

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890030

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分子機序

研究課題名(英文) Evaluation and exploratory mechanistic analysis; how a novel nano technology increases serum HDL levels by oral administration in mice.

研究代表者

嶋田 昌子 (Shimada, Masako)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30637369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化誘発食を負荷した高脂血症、動脈硬化モデルマウスに四級化ポリアミノゲルを経口投与すると対照群マウスに比べて有意なLDLコレステロール(LDL-C)値の低下およびHDL-C値の上昇傾向をきたし、動脈硬化の発症・進展が抑制されることを確認した。HDL-Cが上昇するメカニズムを、四級化ポリアミ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で解析し、特にマイクロアレイ法による網羅的検討において標的遺伝子をいくつか同定した。今後、引き続き、直接的な原因分子の同定と解析を行っていく方針である。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease (CVD) is the most common cause of mortality in the modern society. Elevated serum VLDL and LDL cholesterol levels are associated with a risk for atherosclerosis; thus, the current pharmaceutical lipid modulation has been mainly focused on lowering LDL-C and TG levels. However, this strategy has reduced cardiovascular morbidity and mortality by only up to 25%. Therefore, raising HDL-C levels has recently emerged as a promising therapeutic target for CVD.

In this study, PEGylated and quaternized polyamine nanogel was administered via gavage to examine how the treatment modulates serum VLDL/LDL-C levels. We interestingly found that the nanogel administration not only reduced VLDL/LDL-C levels, but also significantly raised HDL-C levels and reduced atherosclerotic lesions in mice. The oral administration of the nanogel could be a novel therapeutic strategy for treatment of atherosclerosis by raising HDL-C levels in the future.

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：動脈硬化 ナノテクノロジー

1、研究開始当初の背景：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、我が国でも、動脈硬化症とそれに基づく心筋梗塞、脳梗塞などの心血管系のイベントの発症率が近年増加してきている。リポタンパク質異常による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原因のひとつである。一方、HDL-Cは、善玉コレステロールといわれるように、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、高脂血症、動脈硬化症を抑制する。疫学的にも、HDL-C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-Cの上昇を標的とした新規治療薬の開発が今後の心血管系のイベント発症の抑制につながると期待される。

コレステロールは主に肝臓で合成され、胆汁酸に変換された後、小腸に分泌され、食事由来のコレステロールと複合体を形成し、小腸下部で再吸収されて肝臓に戻る。この胆汁酸の腸肝での循環効率は95%以上と高いため、過剰に食事として摂取したコレステロールは血中に分泌され、さらに血中から肝臓への取り込み機能も低下する為、結果として血中コレステロール値の上昇すなわち高脂血症につながる。高コレステロール血症に対する薬剤としてはHMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）が代表的であり、LDL-C値を低下させることで動脈硬化性疾患の発症のリスクを低下させる効果があることが知られている。リポタンパク質異常による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原因のひとつである。一方、HDL-Cは、善玉コレステロールといわれるように、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、高脂血症、動脈硬化症を抑制する。疫学的にも、HDL-C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-C値の上昇を標的とした新規治療薬の開発が今後の心血管系のイベント発症の抑制につながると期待される。しかし、スタチンによるHDL-Cの上昇は軽微であり、肝機能障害、横紋筋融解症、催奇形性などの副作用も報告されている。また、すでに市販されている胆汁酸吸着剤（陰イオン交換樹脂）は、腸管内において胆汁酸を静電的に吸着し、便中への排泄を促進することで肝臓のコレステロール代謝を活性化させ、血中LDLを低下させる作用を持つが、粒子が大きいために服用しにくく、またHDL-Cを上昇させる作用は有していない。

