

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23659463

研究課題名（和文）HDL コレステロール値を上昇させる新しいナノテクノロジーの評価と
その分子機序研究課題名（英文）Evaluation of new nanotechnology to raise HDL cholesterol level and
elucidation of its molecular mechanism.

研究代表者

島野 仁 (SHIMANO HITOSHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20251241

研究成果の概要（和文）：高比重リポタンパク（HDL）を上昇させる薬剤の開発は心血管イベントの抑制につながると期待される。本研究では、胆汁酸吸着剤として新規に開発されたナノ粒子（4級化ポリアミンナノゲル）による HDL コレステロールの上昇作用の解析を行った。マウスへのナノゲルの投与により血中 HDL レベルが上昇し、この作用は主に肝臓における HDL 新生の亢進によることが明らかとなった。動脈硬化モデルマウスである LDR 受容体欠損マウスにナノゲルを投与すると、高脂肪食負荷で誘発される動脈硬化の発症が著明に抑制された。本研究の継続により、HDL 上昇薬の開発や HDL の新規代謝経路および創薬の新規標的の発見につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Raising HDL-cholesterol (C) has emerged as a potential strategy to tackle the residual risk that remains even after lowering LDL-C and triglyceride, in preventing cardiovascular disease. PEGylated and quaternized polyamine nanogel (Q-Nanogel) is a newly synthesized bile salt sequestering agent intended to treat dyslipidemia. We assessed the effects of Nanogel on dyslipidemia and atherosclerosis. Nanogel treatment resulted in a 35% reduction in plasma VLDL/LDL-C levels, a 58% increase in plasma HDL-C levels in C57BL/6J mice. In LDLR^{-/-} mice, atherosclerotic lesion size with Nanogel was reduced by 45% compared to PBS. These data indicate that Nanogel not only decreased VLDL/LDL-C levels but also raised HDL-C levels. Nanogel could be a potential therapeutic candidate to raise HDL-C and the treatment of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：代謝学、内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：リポタンパク質、動脈硬化、胆汁酸、ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

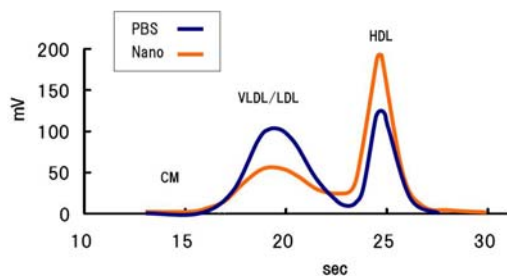
近年、我が国では、社会の高齢化や肥満、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病の増加を背景として、動脈硬化病変とそれに基づく心筋梗塞、脳梗塞などの心血管イベントの発症率が増加してきている。リポタンパク異常

に基づく動脈硬化病変の形成は、虚血性心疾患や脳血管疾患の最も主要な発症プロセスである。高比重リポタンパク（high-density lipoprotein；HDL）は、末梢組織に過剰に蓄積したコレステロールを血中へ引き抜き、肝臓へ運び、動脈硬化を抑制する。疫学的に

は、HDL 値と冠動脈疾患のリスクは有意に逆相関する。したがって、高比重リポタンパク (HDL) は動脈硬化症に対する防御因子として働いていると考えられ、HDL を上昇させる薬剤の開発が今後の心血管イベントの抑制につながると期待されている。

我々の研究協力者である筑波大学学際物質工学研究センターの長崎幸夫教授らのグループでは、これまでコアにポリアミンゲル、その外殻にポリエチレングリコール (PEG) 層を持つコアシェル型のナノ粒子 (ナノゲル) を乳化重合により合成し、その胆汁酸吸着特性を調べてきた。今回、さらなる吸着性の向上を目指して、ナノゲルコアに固定荷電である 4 級アンモニウム塩を用いたナノゲルの作製を行い、作製したナノゲル粒子をマウスに投与して血中リポタンパクの変化を評価したところ、non-HDL の低下とともに HDL の顕著な上昇を観察した。

4 級化ポリアミンナノゲルによる血中 HDL 上昇作用



2. 研究の目的

そこで本研究では、新規胆汁酸吸着剤 4 級化ポリアミンナノゲルによる HDL コレステロールの上昇作用の評価とその分子機序の解析、さらに動脈硬化モデルマウスを用いた抗動脈硬化作用についての解析を行い、新規 HDL 上昇薬としての臨床応用への端緒とすることを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウス、LDL 受容体欠損マウス、ApoE 欠損マウスへ 4 級化ポリアミンナノゲルを投与し、血中リポタンパクプロファイルや動脈硬化への影響を解析した。

① 4 級化ポリアミンナノゲルの投与が血中リポタンパクプロファイルにおよぼす影響の解析: C57BL/6J または ICR マウスに動脈硬化誘発食 (脂肪 10.5%、コレステロール 1.25%、コール酸 0.5%) を 1 週間自由摂取させ、高脂血症モデルマウスを作成した。1 週間後より、動脈硬化誘発食を自由摂取させながら生理食塩水または 4 級化ポリアミンナノゲルを 1 日 1 回経口投与した。1 週間ごとに採血を行い、総コレステロール (T-Cho) および HDL コレステロールを酵素法にて、カイロミクロ

