

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04124

研究課題名（和文）動脈硬化治療法の確立に向けたHDLリモデリングの分子基盤の解明とその応用

研究課題名（英文）Functional analysis of ApoA-I/HDL binding protein for the treatment of atherosclerosis

研究代表者

奥平 桂一郎 (Okuhira, Keiichiro)

大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10425671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患に対して、高密度リポタンパク質（HDL）は病変からの脂質の引き抜き作用や炎症を抑える効果によって、動脈硬化を改善することが知られている。本研究では、HDLと結合するタンパク質ApoA-I binding protein (AIBP) が抗炎症作用を有すること、また、生体におけるAIBPの発現分布、及びAIBPタンパク質が動脈硬化に対する予防や治療に利用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDLが動脈硬化に対して予防的・抑制的に働くことは知られているが、HDLを利用することによって動脈硬化を治療する薬はまだ実現していない。本研究によって得られた研究成果の学術的・社会的意義は、HDLの作用を増強すると考えられるAIBPの機能が明らかとなり、AIBPタンパク質が動脈硬化に対する予防や治療に利用されることが示されたという点にある。

研究成果の概要（英文）：High-density lipoprotein (HDL) is known to show preventive effects against atherosclerotic diseases such as myocardial infarction and ischemic stroke by releasing lipids from lesions and suppressing inflammation. In this study, we demonstrated that the inflammatory effect of ApoA-I binding protein (AIBP) and the distribution of AIBP expression in vivo, and showed that AIBP could be used for the prevention and treatment against atherosclerosis.

研究分野：生化学

キーワード：動脈硬化

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血漿リポタンパク質は脂質や脂溶性物質の血中運搬を担い、中でも「善玉」と呼ばれる高密度リポタンパク質 (HDL) は、その血中濃度が高いほど心疾患・脳卒中などの動脈硬化性疾患のリスクが低下することが分かっている。HDL の生体での役割は多岐にわたり、余剰コレステロールの回収・処理 (コレステロール逆転送)、抗酸化・抗炎症効果、血小板凝集抑制、血管内皮障害改善、等の様々な作用により抗動脈硬化的に働くと考えられている。特に、コレステロール逆転送活性は、HDL が末梢組織 (動脈硬化病変を含む) に蓄積した余剰コレステロールを脂質トランスポーター (ABC トランスポーター) を介して引き抜き (脂質搬出反応)、最後は肝臓へと運ばれ異化されるという一連の経路により、動脈硬化病変の退縮を促進する。HDL による抗動脈硬化作用を治療に応用することができれば、形成された病変を縮小させる効果によりイベント抑制率が劇的に改善することが予想される。

ApoA-I binding protein (AIBP) は、HDL 構成タンパク質である apoA-I に強く結合するタンパク質として 2002 年に発見されたが、これまでその機能についてはほとんど分かっていなかった。最近 AIBP が HDL による細胞からの脂質搬出反応を促進することが報告され、申請者も独自に研究を進め、AIBP が HDL と結合して、HDL の脂質搬出、抗炎症効果等を促進することを確認している。しかし、その生理的意義および活性の分子機構についてはまだ理解が進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究では、AIBP の機能の検証および生理活性の分子機構を明らかにすることを目的として研究を進めた。HDL は脂質搬出活性だけでなく抗炎症作用を示すことで、動脈硬化に対して予防的・抑制的に機能する。AIBP は HDL の抗炎症作用を増強することが示唆されており、動脈硬化が進んで血管壁で慢性的に炎症が起こっている場合に、それらを抑制する反応に関わることが予想された。そこで、AIBP による HDL 炎症活性増強機能の評価、マウスにおける AIBP の抗炎症作用の検証、抗動脈硬化作用の評価、及び、マウス及びヒトにおける AIBP 発現量の評価を行った。