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。近年、さらに吸着性の向上を目指して、ゲルのコアに従来の三級アンモニウム塩から、固定荷電をもつ四級アンモニウム塩を用いたナノゲルの作製を行った。そのナノゲル粒子を高脂血症モデルマウスに経口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-Cの低下傾向と共にHDL-Cの顕著な増加が観察された。本研究で用いる四級化ポリアミンナノゲルは、1) 外殻にPEGを持つため水に分散可能であり、かつ、ナノサイズである為に服用しやすく、副作用を軽減できること、2) コアに四級アミノ基の固定電化（カチオン性高分子）を持つため、三級化ポリアミンナノゲルよりも腸管内のpH変化の影響を受けずに小腸下部においても高い胆汁酸吸着効率の持続が期待できること、3) ナノゲル粒子の合成は乳化重合を用いることができ、簡便かつ低コストでの生産が可能であること等の優れた特徴を持ち、効率的に作用し、服用性の良い、副作用のない、LDL-C低下傾向とHDL-C上昇作用を持つ優れた高脂血症治療薬としての適用が期待される。

2、研究の目的：高脂血症および動脈硬化モデルマウス(Apo EおよびLDL受容体欠損マウス)を用いて、この新規胆汁酸吸着剤、四級化ポリアミンナノゲル(Nano I-)の生体内におけるHDL-Cの上昇作用と動脈硬化巣形成に対する効果の評価、およびHDL-C上昇の分子機序の解明に努め、新規HDL-C上昇作用を持つ抗動脈硬化薬としての臨床応用への端緒とすることを目的とする。

3、研究の方法：動脈硬化誘発食を負荷中の高脂血症、動脈硬化モデルマウスに四級化ポリアミンナノゲルを1日1回経口投与し、血中リポ蛋白プロファイル、動脈硬化病変への効果を評価する。また小腸、肝臓、腎臓を中心として、ナノゲルの胆汁酸、リポタンパク代謝関連因子への影響をその代謝関連諸因子のmRNAおよびタンパクレベルで解析し、分子レベルでの作用機序を明らかにする。以上の解析により、四級化ポリアミンナノゲルの高脂血症治療薬・HDL-C上昇薬としての効果を確立するとともに、特にHDL-C上昇作用に着目し、その分子機序を解明する。

(1) 四級化ポリアミンナノゲル投与の血中リポ蛋白プロファイルおよび動脈硬化の発症・進展に及ぼす効果の解析

四級化ポリアミンナノゲルによる LDL-C 低下および HDL-C 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。

高脂血症マウスを作製する為に C57BL/6J マウスに、また、動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損および LDL 受容体欠損マウスそれぞれに動脈硬化誘発食（脂肪 10.5%、コレステロール 1.25%、コール酸 0.5%）を 8 週間自由摂取させる。

動脈硬化誘発食投与開始 1 週間後より、同誘発食を自由摂取させながら生理食塩水または四級化ポリアミンナノゲル（0.25g/kg BW）を 1 日 1 回経口投与する。

2 週間ごとに採血を行い、総コレステロールおよび HDL-C を酵素法にて、カイロミクロン、VLDL、LDL、HDL-C 値を HPLC 法にて測定する。この解析により、四級化ポリアミンナノゲルによる LDL 低下および HDL 上昇作用を確認する。また便中の胆汁酸および脂質含量、血中トリグリセリド値や血糖値も同時に測定し、胆汁酸吸着剤としての効果と胆汁酸代謝への影響を検討する。

動脈硬化病変の評価：上記のマウスから大動脈を摘出し、大動脈全体および起始部の脂肪染色および免疫組織化学染色を行い、動脈硬化病変を評価する。(5) 動脈硬化抑制機序の解析：四級化ポリアミンナノゲルによる動脈硬化巣の形成の抑制が認められた場合、さらにその分子機序を解明する。

(2) 四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

四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の変化も解析する。

小腸の解析：胆汁酸の吸収・代謝に関与する FXR (farnesoid X receptor)、SHP (small hetero-dimer partner)、FGF (fibroblast growth factor)15、コレステロール吸収に関与する NPC1L1 (Niemann-Pick disease, type C-like 1)、HDL 粒子の新生に関与する ABCA1、ApoA1 の遺伝子とタンパク発現を解析し、新規ナノゲルの作用を検証する。

