

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591108

研究課題名(和文) エリスロポエチン受容体アゴニストによるマクロファージ泡沫化抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of suppression of macrophage foam cell formation by 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)は造血作用の他に組織保護作用を有するが、催血栓性のため臨床使用は困難である。我々は前年度の研究で催血栓性のないEPO受容体アゴニスト(HBSP)がウサギの冠動脈病変を抑制することを明らかにしており、本研究ではpyroglutamate HBSP (ARA290)を用いてマクロファージの泡沫化に及ぼす影響を検討した。ARA290はコレステロール逆転送系に重要なABCA1の発現を増加させてマクロファージ泡沫化を抑制し、apoE欠損マウスの大動脈プラーク面積を減少させた。ARA290はHBSPをより安定化させたペプチドであり、新しい動脈硬化治療薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO) has been shown to have nonerythropoietic, tissue-protective effects although prothrombotic effects of EPO hamper its clinical use. Recently, we demonstrated that an EPO receptor agonist (HBSP) that does not have prothrombotic effects suppresses coronary atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic spontaneous myocardial infarction (WHHLMI) rabbits. In the present study, we examined the effects of pyroglutamate HBSP (ARA290) on macrophage foam cell formation. ARA290 significantly inhibited it by up-regulating the expression of ABCA1 that plays a pivotal role in reverse cholesterol transport and reduced aortic plaque area in apo E deficient mice. Because ARA290 is chemically more stable than HBSP, it may be a promising drug for treating atherosclerosis.

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：動脈硬化 erythropoietin マクロファージ シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は我が国において死因の上位を占める虚血性心疾患や脳血管障害の基礎的病態であり、その発症・進展を抑制する新しい治療薬を開発することは医学研究における重要なテーマの一つである。動脈硬化性疾患の発症を抑制するために臨床で広く使用されている薬剤としてスタチンが挙げられるが、主な作用である LDL コレステロール減少効果の他に抗炎症作用や内皮機能改善作用などの多面的効果が認められる反面、肝・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。また、糖尿病治療薬である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抑制することが報告され (Lancet. 2005;366 (9493):1279-89.)、我々の血管内超音波を用いた検討においても同薬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が明らかとなった (Am Heart J. 2007;153: 762e1- 762e7.)。したがって、ピオグリタゾンは新しい動脈硬化治療薬の候補の一つと考えられるが、心不全および重篤な肝・腎機能障害を有する患者には禁忌であり、現在のところ適応は糖尿病患者に限られている。

このような現状を踏まえて我々は米国 Warren Institute の Cerami らと協力して抗動脈硬化作用を有する新薬を開発し、平成 20 - 22 年度の科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) による研究でエリスロポエチン (EPO) 受容体アゴニストの抗動脈硬化作用について検討を行った。この EPO 受容体アゴニストは EPO の受容体結合部位の Helix B を模して合成された 11 個のアミノ酸からなる小分子ペプチドで Helix B surface peptide (HBSP) と呼ばれる。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 EPO 受容体が 2 量体を形成したもので造血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 GM-CSF 受容体などに共通するシグナル伝達サブユニットである共通受容体と 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なくアポトーシス抑制作用を中心とした細胞保護作用のみが認められた (Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(41):14907-12.)。HBSP 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ため、EPO 投与時にみられる血栓症や高血圧などの副作用を生ずることはない。上述の平成 20 - 22 年度基盤研究 (C) では家族性高コレステロール血症の動物モデルで心筋梗塞を自然発症する WHHLMI ウサギを用いた実験を行い、HBSP が冠動脈の動脈硬化病変を有意に抑制することを示した (Mol Med. 2013;19(1): 195-202.)。