### 3. 研究の方法

リコンビナント AIBP タンパク質を野生型及び動脈硬化モデルマウスに静注し、炎症性サイトカイン量を測定した。また、マウス冠状大動脈における脂質の蓄積や病変の退縮を病理学的に分析した。マウスの血液中および各組織における AIBP の発現を評価し、通常マウスと Aged マウスとの比較を行った。ヒトから採取した血液における AIBP 濃度を測定し、生化学検査値との相関を調べた。

### 4. 研究成果

まず、*in vivo* での AIBP の炎症抑制効果を調べるために、LPS を腹腔内投与して炎症を惹起したマウスにリコンビナント AIBP タンパク質を静脈内投与して、血中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6) の量を ELISA により測定した。細胞を使った実験においては、AIBP が TNF- $\alpha$  や IL-6 の量を著しく減少させたことから、マウスにおいても炎症を抑制する効果が観察されることが予想された。しかし、AIBP の投与により血液中の TNF- $\alpha$  や IL-6 の量は抑制される傾向にはあったが、その効果は限定的であった。そこで、AIBP 投与マウスの血液を経時的に採取してウェスタンブロッティングにより AIBP の血中滞留性を評価したところ、約 8 割の AIBP が投与から 4 時間で血中から消失していることが明らかになった (図 1)。AIBP が血中から速やかに代謝されることが分かったため、その改善を目的として、AIBP の C 末端にアルブミン結合ドメイン (ABD) を融合させた改変型リコンビナント AIBP (AIBP-ABD) を大腸菌にて作成し、精製リコンビナントタンパク質を取得した。ABD を有するタンパク質が血液中のアルブミンと結合することにより血中からの消失が抑制されることは、過去の研究から報告されている (Protein Eng Des Sel, 28, 385-393, 2015)。この新しく作成した改変型リコンビナント AIBP タンパク質をマウスに投与して、AIBP の血中量を測定したところ、24 時間後に投与量の約 7 割が残存していることが明らかとなった (図 1)。すなわち、当初予想した通り、改変型 AIBP はアルブミンと結合することで血中滞留性が大幅に改善したと考えられる。この改変型 AIBP の炎症に対する効果について、マクロファージ細胞を用いて RT-PCR により調べたところ、LPS で誘導された TNF-

a、IL-6、IL-1 $\beta$ の発現が抑制されることが分かった。また、その効果は野生型 AIBP とほぼ同程度であった (図2)。このことは、改変型 AIBP が野生型 AIBP とほぼ同等の抗炎症活性を有していることを示している。そこで次に、マウスに改変型 AIBP を投与して、*in vivo* における抗炎症効果を検証した。LPS 投与によって誘導される血中炎症性サイトカインへの影響を調べたところ、AIBP-ABD の投与によって、血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 量は、LPS 単独投与時と比較してほとんど変化がなかった (data not shown)。さらに、高脂肪食を負荷した動脈硬化モデルマウスに対して、野生型 AIBP 及び改変型 AIBP を投与して動脈硬化形成における効果を確認した。マウスの心臓切片を作成して動脈硬化のプラークサイズを測定したところ、プラークの減少は観察されなかった (図3)。このことは、*in vivo* で AIBP が効果を示すためには、今回作成した野生型の AIBP 及び改変型 AIBP では不十分であることを示している。野生型 AIBP は、血中での滞留時間が短すぎることがその効果を示すことができない原因であると考えられ、血中滞留性が改善された改変型