肝臓の解析：胆汁酸の代謝および合成に関与する FXR、SHP、Cyp7a1 (cytochrome P450 7A1)、Cyp8b1、HDL 代謝酵素である LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase)、PLTP (phospholipid transfer protein)、Endothelial lipase、

HDL 受容体である SR-BI (scavenger receptor class B member 1) について、その遺伝子とタンパク発現を解析し、新規ナノゲルの作用を検証する。上述のように、これまでに明らかになってきた HDL 合成に関与する ApoA1 mRNA、ABCA1 タンパク質の発現上昇、HDL 異化に関わる hepatic lipase の mRNA 発現減少のあること、肝臓でのカルシウムチャンネル、S100 カルシウム結合タンパクファミリーの mRNA 発現の顕著な上昇がみられたことに関しては、さらに、発現異常のみられる ABCA1 等の HDL 制御タンパク質の合成、分解系をそれぞれ mRNA およびタンパクレベルで検討し、HDL-C 上昇の分子機序を検索する。

腎臓の解析：腎近位尿管上皮細胞の HDL 受容体 cubilin の発現を mRNA およびタンパクレベルで検討する。その他、4 級化ポリアミンナノゲルは腸管から体内へは吸収されないため、その効果は主に腸管または胆汁酸代謝を介した肝臓での作用であると考えられるが、何らかの間接的効果も考えられること、肝臓でのカルシウム依存性のある複数のタンパク質の発現に変化がみられたことから、血中リパーゼ活性、甲状腺ホルモン (thyroid stimulating hormone、Free T4)、副甲状腺ホルモン、およびカルシウム濃度についても検討する。HDL 合成の主たる制御タンパクである ABCA1 がカルシウム依存性にカルバインとカルモジュリンにより制御されているという最近の報告を受けて、この新規胆汁酸吸着剤が肝臓においてこれらのカルシウム依存性タンパクの作用を介して HDL の上昇をもたらす可能性も含めて検討していく方針である。

(3) データーの総合的解析 以上の解析結果を統合し、新規胆汁酸吸着剤としての四級化ポリアミンナノゲルの HDL-C 上昇作用の動脈硬化病変に対する評価とその分子機序の解明に尽くし、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標とする。

4. 研究成果

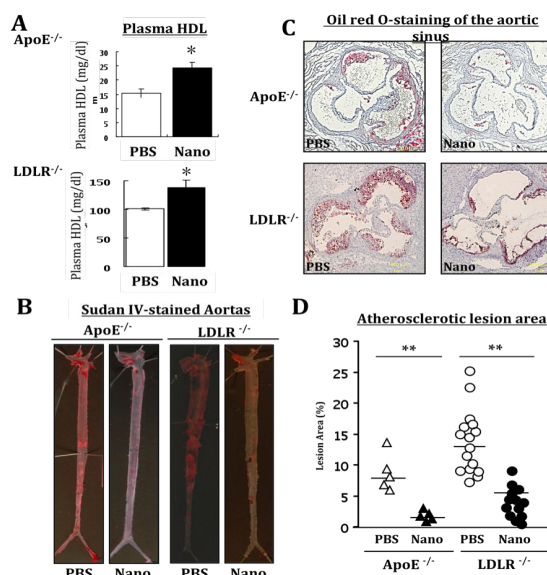
(1) 四級化ポリアミンナノゲル投与の血中リポ蛋白プロファイルおよび動脈硬化の発症・進展に及ぼす効果の解析

