

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591109

研究課題名(和文) 分子標的による機能性HDL増加薬の開発 - 副作用の少ない新規抗動脈硬化剤の創製 -

研究課題名(英文) Development of increasing functional HDL-C using antisense oligonucleotides as innovative therapy

研究代表者

岩本 紀之 (IWAMOTO, Noriyuki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：70534709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血清HDLのマスターレギュレーターであるABCA1を標的とし、革新的な核酸医薬を用いることによって、効率的にABCA1遺伝子の発現をコントロールしHDL増加薬の創薬開発を目的とした基礎研究である。

ABCA1の転写活性メカニズムの検討により、転写調節因子AP2がProtein Kinase D(PKD)によってリン酸化されAP2がABCA1の転写活性を抑制することから、PKDをターゲットし、実際に血清HDLの増加するかを検討した。BNA修飾されたPKD特異的アンチセンスは、培養細胞およびマウス投与実験においてもABCA1のmRNAを増加させHDLを増加させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this basic research is to analyze whether or not innovative antisense oligonucleotides targeted specific molecular gene would be candidate of increasing serum HDL-cholesterol level through the ABCA1/apoA-I pathway. We previously demonstrated that transcription factor AP-2 negatively regulates the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) gene through its Ser-phosphorylation by protein kinase PKD which is a common modulator of the DNA binding activity of AP-2 through their phosphorylation for negative regulation of the ABCA1 in genes expression. The Antisense oligonucleotide modified BNA is so innovative that have stronger effective compared to previous one.

In this study, we demonstrated that the PKD specific targeted antisense could increase ABCA1 mRNA levels in liver in vitro and in vivo, which result in raising serum HDL-C level in vivo. To further develop this strategy, we need more experiments to figure out the value of efficacy and safety using oligonucleotides therapy

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：HDL ABCA1 核酸医薬

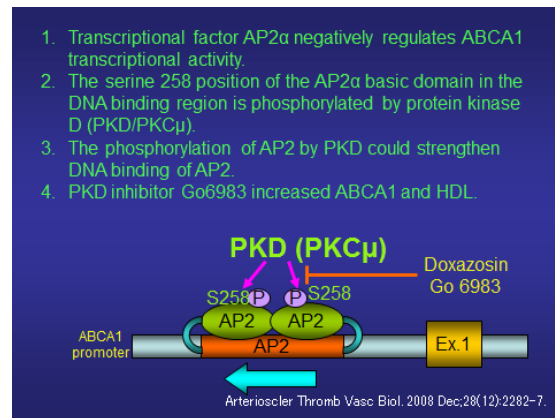
1. 研究開始当初の背景

脂質改善薬は、第2世代のスタチン登場により LDL-C に対しては十分な効果が得られ数多くの臨床研究とともにエビデンスが蓄積されている。しかしながら、HDL-C を特異的に増加させる薬剤に関しては、未だに十分な成果が得られていない。近年 CETP 阻害剤が開発され製薬会社を中心に大規模な CV outcome 研究が実施されているが、これまで結果が得られたものとしては、いずれもイベント抑制効果がなく開発が中止に至っている。これは、CETP 阻害剤で増加する HDL-C はコレステロール逆転送系としての機能性を有していない HDL-C の増加であり、それが故に動脈硬化の進展抑制や退縮が認められないと一部では考えられている。よって、HDL-C を動脈硬化抑制のために増加させるためには、より粒子サイズの小さい原始 HDL を中心として増加させることにより細胞内の余剰コレステロールを効率的に排出することができると考えられる。この原始 HDL の産生に必要なのがアポリポ蛋白 A-I と ABCA1 タンパク (タンジール病の原因遺伝子) との反応である。