さらに、我々はラット心筋細胞および拡張型心筋症ハムスターを用いた研究において

HBSP の心臓保護効果についても明らかにしている (Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107 (32):14357- 14362.)。慢性心不全患者では TNF α が増加して心不全の増悪を来し、予後不良の転帰をとることが知られているが、HBSP はこの TNF α による心筋細胞のアポトーシスを約 80%抑制し、細胞内シグナル伝達の検討から Akt がその効果発現に重要な役割を演じていることが判明した。また、心不全の動物モデルである拡張型心筋症ハムスターに HBSP を投与するとコントロール群と比較して心筋細胞のアポトーシスは約 70%抑制され、血清 CK 活性と心筋 ANP 発現量も有意に低下していた。これらより、HBSP は TNF α の作用に拮抗して心臓保護効果を示すものと考えられ、動脈硬化抑制効果や抗炎症作用と合わせてスタチンのような多面的効果を有するものと考えられた。しかしながら、将来の臨床応用に際しては薬剤の長期保存性および安定性が求められるため、この条件を満たす HBSP 誘導体を開発しその生物学的効果を検討する必要があった。

2. 研究の目的

これまでの研究により HBSP による動脈硬化抑制作用の機序として血管内皮細胞のアポトーシス抑制、TNF α の産生抑制および M1/M2 マクロファージ比率の減少などを明らかにしてきたが (Mol Med. 2013;19(1):195 -202.)、殊にマクロファージに関しては最近 EPO が ABCA1 を介するコレステロール引き抜きを促進して泡沫細胞の形成を抑制することが報告され注目されていた (Circulation. 2010;121:1828-1837.)。そこで本研究では、HBSP と生物学的効果が同等でより安定したペプチドである pyroglutamate HBSP (開発コード名から以下 ARA290 と呼ぶ)を用いて ARA290 がマクロファージの泡沫化に及ぼす影響とその細胞内シグナル伝達を *in vitro* および *in vivo* において検討した。ARA290 には HBSP と同様に EPO 投与時に報告されている血栓症や高血圧などの副作用がみられないため、本研究において ARA290 によるマクロファージ泡沫化抑制とその作用機序が解明されれば、新しい動脈硬化治療薬の臨床応用において breakthrough をもたらすものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 実験

マクロファージ培養系の確立：末梢血ヒト単球 (PBMC) については Cell applications 社から入手後 M-CSF (50 ng/ml) 存在下に 7 日間培養し、ヒト単球由来の THP-1 に関しては既報の如く (J Am Coll Cardiol. 2002;39 (5): 256A.)、PMA (100 nM, 24 時間)を用いてマクロファージへ分化誘導した。

マクロファージの泡沫化誘導：酸化 LDL (50 μ g/ml、フナコシ)を 得られたマクロファージ培養系に加えて 24 時間培養し、泡沫細胞

胞へと誘導した。また、酸化 LDL と同時に ARA290(2.5 ng/ml)、EPO(10 IU/ml)を加えて泡沫細胞化に対する抑制効果を検討した。

脂質蓄積量の評価： の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後 oil red O で染色し、デジタル顕微鏡システム (BX51/DP72、Olympus)および NIH ImageJ を用いて泡沫細胞数を定量評価した。泡沫細胞は oil red O による赤色染色領域が細胞質の 1/3 以上を占めるものとした。

炎症性サイトカインの測定： 既報の実験系 (Atherosclerosis. 2008; 196(1):129-35.) を用いてマクロファージ泡沫化の過程で産生される TNF α を ELISA により定量した。

マクロファージ泡沫化の制御因子および細胞内シグナル伝達系の解析： 既報 (Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(32):14357-14362.)の実験系を用いて Western blot 法により、マクロファージ泡沫化に關与する制御因子の発現に及ぼす ARA290 の影響とその細胞内シグナル伝達系に關して検討を行った。

(2) in vivo 実験

in vitro 実験の結果を踏まえて、in vivo における ARA290 のマクロファージ泡沫化に対する抑制効果を検討するため、apoE 欠損高脂血症モデルマウス(6 週齡)を日本エスエルシーより入手し、2 群(各群 n=12)に分けて ARA290 またはコントロールペプチドの 8 週間投与を行った(30 μ g/kg、皮下注、3 回/週)。ペプチド投与終了後にペントバルビタール麻酔下で sacrifice し、大動脈を取り出して腹側に沿って縦切開し 10%緩衝ホルマリン溶液で固定後、弓部大動脈をパラフィン包埋した。連続切片を作製後 Elastica van Gieson 染色を行い、最も動脈硬化病変の厚い部分で内膜/中膜厚、プラーク面積を計測・算出した。また、in vivo における ARA290 のマクロファージ泡沫化抑制の機序を調べるため、マクロファージ泡沫化の制御因子である ABCA1、ABCG1、SRA などについて免疫組織染色を行い、これらの発現量に及ぼす ARA290 の影響を検討した。

