

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860591

研究課題名(和文) アポA-I模倣ペプチドによる末梢動脈疾患の多面的治療戦略

研究課題名(英文) Development of new treatment strategy in peripheral artery disease using apoA-I mimetic peptide

研究代表者

今泉 聡 (Imaizumi, Satoshi)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：60609478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アポ蛋白A-I模倣ペプチドであるFAMP(=Fukuoka University ApoA-I Mimetic Peptide)の末梢動脈疾患への治療応用の可能性を検討するため、下肢虚血モデルマウスと血管内皮細胞を使用し、FAMPの虚血改善効果及びそのメカニズムについて検討した。その結果、FAMPは高脂肪食を負荷したマウスにおける下肢虚血からの回復を、PI3K/Aktを介したNO産生の経路により促進することが明らかとなった。本研究結果より、FAMPの投与は末梢動脈疾患における魅力的な治療戦略となり得ることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is unclear whether an apoA-I mimetic peptide can promote neovascularization in vivo. Here, we investigated the effect of FAMP on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation and angiogenesis in a murine hindlimb ischemia model. As a result, FAMP promoted recovery from hindlimb ischemia through a nitric oxide (NO)-related pathway by activation of a PI3K / Akt pathway. FAMP may become a new therapeutic agent for the future clinical treatment of peripheral artery disease (PAD).

研究分野：動脈硬化

キーワード：ApoA-I模倣ペプチド 下肢虚血 血管新生 NO HDL

1. 研究開始当初の背景

HDL (高比重リポ蛋白)にはコレステロール引抜き作用の他、抗炎症作用、抗酸化作用、血管弛緩作用といった多面的効果があることが分かっている。近年になり、動脈硬化性疾患を有する個々の患者における HDL の機能に差があり、HDL の量および質 (機能) の低下が動脈硬化進展の大きな要因であることが分かってきた。申請者達は HDL の機能を増強させる合成 HDL の開発を進める中で、様々な合成した合成 HDL が抗動脈硬化作用、内皮管腔形成作用、下肢虚血改善作用、心リモデリングや致死的不整脈の抑制作用を有することを報告してきた。その研究結果から、生体内で HDL の機能を増強させるアポ蛋白 A-I 模倣ペプチド FAMP (=Fukuoka University ApoA-I Mimetic Peptide) の開発を行い、成功した。FAMP には下記の作用が認められている。

強固な両親媒性 ヘリックス構造と ABCA1 を介したコレステロール引き抜き作用を有し、さらに、in vivo で pre- HDL の新生を増加させ、HDL の機能活性を増加させる。

apoE KO マウスの炎症を抑え、動脈硬化形成を抑制する。

放射線ラベルされた ^{68}Ga -DOTA-FAMP は、動脈硬化ウサギ (WHHL) における大動脈プラーク局所に留まって作用を発揮し、PET (positron emission tomography) を利用した動脈硬化イメージングに応用できる。

NO 産生と血管内皮機能の維持に重要な eNOS を活性化させる (未発表)。

血管内皮細胞の管腔形成を促進する。

一方で下肢の動脈が動脈硬化により閉塞する閉塞性動脈硬化症などの末梢動脈疾患 (PAD) は、日本に約 600 万人以上の患者がいると推測されており、下肢切断を余儀なくされる重症患者も見られる。このような重症例に対して、血管内皮前駆細胞 (EPC) が骨髄に由来することに着目して自己骨髄単核球細胞移植や、VEGF プラスミド遺伝子による血管新生療法が試みられているが、その効果は限定的である。その理由の一つとして、動脈硬化性疾患患者では健常者に比して EPC 機能や血管内皮機能が低下していることが考えられている。

2. 研究の目的

申請者は、FAMP の多面的な作用が末梢動脈疾患 (PAD) の治療に応用できると着想した。本研究計画では、FAMP の PAD 治療薬としての有用性を検討し、臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) C57/BL6 マウスおよび高脂肪食を負荷し HDL 機能低下、内皮機能低下を有する C57/BL6 マウス (高脂肪食マウス) の下肢動脈の結紮、除去を行い、下肢虚血モ

デルマウスを作成した。予備実験として 5 週間 FAMP または PBS (Control 群) の腹腔内投与、または筋肉内への投与を行い、レーザー Doppler で下肢虚血の改善効果の検討を行った。その結果、腹腔内投与よりも筋肉内投与の方が虚血改善効果の大きいことを見出した。そのため、本実験では FAMP を筋肉内投与する方針とし、通常食または高脂肪食を負荷した C57/BL6 マウスに FAMP または PBS を 5 週間、虚血肢の筋肉内への投与を行い、レーザー Doppler で下肢虚血の回復の程度を測定した。また、治療後の筋肉組織の新生血管の評価を CD31 染色により行った。さらには、FAMP の虚血肢の機能に対する効果をみるために、Cat Walk システムを使用し歩行機能の測定を行った。

(2) FAMP 投与による全身への影響を見るために、FAMP 投与後の脂質プロファイルと HDL の機能 (コレステロール引き抜き能、抗酸化能) の検討を行い、FAMP 短期投与後の血中への血管内皮前駆細胞 (EPC) の動員をフローサイトメトリーで検討した。

(3) 現在までに末梢動脈疾患の患者では、活性酸素産生の原因となる NADPH oxidase が増加していることが報告されている。また、NADPH oxidase の増加は、内皮機能不全へ繋がる eNOS の uncoupling と関係している。一方で HDL は酸化ストレスを軽減し、内皮機能を改善することが分かっている。そこで、FAMP の活性酸素産生の経路に対する影響を調べるため、FAMP 投与群と非投与群で虚血肢中の NADPH oxidase 2 (NOX2) を測定した。

(4) in vitro の実験で、FAMP によるヒト血管内皮細胞に対する eNOS 活性化、細胞内伝達因子への影響を検討した。

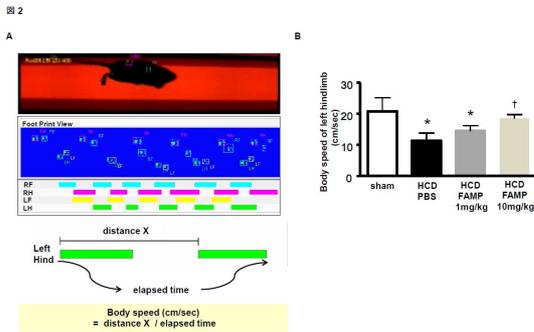
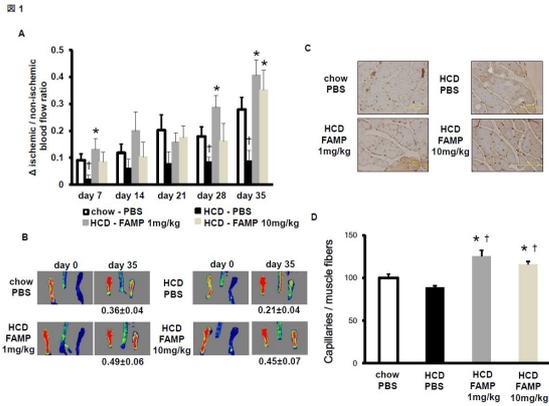
(5) FAMP の血管新生効果を検討するため、scratch injury model で血管内皮細胞遊走能への影響を検討した。

(6) eNOS ノックアウトマウスを使用し、in vivo で FAMP の下肢虚血改善効果を検討した。

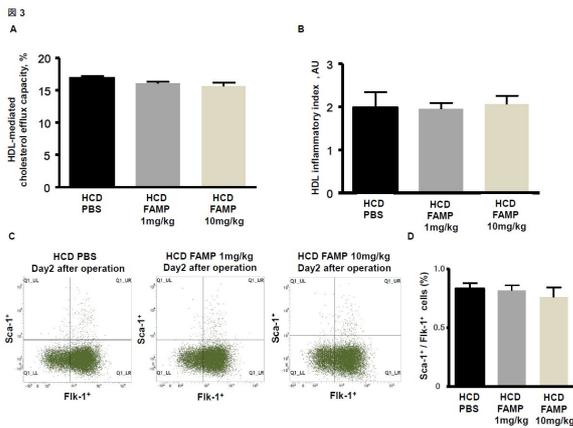
4. 研究成果

(1) 下肢虚血の改善は、高脂肪食を負荷し PBS で治療したマウスが最も悪かったが、FAMP の投与により、著明な虚血の改善を認め (図 1A,B) 治療後の筋肉組織の新生血管の評価を CD31 染色により行い、FAMP 群で新生血管が増加していることを確認した (図 1C,D)。また Cat Walk システムで歩行機能の測定を行い (図 2A) 虚血作成後 1 週間で FAMP 群が Control と比較して歩行能が有意に改善

していることを確認した (図 2B)。

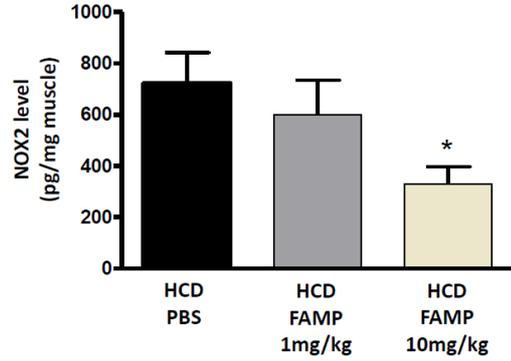


(2) FAMP の虚血肢への投与によっても、血中の HDL のコレステロール引き抜き能や抗酸化能への影響は認められず (図 3A,B)。また、血中の EPC の動員にも影響は認められなかった (図 3C,D)。



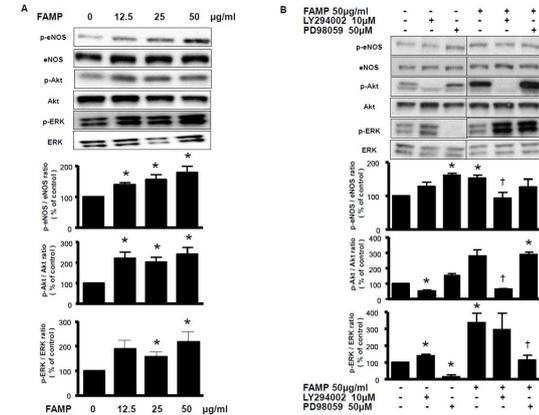
(3) FAMP 群で有意に NOX2 が減少していることが分かった (図 4)。これにより、FAMP が虚血肢での eNOS の活性に関与している可能性も考えられた。

図 4



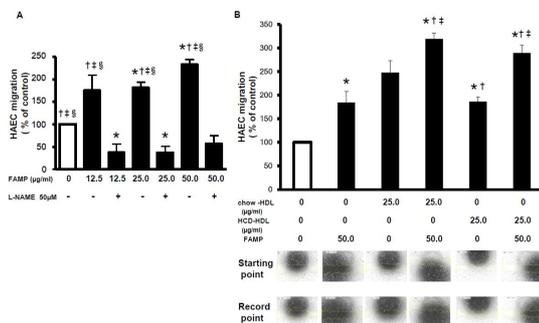
(4) *in vitro* の実験で、FAMP は血管内皮細胞における Akt、ERK、eNOS を活性化させることが分かった (図 5A)。PI3K/Akt の阻害薬である LY294002 は FAMP による eNOS の活性化を阻害したが、ERK 阻害薬である PD98059 では eNOS の活性化は阻害されず、FAMP の eNOS 活性化作用は PI3K/Akt の経路を介していると考えられた (図 5B)。