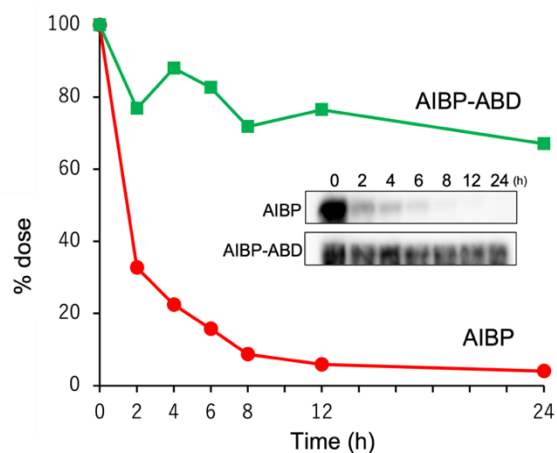


図1 リコンビナント AIBP の血中滞留性

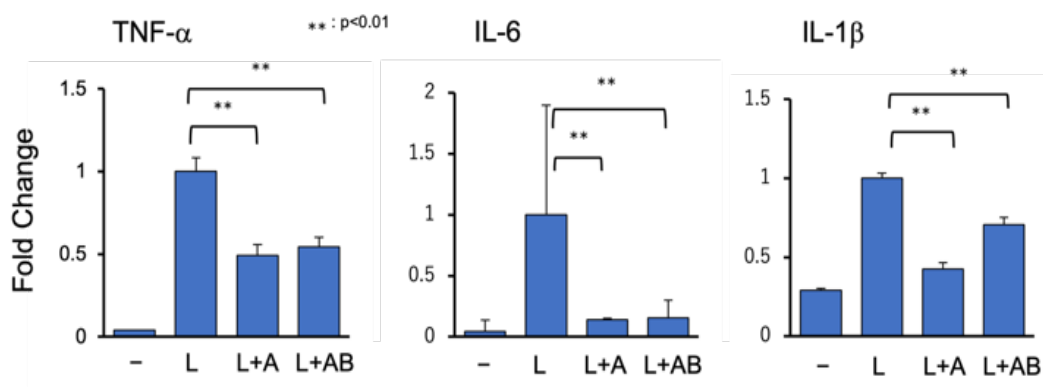


図2 リコンビナント AIBP のマクロファージにおける抗炎症効果  
L:LPS, L+A:LPS+AIBP, L+AB:LPS+AIBP-ABD

AIBP は *in vitro* では炎症抑制効果を示すものの、*in vivo* では効果を示さないことが明らかとなった。このことは、単純に AIBP の血中滞留性を上昇させるだけでは十分ではないことを示しており、AIBP は血中で HDL と結合して機能することが重要であることを示唆しているかもしれない。現在は AIBP と HDL との結合性について詳細に調べている。

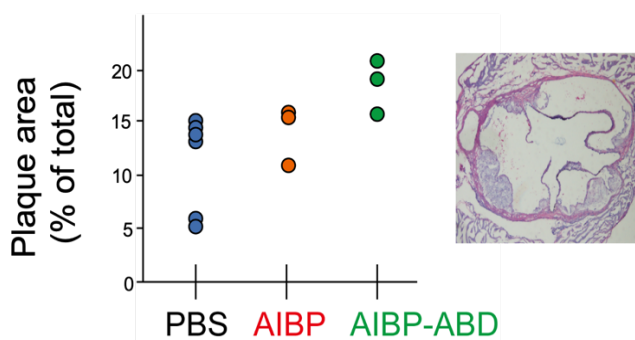


図3 動脈硬化形成に対する AIBP の効果

さらに、マウスにおける AIBP タンパク質の組織分布を調べた。調査した組織のうち、肝臓、大腸で AIBP の発現量が多く、脾臓・膵臓・胸腺ではほとんど AIBP の発現が認められないことが明らかになった (図 4 A)。また、週齢の違うマウスの臓器をそれぞれ採取し、AIBP の発現量の比較を行ったところ、心臓、胃、精巣、大動脈などの組織では、加齢により AIBP の発現量がやや増加する傾向にあることがわかった。一方で、肺、腸+大腸では、AIBP レベルはわずかに減少していた。また、週齢によらず肝臓および腎臓の AIBP 発現量は高かった (図 4 B)。

