

ApoA-I 模倣ペプチド FAMP と超音波／ マイクロバブルを併用した新規動脈硬化治療

FAMP と超音波による動脈硬化治療（課題番号：167107）

研究期間：平成28年7月27日～平成31年3月31日

研究代表者：今泉 聡

研究員名：池 周而

研究成果

【背景・目的】

スタチンで LDL（低比重リポ蛋白）コレステロール値を低下させても、心血管病のリスクは30%程度しか減らず、HDL（高比重リポ蛋白）が重要だと考えられるようになってきた。HDL 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（機能）があることが分かっている。HDL のコレステロール引抜き能が高いほど冠動脈疾患が少なく、心血管イベントの発生が少ないとの報告がなされている。しかし、現在臨床応用されている薬で、HDL 機能を増強させるものは存在しない。申請者は HDL の機能を増強させる合成 HDL の開発を進める中で、様々な設計した合成 HDL が抗動脈硬化作用、内皮管腔形成作用、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。その研究成果をもとにアポ蛋白 A-I 模倣ペプチド FAMP の開発に携わり、FAMP に HDL 機能増強作用、コレステロール引抜き作用、動脈硬化抑制作用、下肢虚血改善作用、虚血再灌流障害抑制作用などがあることを報告している。一方で、現在までに他のアポ蛋白 A-I 模倣ペプチドで臨床応用されたものはない。その原因として、生体内で効果的に作用させるためには大量のペプチドを投与する必要があること、ペプチドの合成にはコストがかかるため、大量のペプチドを合成して多くの人に安定的に供給することは現実的でないことがあげられる。

近年、バブルと超音波照射の併用によって、細胞への薬物、遺伝子のデリバリーが可能なが報告されている。生体にほとんど影響を与えない超音波をバブルと併用すると、バブルの崩壊によって細胞膜表面に微細な穴があき、遺伝子や薬物を細胞内に導入することができ

る。このシステムは、体外からの超音波照射によって、目的組織にのみ低侵襲的な薬物・遺伝子デリバリーを可能とする新たなドラッグデリバリーシステムとして期待されている。

心筋梗塞などの心血管イベントは、冠動脈プラークが破綻し、血栓により血管が閉塞することにより引き起こされる。プラークの破綻は、特に薄い線維性皮膜と大量のコレステロールを有する不安定プラークで起こる。この不安定プラークを有する部位に集中して、コレステロール引き抜き作用を有するような薬剤を作用させることができれば、少量の薬剤で不安定プラークを安定化させることできる可能性がある。そこで、申請者はコレステロール引き抜き作用のある FAMP をバブル、超音波と併用することによって、狙った部位へ集中して作用させることを思い立った。本研究の目的は、FAMP をバブル、超音波と併用することによって、その抗動脈硬化作用を高めると同時に、超音波で狙った部位に集中して作用させることができる、まったく新しい動脈硬化治療法を開発することであり、その基礎的データを得ることである。申請当初はマイクロバブルでの実験を計画していたが、組織移行性なども考慮し、さらに小さなナノバブル（ウルトラファインバブル）での実験を行った。

【方法】

(1) コレステロール引き抜き能の測定

蛍光色素の一種である BODIPY でラベルしたコレステロールと J774マクロファージを使用し、コレステロールの引き抜き能を測定した。FAMP／ウルトラファインバブルと超音波のコレステロール引き抜き効果の測定では、J774マクロファージに BODIPY-コレステロールを1時間添付し取り込ませた後に洗浄し、一晩インキュベーションを行った。再度洗浄後に

