

4. ABCA1 遺伝子を標的とした PI ポリアミドによる善玉コレステロール HDL の誘導

1) 背景

血中の高密度リポタンパク (HDL) の量と冠動脈疾患の発生率の間に負の相関があることは疫学的に知られている。粥状動脈硬化の形成において、コレステロールの過剰な取り込みにより泡沫化したマクロファージが血管壁に沈着することが、初期の重要なステップとなる。哺乳動物細胞はコレステロールの分解ができないことから、動脈硬化の予防や進行抑制には過剰に蓄積したコレステロールの除去が必要となるが、その際 HDL が重要な役割を果たす。HDL は脂質をほとんど含まない apoA-I として肝臓から分泌され、マクロファージからコレステロールを引き抜いて成熟した HDL となり、引き抜いたコレステロールを肝臓へ運び、胆汁への排泄を促す。これが HDL による冠動脈疾患抑制のメカニズムと考えられている。マクロファージから HDL へのコレステロールの受け渡しは、マクロファージ上に存在する ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) を介して行われる。ABCA1 を過剰発現させたマウスでは血中 HDL 濃度の上昇と動脈硬化の発症低下が観察されることから、ABCA1 の発現を増強させることが、動脈硬化の治療や予防につながると考えられた。そこで我々は、ABCA1 の発現を誘導する PI ポリアミドの開発に着手した。ABCA1 の発現は oxysterol-activated liver X receptor や peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α および PPAR γ 等の転写因子により正の制御を受けるが、一方で Activator Protein 2 α (AP2 α) により負の制御を受けている。そこで、ABCA1 のプロモーター領域の AP2 α 結合サイトをブロックするポリアミドを設計・合成し、その機能解析を行った。

2) 結果

マウス ABCA1 遺伝子プロモーター上の、転写開始点より -296 ~ -313 に位置する AP2 α 結合サイトを認識する PI ポリアミド (AP2 α ポリアミド) および AP2 α 結合サイトを認識しない PI ポリアミド (ミスマッチポリアミド) を合成し、HPLC による精製と質量分析機による解析を行った。ゲルシフトアッセイにより、AP2 α ポリアミドは標的 DNA への特異

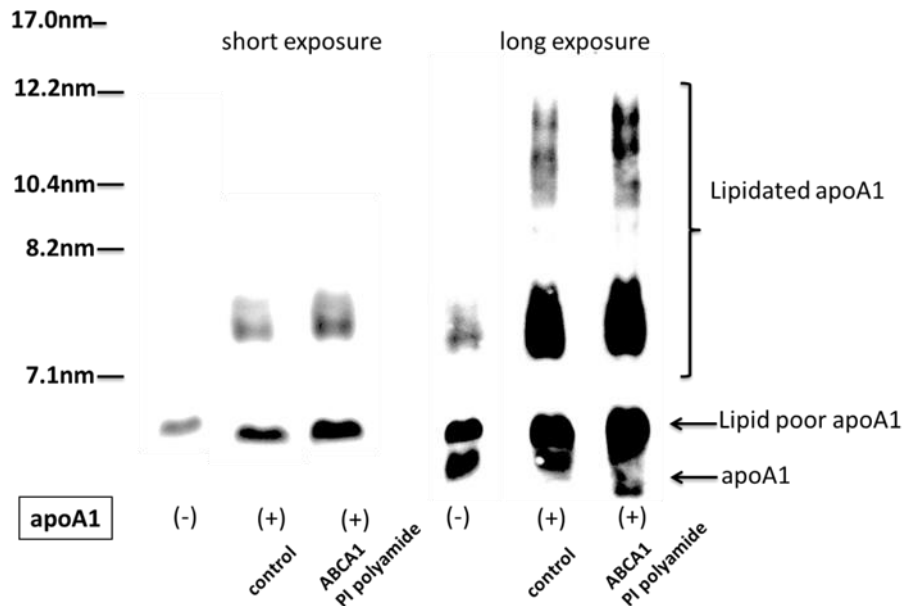


図 1 apoA1 による細胞内から培養液中への脂質の引き抜きにおける ABCA1 PI ポリアミドの効果 (native PAGE)

的結合能を持つが、ミスマッチポリアミドには結合能がないことを確認し、さらに AP2 α ポリアミドが培養系においてマウスのマクロファージ様細胞株 RAW264 の核内に取り込まれ、ABCA1 遺伝子プロモーターの AP2 α 結合サイトに結合することを ChIP アッセイにより確認した。

そこで、AP2 α ポリアミドポリアミドを細胞に投与したところ RAW264 においても肝細胞由来の細胞株 NCTC Clone 1469 においても、ABCA1 の発現レベルがコントロールと比較して有意に増加した。さらに、培養液中に apoA-I 蛋白を添加し NCTC Clone 1469 細胞を培養した実験では、AP2 α ポリアミド存在下で、HDL の新生が亢進することが確認できた(図 1)。ミスマッチポリアミドを用いた実験ではそのような現象は観察されなかった。

更に AP2 α ポリアミドをマウスに経尾静脈投与を行なったところ、血中単核球および肝組織における ABCA1 の発現誘導が観察され、血中の HDL 量がコントロールと比較して有意に上昇していた¹⁾。

3) 考察・今後の展望

以上の結果より、AP2 α ポリアミドが ABCA1 の発現を誘導すること、その結果としてマクロファージから apo-AI へのコレステロールの移動を活性化し、HDL の量を増加させることが *in vitro* と *in vivo* の両方において示された。このことは、AP2 α ポリアミドが動脈硬化の予防や進行抑制に有効な薬剤となる可能性を強く示唆するため、現在引き続き実用化に向けて開発を続けている。また、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン (APN) は、骨格筋や肝臓に発現している受容体を介して作用し、AMPK や PPAR α の活性化により糖代謝を促進する機能がある。そのため、低 APN 血症はインスリン抵抗性や脂質代謝異常症を引き起こすことが判っている。APN 遺伝子は AP2 β により負の発現制御を受けていることから、我々は AP2 β をブロックし APN の発現を誘導する AP2 β ポリアミドを合成し、この分子が培養細胞における APN の発現を誘導することを見出した。APN は ABCA1 や apoA-I の発現を誘導する機能もあるため、AP2 α ポリアミドと AP2 β ポリアミドの相乗効果による動脈硬化症の改善も期待できることから、引き続きこれらについても研究を続けていく。

引用文献

- 1) Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M: A novel gene regulator, pyrroleimidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. *Journal of Molecular Medicine* 92:509-521, 2014 * 8