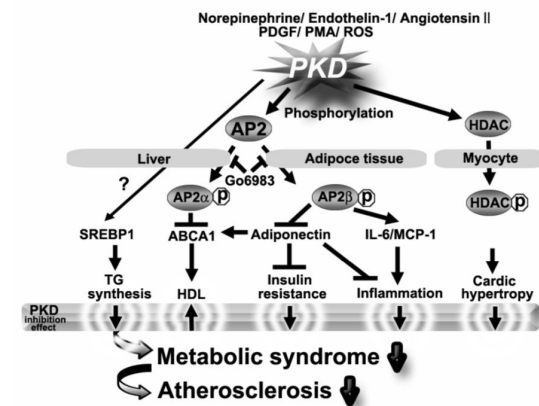
タンジール病は、血清 HDL コレステロール濃度がほとんど 0 になる遺伝子性疾患であり、1999 年その原因遺伝子が ABCA1 と同定された。またげっ歯類において、ABCA1 を過剰発現させると HDL-C の増加と動脈硬化進展抑制が認められたと報告されており、ABCA1 は HDL-C 増加、イベント抑制を期待できるターゲット遺伝子の一つとして考えられている。

我々は、これまでこの ABCA1 の転写調節領域の研究を行い、転写調節因子 AP-2 が負の調節因子として作用することを見出した (図 1)。さらに、この AP2 タンパクは、Protein kinase D (PKD) によってセリン残基がリン酸化されること、そしてリン酸化により DNA との結合がより強くなり、ABCA1 の転写活性レベルを低下させることを報告してきた (PKD/AP2/ABCA1 pathway)。また PKD/AP2 pathway は、ABCA1 遺伝子発現の調節だけでなく、脂肪細胞においてはアディポネクチンの発現も ABCA1 と同様に負に調節していることを我々は報告しており、この pathway の抑制は現在問題となっている Metabolic

syndrome を改善しうる可能性が示唆されている。



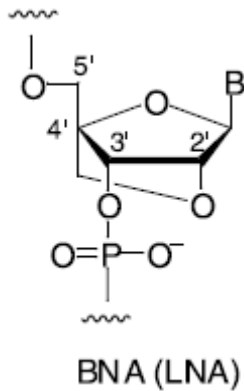
(図 1) PKD/AP2 pathway による ABCA1 の発現調節機構



(図 2) PKD/AP2 pathway により調節を受ける遺伝子

2. 研究の目的

本研究は、ABCA1 の転写調節を増加させて機能的 HDL 産生を増加促進する創薬創製を目的として、PKD/AP2/ABCA1 pathway に対するアプローチを革新的な核酸医薬を用いて検討する。具体的には PKD 特異的アンチセンスを用いてその発現レベルを低下させ、AP2 のリン酸化を低減させることにより ABCA1 の遺伝子発現レベルを増加させ HDL-C が増加するかを in vivo, in vitro いずれにおいても検討する。また革新的とは、標的となる mRNA に対する配列特異性並びに結合親和性を高めるために、天然核酸の糖部の立体的「ゆらぎ」をある方向に固定化した新しい合成核酸ユニット Bridged Nucleic Acid (BNA) を組み入れたオリゴヌクレオチドを用いた (図 3)。



(図3) BNA-オリゴの構造

3. 研究の方法

通常のオリゴヌクレオチドよりも標的 RNA と強固に結合する BNA 修飾 PKD1 特異的アンチセンスオリゴを、コンピュータ解析により RNA の高次構造を考慮して 3 種類を選択した。もっとも効率よく PKD 遺伝子発現を抑制できる BNA 修飾アンチセンスを同定するために、培養細胞(マウス肝臓由来の NMULi 細胞)を用い、Lipofectamine2000 (Invitrogen) にてトランスフェクション。その後 72 時間後に各オリゴヌクレオチドをトランスフェクションした細胞の RNA を Trizol 液を用いて抽出して、PKD1 の発現レベルを Real time PCR 法を用いて検討した。

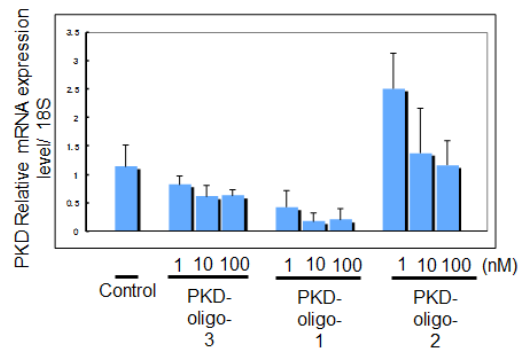
またこれらのアンチセンスオリゴを用いて実際に ABCA1 mRNA が増加するかを培養細胞にて確認した。