図1 コレステロール引き抜き能の測定

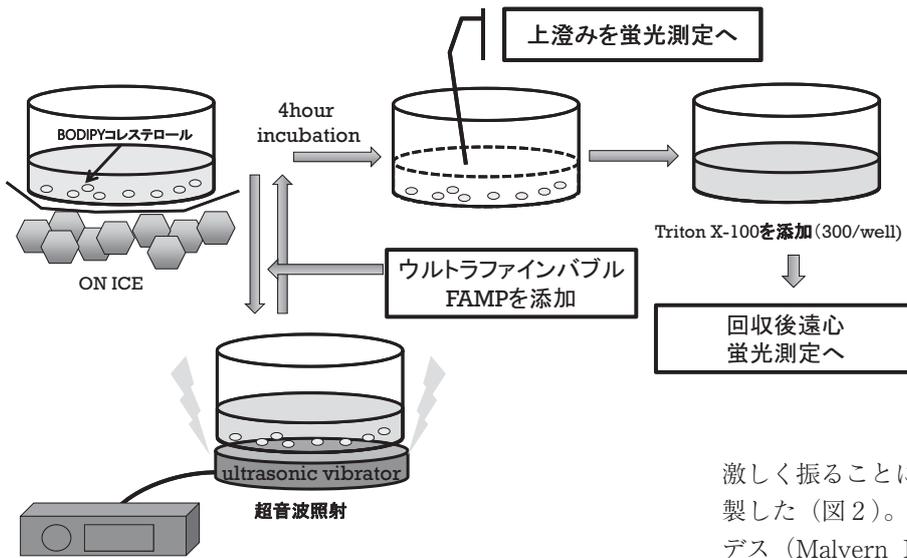


図2 ウルトラファインバブルの作成

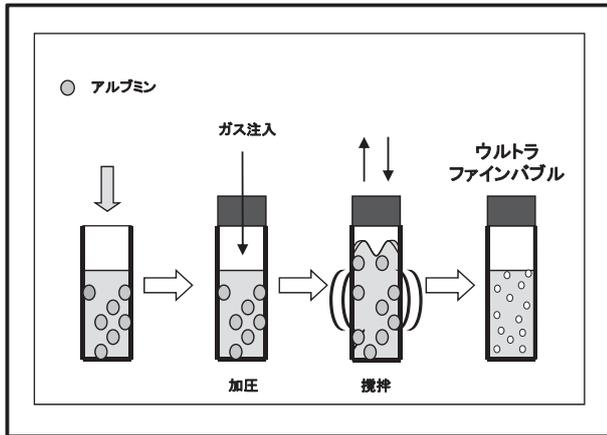
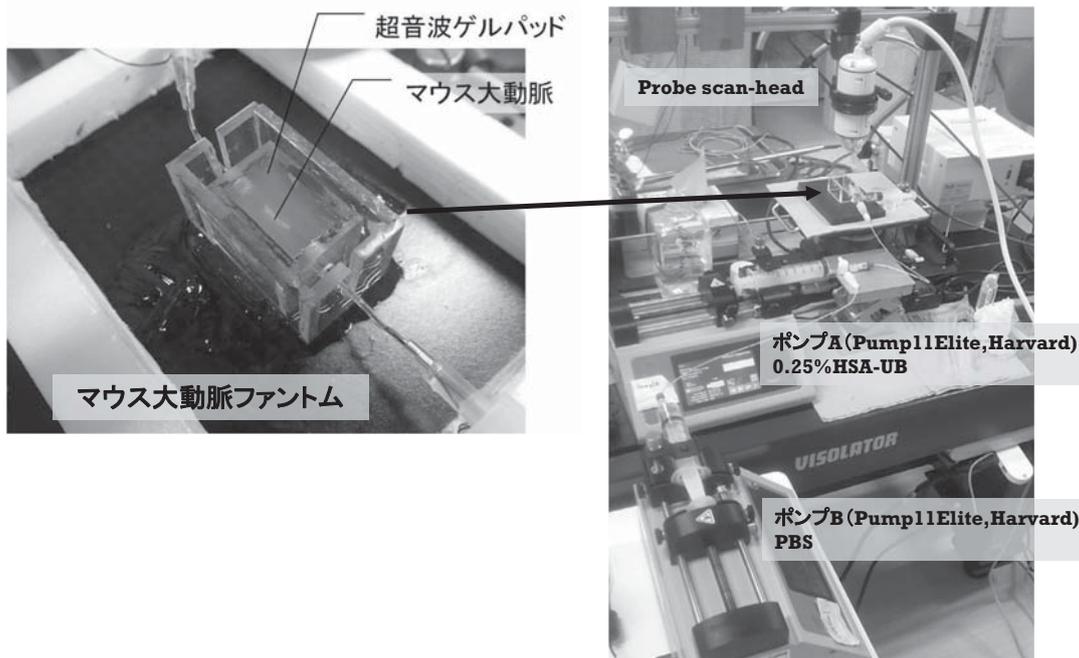


図3 マウス大動脈ファントム



FAMP/ウルトラファインバブルを加えて超音波照射を行い、4時間インキュベーション後に蛍光の測定を行った(図1)。

(2) ウルトラファインバブルの作成

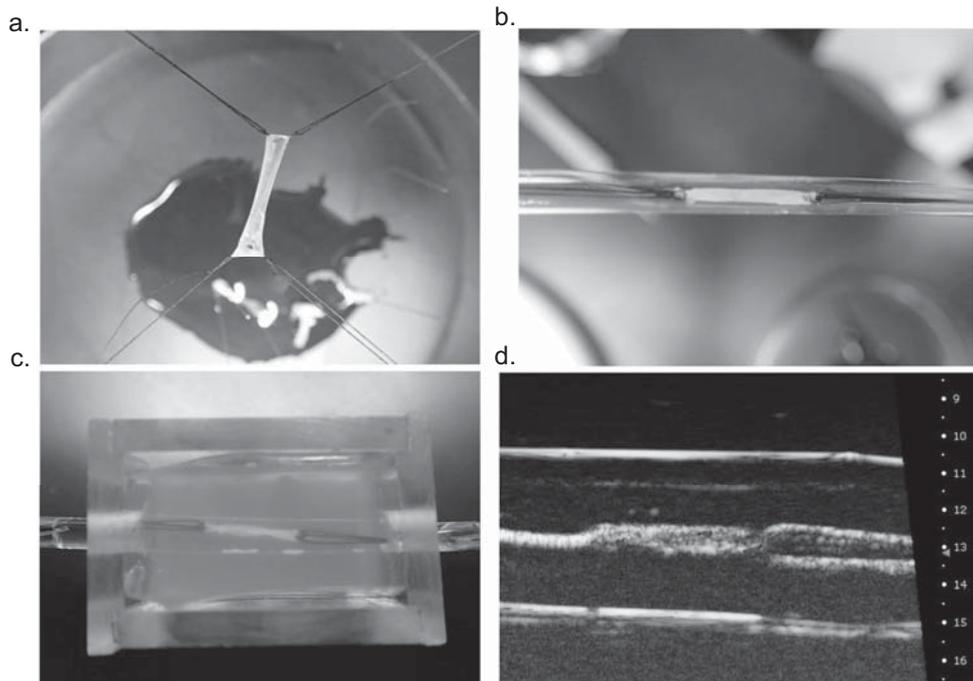
shellの材料(アルブミン)を軽量容器Vialに分注し、容器本体を高圧のパーフルオロカーボンガスで満たした。超高速振動装置を用いて6500回/分で“8”の字に数分間

激しく振ることにより、ウルトラファインバブルを作製した(図2)。粒子径計測システムであるアルキメデス(Malvern Instruments Ltd)を使用し、バブルのサイズを確認した。

(3) ApoE ノックアウトマウスと野生型マウスの大動脈に対する FAMP/ウルトラファインバブルの集積効果

最初にマウス大動脈ファントム(図3)の作製を行った。野生型マウスと、動脈硬化モデルマウスであるApoE ノックアウトマウスから摘出した大動脈を切開し、四隅に縫合糸を縫い付けた(図4a)。マウスの大動脈をPebaxチューブに通し(図4b)、超音波ゲルパッドの中に留置した(図4c)。大動脈を留置したチューブの中を、FAMP/ウルトラファインバブルを含む液で還流し、超音波でウルトラファインバブルの挙動を観察した(図3、図4d)。

図4 マウス大動脈ファントムの作製



【結果】

➤ **FAMP/ウルトラファインバブルと超音波の併用によるコレステロール引き抜き作用。**

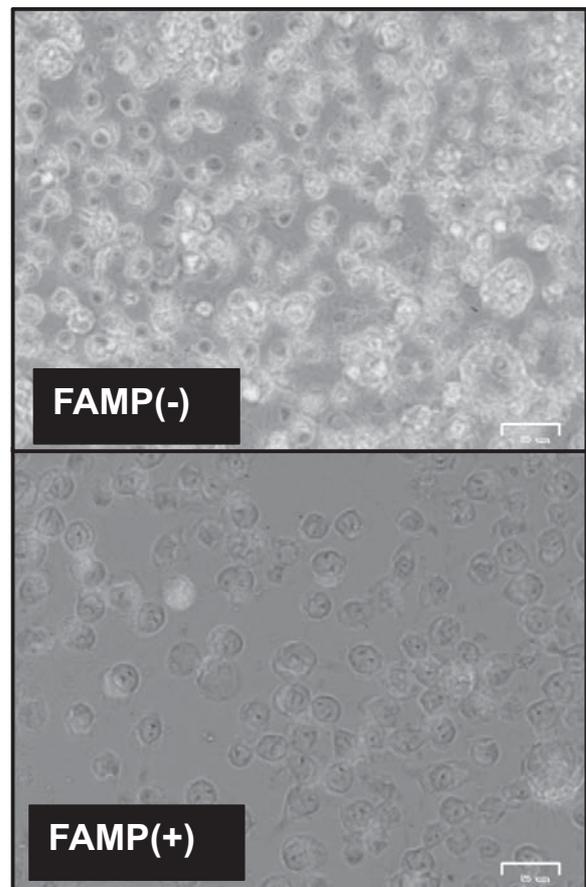
作製したウルトラファインバブルの平均粒子径は200～300nmであった。

最初に、蛍光色素のBODIPYでラベルしたコレステロールを使用することによって、FAMPのコレステロールの引き抜き作用や細胞内での動態を可視化し、定量することに成功した(図5)。次に、図1のin vitroの実験系を使用し、J774マクロファージにおけるFAMP/ウルトラファインバブルと超音波の併用によるコレステロール引き抜き効果について検討した。その結果(図6)、FAMP存在下でのコレステロール引き抜き量は(それぞれの条件とも、FAMPありの値-FAMPなしの値で計算)、ウルトラファインバブル併用、超音波の併用により増加し、ウルトラファインバブルと超音波の両方を併用したものが、最も大きかった(p<0.01)。

