

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590960

研究課題名（和文） 創薬の可能性：新規ペプチド型合成 HDL の開発

研究課題名（英文） Possibility of drug discovery: Development of new peptide type of reconstituted HDL

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（和文）：最近、HDL を標的とした HDL 治療が注目されている。新規開発された ApoA-I 模倣ペプチドの抗動脈硬化作用をウサギモデルにて証明した。さらに、私たちオリジナルの ApoA-I 模倣ペプチドを開発した。このペプチドは強力な α ヘリックス構造を形成し、リン脂質を含まない特徴を有していた。また、pre β -HDL を増加させ、In vitro および In vivo におけるコレステロール引き抜き増強作用を確認した。

研究成果の概要（英文）：Recently, HDL targeted therapy has been attracting attention to prevent atherosclerosis. First, we proved that newly developed ApoA-I mimetic peptide containing phospholipids showed a strong anti-atherosclerotic effect in rabbit model of atherosclerosis. Next, we developed new ApoA-I mimetic peptide without phospholipids which forms strong α -helix structure. We found the mimetic peptide increased pre β -HDL and showed a strong anti-atherosclerotic effect in an in vivo and in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ApoA-I 模倣ペプチド、HDL、コレステロール引き抜き能、pre β -HDL、リン脂質

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患の一次・二次予防における高脂血症治療の原則は、スタチンによる低比重リポ蛋白（LDL）コレステロールの低下療法である。しかし、LDL コレステロールの積極的な低下だけでは、心血管疾患の発症の 2/3 は抑制できていない。そこで、次の治療標的として高比重リポ蛋白（HDL）の作用増強療法が注目されている。しかし、既存薬による

HDL 上昇効果は十分でない。最近、その解決策として、HDL 作用を増強させるために合成 HDL の開発が進められている。

HDL には、逆転送系（RCT）によるコレステロール引き抜き作用とともに、抗アポトーシス、血管弛緩・保護作用、泡沫細胞減少、抗炎症作用などの多面的効果が報告されている。私たちは、これまで、合成 HDL を使用し、下図のような RCT 増強作用に加えて、血流改

善作用（下肢虚血マウスモデル）、活性リン脂質スフィンゴシン1リン酸含有合成HDLの内皮管腔形成促進作用、心リモデリング抑制（ラット心筋梗塞モデル）、致死的不整脈抑制（ラット冠動脈再灌流不整脈モデル）などの多面的効果を報告してきた。合成HDLの有用性は疑う余地のないものであるが、私たちの使用した合成HDLは、アポ蛋白（A-I）とフォスファチジルコリン（POPC）を含有し（POPC/A-I）、特にA-Iは、Full length（267アミノ酸）であるため、その精製が難しく、一度に大量生産できず、静脈内投与のみしかできないという欠点を持ち、臨床治験には問題を残している。

2. 研究の目的

新規ペプチド型HDL（Apo-AI模倣ペプチド）の開発は、Apo-AIの267アミノ酸の内、後半部のヘリックス構造部（220-231残基）がATP-Binding Casstle Transporter-AI（ABCA1）を介したコレステロール引き抜き作用に重要という報告があり（Natarajan P et al. J Biol Chem. 2004）、このデータを基に推進する。また、私たちが以前から使用してきた合成HDLのPOPC/Apo-AI、それに既存のペプチド型HDLであるETC642も使用し比較する。ETC642の多面的効果面の欠点を見つける。その欠点を補うように、Apo-AI模倣ペプチドのデザインを行うこととした。その次に、そのアナログの主作用である動脈硬化退縮効果（コレステロール引き抜き作用）をIn Vivoにおいて確認するために、遺伝性高脂血症ウサギを利用する。また、マウスにおけるin vivoコレステロール逆転送系増強作用についても検討した。

3. 研究の方法

(1) キャピラリー電気泳動法によるApo-AI模倣ペプチドのヒト血漿への作用の解析

Lecithin cholesterol acyltransferase（LCAT）欠損患者や正常者の血漿を使用し、Apo-AI模倣ペプチド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) コレステロール引き抜き作用

³H-コレステロールを24時間インキュベートし細胞に取り込ませる。培地中に合成HDLを投与し、さらに20時間インキュベートして細胞上清中に引き抜かれる放射線ラベルコレステロール量を測定し、コレステロール引き抜き率を計算する。