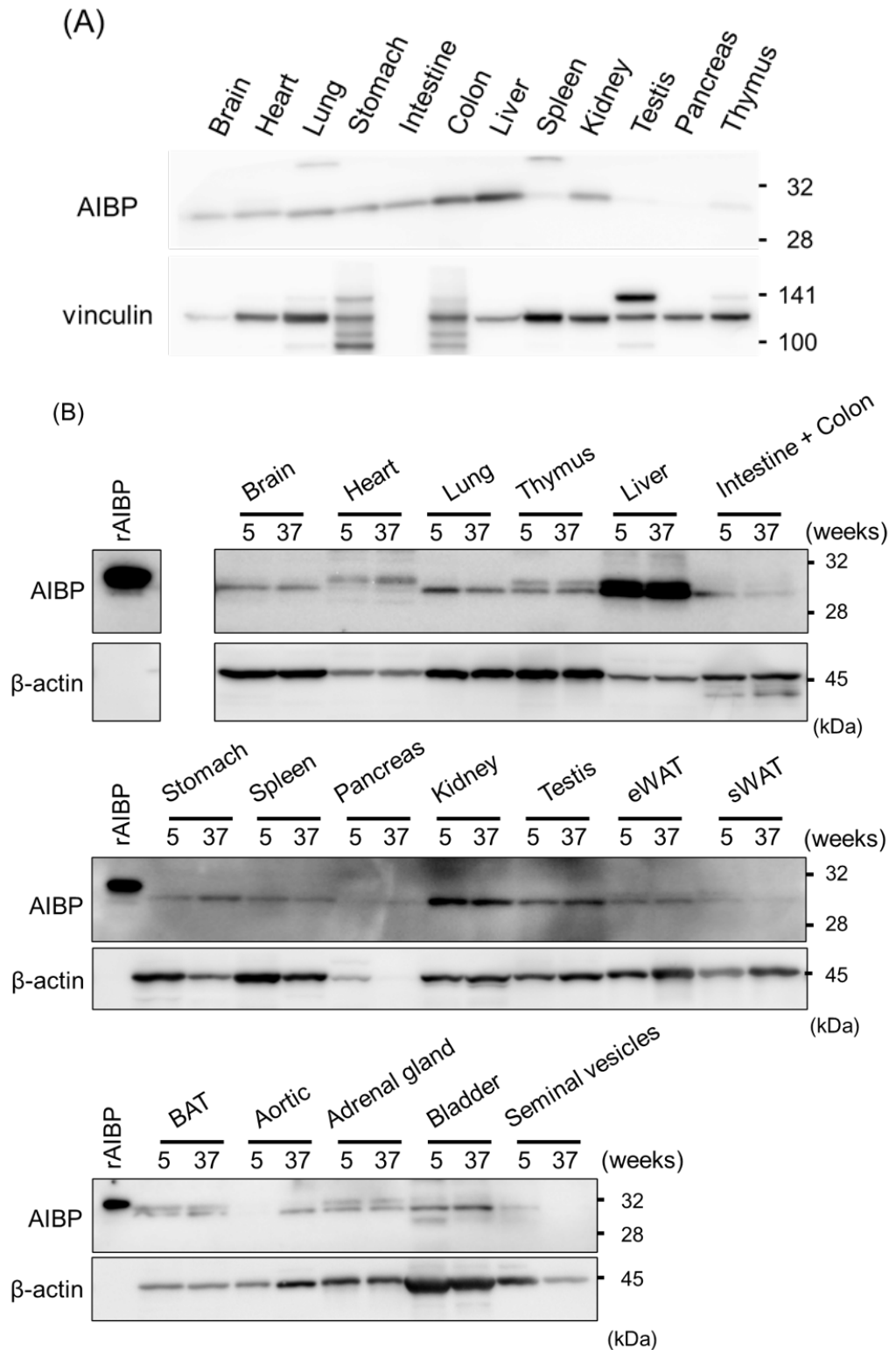


図 4 マウス各種臓器における AIBP タンパク質の発現

最後に、ヒト血清中の AIBP の濃度を測定した。BioIVT 社より購入した 30 検体の健常ヒト血清について AIBP が検出され、30 検体の平均血清 AIBP 濃度は  $120 (\pm 8.8)$  ng/mL であった。Black, Caucasian, Hispanic の人種間で血清 AIBP 濃度に有意な差は無かった (図 5 A)。これらの検体について、血清 AIBP 濃度と Age, Total cholesterol, Triglyceride の相関を確認したところ、それぞれ  $R^2 = 0.0348, 0.039, 0.3926$  となり、血清 AIBP 濃度と Triglyceride の相関は統計的に有意であった (図 5 B)。血清中の中性脂質の濃度が高いとアテローム性動脈硬化症のリスクが増すことが知られており、血清 AIBP 量がアテローム性動脈硬化リスクを反映している可能性を示唆した。