➤ **大動脈へのウルトラファインバブルの集積効果。**

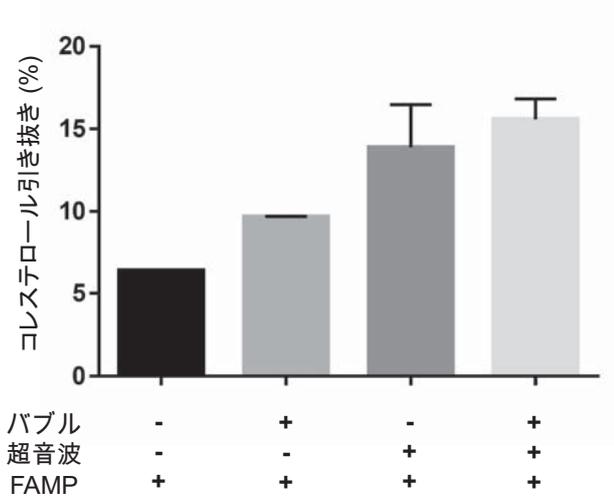
図3、4の実験系を使用し、血管を留置したチューブ内にFAMP/ウルトラファインバブルを灌流し、超音波を使用することにより、ウルトラファインバブルの可視化を試みた。ウルトラファインバブルは小さすぎるため、超音波で同定できないことも想定されたが、ウルトラファインバブルの還流開始とともに、急激な超音波シグナルの増強を認め、超音波により可視化することが可能であった(図7)。wash out phase

図5 FAMPのコレステロール引き抜き作用



培養マクロファージに蛍光色素でラベルしたコレステロールを取り込ませ、FAMPの効果を可視化

図6 FAMP/ウルトラファインバブルと超音波の併用によるコレステロール引き抜き作用



ではチューブ内腔のバブルのシグナルは急激に低下したが、縫合糸や血管壁のウルトラファインバブルの集積は、数分間の灌流の間は低下しないことが分かった(図7)。動脈硬化のない野生型のマウスでは、ウルトラファインバブルのみでは、血管壁に対するウルトラファインバブルの集積は縫合糸(surgical suture)よりも少なかった。また、この結果はFAMPとウルトラファインバブルを混合してもそれほど変わらず、動脈硬化病変のない血管壁にはウルトラファインバブルはそれほど集積しないと考えられた(図8)。一方で動脈硬化モデルマウス(ApoE ノックアウトマウス)の血管では、FAMPを加えなくとも、縫合糸よりも大動脈に対するウルトラファインバブルの集積が増加していた。このウルトラファインバブルの集積は、FAMPを加えることで劇的に増強した。FAMPの濃度を上げることにより、血管壁へのウルトラファインバブルの集積はさらに増加した(図8)。