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) ARA290 および EPO によるマクロファージの泡沫化抑制

ARA290 は in vitro において酸化 LDL による THP-1 由来マクロファージの泡沫細胞化を有意に抑制し(図 1 および図 2)、その効果は EPO と同等であった。

(2) マクロファージの泡沫化過程における ARA290 による TNF α の産生抑制

酸化 LDL によってマクロファージの泡沫化が誘導される過程において TNF α の産生増加が見られたが、ARA290 はこの増加を有意に抑

制した(Control; 86.4 \pm 3.4 pg /10⁶cells、酸化 LDL; 127.1 \pm 3.4 pg/10⁶ cells、酸化 LDL+ARA290; 116.5 \pm 3.3 pg/10⁶ cells、p<0.05、n=12)。

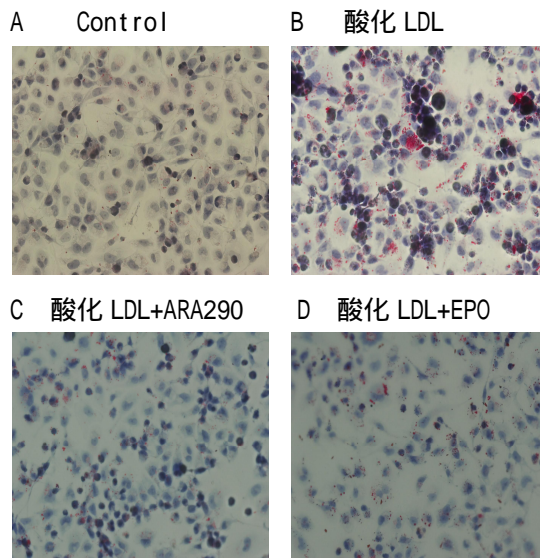


図 1. ARA290 および EPO のマクロファージ泡沫化抑制(赤色細胞 泡沫細胞、oil red O 染色、200x)

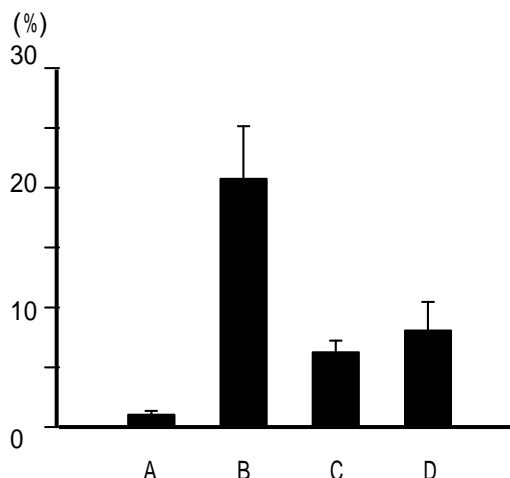


図 2. ARA290 および EPO のマクロファージ泡沫化抑制(oil red O 陽性細胞数、B vs C, D; p<0.05、n=4)

(3) マクロファージ泡沫化の制御因子の発現に及ぼす ARA290 の影響と細胞内シグナル伝達系

マクロファージの泡沫化を制御している因子としては、コレステロールの逆転送系に關与する ABCA1、ABCG1、SRB1 およびスカベンジャーレセプターである SRA などが挙げられる。ARA290 はマクロファージの ABCA1 の発現を亢進させ(図 3)、また ERK1/2 および Akt を 2 相性に活性化した。この活性化パターンは血管内皮細胞における 1 相性の活性化とは明らかに異なっており、PBMC 由来マクロファージにおいても観察された。ABCG1、SRB1 および SRA の発現には変化は見られなかった。

