

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860592

研究課題名(和文)新規HDL自己形成型蛍光ペプチドの開発と早期動脈硬化バイオマーカーの確立

研究課題名(英文)Development of Novel HDL Mimetic Fluorescent Peptide and Establishment of molecular Biomarker for Atherosclerosis

研究代表者

川内 絵未(Kawachi, Emi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：50714416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの研究室で開発に成功している、大動脈プラークを描出・イメージング出来るペプチド；FAMPのターゲット分子、作用メカニズムの詳細を明らかにするため、通常FAMPと比較しても機能性の変らないFITC-FAMPの合成に成功した。FAMPが炎症部位やプラーク局所に集積することからFAMPが単球に吸着し動脈硬化巣まで輸送されると考えていたが、FACSシステムにおいてFITC-FAMPは好中球とポジティブを示した。これにより血中で好中球に吸着したFAMPは全身に輸送され、炎症部位や動脈硬化巣に集積することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：We developed the peptide which can be used for PET imaging to visualize aortic plaque. In order to clarify the mechanism of action and the target molecule of FAMP, we successfully synthesized FITC-FAMP which possesses same functionality with FAMP. We supposed FAMP which adheres to the monocyte is transported to the atherosclerotic lesions, and integrated into the site of inflammation or plaques. However, neutrophil was positive with FITC-FAMP in the FACS system. It was suggested that FAMP adheres to neutrophils in blood and accumulates into the sites of inflammation or arteriosclerotic lesions.

研究分野：バイオマーカー探索とペプチド合成

キーワード：ペプチド アポA-1 動脈硬化 HDL

1. 研究開始当初の背景

現在、心臓・血管疾患の一次予防および二次予防における治療の原則は、スタチン投与による低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) の低下療法である。これまでの多くの大規模臨床試験の結果から、積極的 LDL-C 低下療法は 30~40% 程度の血管イベント発症を抑制できるが、更なる予防としての次世代の脂質治療の 1 つである高比重リポ蛋白 (HDL) をターゲットとする治療が注目されている。現在臨床治験中のコレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 阻害薬は HDL コレステロール (HDL-C) を飛躍的に上昇させるが、HDL 機能の上昇・改善は十分とは言えない。私たちは、これまでに HDL の機能を増強させる合成 HDL の開発を進めてきた。1999 年 ATP-Binding Cassette Transporter (ABC) A1 脂質膜輸送体が家族性 HDL 欠損症の原因遺伝子として同定され、これが HDL を新生し、また細胞内余剰コレステロールを排出していることが判明した。これまでの研究成果から、この ABCA1 輸送体依存的に作用し、生体内にて HDL を自己形成する実用化に適した新規アポ蛋白 A-I 類似 (iCE; inducible Cholesterol Efflux) ペプチドの開発に成功した (FAMP = Fukuoka University ApoA-I Mimetic Peptide)。このペプチドは両親媒性 ヘリックス構造を保持し、ABCA1 依存性コレステロール引き抜き能力を増加し、小粒子 pre-HDL の新生を増加させることにより HDL の機能活性を亢進しマウスにおける大動脈プラークを抑制することが明らかとなっている。放射線標識した ⁶⁸Ga-DOTA-FAMP は、動脈硬化ウサギにおける大動脈プラークを描出・イメージング出来ることから、本ペプチドはプラーク局所に留まり抗動脈硬化作用を発揮している事が確認できている。

2. 研究の目的

本ペプチドの多種蛍光標識トレーサーを作製、開発することによって、そのターゲット分子、作用メカニズムの詳細を明らかにすること。また本ペプチドは HDL 様分子特性をもつことから、プラークを形成する早期段階の動脈硬化においても相互作用することが推察される。そのため、この新規ペプチドを用いたヒト早期動脈硬化の血中バイオマーカーとしての有用性について明らかにすることが本研究の主目的である。まず新規の蛍光標識ペプチドとして FITC-FAMP の合成、精製を行い、その機能性を確認検討する。また、FITC-FAMP を蛍光トレーサーとして免疫組織学的検討にて標的細胞、標的分子までも明らかにする。

3. 研究の方法

(1) FITC-FAMP の合成と機能

ペプチド固相合成装置を用いて既開発の iCE ペプチド FAMP (H- ALE HLF TLY EKA LKA LED LLK KLL -Resin) を合成し、-Ala を N 末端に追加したあと FITC を結合させ樹脂から切り出した。HPLC または Sephadex Gel 25 を用いて精製を行い、MALDI-TOF-Mass にて合成を確認した。Native PAGE を用いてヒト血液中における HDL への機能を確認した。

(2) コレステロール引き抜き機能

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 FITC-FAMP 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した。

(3) 細胞内の分子機構

作製した FITC-FAMP を蛍光リガンドとして、CHO 細胞、COS、RAW264、A172 細胞へインキュベーションしその局在を共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて検討した。また、Probucol 投与下における局在変化および蛍光シグナルの変化も共焦点レーザー走査顕微鏡にて測定検討した。

(4) FACS による陽性細胞の同定

FACS (フローサイトメトリー) システムを用いて、ヒト白血球において、FITC-FAMP を蛍光標識抗体と代替使用して、FITC-FAMP 結合 (陽性) 細胞を同定した。さらに CD11b/Mac-1、CD14、CD32、CD33、CD36、CD64、CD68、CD163、CD177、CD204 抗体と併用しどの表面マーカーをもつ細胞に特異的に作用しているかを解明した。

4. 研究成果

(1) 蛍光分子を持つ FITC-FAMP の合成に成功した。蛍光標識により FAMP の機能性への影響を native PAGE にて検討したところ、同じように HDL が pre-HDL にシフトすることを証明した。さらに、アルブミンに強く吸着していることがわかった。このことから血中ではアルブミンによって全身に輸送されることが示唆される。

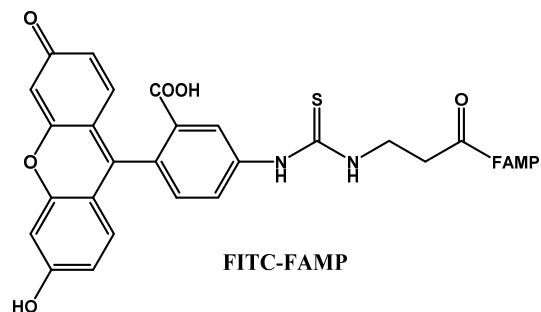


Figure.1 蛍光標識 FAMP の構造

(2) FITC-FAMP の効果を検討した。以前より使用していた FAMP、acd-FAMP 等と同様にコレステロール引き抜き能を有しており、機能性に影響がないことを確認した。

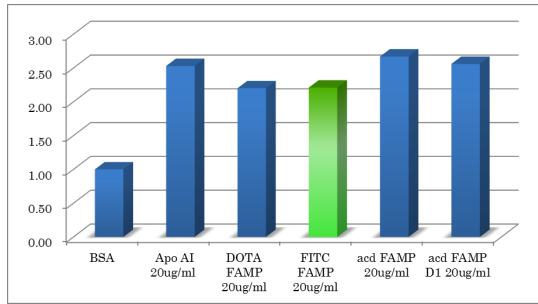


Figure.2 Efflux

(3)細胞モデルにおける FITC-FAMP の局所を共焦点レーザー走査顕微鏡にて確認したところ、どの細胞モデルでも細胞膜と細胞内に蛍光を確認できた。また、probucol で ABCA1 を阻害した場合、細胞膜への集積が抑制された。このことから、ABCA1 を介していることがわかる。また細胞内にも確認できることから ABCG1 など他のレセプターとの相互作用や貪食作用の可能性が示唆される。

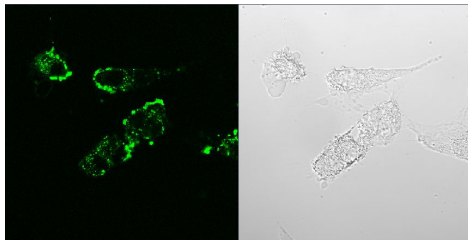


Figure.3 A172 cell

(4)FAMP が炎症部位やプラーク局所に集積することから単球に吸着し動脈硬化巣まで輸送されると考えていた。しかしながら、FACS システムにおいて FITC-FAMP は単球と 1.2% ポジティブ反応を示したのに対して、顆粒球と 19.6% ポジティブ反応を示した。(Figure.4)フリーの FAMP で阻害したところ、

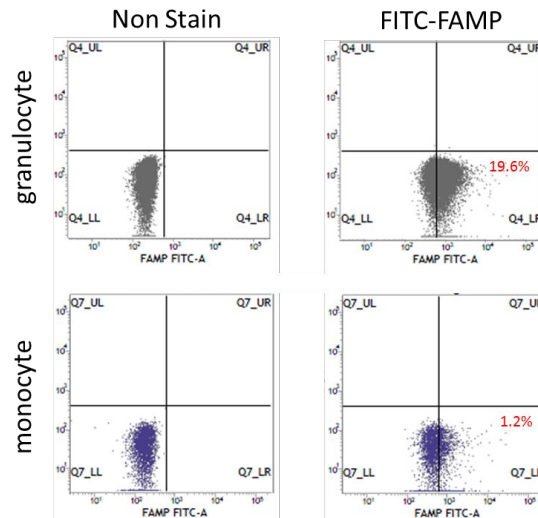


Figure.4 FACS system

FITC-FAMP は結合を抑制されたことから、顆粒球内に特異的なレセプターがある可能性が考えられる。また、その中でも、好中球に多くみられる CD177 と強くポジティブを示した。好中球もマクロファージと同様に貪食作用があり炎症部位に遊走して集積する。このことから、血中で好中球に吸着した FAMP は全身に輸送され、炎症部位や動脈硬化巣に集積することが示唆される。

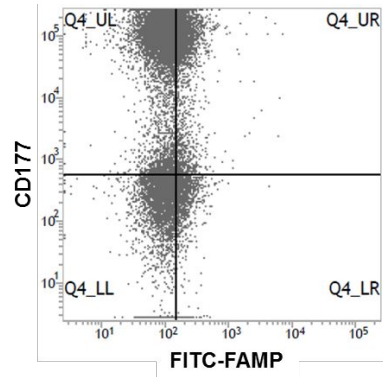


Figure.5 Proportion of CD177/FITC-FAMP

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 4 件)

(1) Kohei Takata, Satoshi Imaizumi, Emi Kawachi, Eiji Yahiro, Yasunori Suematsu, Tomohiko Shimizu, Satomi Abe, Yoshino Matsuo, Kyoko Nakajima, Tetsuhiko Yasuno, Shiro Jimi, Bo Zhang, Yoshinari Uehara, Shin-ichiro Miura, Keiji Saku / The ApoA-I mimetic peptide FAMP promotes recovery from hindlimb ischemia through a nitric oxide (NO)-related pathway / *International Journal of Cardiology* 査読有り 207 (2016) 317-325 doi: 10.1016/j.ijcard.2016.01.012.

(2) Eiji Yahiro, Emi Kawachi, Shin-ichiro Miura, Takashi Kuwano, Satoshi Imaizumi, Atsushi Iwata, Koki Hasegawa, Tsuneo Yano, Yasuyoshi Watanabe, Yoshinari Uehara, and Keiji Saku / Comparison of ^{64}Cu and ^{68}Ga for Molecular Imaging of Atherosclerosis using the Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide FAMP / *Journal of Cardiovascular Diseases & Diagnosis* 査読有り Vol. 3 2015, 3 1000201 doi: 10.4172/2329-9517.1000201

(3) Eiji Yahiro, Yoshinari Uehara, Emi Kawachi, Setsuko Ando, Shin-ichiro Miura, Keiji Saku / Improved

survival rate after myocardial infarction using an inducible cholesterol efflux (iCE) peptide: FAMP / *IJC Heart & Vessels* 査読有り Volume 4, September 2014, Pages 135-137 doi:10.1016/j.ijchv.2014.05.005

- (4) Kohei Takata, Satoshi Imaizumi, Emi Kawachi, Yasunori Suematsu, Tomohiko Shimizu, Satomi Abe, Yoshino Matsuo, Hitomi Tsukahara, Keita Noda, Eiji Yahiro, Bo Zhang, Yoshinari Uehara, Shin-ichiro Miura, Keiji Saku / Impact of Cigarette Smoking Cessation on High-Density Lipoprotein Functionality - VN-SEESAW-HDL - / *Circulation Journal* 査読有り Vol. 78 (2014) No. 12 2955-2962 doi:10.1253/circj.CJ-14-0638

〔学会発表〕(計 5件)

- (1) Imaizumi S, Takata K, Yahiro E, Kawachi E, Iwata A, Uehara Y, Zhang Bo, Miura S, Saku K / Inhibition of lipopolysaccharide induced gene expression by HDL from healthy subjects and patients with acute myocardial infarction. / European Society of Cardiology 8.26-31 2016 イタリア
- (2) Takata K, Imaizumi S, Zhang B, Kawachi E, Uehara Y, Miura S, Saku K / Effect of Statins on the Relationships of Adiponectin and Lipoproteins Analyzed by Capillary Isotachopheresis. / The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2015. 4.24-26 大阪
- (3) Takata K, Imaizumi S, Kawachi E, Yahiro E, Zhang B, Uehara Y, Miura S, Saku K / FAMP (Fukuoka University Apo A-I Mimetic Peptide) ameliorates impaired HDL function with activation of NO related pathway. / The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2015.4.24-26 大阪
- (4) Emi Kawachi, Yoshinari Uehara, Eiji Yahiro, Satomi Abe, Setsuko Ando, Shin-ichiro Miura, Keiji Saku / A newly developed apoA-I mimetic peptide with a D-amino acid promotes HDL via ABCA1-mediated cholesterol efflux / European Society of Cardiology

8.28-9.2 2014 スペイン

- (5) Emi Kawachi, Satoshi Imaizumi, Kohei Takata, Satomi Abe, Yoshino Matsuo, Eiji Yahiro, Yoshinari Uehara, Bo Zhang, Shin-ichiro Miura, Keiji Saku / Effect of smoking cessation on HDL function / Yoshino European Society of Cardiology 8.28-9.2 2014 スペイン

6. 研究組織

研究代表者

川内 絵未 (KAWACHI, Emi)

福岡大学 医学部 助教

研究者番号: 50714416