図7 超音波でのウルトラファインバブルの検出

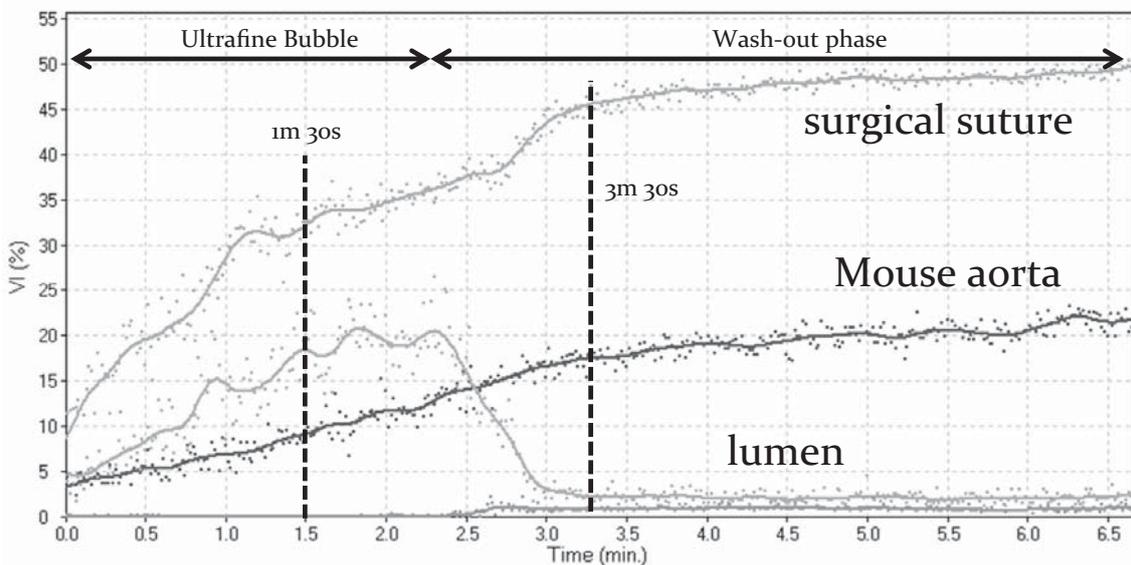
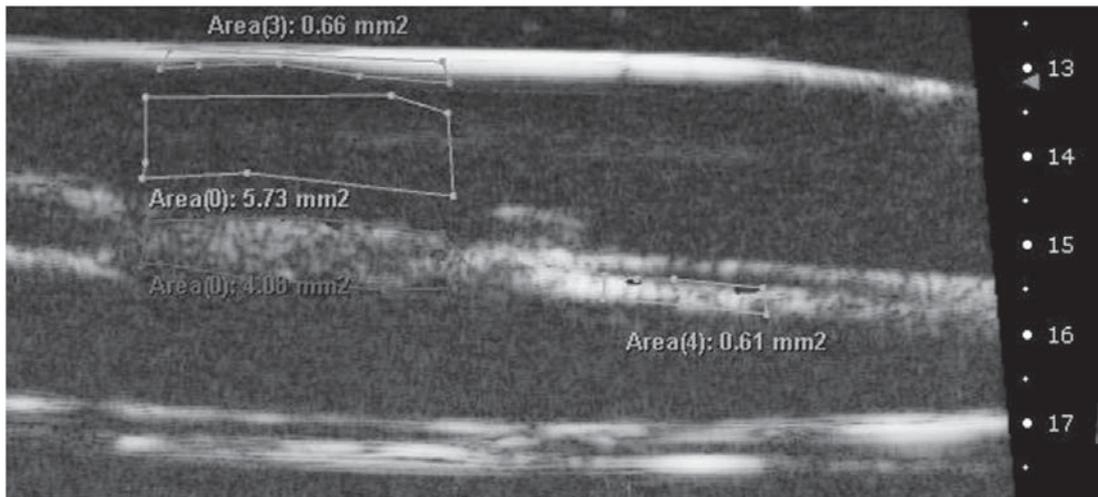
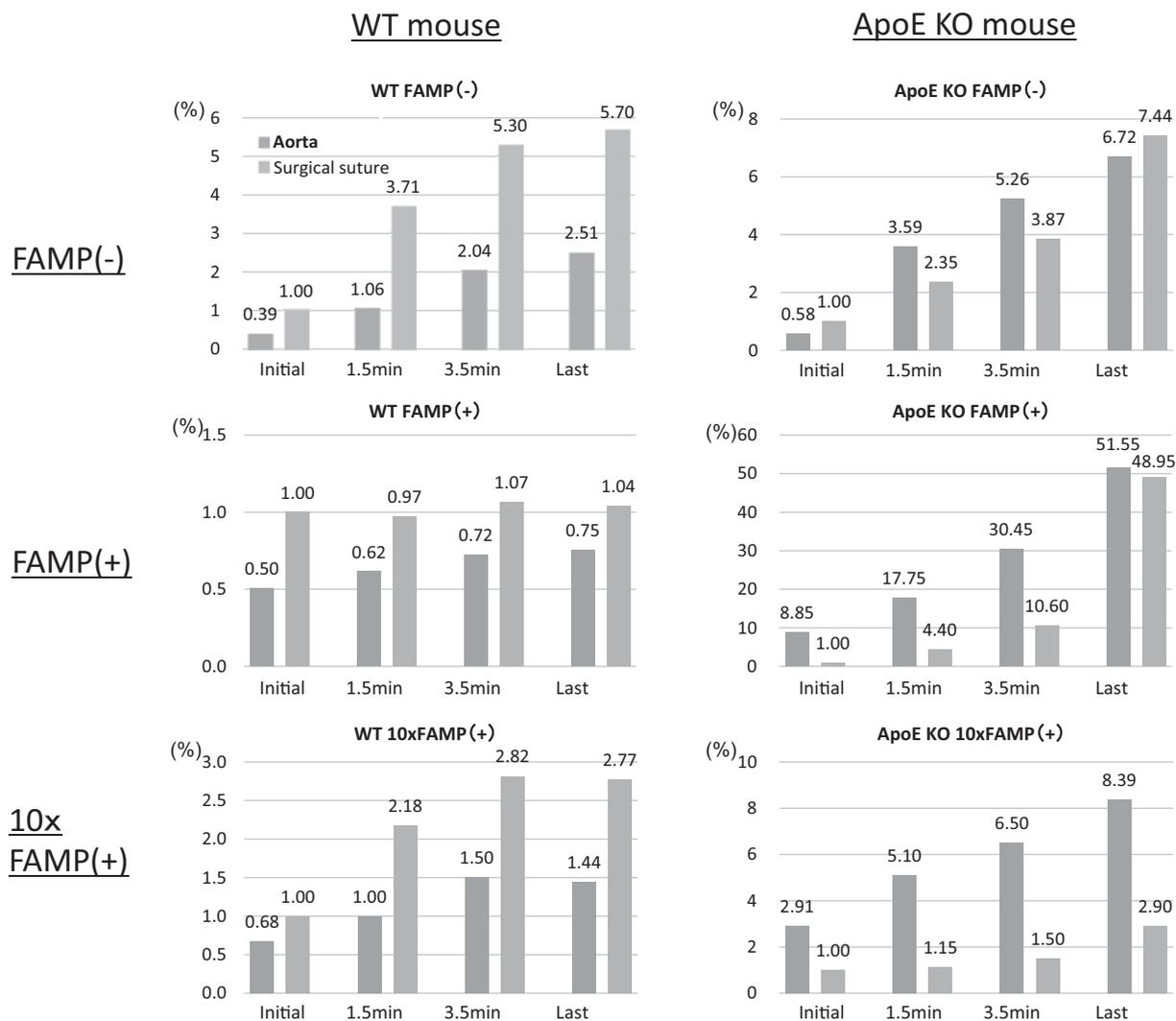


図8 大動脈へのウルトラファインバブルの集積効果



【考察】

本研究では、FAMPをウルトラファインバブル、超音波と併用することによるコレステロール引き抜きに対する効果を調べ、マウスの動脈硬化病変に対するFAMP/ウルトラファインバブル集積効果を超音波で検討した。コレステロール引き抜きに対する効果をみた実験では、超音波は超音波エネルギーを利用するための装置として使用されたが、動脈硬化病変に対する集積効果の検討では、超音波をウルトラファインバブルの検出装置として使用している。このような超音波の使用方法は両方も、実際に医学の領域で臨床応用されている。超音波エネルギーを利用した使用方法としては、血栓溶解用超音波カテーテルや前立腺癌などに対する強力集束超音波治療などがあり、画像診断装置としては、腹部超音波検査や心臓超音波検査などがある。超音波エネルギーの非温熱効果と薬物を併用する試みも盛んに行われている。本研究では、実際の臨床応用を考え、超音波でバブルを同定し、そのまま狙った部位へと超音波を当てることに

より超音波エネルギーを利用することを想定しているため、両方の使用方法で実験を行った。

コレステロール引き抜き実験では、FAMPにウルトラファインバブルと超音波の両方を併用したものが、最もコレステロール引き抜き量が大きかった。ウルトラファインバブルを加えるだけでもコレステロール引き抜き量は増加したが、もともとアルブミンにはコレステロール引き抜き作用があることは分かっている。ウルトラファインバブルを加えることによる引き抜き量の増加は、バブル自体に含まれるアルブミンのコレステロール引き抜き作用が関与している可能性が大きい。アルブミンは生体内で大量に存在しており、アルブミンの生体内でのコレステロール引き抜き作用が、動脈硬化の抑制に関与しているかは不明である。そのため、本研究で得られたウルトラファインバブルによるコレステロール引き抜き量の増加が、臨床的に意味があるかは分からない。一方で、超音波を加えることでも、FAMP添加による引き抜き量は増加した。申請者らはFAMPがABCA1トランスポーターを介したコレステロール引き抜きと動

脈硬化抑制作用を有することを報告している。コレステロール引き抜きには、ABCA1 トランスポーターを介した経路の他に、ABCG1 や SR-B1 など他のトランスポーターを介した経路、さらには、濃度勾配による拡散も報告されている。超音波照射により、トランスポーターを介した経路に何らかの影響を与えた可能性と、拡散に対する影響の可能性が考えられる。超音波エネルギーにより、薬物の一過性の細胞膜透過亢進がもたらされることが報告されており、このような効果がコレステロール引き抜き量の増加につながった可能性もある。マイクロバブルを添加することで、同様の現象がより低い超音波エネルギーで起こることも報告されており、ウルトラファインバブルと超音波の両方を併用したものが、最もコレステロール引き抜き量が大きかった要因かもしれない。その場合は、バブルの崩壊による細胞膜への修飾が影響している可能性がある。細胞への障害で細胞死が増えることも考えられるが、少なくとも、本実験で使用した超音波の設定では、明らかな細胞死の増加は認められなかった。

マウスの動脈硬化病変に対する FAMP/ウルトラファインバブル集積効果を検討した実験では、動脈硬化モデルマウスの血管でウルトラファインバブルの集積増加を認め、このウルトラファインバブルの集積は、FAMP を加えることで劇的に増強した。さらに、FAMP の濃度を上げることにより、血管壁へのウルトラファインバブルの集積はさらに増加した。

申請者は放射線ラベルされた⁶⁸Ga-DOTA-FAMP で動脈硬化の PET イメージングが可能であることを報告しており、FAMP が動脈硬化巣に作用することは分かっている。アルブミンは多くの薬物と結合する性質があり、FAMP とアルブミンで作製されたウルトラファインバブルを混合させると、FAMP とウルトラファインバブルが結合することが想定される。FAMP が動脈硬化巣に作用することを考えると、本研究で得られたウルトラファインバブルの大動脈壁への集積は、ウルトラファインバブルと結合した FAMP が大動脈のプラーク部位へ集積することによりもたらされたと考えられた。動脈硬化のない野生型のマウスでは、縫合糸と比較して大動脈へのバブルの集積が少ない。FAMP を加えずにウルトラファインバブルだけでも、動脈硬化を有する ApoE ノックアウトマウスの血管ではバブルの集積が増加していたが、これは、血管表面が動脈硬化のために性状が滑らかではなく、そのためにバブルの集積が増加した可能性が考えられた。

これまでの研究から、FAMP が強いコレステロール引き抜き作用を有し、HDL の機能活性を高め動脈硬化を抑制する事が分かっている。しかし、臨床応用には比較的大量の FAMP を投与することが必要である。動脈硬化巣だけに FAMP を作用させることができれば理想

