

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293274

研究課題名(和文) 環状ホスファチジン酸による抗動脈硬化作用を利用した治療創薬の基盤開発

研究課題名(英文) The effect of cPA on carotid intima-media thickness progression in animal model with atherosclerosis

研究代表者

塚原 完 (TSUKAHARA, Tamotsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：00529943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性脂質であるcPAはNon-injury内膜肥厚モデルにおいて有意に内膜肥厚を抑制した。さらに、ApoE欠損マウスにcPAを短期腹腔内投与を繰り返したところ、cPA投与群では有意にLDLコレステロール値が低下した。一方で、HDLコレステロールについては有意に増加した。動脈硬化症関連遺伝子については、いずれもcPA投与により顕著な発現レベルの抑制が観察された。これらの成果より、これまでの欠点を克服した新規な動脈硬化症治療法を明らかにすることに成功した、今後、臨床への貢献度が益々大きくなることを期待している。

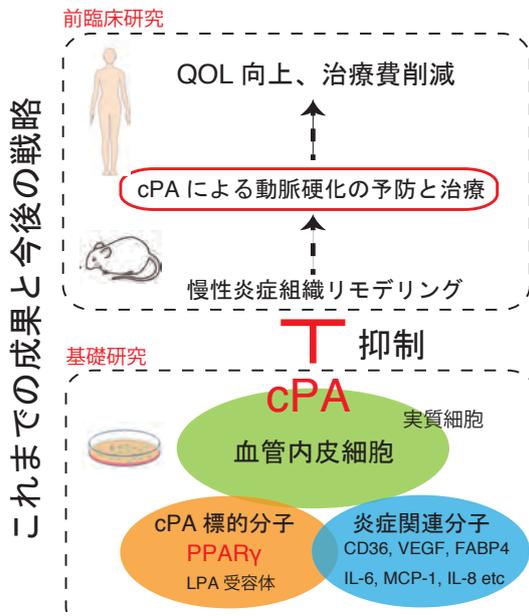
研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine whether metabolically stabilized cPA, in the form of a carba-derivative of cPA (2ccPA), could reduce plasma cholesterol levels and affect the expression of genes related to atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout (apoE<sup>-/-</sup>) mice. 2ccPA reduced LDL-C levels in these mice (n = 3) from 460 to 330 mg/ml, from 420 to 350 mg/ml, and 420 to 281 mg/ml under a western-type diet. 2ccPA also reduced expression of lipid metabolism-related genes, cytokines, and chemokines in ApoE-deficient mice on a high-fat diet. Taken together, these results suggest that 2ccPA governs anti-atherogenic activities in the carotid arteries of apoE-deficient mice. Thus, the results of this study raise the possibility of using cPA as a lead compound to develop new treatments that act on PPAR; however, further investigation is required to determine the molecular mechanisms underlying the described effect of cPA.

研究分野：脂質生化学

キーワード：動脈硬化 内膜肥厚 リゾリン脂質 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症は一種の慢性炎症であり、平滑筋細胞の遊走および増殖により発生する新生内膜肥厚をきっかけとしたプラーク発生とその破綻が主な原因となる。血清脂質であり脂質メディエーターのひとつであるリゾホスファチジン酸(LPA)は、動脈硬化症の前段階で生じる血管内膜肥厚の促進に核内受容体の1つであるPPAR $\gamma$ の活性化を介して関与するアゴ



ニストとして機能している。一方、LPAの構造アナログ体であるcPAはPPAR $\gamma$ のアンタゴニストであることを我々は明らかにしており、LPA依存的に誘発される内膜肥厚形成をcPAが有為に抑制することを報告した。cPAで内膜肥厚が抑制されている患部組織では内膜肥厚の促進に関与する遺伝子の発現が抑制されていることが予想されるため、これらの遺伝子を同定できれば、動脈硬化症の予防および治療法の開発研究が一層進展することが期待される。生体内にはこれらリズリン脂質が厳密にバランスを保ちながら体内の恒常性を維持していると考えられ、これらのバランスが崩れることで病態発症につながると予想される。我々はLPAによるPPAR $\gamma$ の活性化を介した動脈硬化症の発症メカニズムを解明するために、これまでに次の2点を明らかにしてきた。

1) 動脈硬化症の前段階である内膜肥厚形成がLPAにより促進され、cPAが有為に抑制する現象の解明。2) 内膜肥厚を抑制するための新規ドラッグデリバリー法の開発 (研究業績#2)。これまでの研究からcPAによるPPAR $\gamma$ の活性化の抑制が動脈硬化症発症の制御に重要な因子であることが示唆されるが、その病態分子機構の解明は依然不明のままである。本研究では動脈硬化症発症に関与する新