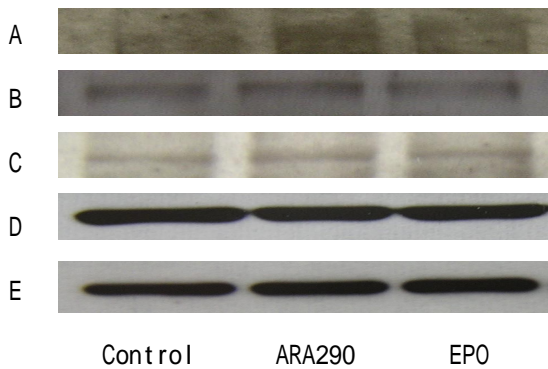


図 3. マクロファージ泡沫化の制御因子の発現に及ぼす ARA290 の影響 (A; ABCA1、B; ABCG1、C; SRB1、D; SRA、E; β -Actin)

(4) apoE 欠損高脂血症モデルマウスにおける ARA290 による初期動脈硬化病変の形成抑制

in vitro の実験結果に基づいて初期動脈硬化病変の形成に及ぼす ARA290 の影響を調べるため、6 週齢の apoE 欠損高脂血症モデルマウスに ARA290 またはコントロールペプチドを普通食下で 8 週間投与し、弓部大動脈の組織学的検討を行った。その結果、ARA290 投与群ではコントロール群に比し、内膜/中膜厚 (IMT) および大動脈プラーク面積が有意に抑制されていた (図 4 および図 5)。

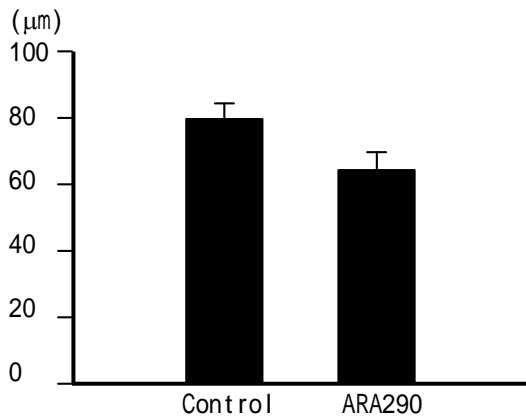


図 4. apoE 欠損マウス大動脈 IMT の ARA290 による抑制 ($p < 0.05$, $n = 12$)

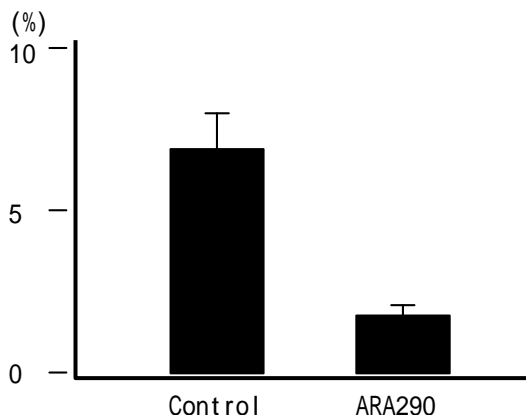


図 5. apoE 欠損マウス大動脈プラーク面積の ARA290 による抑制 ($p < 0.01$, $n = 12$)

(5) apoE 欠損高脂血症モデルマウスの初期動脈硬化病変におけるマクロファージ泡沫化制御因子の発現に及ぼす ARA290 の影響

in vivo におけるマクロファージ泡沫化抑制の機序を調べるため、apoE 欠損高脂血症モデルマウスの大動脈プラークにおける ABCA1、ABCG1、SRB1 および SRA の発現を免疫組織染色を用いて検討した。その結果、ARA290 投与群では *in vitro* の結果と同様に、コントロール群に比し ABCA1 陽性細胞が有意に増加していた (図 6)。他の因子の発現に関しては両群間で有意差を認めなかった。