だが、今までは、動脈硬化特異的に薬剤を作用されることは難しかった。今回の研究結果より、動脈硬化部位にウルトラファインバブルと FAMP を集積させ、超音波を照射することで、FAMP を狙った部位に効率よく作用させることができる可能性があると考えられた。また、FAMP とウルトラファインバブル、超音波の併用により、コレステロール引き抜きが増加する可能性も考えられた。つまり、超音波照射の局在化で時間空間的に Drug Release を自由にコントロールし、効率的に動脈硬化巣に作用させ、同時にウルトラファインバブル、超音波の併用によって動脈硬化巣から一気にコレステロールを引き抜き、治療することができる可能性があると考えられた。さらには、FAMP を併用することにより、ウルトラファインバブルに含まれる薬剤を動脈硬化巣に集中させることができるかもしれない。つまり、動脈硬化巣における FAMP の集中的な作用だけではなく、ウルトラファインバブルに FAMP 以外の薬剤を含ませて、FAMP と併用することにより、動脈硬化巣へ薬剤を集中して作用させることにつながる可能性がある。動脈硬化巣にスタチンを作用させれば様々な効果を得られることが報告されているが、ウルトラファインバブルにスタチンを含めることにより特殊なウルトラファインバブルを作成し、FAMP と合わせて、動脈硬化部位に集中して作用することなどが考えられる。このように本研究課題を発展させることにより、超音波とウルトラファインバブルの特殊な効果に着目し、FAMP と併用した新しい動脈硬化治療法の確立を目指していく方針である。

謝辞

本研究の一部は、福岡大学推奨研究プロジェクトの研究経費により実施した。また、共同研究者の先生方には、研究遂行に関して多くのご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

研究業績

1. Imaizumi S, Miura S, Takata K, Takamiya Y, Kuwano T, Sugihara M, Ike A, Iwata A, Nishikawa H, Saku K. Association between cholesterol efflux capacity and coronary restenosis after successful stent implantation. *Heart Vessels*. 2016 Aug; 31(8): 1257-65.
2. Suematsu Y, Miura SI, Goto M, Matsuo Y, Arimura T, Kuwano T, Imaizumi S, Iwata A, Yahiro E, Saku K. Lcz 696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, improves cardiac function with the attenuation of fibrosis in heart failure with reduced ejection fraction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Heart Fail*. 2016 Apr; 18(4): 386-93.

3. 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 apoa-i mimetic peptide famp promotes recovery from hindlimb ischemia through a nitric oxide (no)-related pathway. *Int J Cardiol.* 2016; 207: 317-325
4. Takata K, Imaizumi S, Zhang B, Miura S, Saku K. Stabilization of high-risk plaques. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy.* 2016 Aug; 6(4): 304-21.
5. Hitaka Y, Ogawa M, Zhang B, Goto S, Nagata Y, Morii J, Imaizumi S, Yasuda T, Matsumoto N, Matsunaga A, Saku K. Circadian variations in laboratory measurements of coagulation assays after administration of rivaroxaban or warfarin in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *J Cardiol.* 2016 Dec; 68 (6): 529-535.
6. Norimatsu K, Kuwano T, Miura SI, Shimizu T, Shiga Y, Suematsu Y, Miyase Y, Adachi S, Nakamura A, Imaizumi S, Iwata A, Nishikawa H, Uehara Y, Saku K. Significance of the percentage of cholesterol efflux capacity and total cholesterol efflux capacity in patients with or without coronary artery disease. *Heart Vessels.* 2017 Jan; 32(1): 30-38.
7. Idemoto Y, Miura SI, Norimatsu K, Suematsu Y, Hitaka Y, Shiga Y, Morii J, Imaizumi S, Kuwano T, Iwata A, Zhang B, Ogawa M, Saku K. Evaluation of the antithrombotic abilities of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants using the Total Thrombusformation Analysis System[®]. *Heart Vessels.* 2016 Jun 21.
8. Nagata Y, Ogawa M, Goto S, Morii J, Imaizumi S, Yasuda T, Matsumoto N, Saku K. Frequent Premature Ventricular Complexes Originating from the Left Ventricular Summit Successfully Ablated from the Proximal Great Cardiac Vein Using an Impedance-based Electroanatomical Mapping System. *Intern Med.* 2016; 55(13): 1751-1753.
9. Goto M, Miura SI, Suematsu Y, Idemoto Y, Takata K, Imaizumi S, Uehara Y, Saku K. Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, induces the secondary prevention of cardiovascular events after myocardial ischemia reperfusion injury in mice. *Int J Cardiol.* 2016 Jun 28; 220: 602-607.
10. 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 Mar; 40(3): 271-276.
11. Hasegawa K, Kawachi E, Uehara Y, Yoshida T, Imaizumi S, Ogawa M, Miura SI, Saku K. Improved ⁶⁸Ga-labeling method using ethanol addition: Application to the α -helical peptide DOTA-FAMP. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2017 Jan; 60(1): 55-61.
12. Komaki T, Miura SI, Arimura T, Shiga Y, Morii J, Kuwano T, Imaizumi S, Kitajima K, Iwata A, Morito N, Yahiro E, Fujimi K, Matsunaga A, Saku K. The change in body weight during hospitalization predicts mortality in patients with acute decompensated heart failure. *J Clin Med Res.* 2017; 9: 200-206
13. Yuta Kato, Atsushi Iwata, Bo Zhang, Shin-ichiro Miura, Satoshi Imaizumi, Takashi Kuwano, Amane Ike, Makoto Sugihara, Hiroaki Nishikawa, Shin-ichiro Yasunaga, Keijiro Saku. Effects of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Sitagliptin on Coronary Atherosclerosis as Assessed by Intravascular Ultrasound in Type 2 Diabetes Mellitus with Coronary Artery Disease. *IJC Metabolic & Endocrine*, 2017; 16: 1-9
14. Shiiba M, Zhang B, Miura SI, Ike A, Nose D, Kuwano T, Imaizumi S, Sugihara M, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Shirai K, Yasunaga S, Saku K. Association between discordance of LDL-C and non-HDL-C and clinical outcomes in patients with stent implantation: from the FU-Registry. *Heart Vessels.* 2017 Aug 16.
15. Matsumoto N, Ogawa M, Morii J, Nagata Y, Imaizumi S, Matsunaga A, Saku K. Successful Catheter Ablation of Two Distinct Premature Ventricular Complexes Arising from Right Ventricular Outflow Tract Guided by EnSite NavX 3-D Mapping System with Multielectrode Basket Catheter. *福岡大学医学紀要.* 44(1) : 35-40
16. Kato Y, Iwata A, Futami M, Yamashita M, Imaizumi S, Kuwano T, Ike A, Sugihara M, Nishikawa H, Zhang B, Yasunaga S, Saku K and Miura SI. Impact of Von Willebrand Factor on Coronary Plaque Burden in Coronary Artery Disease Patients Treated with Statins. *Medicine.* 2018; 97: e0589.
17. Satoshi Imaizumi, Yuhei Shiga, Masahiro Ogawa, Hideto Sako, Yoshihisa Nagata, Akira Matsunaga, Tetsuro Shirota, Fumihiko Hoshino, Eiji Yahiro, Yuko Uehara, Natsumi Morito, Hiroyuki Tanigawa, Dai Shimono, Mikio Fukushima, Hidekazu Sugihara, Kenji Norimatsu, Takaaki Kusumoto, Keijiro Saku, Shin-ichiro Miura; ACADEMIE Study Investigators. Randomized trial of An increased dose of Calcium channel blocker or Angiotensin II type I receptor

