

環状フォスファチジン酸の核内受容体アンタゴニスト活性を利用した 新生内膜形成の抑制と動脈硬化症の予防および治療法の開発

信州大学 医学部 統合生理学教室
塚原 完

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

虚血性心疾患の発生予防および治療は先進国における大変重要な国民保険的課題である。虚血性心疾患はステントを用いた血管拡張治療が有効な治療法であるが、慢性期に再狭窄をきたすことが報告されており問題になっている。再狭窄時に新生内膜の増殖が観察されることから、いかにして、新生内膜厚肥を抑えるかは大変重要な課題になっている。近年、リゾリン脂質がPPAR γ （ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体）のアゴニストとして働くことが明らかにされてきた。研究が進展するにつれて、これらアゴニストがPPAR γ の活性化を介して新生内膜肥厚の形成に関与する事が明らかになってきた。このような生体内での現象がひいては複雑な動脈硬化症を発症するメカニズム (Ross, R. N Engl J Med. 1999) の1つに関与することが予想されている。しかし、これらアゴニストの働きとは対照的に、提案者は最近、環状フォスファチジン酸 (cPA) と呼ばれるリゾリン脂質が、PPAR γ に対してアンタゴニスト活性を持つ事を発見し報告した。cPAはPPAR γ のリガンド結合部位に特異的に結合するとともにリプレッサー分子 (SMRT) と複合体を形成することでアンタゴニスト活性を示し、新生内膜肥厚形成を抑制する事を明らかにしている。本研究の目的はHydrogelと呼ばれるバイオゲルへcPAを吸収させたハイドロゲル-cPAを作製し、動脈硬化自然発症動物モデルを利用してその治療効果を確認することである。

2. 方法

新生内膜肥厚が発生する原因の1つとして、血中に存在するリゾリン脂質の1つであるリゾフォスファチジン酸 (LPA, 特に不飽和型20:4) によるPPAR γ の活性化が報告されている (JEM, 2004 Zhang et al.). LPAはPPAR γ を活性化し、脂肪酸輸送に関与するCD36とともに新生内膜部位に強く発現誘導されることが明らかになっており、新生内膜肥厚の形成とPPAR γ の局在は極めて密接に関連している (添付図参照)。そこでPPAR γ が高発現している新生内膜の血管表面にHydrogel-cPAを固定させ拡散・徐放させることにより、新生内膜の形成を抑制させることが可能かどうか、ひいては動脈硬化症の治療につながる布石になりえるのか、提案者は以下の研究計画2点を立案した。

1. cPA徐放性ハイドロゲルの作製

医療用ハイドロゲルへcPAを吸収させ、ハイドロゲル-cPAを作製する。ハイドロゲルに薬剤を吸収させる方法は比較的多数の報告がされているが、脂質のような難溶性の物質をハイドロゲルへ浸透吸収させる事が可能かどうかは不明である。さらにハイドロゲル-cPAが新生内膜へ効果的に浸透するかどうかは未確認である。そこではじめに提案者はcPAの蛍光ラベル体 (Bodipy-cPA) を調製し「ハイドロゲル-Bodipy-cPA複合体」の基礎的性質を調べた。

2. 小型動物を利用したCPA徐放性ハイドロゲルの新生内膜厚肥形成抑制の確認

本研究計画の提案者は以前からマウスおよびラットを利用した新生内膜厚肥形成の実験およびその評価に携わってきた。本提案は薬剤溶出ステント (DES) を使用する方法と比較して、外科的手術の期間が大幅に省略できる上、ハイドロゲルを血管上に固定する操作はマウスのような小動物においても十分に応用可能である。そこで、本計画では主に病態モデルマウス (ApoE, LDL受容体欠損マウスなどを検討中) を利用して実験効果の評価を行うが、その他の病態モデル動物としてラットおよびウサギ (WHHL) も有用な実験評価系として随時考慮する。

3. 結果 研究成果

蛍光ラベルフォスファチジルコリン (Bodipy-LPC) をフォスホリパーゼD (PLD) によるトランスフォスチジーレーション反応により合成し、蛍光ラベル環状フォスファチジン酸 (Bodipy-cPA) を作製した。作製した Bodipy-cPA は薄層クロマトグラフィにて複数回精製し、シリカカラムを利用した液体クロマトグラフ質量分析器 (LC-MS) により純度検定を行った。その後、ハイドロゲル (MedGel-PI5, WAKO) を環状フォスファチジン酸と混合し、バッファーのpHを変化させることにより、最も効果の高い Bodipy-cPAの浸透吸収条件を検討しハイドロゲル-cPAを作製した。次に、細胞内への環状フォスファチジン酸の浸透効果を調べるために、合成cPA (17:0) を利用する事で、ハイドロゲル-cPA17:0を調製した。ハイドロゲル-cPA17:0を細胞培地中に加え、時間依存的に生じるリゾフォスファチジン酸 (LPA) への分解をLC-MSにより検討したところ、環状フォスファチジン酸17:0を単独で使用した場合には、時間経時的に環状フォスファチジン酸がLPAへ時間依存的に分解して増加していく事が明らかになったが、ハイドロゲルへ浸透吸収された環状フォスファチジン酸、すなわち徐放化環状フォスファチジン酸17:0の場合は、安定的かつ長期的に環状フォスファチジン酸の徐放を観察された。

4. 考察 まとめ

徐放化環状フォスファチジン酸を利用する事により、生体内で安定した形で環状フォスファチジン酸の持つ生理活性が発揮できるようになることが期待できると考えられる。今後、新生内膜内への浸透効果を凍結切片から固定標本を作成して、時間経時ごとに蛍光顕微鏡で観察するとともに、新生内膜内に浸透したcPAの量をLC-MSを利用したcPA定量法(すでに確立済み)により確認した。また、cPAが生体内で酵素的分解を受け、生理活性を失う可能性が考えられるため、代謝安定体(カルバ体-cPA)を利用した基礎評価も今後行う予定であり、さらに徐放化環状フォスファチジン酸を病態動物モデルへ応用しその効果を検討していく予定である。これらの結果のうち、特に徐放化環状フォスファチジン酸の基礎的検討については論文として現在サブミット中(下記1および2)であり受理され次第別途お知らせ致します。

5. 発表論文、参考文献

1. Tamotsu Tsukahara* and Ryoko Tsukahara Gelatin-Based Hydrogels for stable and efficient delivery of bioactive lipids to cancer cells *submitted* (2012) *Corresponding author
2. Tamotsu Tsukahara Nuclear receptor co-repressor and endogenous PPAR γ antagonist, cyclic phosphatidic acid (Review) *PPAR research in preparation* 2012
3. Ryoko Tsukahara, Tamotsu Tsukahara, Gabor Tigyi (2012) Regulation of the Nuclear Hormone Receptor PPAR γ by Endogenous Lysophosphatidic Acids. Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry (edited by Jerold Chun) John Wiley book (ISBN: 978-0-470-56905-4)