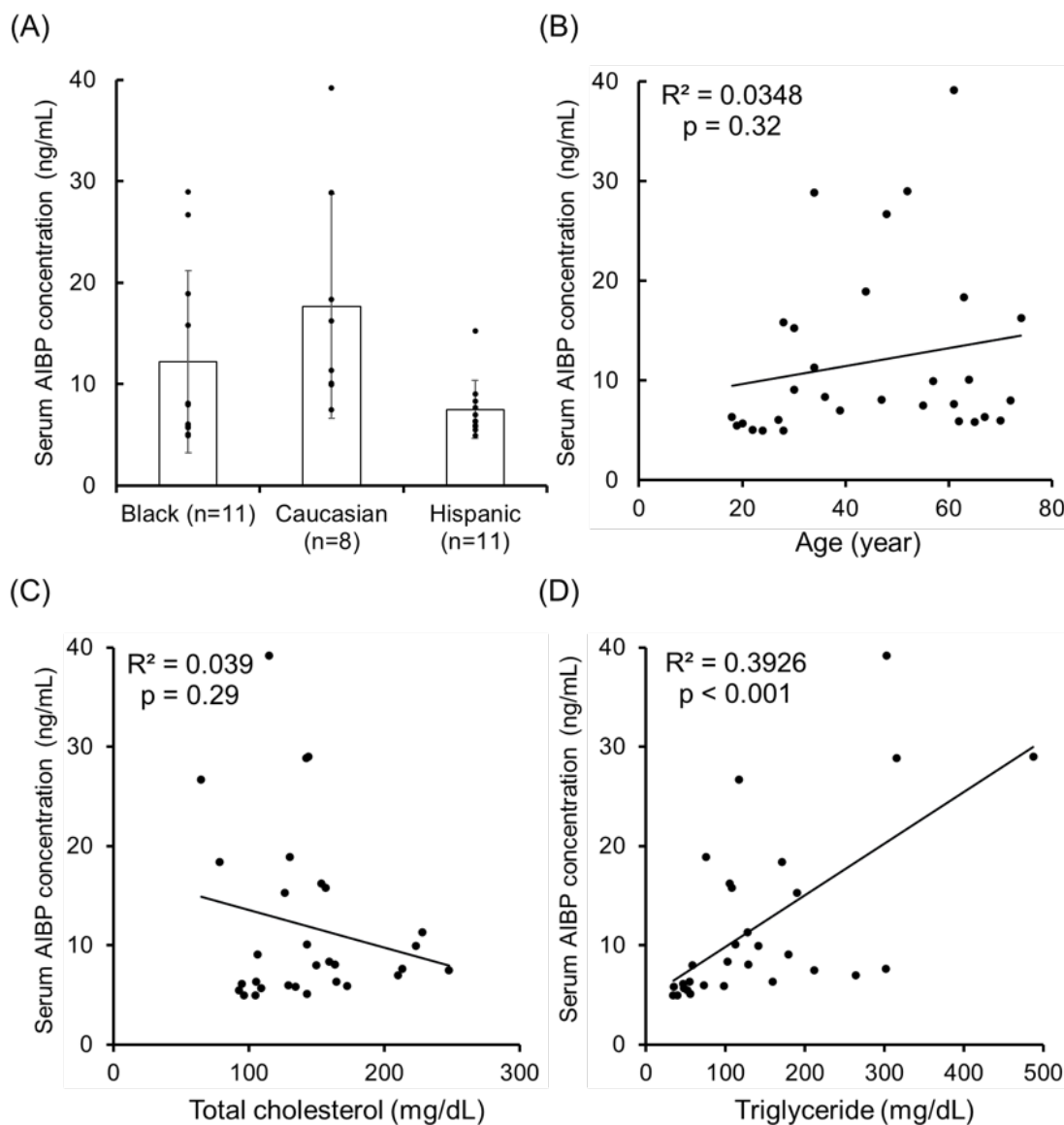


図 5 人種別のヒト血清中 AIBP 濃度 (A)、及び、AIBP 濃度と年齢 (B)、総コレステロール (C) 中性脂質 (D) の相関

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tachibana Koki, Kusumoto Kohshi, Ogawa Mai, Ando Hidenori, Shimizu Taro, Ishima Yu, Ishida Tatsuhiro, Okuhira Keiichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 FTY720 Reduces Lipid Accumulation by Upregulating ABCA1 through Liver X Receptor and Sphingosine Kinase 2 Signaling in Macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232314617	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 該当する
1. 著者名 Kinoshita Ryo, Ishima Yu, Chuang Victor T. G., Watanabe Hiroshi, Shimizu Taro, Ando Hidenori, Okuhira Keiichiro, Otagiri Masaki, Ishida Tatsuhiro, Maruyama Toru	4. 巻 13
2. 論文標題 The Therapeutic Effect of Human Serum Albumin Dimer-Doxorubicin Complex against Human Pancreatic Tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13081209	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 Hirakawa Naoki, Ishima Yu, Kinoshita Ryo, Nakano Ryuto, Chuang Victor Tuan Giam, Ando Hidenori, Shimizu Taro, Okuhira Keiichiro, Maruyama Toru, Otagiri Masaki, Ishida Tatsuhiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Reduction-Responsive and Multidrug Deliverable Albumin Nanoparticles: An Antitumor Drug to Abraxane against Human Pancreatic Tumor-Bearing Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 4302 ~ 4309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.1c00110	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 Sakuma Satoru, Yabuuchi Midori, Yoshizumi Ayumi, Okajima Yui, Fujimoto Yohko, Okuhira Keiichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparative Effects of Luteolin and Quercetin on Adipogenesis in 3T3-L1 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.29169/1927-5951.2021.11.09	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 Sakuma Satoru, Yasuda Kana, Kitahara Risa, Tsujimoto Kaho, Yamashita Kishiko, Hoshino Naohiro, Fujimoto Yohko, Okuhira Keiichiro	4. 巻 2022
2. 論文標題 Comparative Effects of Sulforaphane and Allyl Isothiocyanate on 3T3-L1 Adipogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutrition and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/8705163	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 Ueda Masahiro, Komiya Chiaki, Arie Sayuki, Kusumoto Kohshi, Denda Masaya, Okuhira Keiichiro, Shigenaga Akira, Otaka Akira	4. 巻 68
2. 論文標題 Sequence-Independent Traceless Method for Preparation of Peptide/Protein Thioesters Using CPaseY-Mediated Hydrazinolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1226~1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00674	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 Ishima Yu, Mimono Ai, Tuan Giam Chuang Victor, Fukuda Tetsuya, Kusumoto Kohshi, Okuhira Keiichiro, Suwa Yoshiaki, Watanabe Hiroshi, Ishida Tatsuhiro, Morioka Hiroshi, Maruyama Toru, Otagiri Masaki	4. 巻 72
2. 論文標題 Albumin domain mutants with enhanced A binding capacity identified by phage display analysis for application in various peripheral A elimination approaches of Alzheimer's disease treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUBMB Life	6. 最初と最後の頁 641~651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iub.2203	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 Tsujita Maki, Vaisman Boris, Chengyu Liu, Vickers Kasey C., Okuhira Keiichiro, Braesch Andersen Sten, Remaley Alan T.	4. 巻 595
2. 論文標題 Apolipoprotein A I in mouse cerebrospinal fluid derives from the liver and intestine via plasma high density lipoproteins assembled by ABCA1 and LCAT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 773~788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13950	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 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Maki Tsujita, Hiroshi Takase, Keito Furuie, Motonari Tsubaki, Keiichiro Okuhira, Frank J Gonzalez, Natsuko Kumamoto, Shinya Ugawa
2. 発表標題 The magnetic field treated wild-type mice, and in untreated Abca1-null mice reduced the adult-neurogenesis at the hippocampal dentate gyrus
3. 学会等名 ABC2023 - 9th FEBS Special Meeting ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases (国際学会)
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 立花洗季, 楠本嵩志, 前橋梨花, 樹山友絵, 永尾綾菜, 辻田麻紀, 異島優, 石田竜弘, 奥平桂一郎
2. 発表標題 ApoA-1 binding protein の加齢に伴う血清中濃度の変化およびその抗炎症作用
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 立花洗季, 楠本嵩志, 前橋梨花, 樹山友絵, 永尾綾菜, 辻田麻紀, 異島優, 石田竜弘, 奥平桂一郎
2. 発表標題 抗炎症タンパク質ApoA-1 binding protein の加齢に伴う血清中濃度の変化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 服部菜々美, 佐久間寛, 奥平桂一郎
2. 発表標題 SulforaphaneはPRDM16経路を介して白色脂肪細胞のベージュ化を誘導する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年~2023年