規治療標的分子をin vivoで同定することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究では我々が新規に発見した内在性PPAR $\gamma$ アンタゴニスト「cPA」による内膜肥厚形成の抑制作用を利用した新規動脈硬化症治療に向けた治療標的分子を同定することを目標とし、期間内に以下の内容を明らかにする。徐放化ハイドロゲル-cPAによる内膜肥厚形成抑制効果をラットによる「Non-injury 内膜肥厚モデル」を利用して治療効果を検討する。LPAにより内膜肥厚が誘発されたものおよび徐放化cPA-ハイドロゲルで内膜肥厚の進行を抑制させたもの、それぞれの患部組織からRNAを抽出後、増殖・炎症に関連する遺伝子を重点的に、マイクロアレイ法で発現変動比解析を行い、治療標的遺伝子の候補を同定する。さらに、動物モデルを使用し、ハイドロゲル-cPAによる頸動脈内における動脈硬化症関連遺伝子を明らかにするとともに、血中コレステロールを含んだ臨床検査を行い、cPAによる血清動態を明らかにする。

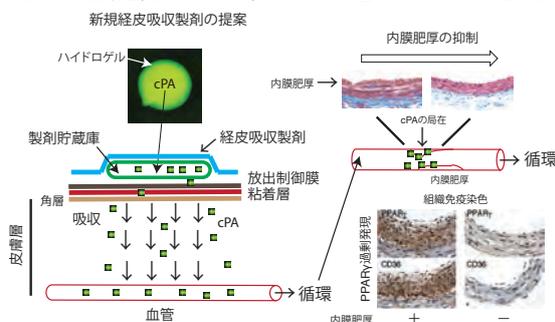
3. 研究の方法

申請者はcPAが新生内膜肥厚の抑制に関与する因子であることを明らかにしたが、これらの現象を制御する病態分子機構については未だ不明のままである。創薬を含めた臨床試験へ移行するためには、これらの分子機構の全解明が必須である。そこで、マウス頸動脈内腔に生理的濃度の18:1LPA(5  $\mu$ M/ 50  $\mu$ L in PBS)を60分暴露し誘発させた内膜肥厚に対する治療効果を検討した。内膜肥厚患部へ腹腔注射によりハイドロゲル-cPAを投与させる。治療開始3週間後に、マウスを麻酔させ、内膜肥厚患部から組織切片を作製し写真撮影後、各薬剤処理をした新鮮組織切片患部からRNAを抽出し(Total RNAで2  $\mu$ g以上)、遺伝子発現解析を行った。LPAで誘発させた内膜肥厚組織を対照サンプルとしたときに、cPAで内膜肥厚組織を供処理した試験区において、遺伝子の発現が抑制されたもので、増殖や炎症に関与する遺伝子を注意深く探索し同定した。

4. 研究成果

1年目のin vitro試験において、我々はヒト冠状動脈内皮細胞におけるLPA標的タンパク質をLPAアフィニティクロマトグラフィーで同定した。FABP3がLPAと結合し、核内移行することを明らかにした(発表論文4)。さらに、ヒト冠状動脈内皮細胞において、HDAC2の発現がcPAにより抑制され、炎症性サイトカイン類の活性化を抑制することを明らかにした

(発表論文 3)。糖尿病患者由来のヒト冠状動脈内皮細胞において cPA を介した核内受容体 PPAR $\gamma$  の活性化抑制が血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現低下と細胞増殖制御抑制に關与することを明らかにした(発表論文 2)。ApoE 欠損マウスへハイドロゲル-cPA を腹腔内投与させた際の、頸動脈患部における cPA 依存的に発現制御される動脈硬化関連遺伝子である CD36、PPAR $\gamma$ 、FABP4、VEGF については、いずれも cPA 投与により顕著な発現レベルの抑制が観察された。さらに、cPA を短期腹腔内投与繰り返したところ、cPA 投与群では有意にコレステロール値(T-CHO)及び LDL コレステロール値が低下した。一方で、HDL コレステロールについては有意に増加した。これらの成果から、cPA 放出をコントロールすることが可能になれば、投与後の分解・消失による効果軽減を抑制し、血中持続性を高め、患部への cPA 移行量を増やすアプローチが可能になると考えられた(下図参照)。これまで、様々な経皮吸収剤の研究開発が行われてきたが、動脈硬化症の予防または治療という観点からのアプローチは現在までに達成されていない。本研究計画が順調に進めば、新規な動脈硬化症の予防および治療法における革新的成果になることが期待され、臨床研究への橋渡しが一段と進む。これまでプラーク破綻の抑制が期待されるような薬剤の評価が進まなかった原因として、有効な疾患モデルの存在がなかったことがあげられる。本成果はこれまでの欠点を克服した新しい疾患モデルによる



新規な動脈硬化治療法を提案するものであり、臨床への貢献度も大きくなることを期待される。

##### 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 7 件)

1. Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu, Yoshikazu Matsuda, and Kimiko Murakami-Murofushi Short-term treatment with a 2-carba analog of cyclic phosphatidic acid induces lowering of plasma cholesterol levels *Biochemical and Biophysical*

Research Communications  
473:107-113 2016 (査読有)

2. Tamotsu Tsukahara, Ryoko Tsukahara, Hisao Haniu, Yoshikazu Matsuda, and Kimiko Murakami-Murofushi Cyclic Phosphatidic Acid inhibits the Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor from Diabetic Human Coronary Artery Endothelial Cells through Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Molecular and Cellular Endocrinology 412:320-329 2015 (査読有)
3. Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu and Yoshikazu Matsuda Cyclic phosphatidic acid inhibit alkyl-glycerophosphate induced down-regulation of Histone deacetylase 2 expression and suppress inflammatory activation in human coronary artery endothelial cells *International Journal of Medical Sciences* 11:955-961 2014 (査読有)
4. Ryoko Tsukahara, Hisao Haniu, Yoshikazu Matsuda and Tamotsu Tsukahara Heart-type fatty-acid-binding protein (FABP3) is a lysophosphatidic acid-binding protein in human coronary artery endothelial cells. *FEBS Open Bio* 4:947-951 2014 (査読有)
5. Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu, Yoshikazu Matsuda, and Kimiko Murakami-Murofushi Cyclic Phosphatidic Acid (cPA) an Endogenous Antagonist of PPAR $\gamma$  *Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity* 1:1005 2013 (査読有)
6. 松田佳和, 羽二生久夫, 塚原 完, 井上俊夫, 佐古兼一, 杉田和夫, 馬淵知子, 江水保, 佐藤和三郎 プタ肝臓分解物のヒト認知機能改善効果 *医学と薬学* 73 巻 8 号 2016 年 8 月号 (査読有)
7. 井上俊夫, 松田佳和, 佐藤卓美, 櫻田誓, 羽二生久夫, 塚原 完, 杉田和夫, 馬淵智子, 江水保, 佐藤和三郎 ラットの空間認知記憶に及ぼすコリン塩化物長期摂取の影響 *医学と薬学* 73 巻 8 号 2016 年 8 月号 (査読有)

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 塚原 完 核内受容体 PPAR $\gamma$  とリゾリン脂質性リガンド 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業脂質ワールドの臨床応用を目指す研究拠点会議 石川県内灘町(金沢医科大学) 平成 25 年 4 月 4 日
2. 塚原 完 環状ホスファチジン酸 (cPA)による核内受容体 PPAR $\gamma$  アンタゴニスト活性を介した頸動脈内膜肥厚形成の抑制効果 第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 名古屋市(名古屋市立大学大学院薬学研究科・宮田専治記念ホール大講堂) 平成 26 年 5 月 23 日
3. 塚原 完 リゾリン脂質を介した新生内膜形成と動脈硬化症 第 25 回神経行動薬理若手研究者の集いシンポジウム：健康寿命の延伸を受けた新たなアプローチ 埼玉県さいたま市ソニックシティビル公益財団法人埼玉県産業文化センター 平成 28 年 3 月 8 日
4. 松田佳和、羽二生久夫、塚原 完 ラットの空間認知記憶に及ぼすコリン塩化物反復投与の影響 第 25 回神経行動薬理若手研究者の集いシンポジウム：健康寿命の延伸を受けた新たなアプローチ 埼玉県さいたま市ソニックシティビル公益財団法人埼玉県産業文化センター 平成 28 年 3 月 8 日

〔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  
塚原 完 (TSUKAHARA, Tamotsu)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：00529943

(2) 研究分担者  
羽二生 久夫 (HANIU, Hisao)  
信州大学・先鋭領域融合研究群・バイオ  
メディカル研究所・准教授  
研究者番号：30252050

松田 佳和 (MATSUDA, Yoshikazu)  
日本薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：20377633

(3) 連携研究者

室伏 きみ子 (MUROFUSHI, Kimiko)  
お茶の水女子大学・学長  
研究者番号：00103557