次に、1 種類の BNA 修飾オリゴヌクレオチドをマウスの腹腔内に投与し、in vivo でマウス肝臓において ABCA1 の増加が認められるかを検討した。

同時にマウス血清を採取し、総コレステロールおよび HDL コレステロールの変動を HPLC 法を用いて測定した。

4. 研究成果

PKD 特異的オリゴヌクレオチド 3 種類を培養細胞にトランスフェクションし、最も PKD の発現レベルを抑制できた PKD-oligo-1 を同定した(図4)。

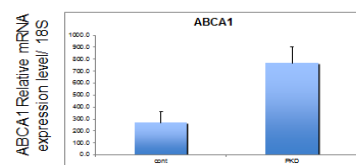


(図4) 培養細胞での各 PKD 特異的 BNA 修飾オリゴヌクレオチドによる PKD mRNA 発現抑制の検討

このアンチセンスオリゴ (PKD-oligo-1) は、アンチセンス濃度依存性に PKD の発現抑制が認められ、ABCA1 の mRNA の発現レベルも同時に増加が認められていた。

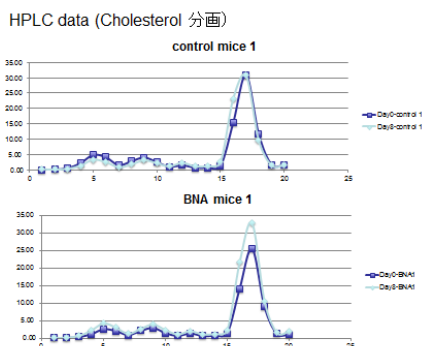
次にこの PKD-oligo-1 をマウス腹腔内に投与し、1 週間後にマウス肝臓 RNA 及び血清を抽出。Real time PCR 法にて肝臓における ABCA1 の発現レベルを調べたところ、オリゴヌクレオチド投与群は生食を投与したコントロール群に比べ、ABCA1 の発現レベルの増加が認められた (図5)。

In vivo study mRNA (mice liver)



(図5) マウス肝臓での PKD オリゴヌクレオチドによる ABCA1 の発現レベルへの影響

また血清総コレステロール特に HDL コレステロール分画において、オリゴヌクレオチド投与群はコントロール群に比べて増加が認められた(図6)。



(図6) マウス血清 HPLC (コレステロール分画)

以上の結果より BNA 修飾された PKD 特異的オリゴヌクレオチド PKD-oligo-1 は、培養細胞およびマウス投与と実験において、ABCA1 の mRNA を増加させ HDL コレステロールを増加させることが示唆された。

本研究は、まだ preliminary 実験における結果であり、今後はデータの蓄積とさらなるエビデンスの構築が必要になってくると考える。HDL-C 増加薬としてさらに開発発展させるためには、まだ研究が不十分であり、さらなる詳細実験が今後必要である。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1 Protein kinase D regulates the adiponectin gene expression through phosphorylation of AP-2: a common pathway to the ABCA1 gene regulation.

Iwamoto N, Yokoyama S.

Atherosclerosis. 2011 May;216(1):90-6

査読有

2 Involvement of protein kinase D in phosphorylation and increase of DNA binding of activator protein 2 alpha to

downregulate ATP-binding cassette transporter A1.

Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Lu R, Yokoyama S.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Dec;28(12):2282-7.

査読有

3 ATP-binding cassette transporter A1 gene transcription is downregulated by activator protein 2alpha. Doxazosin inhibits activator protein 2alpha and increases high-density lipoprotein biogenesis independent of alpha1-adrenoceptor blockade.

Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Ayaori M, Tanaka N, Kusuhashi M, Ohsuzu F, Yokoyama S.

Circ Res. 2007 Jul 20;101(2):156-65.

査読有

[学会発表](計 0 件)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

独立行政法人循環器病研究センター・研究所・客員研究員
岩本紀之 (IWAMOTO Noriyuki)

研究者番号 : 70534709

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :