

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591123

研究課題名(和文)新規アポA-I模倣ペプチド(FAMP)：新たな動脈硬化の診断・治療法の確立

研究課題名(英文)New diagnostic and therapeutic strategies for atherosclerosis using newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide

研究代表者

朔 啓二郎(SAKU, Keijiro)

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規アポA-I模倣ペプチド(FAMP)の開発に成功後、この3年間は、FAMPを利用した新たな動脈硬化の診断・治療法の確立へ向けて研究を実施した。FAMPが動脈硬化性マウスにおいて、HDLの機能を高めて動脈硬化を抑制することを証明した。FAMPによる抗動脈硬化作用のメカニズムとして、FAMPは、HDLの機能を高め、コレステロール逆転送系の作用を増強していることがマウスにおいて証明した。また、FAMPの逆転送系増強作用以外に作用として、血管新生作用や抗炎症作用、心筋虚血再灌流障害抑制作用を見いだした。さらに、診断法については、68Gaを使用したPETイメージング法を動脈硬化ウサギにおいて確立した。

研究成果の概要(英文)：We had developed apolipoprotein A-I mimetic peptide (Fukuoka University ApoA-I Mimetic Peptide, FAMP). In this project, we established new diagnostic and therapeutic strategies for atherosclerosis using FAMP. First, FAMP had an anti-atherosclerotic effect through the enhancement of function of HDL in mice model of atherosclerosis. Second, as the mechanisms of FAMP-induced atheroprotective effects, we found that the administration of FAMP promoted ATP-binding cassette transporter A1-dependent efflux ex vivo, HDL turnover in vivo, and macrophage reverse cholesterol transport in vivo despite reduced plasma HDL-C levels. In addition, HDL with FAMP evoked pleiotropic effects, such as improvement of cardiac function in a model of myocardial ischemia reperfusion injury, an induction of endothelial cell tube formation and anti-inflammation. Finally, using FAMP as a diagnostic tool, FAMP with 68Ga-DOTA is a promising candidate diagnostic tracer for PET imaging of the atherosclerotic lipid burden.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ApoA-I模倣ペプチド HDL コレステロール逆転送系

1. 研究開始当初の背景

心臓・血管疾患の一次・二次予防における治療の原則は、スタチン投与など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。しかし、積極的 LDL-C 低下療法は、30%程度の心血管イベント発症を抑制できるが、残存するリスクは70%ほど存在している。従って、更なる創薬が期待される。脂質治療のネクストステージとして、高比重リポ蛋白 (HDL) を治療ターゲットとする試みが注目されているが、既存薬、現在開発中のコレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 阻害薬などの薬剤による HDL 機能の改善は十分でない。私たちは、以前から HDL の機能を増強させる合成 HDL の開発を進めており、この一連の研究を「HDL 治療」と名付け、「心血管病の先進医療戦略 HDL 治療の確立へ向けた各種病態の分子機構の解明とその応用」をテーマに、基礎的研究を行ってきた。つまり、様々に合成した HDL を用い、HDL のコレステロール逆転送作用のみならず多面的効果の分子機構を解明し、「HDL 治療」の Translational Research の達成に向けての準備を行い、基礎研究から抗動脈硬化作用の増強効果、内皮管腔形成促進作用、心リモデリング抑制や致死的不整脈抑制作用などを報告してきた。その研究成果をさらに進めるため、「創薬の可能性：新規ペプチド型合成 HDL の開発」と題し、実用化に適した新規アポ蛋白 A-I 模倣ペプチドの開発に取り組み、その開発に成功した (FAMP = Fukuoka University Apo A-I Mimetic Peptide)。このペプチドは、リン脂質を含有せず、強固な class A α ヘリックス構造を保持し、A172 細胞を用いた cholesterol efflux study では、FAMP により ABCA1 を介した efflux を増加、さらに、In vivo で pre- β の新生を増加させ、HDL の機能活性を上げることがわかっている。

2. 研究の目的

FAMP を用い、動脈硬化の診断および治療の二面から研究を実施することとした。

動脈硬化の診断法は、FAMP が動脈硬化巣に進入し蓄積されたコレステロールを細胞外に搬出するなら、そのペプチドを標的にした動脈硬化分子イメージングが可能になるのではないかと仮説から考えた。つまり、FAMP の動脈硬化治療薬としての開発と共に、動脈硬化診断薬としての展開を目指した。私たちは、PET (positron emission tomography) 画像で FAMP による動脈硬化分子イメージング法の確立のために、FAMP に対し、キレーターで修飾し、ポジトロン放出金属核種 ^{68}Ga や ^{64}Cu にて標識することとした。その後、DOTA-FAMP をウサギ、マウ

スへ投与し、PET での動脈硬化イメージング法を確立することとした。

さらに、FAMP を用い動脈硬化抑制薬として、その作用機序および新しい治療の可能性を模索するために、In vivo での検討は、動脈硬化層に対する影響 (athero study) をウサギや Apo-E ノックアウトマウスを使用して検討した。また、CETP トランスジェニックマウスを用い、コレステロールのマクロファージからの引き抜き能 (efflux study)、血液中から肝臓へのコレステロール代謝への影響 (turn over study) やコレステロール逆転送系への効果 (RCT study) を検討した。さらに、FAMP の逆転送系増強作用以外の作用があるのかについても検討することとした。

3. 研究の方法

(1) FAMP の Cholesterol Efflux 増強効果を各種単球・マクロファージを使用して測定した。次に FAMP の動脈硬化抑制効果を In vivo で評価した。動脈硬化層に対する影響 (athero study) は、Apo-E ノックアウトマウスにて、高コレステロール食負荷後、マウスを FAMP 非投与群、低用量 FAMP 投与群と高用量 FAMP 投与群の 3 群に分け、投与前及び試験終了時に、採血、大動脈の動脈硬化抑制作用を検討した。

(2) CETP トランスジェニックマウスまたは WT マウスを使用し、高コレステロール食負荷後、FAMP 非投与群、低用量 FAMP 投与群と高用量 FAMP 投与群の 3 群に分けた。6 週間の薬物負荷後、血液、肝臓を採取、組織における SR-B1、ABCA1、CETP などの mRNA の発現を評価した。ヒト HDL に ^3H -コレステロールを導入し、静脈注射した後に 48 時間経時的に採血を行った。RI 投与量に対する便中への排出を測定し、血液中の HDL から肝臓を介し糞中に至るコレステロールの turn over の評価を行った (turn over study)。 ^3H -コレステロールでラベルした J774 マクロファージを腹腔内に注射し、経時的に採血を行った。血中 RI の経時変化および 48 時間分の糞中 RI を測定し、マクロファージから肝臓を経由し、糞中排泄に至る RCT 全体に対する影響を評価する (RCT study)。6 週間の薬物負荷後、各群より採取した plasma を ^3H -コレステロールを取り込んだ J774 細胞または bone marrow macrophage に負荷し、コレステロール引き抜きを測定した。また、プロブコール負荷により ABCG1 を抑制後、ABCA1 依存性の引き抜きを評価した (ex vivo における efflux study)。

(3) 雄性 C57BL/6J マウスにリン酸バッファー (コントロール) 低用量 FAMP、高用量 FAMP を腹腔内投与した後に、左側開胸後、左冠動脈前下行枝を結紮、30 分後に再灌流さ

せる心筋再灌流モデルを使用した。6 時間後に血圧、ミラーカテテルによる心機能評価、梗塞サイズ、チトクローム C、TUNEL assay、各種因子の mRNA レベルを測定した。また、FAMP による一酸化窒素 (NO) 産生能に注目し、eNOS KO マウスでの FAMP の効果も検討した。また、In vitro では、内皮細胞を用い、無添加、FAMP や FAMP+HDL を細胞に添加し、炎症物質の細胞内から培養液中への分泌量 (MCP-1 や IL-6) を ELISA 法にて測定した。から抗炎症作用や血管新生作用を検討した。内皮管腔形成作用は、内皮細胞をマトリジェル上で培養し、無添加、FAMP や FAMP+HDL を細胞に添加し評価した。