1. 発表者名 立花 洸季、小川 真依、石田 竜弘、異島 優、奥平 桂一郎
2. 発表標題 免疫抑制剤フィンゴリモドによるABCトランスポーターの増加を介した泡沫化マクロファージへの脂質蓄積への影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 真依、立花 洸季、石田 竜弘、奥平 桂一郎
2. 発表標題 多発性硬化症治療薬FTY720によるABCトランスポーターA1発現に対する影響とそのメカニズム
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maki Tsujita, Juniki Yamamoto, Rinka Maehashi, Alan T Remaley, Chieko Mineo, Philip W Shaul, Shinji Yokoyama and Keiichiro Okuhira
2. 発表標題 SAA and conditional SR-BI null mice plasma
3. 学会等名 19th International Symposium on Atherosclerosis (ISA2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻田麻紀、高瀬博嗣、奥平桂一郎、鏑木基成
2. 発表標題 磁場照射によるABCA1トランスポーター機能とマウス成体脳細胞新生への影響
3. 学会等名 第1回トランスポーター研究会関西西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東南 百花、佐久間 覚、奥平 桂一郎
2. 発表標題 3T3-L1細胞を用いた白色脂肪細胞のペーグ化関連遺伝子発現に対するスルフォラファンの影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥平 桂一郎
2. 発表標題 脂質トランスポーターABCA7の発現制御機構解明に向けた研究
3. 学会等名 第15回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥平 桂一郎
2. 発表標題 動脈硬化性疾患を標的としたHDL創薬への挑戦
3. 学会等名 徳島大学大学院医歯薬学研究部・BRIGHT合同公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立花 洸季、小川 真依、石田 竜弘、異島 優、奥平 桂一郎
2. 発表標題 免疫抑制剤フィンゴリモドがマクロファージへの脂質蓄積に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間 寛、奥平 桂一郎
2. 発表標題 3T3-L1前駆脂肪細胞の分化誘導に対するスルフォラファン及びアリルイソチオシアネートの影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪医科薬科大学 衛生化学研究室 <a href="https://www.oups.ac.jp/academics/lab/hgn.html">https://www.oups.ac.jp/academics/lab/hgn.html</a>
---

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	清水 太郎  (Shimizu Taro)  (30749388)	大阪大学・微生物病研究所・特任講師   (16101)	
研究分担者	田中 将史  (Tanaka Masafumi)  (40411904)	神戸薬科大学・薬学部・教授   (34512)	
研究分担者	石田 竜弘  (Ishida Tatsuhiro)  (50325271)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授   (16101)	

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
---------	---------