(3) ワタナベ遺伝性高脂血症（WHHL）ウサギにおけるETC642の動脈硬化退縮効果

WHHLウサギ（月齢7-15ヶ月）にETC642またはコントロールとして生理食塩水を週2回、計12週間経静脈的に投与し、さらに血管内超音波（Intravascular ultrasound: IVUS）による大動脈プラークの解析を行った。ETC642投与前、投与12週後に大腿動脈からIVUSを挿入し、ETC642投与前後における胸部大動脈プラーク体積の変化率を計測し、高用量ETC642群、低用量ETC642群、コントロール群の3群において比較検討した。なお、IVUSによるプラークの評価は、左鎖骨下動脈を指標にして合成HDL投与前後で胸部大動脈の同一部位で計測した（左鎖骨下動脈から1-4cm離れた合計3cmの範囲でPVを計測）。

(4) 心筋梗塞マウスモデルにおける新規Apo-AI模倣ペプチドの効果

新規Apo-AI模倣ペプチドには、多面的効果（抗炎症、血管新生、抗アポトーシスなど）も期待され、心筋梗塞後の予後改善に役立つ可能性が示唆されたため、その効果を検討した。マウスを用いて心筋梗塞モデルを作製した。バッファ投与群（コントロール群）、新規Apo-AI模倣ペプチド低用量群（10mg/kg）、新規Apo-AI模倣ペプチド高用量群（50mg/kg）をそれぞれ腹腔内へ投与を行い、7日後に効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 合成HDL、Apo-AI模倣ペプチドの効果の比較検討

私たちが以前から使用してきたFull-lengthの合成HDLのPOPC/ApoA-I、それに既存のペプチド型HDLであるD4FやETC642を使用し、単球におけるコレステロール引き抜き能を比較した。細胞モデルにおいて、どのペプチドもHDLと同様の強力なコレステロール引き抜き能を有していた。また、POPC/ApoA-Iでは、自然高血圧発症モデルラットにおける効果を検討し、血圧に影響せず、中性脂肪を低下させる傾向をもたらしていた。

(2) WHHLウサギにおけるETC642の動脈硬化退縮効果

高用量ETC642群、低用量ETC642群、コントロール群の3群における月齢、体重、性別などの因子に有意差は認めなかった。低用量ETC642群、コントロール群ではPVの変化率はそれぞれ動脈硬化が進展していたが、高用量合成HDL群ではプラーク体積の変化率は有意に低率であった（ $P < 0.05$ ）。同様に、低用量ETC642群、コントロール群における%プラーク体積（プラーク体積/血管体積）変化率は増加していたが、高用量ETC642群では%プラーク体積変化率は低下し

しており、有意に大動脈プラークが退縮していた (P<0.05) (図 1)。WHHL ウサギにおいて、新規 Apo-AI 模倣ペプチドが大動脈プラーク進展を有意に抑制することを確認した。

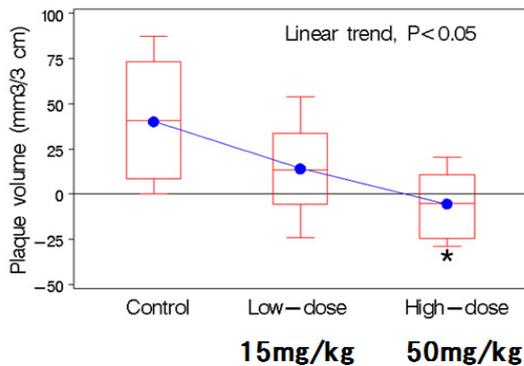


図 1. ETC642 による%プラーク体積の変化率

(3) 新規 Apo-AI 模倣ペプチドの開発

新規 Apo-AI 模倣ペプチドの開発は、ApoA-I 後半部のヘリックス構造部に注目し、約 10 種類合成した。次に、合成したペプチドが α -ヘリックス構造をとっているかについて、CD spectrum により検討した。 α -ヘリックス構造をとっている Apo-AI 模倣ペプチドをいくつか選び出し、そのシーケンスに変異をさらに加えた。再度、 α -ヘリックス構造について検討し、数種類を選択した。Apo-AI 模倣ペプチドには、リン脂質が必要であるが、高濃度では有害であるため、新規 Apo-AI 模倣ペプチドは、リン脂質を付けずに実験を進めることとした。また、これらの新規 Apo-AI 模倣ペプチドは、既存の Apo-AI 模倣ペプチドと同等のコレステロール引き抜き能を有していた。

FAMPとは、私たちが新しく作成した (Fukuoka University) Apo A-1 Mimetic Peptide である。

24個のアミノ酸配列からなり、野生型ApoA-1の配列のうち8か所に変異を加えている。

特徴:

1. リン脂質を含有しない。
2. 強力な α -ヘリックス構造を持つ。

Human ApoA-1 H- xxx AAA xxx xxx xxx AAA xxx xxx AAA xxx xxx xxx AAA AAA xxx xxx xxx xxx xxx -OH

