRP は単球による TNF- α と MMP-9 の産生も誘導して動脈硬化病変の発症・進展に関与するが (Atherosclerosis 2008 196(1) 129-35.)、EPORA は EPO と同じ程度にこれらの産生も有意に抑制した (TNF- α 産生量: コントロール 61.8 ± 3.2 pg/ml、CRP 79.7 ± 4.5 pg/ml、CRP+EPO 54.1 ± 1.9 pg/ml、CRP+EPORA 62.8 ± 4.3 pg/ml、MMP-9 産生量: コントロール 3.1 ± 0.2 ng/ml、CRP 3.5 ± 0.1 ng/ml、CRP+EPO 3.2 ± 0.3 ng/ml、CRP+EPORA 3.1 ± 0.1 ng/ml)。

以上より、EPORA は EPO に勝るとも劣らないアポトーシス抑制作用および抗炎症作用を有し、心筋梗塞を自然発症する動物モデルである WHHLMI ウサギの冠動脈硬化病変の進行を有意に抑制することが判明した。内皮細胞のアポトーシス抑制作用においては Akt が重要な働きをしていることも明らかとなり、これは最近我々が報告した EPORA の心筋保護作用と同様のメカニズムと考えられる (Proc

Natl Acad Sci U S A. 2010;107(32): 14357-14362.)。EPORA には EPO 投与時に見られる血栓症惹起作用がなく大量投与も可能であり、さらにはスタチンのような多面的効果も認められることから、新しい動脈硬化治療薬として今後の臨床応用が期待される (投稿準備中)。

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 3 件)

(1) Masanobu Kawakami, Hiroto Ueba, Michael Brines, Michael Yamin, Tomio Umemoto, Junya Ako, Shin-ichi Momomura, and Anthony Cerami. Reply to Abdelwahid and Smith: The effect on cardiomyocytes of helix B-surface peptide (HBSP), a peptide with cell-protective but not erythropoietic activities of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(6):E18.

(2) Hiroto Ueba, Michael Brines, Michael Yamin, Tomio Umemoto, Junya Ako, Shin-ichi Momomura, Anthony Cerami, and Masanobu Kawakami. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(32): 14357-14362.

(3) Aoi Nabata, Masatoshi Kuroki, Hiroto Ueba, Shigemasa Hashimoto, Tomio Umemoto, Hiroshi Wada, Takanori Yasu, Muneyasu Saito, Shin-ichi Momomura, Masanobu Kawakami. C-Reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrix metalloproteinase-9 production in human mononuclear cells: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque. Atherosclerosis. 2008;196(1):129-35.

[学会発表] (計 3 件)

(1) Ueba, H, Hashimoto, S, Umemoto, T, Ako, J, Momomura, S, Kawakami, M. Role of osteopontin and $\alpha v \beta 3$ integrin in the regulation of endothelial cell survival by endothelial cell-monocyte interaction. 第 42 回日本動脈硬化学会総会 2010 年 7 月 15 日 岐阜市.

(2) Ueba, H, Brines, M, Yamin, M, Umemoto, T, Ako, J, Momomura, S, Cerami, A, Kawakami, M. Cardiomyocyte protection by a nonerythropoietic, tissue-protective

peptide derived from erythropoietin. 第
74 回日本循環器学会総会 2010 年 3 月 5 日
京都市.

(3) Ueba, H., Nabata, A, Kuroki, M,
Hashimoto, S, Umemoto, T, Sugawara, Y,
Kubo, N, Momomura, S, Kawakami, M.
Induction of endothelial cell apoptosis
and monocyte matrix
metalloproteinase-9 production by
C-reactive protein. 第 73 回日本循環器学
会総会 2009 年 3 月 21 日 大阪市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上羽 洋人 (UEBA HIROTO)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：80316546

(2) 研究分担者

川上 正舒 (KAWAKAMI MASANOBU)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：40161286