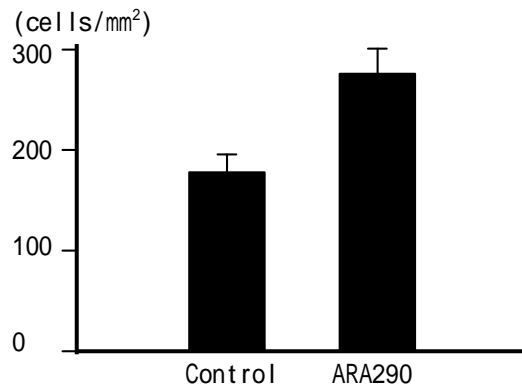


図 6. apoE 欠損マウス大動脈プラークにおける ARA290 による ABCA1 陽性細胞の増加 ($p < 0.01$, $n = 12$)

以上より、ARA290 は *in vitro* および *in vivo* において、コレステロール逆転送系で重要な役割を演じている ABCA1 の発現を亢進させてマクロファージの泡沫化を抑制することが明らかになった。我々は平成 20 - 22 年度基盤研究 (C) において、HBSP が WHHLMI ウサギ冠動脈の動脈硬化病変を抑制する機序の一つとして M1/M2 マクロファージ比率の減少を報告している (Mol. Med. 2013;19(1):195-202.)。本研究の結果は、これに加えて ARA290 がマクロファージの機能を直接修飾して動脈硬化を抑制することを示した点でその意義は大きいと考えられる。また前述の如く、ARA290 には EPO 投与時に見られる血栓症などの有害事象がなく大量投与も可能であり、抗アポトーシスおよび抗炎症作用といった多面的効果も認められる。さらに、ARA290 は N 末端のグルタミンが環化した pyroglutamate HBSP であり、HBSP に比し長期保存性および安定性に優れている。これらの薬理学的特性より、ARA290 は将来の臨床応用において有望な動脈硬化治療薬の候補と考えられ、今後の研究の発展が待たれる。

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) Ueba H, Shiomi M, Brines M, Yamin M, Kobayashi T, Ako J, Momomura S, Cerami A,

Kawakami M. Suppression of coronary atherosclerosis by a helix B surface peptide, a nonerythropoietic tissue-protective compound derived from erythropoietin. Mol Med. 2013 Jul 24;19(1):195-202.

(2) Yasu T, Ueba H, Katayama T, Kawakami M. Effects of Thiazolidinediones on In-Stent Restenosis: A Review of IVUS Studies, Intravascular Ultrasound, Yasuhiro Honda (Ed.), ISBN:978-953-307-900-4, InTech 2012, Available from: <http://www.intechopen.com/books/intravascular-ultrasound/effects-of-thiazolidinedione-on-in-stent-restenosis-a-review-of-ivus-studies>.

(3) Masanobu Kawakami, Hiroto Ueba, Michael Brines, Michael Yamin, Tomio Uemoto, 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.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Ueba, H., Shiomi, M., Brines, M., Yamin M., Cerami, A., Momomura, S. Helix B surface peptide, a nonerythropoietic erythropoietin derivative, modifies macrophage polarization and prevents progression of coronary atherosclerotic lesions. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, March 22, 2014.

(2) Ueba, H., Shiomi, M., Brines, M., Yamin, M., Ako, J., Momomura, S., Cerami, A., Kawakami, M. Suppression of coronary atherosclerosis by a helix B surface peptide, a nonerythropoietic tissue-protective compound derived from erythropoietin. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, March 15, 2013.

(3) 上羽洋人, Michael Brines, Michael Yamin, Anthony Cerami, 梅本富士, 阿古潤哉, 川上正舒, 百村伸一. 慢性心不全動物モデルにおける非造血性エリスロポエチン誘導体による心筋保護作用 抗アポトーシス効果による適応. 第 17 回日本適応医学学会 学術集会, さいたま市, 2013 年 6 月 29 日.

(4) Ueba, H., Brines, M., Yamin, M., Uemoto, T., Ako, J., Momomura, S., Cerami, A., Kawakami, M. Cardioprotective Properties of Helix B Surface Peptide, a Nonerythropoietic Derivative Mimicking the 3D Structure of Erythropoietin. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama,

August 3, 2011.

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・名誉教授
研究者番号 : 40161286