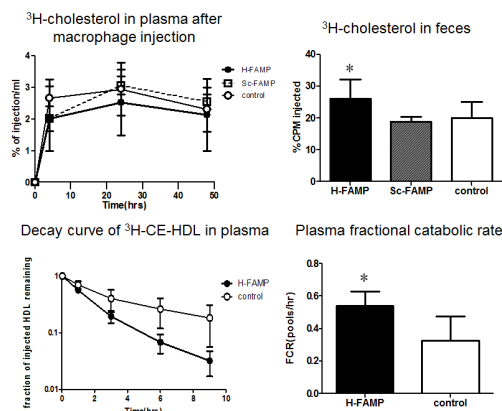
(4) 蛍光標識 FAMP を合成・精製する。FITC-FAMP を蛍光トレーサーとして免疫組織学的に標的臓器・細胞を突き止めた。動脈硬化分子イメージング法も利用し、⁶⁸Ga-DOTA-FAMP や ⁶⁴Cu-TE2A-FAMP を生成し、動脈硬化ウサギへ投与後、動脈硬化層のイメージングを実施して、感度・特異度を検討した。

4. 研究成果

(1) A172 細胞を用いた cholesterol efflux study を行い、FAMP 負荷による、特に、ABCA1 を介した efflux の増加を確認した。また、HDL への効果として FAMP による pre-β HDL の増加をキャピラリー電気泳動法とアガロース電気泳動法にて確認し、FAMP は強力な Pre-β HDL producer であることを確認した。また、Apo-E ノックアウトマウスにて高コレステロール食負荷後、特に高用量 FAMP 投与群において大動脈硬化抑制作用も確認した。

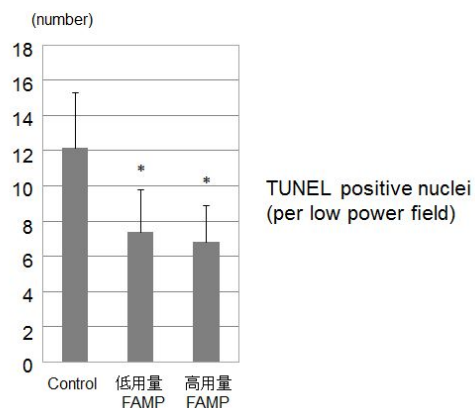
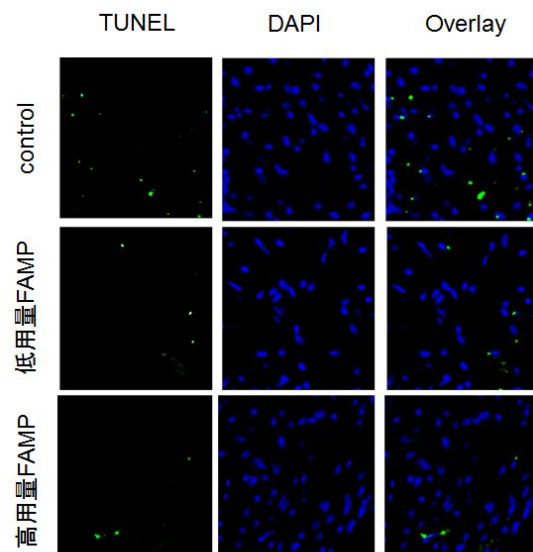
(2) CETP トランスジェニックマウスを使用して In vivo での study を実施した。FAMP 投与により約 30% の血中 HDL の低下を認めたと、その plasma による bone marrow macrophage を使用した efflux study においては、その HDL の低下にかかわらず同等の効果を認め、特に、ABCA1 を介した efflux は約 30% の増加を示した。以上より、FAMP の動脈硬化抑制の機序を In vivo 解明した(図 1)。

図 1.



(3) 高用量 FAMP は、コントロールに比し心拍出量、左室駆出率を有意に改善させた。梗塞サイズは低・高用量 FAMP にて有意に縮小し、それらの効果は eNOS KO マウスでは見られなかった。チトクローム C は、高用量 FAMP にてミトコンドリア内に有意に残存し、細胞質への放出を抑制しており、TUNEL assay では低・高用量 FAMP 投与によって有意にアポトーシスを抑制した。mRNA では、MCP-1、IL-6、VEGFR-2、HIF-1α に有意差を認めなかった。FAMP は、IRI モデルにおいて、NO 産生-ミトコンドリア保護作用を介し梗塞サイズを縮小し、心機能を改善させた。これらのことから FAMP の心筋虚血再灌流障害抑制効果を証明した(図 2)。また、FAMP を HDL 分画とインキュベーション後細胞へ添加すると、内皮細胞の管腔形成が促進され、炎症物質が減少している(細胞からの MCP-1 や IL-6 の分泌抑制)ことも確認された。

図 2.



(4) キレートである DOTA で修飾し、ポジトロン放出金属核種 ⁶⁸Ga にて標識した ⁶⁸Ga-DOTA-FAMP を合成し、動脈硬化診断薬として開発し、遺伝的高コレステロール血症ウサギにおいて PET 分子イメージングによる動脈硬化層の検出に成功した (⁶⁴Cu-TE2A-FAMP では、イメージング

できなかった)。この結果より FAMP は、動脈硬化薬に進入し、蓄積されたコレステロールを細胞外に搬出すると考えられることから、コレステロール貯蓄があると判断される血管病巣に進入しており、アクティブな動脈硬化薬のイメージが可能となる動脈硬化診断薬としての応用が期待できると思われた。

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5件)

Shimizu T, Tanigawa H, Miura S, Kuwano T, Takata K, Suematsu Y, Imaizumi S, Yahiro E, Zhang B, Uehara Y, Saku K. Newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Int J Cardiol.* 2015;192:82-88. 査読有り

Yahiro E, Uehara Y, Kawachi E, Ando S, Miura S, Saku K. Improved survival rate after myocardial infarction using an inducible cholesterol efflux peptide: FAMP. *IJC Heart & Vessels.* 2014;4:135-137. 査読有り

Miura S, Suematsu Y, Matsuo Y, Imaizumi S, Yahiro E, Uehara Y, Saku K. Induction of endothelial tube formation and anti-inflammation by newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide. *IJC Metabolic & Endocrine.* 2014;5:70-72. 査読有り

Uehara Y, Ando S, Yahiro E, Oniki K, Ayaori M, Abe S, Kawachi E, Zhang B, Tanigawa H, Imaizumi S, Miura S, Saku K. FAMP, a Novel ApoA-I Mimetic Peptide, Suppresses Aortic Plaque Formation Through Promotion of Biological HDL Function in ApoE-Deficient Mice. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000048. 査読有り

Kawachi E, Uehara Y, Hasegawa K, Yahiro E, Ando S, Wada Y, Yano T, Nishikawa H, Shiomi M, Miura S, Watanabe Y, Saku K. Novel Molecular Imaging of Atherosclerosis With Gallium-68-Labeled Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide and Positron Emission Tomography. *Circ J.* 2013;77:1482-1489. 査読有り

[学会発表](計4件)

八尋英二、上原吉就、三浦伸一郎、朔啓二郎。FAMP による標的血管動脈硬化分子イメージング。第46回日本動脈硬化学会総会、2014年7月10-11日、東京、千代田区。

Suematsu Y, Miura S, Takata K, Shimizu T, Imaizumi S, Yahiro E, Uehara Y, Saku K. FAMP, a Novel ApoA-I Mimetic Peptide

Suppresses Myocardial Reperfusion Injury in Mice. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014.03.21-23, Chiyoda-Ku, Tokyo.

Takata K, Imaizumi S, Miura S, Kawachi E, Yahiro E, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Zhang B, Uehara Y, Saku K. FAMP (Fukuoka University Apo A-I Mimetic Peptide) Induces Neovascularization through Improvement of Endothelia/HDL Function in Mouse Hind Limb Ischemia. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014.3.21-23, Chiyoda-Ku, Tokyo.

Uehara Y, Yahiro E, Abe S, Kawachi E, Ando S, Imaizumi S, Miura S, Saku K. The Mechanisms for a Beneficial Effect of iCE Peptide on Aortic Plaque Formations in ApoE^{-/-} Mice. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014.3.21-23, Chiyoda-Ku, Tokyo.

6. 研究組織

(1)研究代表者

朔 啓二郎 (SAKU, Keijiro)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：40183371

(2)研究分担者

太田 孝夫 (OHTA, Takao)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号：70185271

三浦 伸一郎 (MIURA, Shinichiro)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：20343709