図 5



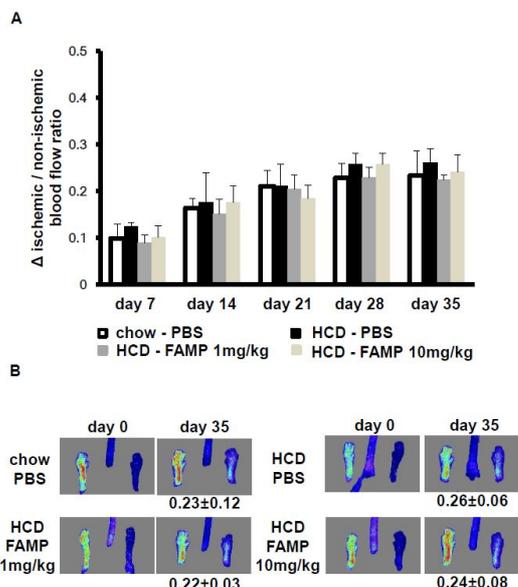
(5) FAMP 群は control と比べ有意に血管内皮細胞の遊走能が増強しており、NO 産生阻害薬である L-NAME は FAMP による内皮細胞の遊走促進作用を阻害した (図 6A)。さらに通常食群と高コレステロール食群のマウスの HDL を用いて、そこに FAMP を incubation したものを添加したところ、高コレステロール食群マウスの HDL による遊走能の改善を認めた (図 6B)。

図 6



(6) eNOS ノックアウトマウスを使った in vivo での検討では、FAMP の下肢虚血改善効果は認められなかった (図 7A,B)

図 7



以上の結果より、FAMP は高脂肪食マウスにおける下肢虚血からの回復を、PI3K/Akt を介した NO 産生の経路により促進することが明らかとなった。

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 7 件)

Takata K, Imaizumi S, Kawachi E, Yahiro E, Suematsu Y, Shimizu T, Abe S, Matsuo Y, Nakajima K, Yasuno T, Jimi S, Zhang B, Uehara Y, Miura SI, Saku K. The apo-a-i mimetic peptide famp promotes recovery from hindlimb ischemia through a nitric oxide (no)-related pathway. *Int J Cardiol.* 2016;207:317-325、査読あり
doi: 10.1016/j.ijcard.2016.01.012.

Suematsu Y, Miura SI, Takata K, Shimizu T, Kuwano T, Imaizumi S, Matsuo Y, 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.* 2015 Oct 9;202:810-816、査読あり
doi: 10.1016/j.ijcard.2015.10.013.

Yahiro E, Kawachi E, Miura S, Kuwano T, Imaizumi S, Iwata A, Hasegawa K, Yano T, Watanabe Y, Uehara Y, Saku K. Comparison of ⁶⁴Cu and ⁶⁸Ga for Molecular Imaging of Atherosclerosis using the Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide FAMP. *J Cardiovasc Dis Diag.* 2015;3:201、査読あり
doi:10.4172/2329-9517.1000201.

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、査読あり
doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.012.

[学会発表](計 4 件)

ApoA-I mimetic peptide FAMP induces neovascularization through activation of endothelial cell nitric oxide related pathway. Takata K, Imaizumi S, Kawachi E, Abe S, Matsuo Y, Yahiro E, Uehara Y, Zhang B, Miura S, Saku K. ESC congress 2014, Barcelona, 2014.8.30-9.3

FAMP (Fukuoka University Apo A-1 Mimetic peptide) Induces Neovascularization through Improvement of Endothelia/HDL function in Mouse Hind limb Ischemia. Takata K, Imaizumi S, Miura S, Kawachi E, Abe S, Matsuo Y, Yahiro E, Zhang B, Uehara Y, Saku K. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014.3.21-23, Tokyo.

FAMP, a Novel ApoA-I Mimetic Peptide Suppresses Myocardial Reperfusion Injury in Mice. Suematsu Y, Miura S, Takata K, Shimizu T, Imaizumi S, Yahiro E, Uehara Y, Saku K. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2014.3.21-23, Tokyo.

〔図書〕(計1件)

新規 HDL-C 増加薬(2) 合成 HDL と
ミメティックペプチド. 今泉聡、上原吉
就、Giulia Chiesa、朔啓二郎. 血管医
学 Vol.16. No.1. 2015-3. 45-51

6. 研究組織

(1)研究代表者

今泉 聡 (IMAIZUMI, Satoshi)

福岡大学医学部・医学系研究 生命医療倫
理部門・准教授

研究者番号 : 60609478