対照群に比べて Nano I-投与マウスでは有意に血清 HDL-C 値が上昇し (対照群 50 ± 5 vs. Nano I-群 $95 \pm 7^*$ mg/dl)、LDL-C 値が減少 (対照群 125 ± 1.8 vs. Nano I-群 $98 \pm 2.5^*$ mg/dl, * $p < 0.05$) していた。それぞれのリポ蛋白分画を HPLC 法によりさらに解析すると、Nano I-投与群で有意に VLDL/LDL-C 分画が減少し、HDL-C 分画が増加していた。一方、便中のコレステロール、胆汁酸の排泄は Nano I-投与群で有意に増加していた。このことが

ら、経口的に NanoI-を投与したマウスでは、腸管からのコレステロール排泄が増加していると考えられる。

次に、動脈硬化誘発動物モデルで NanoI-経口投与によって動脈硬化巣の形成が抑制される否かを Sudan 染色後、画像解析を行い評価した。次ページの図 1 に示すように ApoE および LDLR 欠損マウスにおいて血漿 HDL 値は有意に上昇し、大動脈全体(B)および大動脈弁起始部(C)の動脈硬化層病変面積の顕著な改善(D)が認められた。

図1、Nano I-の経口投与で動脈硬化惹起マウスモデルに形成される動脈硬化巣病変の有意な改善がみられた。A. ApoE および LDLR ノックアウトマウスに Nano I-投与すると HDL-C の有意の上昇が観察された。B-D. 動脈全体(B)および大動脈弁起始部(C)において Sudan 染色で染まる動脈硬化病変が NanoI-投与マウスで有意に軽減した(D)。



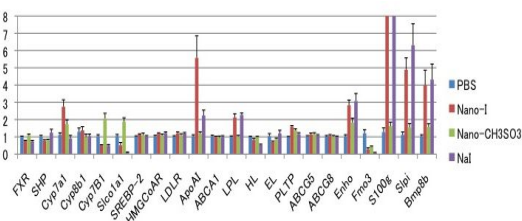
(2) 四級化ポリアミンナノゲルによる HDL 上昇の分子メカニズムの検討

次に、NanoI-投与による HDL-C 上昇のメカニズムを解明するために、網羅的な Microarray 解析により明らかになった小腸、肝臓にて HDL-C 代謝に関連していると考えられている各遺伝子の発現を real-time RT-PCR の手法によりさらに検討した。図 2 に示すように NanoI-投与マウスにて *Cyp7a1*, *ApoA1*, *LPL*, *Enho*, *s100g*, *Slpi*, *Bmp8b* の遺伝子発現が肝臓において有意に上昇していた。

さらに、我々は NanoI-投与で最も発現上昇のみられた(図 2) *s100g* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製し、そのアデノウイルスを HepG2 細胞に感染させると対照群ウイルスに比べて約 1×10^6 倍の *s100g* の発現の増加が得られたが、それに伴う *ApoA1*, *ABCA1*, *LPL* 遺伝子の発現増加はそれぞれ対照群に比べて約 1.5 倍にとどまるにすぎな

った。また、同ウイルスをマウスの尾静脈から静注して肝臓で約 300 倍に過剰発現させたところ、対照ウイルスを過剰発現させたマウスと比較して血中の HDL-C の上昇傾向はみられたが、有意な上昇は観察されなかった。従って、*s100g* の HDL-C 上昇への寄与は発現上昇率の割には限られており、*s100g* の肝臓での過剰発現が HDL-C 上昇の一次的な原因遺伝子とは考えにくかった。

図 2、肝臓における HDL-C 代謝に関連した定量的な遺伝子発現の検討。1 を対照群の平均的遺伝子発現量と規定する。



以上の結果から、今後我々は、さらに NanoI-投与マウスで HDL-C 上昇の原因遺伝子として候補となっている他の遺伝子の過剰発現、あるいはノックアウトするアデノウイルスを作製し、血清 HDL-C レベルの上昇メカニズムを引き続き検討していく方針である。

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) なし。

6、研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 昌子 (SHIMADA, MASAKO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30637369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし