

令和元年6月5日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09484

研究課題名(和文) HDLによる新規動脈硬化症診断・治療のトランスレーショナルサイエンスの実践

研究課題名(英文) Newly developed diagnosis and therapy of HDL for anti-atherosclerosis

研究代表者

朔 啓二郎 (Saku, Kei-jiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40183371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：HDLペプチド(ApoA-I模倣ペプチド、FAMP)を用いて、診断法については、⁶⁸Ga-DOTA-FAMPのラベリングが効率よく実施できるように方法を改良し報告した。治療法では、FAMPを改良し、さらに強力な抗動脈硬化作用を持つペプチドを見だし改良型FAMPと名付けた。また、改良型FAMPのコレステロール引き抜き効果の大部分は、ABCA1を介していた。次に、高脂肪食負荷アポEノックアウトマウスモデルにて改良型FAMPの効果を検証し、改良型FAMPの動脈硬化抑制作用は、コレステロール逆転送系の増強により従来型のFAMPよりも強力であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物治療によるLDLコレステロール抑制を介した動脈硬化性疾患の抑制はある程度効果を上げているが、未だに残存リスクがある。動脈硬化病変に直接作用し、抗動脈硬化抑制作用を発揮することで残存リスクの軽減が期待される。今回、HDLの主要構成成分であるApoA-Iの模倣ペプチドを精製し、動脈硬化動物モデルにて抗動脈硬化抑制効果を実証し、新規の抗動脈硬化抑制療法の可能性を広げることができた。

研究成果の概要(英文)：As a labeling strategy of HDL peptide (ApoA-I mimetic peptide, FAMP) for diagnostic tool, the strategy was improved and reported that labeling of ⁶⁸Ga-DOTA-FAMP could be efficiently performed. As for treatment, FAMP was improved, and the peptide had more potent anti-atherosclerotic action and named as improved FAMP (iFAMP). The effect of cholesterol efflux by iFAMP was through ATP-binding cassette transporter-1. Next, the effect of iFAMP was examined using a high fat diet-loaded ApoE knockout mouse model, and the anti-arteriosclerosis action of iFAMP was stronger than the conventional FAMP by the enhancement of the reverse cholesterol transfer system.

研究分野：循環器内科、動脈硬化

キーワード：低比重リポ蛋白 コレステロール引き抜き能 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管病の一次・二次予防における薬物治療には、脂質異常症に対するスタチン投与などにより低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) を低下させることである。しかし、これまでの積極的脂質低下療法では、30%程度の心血管イベント発症を抑制できるが、残存リスクが約70%存在しており、更なる治療薬が期待されている。

最近、HDL を治療ターゲットとすることが注目されている。治療法の中でも HDL-C を増加させるだけでは、ナイアシンやコレステロール転送蛋白阻害薬などの臨床研究の結果から予後の改善効果はもたらされず、HDL の機能を高めることが必要とされている。これまでも ApoA-I Milano (Full-length 型合成 HDL)、既存のペプチド型 HDL である D4F や ETC642 などが臨床治験に用いられたが、体内蓄積やリン脂質を含有するなどの問題で HDL 機能改善治療薬として未だに承認されたものは無いのが現状である。

以前より、私たちは、HDL 機能を増強させる合成 HDL の研究開発を行ってきた。その結果、A172 細胞を用いた cholesterol efflux study において ABCA1 を介したコレステロール efflux を増加する HDL ペプチドである (FAMP、Fukuoka Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide) の開発に成功し、マウスにおいて動脈硬化の抑制効果も確認した。FAMP は、ApoA-I 模倣するに必要最小限のアミノ酸配列に変異を加えペプチドの安定性を確保し、毒性の原因となるリン脂質を含有していないことが特徴となっている。

2. 研究の目的

私たちは、動脈硬化性心血管病の先進医療ツールとして、高比重リポ蛋白 (HDL) ペプチド (FAMP、Fukuoka Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide) の開発に成功し特許を得た。FAMP による診断・治療法の確立を目指した基礎研究を実施し、診断面では動脈硬化層イメージングに成功、治療法では、動脈硬化進展抑制、心筋虚血再灌流後の心機能改善・虚血下肢血流改善効果などを報告した。今回は、これら基礎研究成果を一步進め、改良型 FAMP を開発し、さらに効果的なツールとすることを目的とした。

3. 研究の方法

診断法

^{68}Ga -DOTA-FAMP のラベリングが効率よく実施できるように方法を開発する。DOTA-FAMP が radiolabeling 中に構造変化するかを検討した。ラベリングの方法は、Zhernosekov's method (using acetone for ^{68}Ga purification) を改良して使用した。構造変化は、circular dichroism spectroscopy 法を用いた。

治療法

改良型 FAMP の開発

1) FAMP を改良し、さらに強力な抗動脈硬化作用を持ち、高感度な分子イメージングへ応用可能なペプチドの開発として、D 体 FAMP (D-FAMP)、二量 D 体 FAMP (D-FAMP-Duo) や四量 D 体 FAMP (D-FAMP-Quad) を合成・精製する。Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry、High Performance Liquid Chromatography 及び Circular Dichroism spectra により、合成・精製した FAMP の性質を評価した。

2) D-FAMP、D-FAMP-Duo の Cholesterol Efflux 増強効果が従来型 FAMP よりも強力であることを各種単球・マクロファージ測定系 (A172 human glioblastoma cells と J774 macrophages) により確定する。A172 human glioblastomas には、ABCA1 cDNA を Lipofectamine 2000 を使用し、トランスフェクションした。 ^3H -cholesterol を細胞に取り込ませ、各種処理を実施後、Cholesterol Efflux 能を測定した。

3) D-FAMP の血中動態の計測

7 週齢の雄 C57BL6 マウスに 10 mg/kg の fluorescence-labeled Acid-FAMP または Acid-i-FAMP-D1 を静注する。血漿の蛍光シグナルを投与 0、10、30、60、120、180、240、360、480 分後に測定した。

4) CETP トランスジェニックマウスを用い、コレステロール逆転送系への効果 (RCT study) について検討し、動脈硬化抑制の機序を検討した。J774 cells を培養し、Ac-LDL とともに ^3H -cholesterol を取り込ませた。CETP トランスジェニックマウスを 0.5% high-cholesterol diet (10% coconut oil) にて 3 週間飼育した。その後、CETP トランスジェニックマウスを 3 群に分け、FAMP (50 mg/kg of body weight per day)、i-FAMP-D1 (50 mg/kg of body weight per day) またはプラセボ群として、5 日間飼育した。4 日目に、ラベルした J774 macrophage cells を投与した。その後、4、24、48 時間で便を集め、便中の放射能活性を測定した。

5) コレステロール負荷 Apo-E ノックアウトマウスを使用し D-FAMP (改良型ペプチド) の動脈硬化抑制効果を検証した。Apo-E ノックアウトマウスを 0.5% high-cholesterol diet (10%

coconut oil)にて16週間飼育した。その間に、FAMP (50 mg/kg)、i-FAMP-D1 (50 mg/kg) またはプラセボを週に2回投与した。終了後、大動脈を取り出し、Oil Red O で染色し動脈硬化面積を計測した。

4. 研究成果

1) HDL ペプチド (ApoA-I 模倣ペプチド、FAMP) を用いて、診断法については、⁶⁸Ga-DOTA-FAMP のラベリングが効率よく実施できるように方法を改良し報告した。ラベリングは、オリジナルの方法に比し、改良法はラベリング効率が格段に進歩した。構造変化は、熱処理により aggregation が多くなり、ラベリング効率が低下していた。これらを踏まえ改良を加え、ラベリングが効率が高まった。

2) FAMP を改良し、D-FAMP、D-FAMP-Duo の Cholesterol Efflux 増強効果が従来型 FAMP よりも強力であることを各種単球・マクロファージ測定系により確定した。FAMP、D-FAMP、D-FAMP-Duo は、Fmoc(N-[9-fluorenyl]methoxycarbonyl)-based solid-phase peptide synthesis により合成した。その結果、D-FAMP-Duo は、Cholesterol Efflux 増強効果が強力であったが、合成の問題もあり、その後の実験では、D-FAMP でも増強効果が強力であったため、D-FAMP を使用することとした。この強力な抗動脈硬化作用を持つペプチドを見だし改良型 FAMP (D-FAMP) と名付けた。

3) この改良型 FAMP は、ApoA-I よりも強力な Cholesterol Efflux 増強効果を有していることがわかった。この改良型 FAMP は、強力な alpha-ヘリックス構造を有していた。アガロースゲル法とウエスタンブロット法によるリポ蛋白解析では、HDL と改良型 FAMP をインキュベーションしたところ、改良型 FAMP が pre-beta-HDL を著名に増加させていた。また、改良型 FAMP のコレステロール引き抜き効果の大部分は、ABCA1 を介していた。

4) fluorescence-labeled Acd-FAMP または Acd-改良型 FAMP を静注した実験では、改良型 FAMP の方が FAMP よりも長く血中に止まっていることがわかった。

5) CETP トランスジェニックマウスを用いた結果では、改良型 FAMP の方が FAMP よりも便中の放射能活性が高く、コレステロール逆転送系への効果が高いことがわかった。

6) アポ E ノックアウトマウスモデルを用いた結果では、改良型 FAMP が FAMP より大動脈の動脈硬化面積が小さいことがわかった。

したがって、改良型 FAMP は、FAMP より長く血中に止まり、末梢からの Cholesterol Efflux を増強し、便中へ多く排泄させ (コレステロール逆転送系の増強作用) 動脈硬化を抑制していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Hasegawa K, Kawachi E, Uehara Y, Yoshida T, Imaizumi S, Ogawa M, Miura S, Saku K. Improved ⁶⁸Ga-labeling method using ethanol addition: Application to the Q1alpha-helical peptide DOTA-FAMP. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2017;60:55-61. (査読有り)
2. Kuwano T, Miura S, Norimatsu K, Arimura T, Shiga Y, Tomita S, Nakayama A, Matsuo Y, Imaizumi S, Saku K. Advanced glycation of high-density lipoprotein and the functionality of aldosterone release in type 2 diabetes. *Hypertens Res*. 2017;40:271-276. (査読有り)
3. Suematsu Y, Miura S, Takata K, Shimizu T, Kuwano T, Imaizumi S, Yahiro E, Uehara Y, Saku K. A novel inducible cholesterol efflux peptide, FAMP, protects against myocardial ischemia reperfusion injury through a nitric oxide pathway. *Int J Cardiol*. 2016;202:810-816. (査読有り)

[学会発表](計6件)

1. 田代浩平、志賀悠平、井手元良彰、今泉朝樹、上田容子、矢野祐依子、則松賢次、三浦伸一郎。Association of Extremely High Levels of High-density Lipoprotein with Coronary Atherosclerosis in Patients who Underwent Coronary CT Angiography. 第83回日本循環器学会学術集会、2019年3月29-31日、横浜。
2. Suematsu Y, Idemoto Y, Kuwano T, Imaizumi S, Uehara Y, Saku K, Miura S. Anti-atherosclerotic Effects of Improved Apolipoprotein (Apo) A-I Mimetic Peptide. 第82回日本循環器学会学術集会、2018年3月23-25日、大阪。
3. Suematsu Y, Idemoto Y, Kuwano T, Imaizumi S, Uehara Y, Saku K, Miura S. Improved Apolipoprotein (Apo) A-I Mimetic Peptide Induced Antiatherosclerotic Effect. 第1

回日本循環器学会基礎研究フォーラム、2018年1月6-7日、東京。

4. 三浦伸一郎、藤見幹太、杉原充、有村忠聡、志賀悠平、北島研、朔啓二郎。包括的心臓リハビリテーションにおける効果的な動脈硬化リスクファクターの管理。第64回日本心臓病学会学術集会、2016年9月23日、東京。
5. 三浦伸一郎、藤見幹太、有村忠聡、志賀悠平、北島研、朔啓二郎。Residual Riskに対するHDL増加・機能改善療法における包括的心臓リハビリテーションの役割。第22回日本心臓リハビリテーション学会学術集会、シンポジウム9、2016年7月16-17日、東京。
6. 三浦伸一郎。脂質代謝のコントロールの基本と最新情報～脂質異常症への最適な包括個別治療～。第5回臨床高血圧フォーラム、シンポジウム。2016年5月14-15日、東京。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三浦伸一郎
ローマ字氏名：Shin-ichiro Miura
所属研究機関名：福岡大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：20343709

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。