FAMP H- xxx Leu xxx xxx xxx Phe xxx xxx Tyr xxx xxx xxx Leu Lys xxx xxx xxx xxx Leu Lys Lys xxx xxx -OH

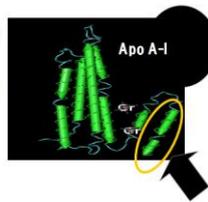


図 2. FAMP

この中で最も強力であった Apo-AI 模倣ペプチドを Fukuoka ApoA-1 mimetic peptide (FAMP) と名付けた (図 2)。FAMP は 24 個のアミノ酸からなり、リン脂質を持たないという特徴を持ち、強固な class A α -ヘリックス構造を保持するためにヒト野生型 ApoA-1 の

配列に 8 か所の変異を加えた。

私たちは、この FAMP を用い、動脈硬化に対する新しい治療の可能性を模索するべく In vitro、In vivo でのコレステロールのマクロファージからの引き抜き能 (efflux study)、血液中から肝臓へのコレステロール代謝への影響 (turn over study)、コレステロール逆転送系への効果 (RCT study) について検討した (図 3)。FAMP 投与により、特に ABCA1 を介した efflux の増加を確認した。また、FAMP は、マウス血液中から肝臓への HDL によるコレステロールの代謝を有意に促進することが分かり、マウスにおいて有意にマクロファージから便中への RCT を賦活化することを証明した。

FAMPは、pre- β HDLを増加させ、ABCA1を介したコレステロール引き抜きを増強、HDLのTurnoverを促進し、コレステロール逆転送系を賦活化した。

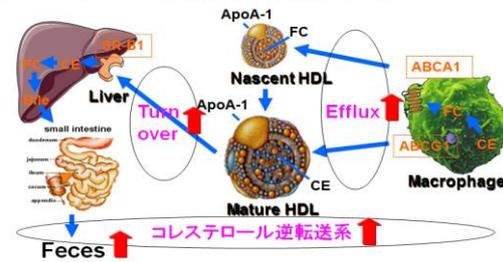


図 3. FAMP の efflux study、turn over study、RCT study

また、HDL への効果として FAMP による pre- β HDL の増加をキャピラリー電気泳動法とアガロース電気泳動法にて確認した (図 4)。さらに、FAMP を蛍光にてラベルし、細胞への取り込みおよび pre- β HDL position へ取り込まれていることも確認した。

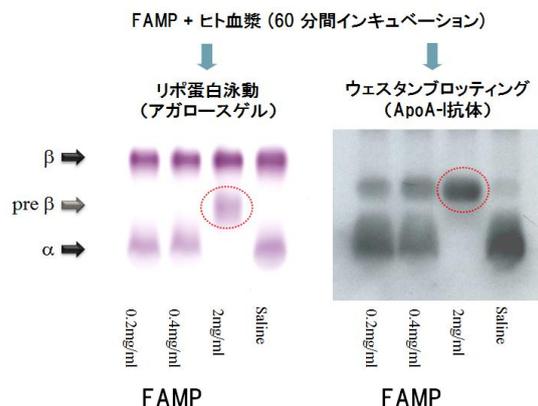


図 4. FAMP による pre- β HDL の増加

(4) FAMP の多面的効果

コントロール群、FAMP 低用量投与群 (10mg/kg)、FAMP 高用量投与群 (50mg/kg) の

3群で実施した。FAMP投与により総コレステロールやHDLコレステロール値は、3群間で全く差が認められず、血圧や心拍数への影響も見られなかった。梗塞サイズやアポトーシスに差は認められなかったが、FAMP高用量群の生存率の改善を認めた(図5)。MCP-1など

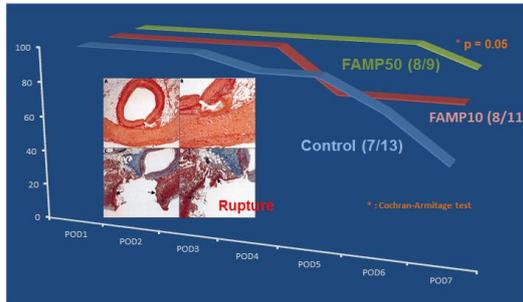


図5. 心筋梗塞後マウスの生存率

の抗炎症作用もFAMP高用量投与群において確認された。更に、ANFやCTGF等は低用量群で有意に上昇し、心筋構造破壊を抑制、心破裂を予防する機序が血管新生作用や抗炎症作用によりもたらされている可能性が示唆された。また、In vitroにおける検討においても、FAMPをHDL分画とインキュベーションし、細胞へ投与すると、内皮細胞管腔形成促進作用および抗炎症作用(細胞からのMCP-1やIL-6の分泌抑制)が確認された。FAMPによるHDL治療は、動脈硬化の退縮のみならず、心筋梗塞の予後改善、特に、急性期での突然死予防において非常に期待される新たな治療戦略の1つであることが示唆された。

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5件)

1. Iwata A, Miura S, Zhang B, Imaizumi S, Uehara Y, Shiomi M, Saku K. Antiatherogenic effects of newly-developed apolipoprotein A-I mimetic peptide/phospholipid complexes against aortic plaque burden in Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2011;218:300-307. 査読有
2. Imaizumi S, Kiya Y, Miura S, Zhang B, Matsuo Y, Uehara Y, Rye KA, Saku K. Pharmacological intervention using reconstituted high-density lipoprotein changes the lipid profile

in spontaneously hypersensitive rats. *Clin Exp Hypertens*. 32:202-208: 2010. 査読有

3. 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*. 203:137-144: 2009. 査読有
4. Furuyama S, Uehara Y, Zhang B, Miura S, Saku K. Genotypic effect of the -257T>G polymorphism in the ABCG1 gene promoter on ABCG1 transcription activity and severity of coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*. 16:194-200: 2009. 査読有
5. Zhang B, Matsunaga A, Rainwater DL, Miura S, Noda K, Nishikawa H, Uehara Y, Shirai K, Ogawa M, Saku K. Effects of ROSuvastatin on electronegative LDL as characterized by Capillary isotachopheresis: The ROSARY study. *J Lipid Res*. 50:1832-1841: 2009. 査読有

[学会発表] (計10件)

1. 今泉聡、三浦伸一郎、Reddy ST、Fogelman AM、朔啓二郎。ApoA-I 模倣ペプチド L-4F による HDL 機能改善作用とそのメカニズム。第49回日本臨床分子医学会学術集会(2012年4月14日、京都)
2. Tanigawa H, Miura S, Uehara Y, Saku K. FAMP, a Novel Fukuoka University Apo A-I Mimetic Peptide, Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Vivo. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 8.3-4. 2011, Yokohama, Japan.
3. Yahiro E, Kiya Y, Tanigawa H, Uehara Y, Miura S, Saku K. FAMP, a Novel Apo A-I Mimetic Peptide Improved the Survival Rate in Myocardial Infarction Model Mice. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 8.3-4. 2011, Yokohama, Japan.
4. Uehara Y, Ando S, Abe S, Oniki K, Yahiro E, Miura S, Saku K. A Newly Developed Symmetrical Mimetic Peptide of ApoA-I Promotes HDL *via* ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 8.3-4. 2011, Yokohama, Japan.

5. Uehara Y, Ando S, Yahiro E, Oniki K, Abe S, Tanigawa H, Miura S, Saku K. A Novel Short ApoA-I Mimetic Peptide Constructs Pre-Beta HDL in vitro and in vivo. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 8.3-4. 2011, Yokohama, Japan.
6. Miura S, Uehara Y, Tanigawa H, Yahiro E, Saku K. FAMP, A Powerful Producer of Pre- β HDL, Enhances Reverse Cholesterol Transport and Improves Survival Rate in A Myocardial Infarction Model. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 8.3-4. 2011, Yokohama, Japan.
7. Uehara Y, Ando S, Oniki K, Abe S, Yahiro E, Tanigawa H, Miura S, Saku K. FAMP, a novel apoA-I mimetic peptide synthesized HDL via ABCA1 mediated pathway. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.5-7. 2010, Kyoto, Japan.
8. Tanigawa H, Yamamoto S, Miura S, Jeffery B, George R, Rader D, Saku K. Probucol Promotes Reverse Cholesterol Transport (RCT) on SR-BI Knockout Mice; Possible Role of Hepatic ABCA1 in RCT. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.5-7. 2010, Kyoto, Japan.
9. Uehara Y, Abe S, Yahiro E, Kawamura A, Iwamoto T, Miura S, Saku K. Identofocation and cloning of novel soluble and membrane bound forms of the human ATP-binding cassette transporter G4. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 3.5-7. 2010, Kyoto, Japan.
10. Miura S, Uehara Y, Zhang B, Iwata A, Saku K. Significance of serum HDL-C levels in coronary arteries disease and therapeutic strategy to improve HDL function. 第41回日本動脈硬化学会総会、シンポジウム、2009年7月17-18日、下関。

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 (OHTA TAKAO)
 琉球大学・医学部・教授

研究者番号 70185271

三浦 伸一郎 (MIURA SHINICHIRO)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：20343709

(3) 連携研究者：なし