ン (CM)、VLDL、LDL、HDL 値を HPLC 法にて測定した。

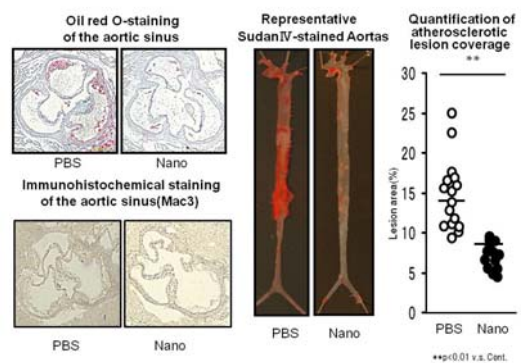
② 4 級化ポリアミンナノゲルによる HDL 上昇の分子メカニズムの解析: 4 級化ポリアミンナノゲルが直接作用する小腸、胆汁酸・コレステロール代謝の中心臓器である肝臓、HDL のクリアランスに関与する腎臓における胆汁酸およびコレステロール代謝関連因子の変化を遺伝子発現およびタンパクレベルで解析する。またリポタンパク代謝に関連する血中のリパーゼ活性、コレステロール代謝に影響を与えるホルモン (甲状腺ホルモン) の変化を解析する。

③ 動脈硬化の発症・進展に及ぼす 4 級化ポリアミンナノゲル投与の効果の解析: 4 級化ポリアミンナノゲルによる LDL 低下および HDL 上昇作用は動脈硬化の発症・進展を抑制することが期待される。そこで、動脈硬化モデルマウスである LDLR 欠損マウスおよび ApoE 欠損マウスに上記の動脈硬化誘発食を負荷して動脈硬化の発症を誘発するとともに、生理食塩水または 4 級化ポリアミンナノゲルを 1 日 1 回経口投与し、動脈硬化巣形成の解析を行った。同時に血中コレステロール・リポタンパク分析や個体の糖・脂質代謝状態の解析を行った。これらの解析により、4 級化ポリアミンナノゲルが動脈硬化形成を抑制しうるかを、その分子機序とともに明らかにする。

4. 研究成果

マウスへの 4 級化ポリアミンナノゲルの投与により血中 HDL レベルが有意に上昇した。この作用はナノゲルのカウンターイオンの種類に依存すること、HDL 上昇は主に肝臓における HDL 新生が亢進することが明らかとなった。ナノゲルの投与による HDL 上昇は動脈硬化モデルマウスである LDR 受容体欠損マウスや ApoE 欠損マウスにおいても認められ、これらマウスへの高脂肪食負荷で誘発される動脈硬化の発症がナノゲルの投与により著明に抑制された。

4 級化ポリアミンナノゲルは LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化発症を抑制する



今後さらに本研究を継続することにより、

世界的に切望されている HDL 上昇薬の開発、さらには HDL の新規代謝経路や創薬の新規的の発見につながると期待される。

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 6 件)

- ① Iwasaki H, Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 regulates muscle metabolic gene expression, increases glycogen stores, and enhances insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302(7), E896-902, 2012. 査読有
- ② Shimano H. Novel qualitative aspects of tissue fatty acids related to metabolic regulation: Lessons from Elov16 knockout. *Prog Lipid Res.* 2012, in press. 査読有
- ③ Saito R, Matsuzaka T, Karasawa T, Sekiya M, Okada N, Igarashi M, Matsumori R, Ishii K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Macrophage Elov16 deficiency ameliorates foam cell formation and reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(9), 1973-9, 2011. 査読有
- ④ Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7a (Fbw7a) causes hepatosteatosis through Krüppel-like factor 5 (KLF5)/peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) pathway but not SREBP-1c protein in mice. *J Biol Chem.* 286(47), 40835-46, 2011. 査読有
- ⑤ Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and

accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(8), 1788-95, 2011. 査読有

- ⑥ Amemiya-Kudo M, Oka J, Takeuchi Y, Okazaki H, Yamamoto T, Yahagi N, Matsuzaka K, Okazaki S, Osuga J, Yamada N, Murase T, Shimano H. Suppression of the pancreatic duodenal homeodomain transcription factor-1 (Pdx-1) promoter by sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c). *J Biol Chem.* 286(32), 27902-14, 2011. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Haruna Shinozaki, Takashi Matsuzaka, Yukio Nagasaki, Hitoshi Shimano, et al. A novel bile salt sequestering agent PEGylated and quaternized polyamine nanogel reduces VLDL and LDL cholesterol, raises HDL cholesterol, and prevents atherosclerosis in mice. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14-15日 パシフィコ横浜、横浜
- ② Rie Matsumori, Takashi Matsuzaka, Yukio Nagasaki, Hitoshi Shimano, et al. A novel bile salt sequestering agent "PEGylated and quaternized polyamine nanogel" reduces VLDL and LDL cholesterol, raises HDL cholesterol, and prevents atherosclerosis in mice. 第84回米国心臓協会学術集会 (AHA Scientific Sessions2011) 2011年11月15日 Orange Country Convention Center, Orlando, Florida, USA
- ③ Rie Matsumori, Takashi Matsuzaka, Yukio Nagasaki, Hitoshi Shimano, et al. "PEGylated and quaternized polyamine nanogel" a novel bile salt sequestering agent, ameliorates dyslipidemia through reduction of VLDL and LDL cholesterol, and induction of HDL cholesterol. 第43回日本動脈硬化学会学術集会 2011年7月16日 ロイトン札幌、札幌
- ④ 島野仁 動脈硬化戦略における脂質管理の新しい視点: 臓器脂質の量的制御と質的制御 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月20日 ロイトン札幌、札幌

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tsuba-endocrinology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島野 仁 (SHIMANO HITOSHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20251241

(2) 研究分担者

高橋 昭光 (TAKAHASHI AKIMITSU)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70344893

松坂 賢 (MATSUZAKA TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70400679