

## 学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 衛生化学研究室

職・氏名 教授・奥平 桂一郎

### 研究テーマ：

高密度リポタンパク質 HDL の機能評価と活性制御機構の解析

### 研究期間：

2021 年 4 月 1 日 ～ 2023 年 3 月 31 日

### 研究担当者：

#### <本学>

研究代表者 奥平 桂一郎（大阪医科薬科大学・薬学部・教授）

#### <共同研究機関>

研究代表者 異島 優（徳島大学・薬学部・准教授）

研究分担者 Michael L. Fitzgerald（マサチューセッツ総合病院・PI）

### 研究目的：

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は、血管壁へ蓄積したコレステロールなどがプラーク（粥腫）を形成して血管を狭窄または閉塞し、血流を阻害することによって発症する。HDL は各組織やプラークに蓄積した余剰の脂質を回収・除去し、さらに、患部の炎症を抑制する作用等を示すことから、治療への応用により心疾患系イベントの抑制率が劇的に改善することが予想されている。創薬の実現には HDL の生理活性発現メカニズムについて理解することが不可欠であるが、脂質タンパク質複合体微粒子としての HDL の構造や特性を踏まえた上で、分子レベルでの HDL の機能及び活性を評価した研究は、代謝研究などとは対照的に極めて少ない。本研究では、HDL の機能を制御すると考えられている HDL 結合因子 AIBP (ApoA-I binding protein) について研究を進めた。AIBP は HDL と結合して HDL の抗炎症作用を増強することが示唆されており、動脈硬化が進んだ状態を含めた血液中の炎症状態が亢進した場合に血液中に分泌されて、炎症を抑制する反応に関与することが予想された。そこで、AIBP による HDL 活性増強機能の評価、および、AIBP をマウスに投与することによる抗炎症作用の検証、抗動脈硬化作用の評価を行った。

### 研究内容および研究成果：

先に述べたように、AIBP は HDL と結合して抗動脈硬化的に作用することが示唆されている。そこで本研究では、AIBP の動脈硬化の治療に応用することを目的として、まず AIBP の大腸菌発現系を構築してリコンビナント AIBP タンパク質を取得した。また、マクロファージ細胞からのコレステロール搬出量を測定することで、リコンビナント AIBP タンパク質の機能を評価した。細胞から培地中に搬出されるコレステロール量は HDL を培地に加えることによって増加し、AIBP を HDL とともに加えるとさらに増加した。この結果は、作成したリコンビナント AIBP が細胞から脂質を搬出す

る HDL の機能を増強することを示している。次に、HDL の抗炎症効果に対するリコンビナント AIBP タンパク質の影響を調べた。ヒトマクロファージ細胞にリポ多糖 (LPS) を加えて炎症を惹起させ、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の mRNA レベルを定量 PCR によって調べた。培地中にリコンビナント AIBP タンパク質を添加すると、LPS によって増加した TNF- $\alpha$  mRNA 量は減少し、HDL と AIBP を同時に添加するとさらに減少した。また、ELISA によって細胞から分泌された培地中の IL-6 量を測定したところ、LPS によって増加した IL-6 分泌量は AIBP の添加によって抑制され、AIBP と HDL を併せて加えることによってさらに抑制された。これらの結果は、細胞レベルで惹起された炎症が AIBP によって抑制され、HDL を同時に加えることによって炎症抑制効果が増強することを示している。次に、*in vivo* での AIBP の炎症抑制効果を調べるために、LPS を腹腔内投与して炎症を惹起したマウスにリコンビナント AIBP タンパク質を静脈内投与して、血中の炎症性サイトカインの量を ELISA により測定した。AIBP の投与により、血液中の TNF- $\alpha$  や IL-6 の量は抑制される傾向が観察されたが、その効果は限定的であった。そこで、AIBP 投与マウスの血液を採取してウェスタンブロッティングによりタンパク質量を測定することで AIBP の血中滞留性を評価したところ、投与した AIBP の 8 割が約 4 時間で血中から消失することが分かった。AIBP が速やかに代謝されることが明らかとなったため、AIBP の C 末端にアルブミン結合ドメイン (ABD) を融合させた改変型リコンビナント AIBP を作成し、大腸菌発現系を構築して精製リコンビナントタンパク質を取得した。改変型リコンビナント AIBP タンパク質をマウスに投与して血中量を測定したところ、24 時間後に投与量の 7 割程度が残っていたことから、改変型 AIBP は血液中のアルブミンと結合することで血中に長時間残存し、野生型と比較して血中滞留性が大幅に改善していることが明らかとなった。この改変型 AIBP の炎症に対する効果について細胞を用いて調べると、野生型 AIBP とほぼ同等の抗炎症活性を有していることが分かった。しかし、マウスに改変型 AIBP を投与して炎症性サイトカイン量を測定したところ、LPS を投与することで増加する血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 量に対して、ほとんど効果を示さなかった。また、高脂食を付加した動脈硬化モデルマウスに改変型 AIBP を投与して、心臓切片を作成して脂質を染めることで動脈硬化のプラークサイズを測定したところ、プラークの減少は観察されなかった。これらの結果から、*in vivo* で AIBP が効果を示すためには血中での滞留性を上昇させるだけでは十分ではないことが示され、AIBP が HDL と結合して機能することが重要であることが示唆された。以上の結果のデータの一部について、主に下記の学会や論文により成果を報告した。

#### 成果発表：

##### <原著論文>

- Kinoshita R, Ishima Y, Chuang VTG, Watanabe H, Shimizu T, Ando H, Okuhira K, Otagiri M, Ishida T, Maruyama T. The Therapeutic Effect of Human Serum Albumin Dimer-Doxorubicin Complex against Human Pancreatic Tumors. *Pharmaceutics*, 13(8), 1209, 2021
- Sakuma S, Yabuuchi M, Yoshizumi A, Okajima Y, Fujimoto Y, Okuhira K. Comparative effects of luteolin and quercetin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Pharm Nutr Sci*, 11, 65-72, 2021
- Tachibana K, Kusumoto K, Ogawa M, Ando H, Shimizu T, Ishima Y, Ishida T, Okuhira K. FTY720 Reduces Lipid Accumulation by Upregulating ABCA1 through Liver X Receptor and Sphingosine Kinase 2 Signaling in Macrophages. *Int J Mol Sci*, 23(23), 14617, 2022

<学会発表>

- ・ 小川 真依、立花 洸季、石田 竜弘、奥平 桂一郎 多発性硬化症治療薬 FTY720 による ABC トランスポーターA1 発現に対する影響とそのメカニズム 日本薬剤学会第 36 年会 2021.5.13
- ・ 立花 洸季, 楠本 嵩志, 前橋 梨花, 樹山 友絵, 永尾 綾菜, 辻田 麻紀, 異島 優, 石田 竜弘, 奥平 桂一郎 ApoA-1 binding protein の加齢に伴う血清中濃度の変化およびその抗炎症作用 フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー 2022.8.31
- ・ 立花 洸季, 楠本 嵩志, 前橋 梨花, 樹山 友絵, 永尾 綾菜, 辻田 麻紀, 異島 優, 石田 竜弘, 奥平 桂一郎 抗炎症タンパク質 ApoA-1 binding protein の加齢に伴う血中濃度の変化 第 95 回日本生化学会大会 2022.11.9