- blocker as an add-on intensive DEpressor therapy in type 2 diabetes Mellitus patients with uncontrolled Essential hypertension: the ACADEMIE Study. *Heart Vessels*. 2019 Apr; 34(4): 698-710.
18. Eiji Shigemoto, Atsushi Iwata, Makito Futami, Yuta Kato, Motoki Yamashita, Satoshi Imaizumi, Takashi Kuwano, Amane Ike, Makoto Sugihara, Keijiro Saku, Shin-ichiro Miura. Influence of Chronic Kidney Disease on Coronary Plaque Components in Coronary Artery Disease Patients with both Diabetes Mellitus and Hypertension. *Heart Vessels*. 2019 Jan 3.
 19. Yamashita M, Iwata A, Kato Y, Futami M, Imaizumi S, Kuwano T, Ike A, Sugihara M, Nishikawa H, Zhang B, Yasunaga S, Saku K and Miura SI. Impact of the triglyceride level on coronary plaque components in female patients with coronary artery disease treated with statins. *Heart Vessels*. 2018; 33: 1175-1184.
 20. Kamizono Y, Shiga Y, Suematsu Y, Imaizumi S, Tsukahara H, Noda K, Kuwano T, Fujimi K, Saku K, Miura SI. Impact of cigarette smoking cessation on plasma α -klotho levels. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Aug; 97(35): e11947.
 21. Shiiba M, Zhang B, Miura SI, Ike A, Nose D, Kuwano T, Imaizumi S, Sugihara M, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Shirai K, Yasunaga S, Saku K. Association between discordance of LDL-C and non-HDL-C and clinical outcomes in patients with stent implantation: from the FU-Registry. *Heart Vessels*. 2018 Feb; 33(2): 102-112.
 22. Suematsu Y, Kawachi E, Idemoto Y, Matsuo Y, Kuwano T, Kitajima K, Imaizumi S, Kawamura A, Saku K, Uehara Y, Miura S. Anti-atherosclerotic Effects of an Improved Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide. *Int J Cardiol*. 2019. *Int J Cardiol*. 2019 Aug 22.

学会発表

1. 川内絵未、今泉聡、渡邊晶子、辻山理加、岡崎優子、西川宏明、上原吉就、三浦伸一郎、朔啓二郎、立花克郎；アポ A-I 模倣ペプチドのコレステロール引き抜き能に対する超音波／ナノバブルの効果、第 4 回超音波分子診断治療研究会
2. 川内絵未、今泉聡、渡邊晶子、辻山理加、岡崎優子、西川宏明、上原吉就、三浦伸一郎、朔啓二郎、立花克郎、超音波／ナノバブルによるアポ A-I 模倣ペプチドの高機能化、第 5 回超音波分子診断治療研究会