

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01715

研究課題名(和文)生活習慣病におけるアポE含有HDLの役割

研究課題名(英文)The role of apoE-rich HDL in lifestyle diseases

研究代表者

臼井 真一 (USUI, SHINICHI)

岡山大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：50346417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血清アポE含有HDLの定量測定法を開発し、肥満モデルマウスでアポ含有HDLが増加することを示した。臨床検体の検討では、重回帰分析により、肥満に深く関わる中性脂肪やアディポネクチンがアポE含有HDL-コレステロールの有意な予測因子であることを明らかにした。しかし、脂肪細胞の培養実験では、アポE含有HDLが脂肪蓄積に関与するデータは得られなかった。一方、肝細胞の培養実験では高グルコース培地によりアポE含有HDLの生成が増加し、細胞内へのグルコース取り込みがアポE含有HDLの生成に深く関与していることが示唆され、糖代謝とアポE含有HDLの生成との関連において今後新たな展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a quantitative method for serum apoE-rich HDL and showed that apoE-rich HDL increased in obese model mice. In clinical study, multiple regression analysis revealed that triglycerides and adiponectin strongly involved in obesity are significant predictors of apoE-rich HDL-cholesterol levels. However, in the culture experiment of adipocytes, we did not obtain data on which apoE-rich HDL was involved in fat accumulation. In cultured hepatocytes, the production of apoE-rich HDL was increased by the high glucose medium, suggesting that glucose uptake by hepatocytes was significantly involved in the production of apoE-rich HDL. A new research progress is expected in the future in relation to glucose metabolism and the production of E-rich HDL in hepatocytes.

研究分野：臨床化学検査

キーワード：HDL アポリポ蛋白E 肥満 生活習慣病モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

現代の我が国において、心筋梗塞や脳血管疾患といった動脈硬化性疾患の予防と治療は国民的課題である。動脈硬化性疾患は、肥満や脂質異常症、糖尿病などの生活習慣病がその病態の基盤にあると考えられている。血中 HDL-コレステロールは健康診断等によく測定される検査項目であり、動脈硬化のリスク指標の1つとして利用されている。HDL-コレステロールの高値は動脈硬化の負の危険因子であり、善玉コレステロールとして知られているが、HDLには脂質や蛋白質組成が異なる様々な HDL 粒子が存在し、個々の HDL がもつ機能は十分に解明されていない。また、HDL は抗動脈硬化作用だけでなく、糖代謝にも良好な効果を有していることが近年明らかとなってきている。しかし、肥満や糖尿病などの生活習慣病との関連から、HDL 亜分画の機能に関して行った研究は世界的に見ても少なく、未解明な部分が多い。

我々はこれまで、HDL の中でもアポ E を蛋白質成分として含む HDL 粒子 (以下、アポ E-rich HDL) に着目してきた。アポ E は主に肝臓で合成され、細胞からのコレステロール引き抜きや抗酸化能を有する蛋白質であり、血中では HDL や VLDL にのって分布している。しかし、アポ E-rich HDL は健常人では全 HDL の 5~10% と少なく、特異的に測定する方法がなかったため、その役割や測定意義については十分に分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、肥満や糖尿病などの生活習慣病におけるアポ E-rich HDL の役割を明らかにし、生活習慣病の予防や治療法、診断マーカーの開発基盤となる研究を行うことを主目的とする。

3. 研究の方法

アポ E-rich HDL の測定・精製法

陽イオン交換カラム (HiTrap SPHP, GE ヘルスケア) を用いたアポ E-rich HDL-コレステロール測定法を検討した。血清と 13% ポリエチレングリコール (PEG) を 1:1 で混和後、遠心分離した HDL 分画をカラムに注入した。カラムは 40 mmol/l の Mg^{2+} を含む結合 buffer で平衡化した後、サンプルを注入し、HDL をカラムに吸着しない分画 (アポ E-poor HDL) と、1 mol/l 酢酸ナトリウムを含む溶出 buffer で溶出する分画 (アポ E-rich HDL) に分離した。アポ E-rich HDL-コレステロールはポストカラム酵素反応で得られるコレステロールパターンから定量した。細胞培養実験で用いるアポ E-rich HDL は、ポリエチレングリコールで分離した HDL 分画を比重 1.21 に調整後、超遠心法 (100,000rpm, 17 時間) により HDL 以外の血清蛋白質を除去した後、陽イオン交換カラムに注入して精製し

た。

精製アポ E-rich HDL の生化学的性状の確認

アポ蛋白質 (アポ A-I, アポ A-II, アポ E, アポ B) はサンドイッチ ELISA 法で定量した。総コレステロール及び遊離コレステロールは酵素法で測定し、その差をエステル型コレステロールとして算出した。トリグリセリド及びリン脂質は酵素法で測定した。リポ蛋白質粒子径はゲル濾過 HPLC (Superose 6HR, GE ヘルスケア) で測定した。精製した HDL の一部は、脱脂、還元・アルキル化、トリプシン消化 (In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit, Thermo Scientific) を行い、岡山大学医学部共同実験室に質量分析を依頼した。質量分析計は Agilent 1100LC/MSD Trap XCT Ultra, カラムは Zorbax 300SB-C18, データベース解析は Swiss Prot を用いた。

生活習慣病モデルマウスのリポ蛋白質分析

6~10 週齢の野生型マウス (C57BL/6), 肥満糖尿病モデルマウス (レプチン受容体欠損, db/db), レプチン欠損マウス (ob/ob), および脂肪負荷野生型マウス (DIO) のアポ E-rich HDL-コレステロールを測定して比較した。また、肝臓におけるアポ E-rich HDL の生成や取り込みに関与すると予測される遺伝子について、その発現量を比較した。

細胞培養実験

1) 抗肥満作用の検討

培養細胞は、マウス由来の前駆脂肪細胞 3T3-L1 (JCRB 細胞バンク) を使用した。既報に基づき分化誘導を開始し、3 日後に分化維持培地 (10% FBS, 1% ペニシリン・ストレプトマイシン, 10 μ g/mL インスリン, high glucose DMEM) にした (Day0)。Day2 に FBS とインスリンを含まない培養液に換えて、Day3~Day7 まで培養した。分化誘導前、分化誘導時または分化誘導後に、アポ E-rich HDL (25~100 μ g/mL) の添加を行い、細胞内の脂質蓄積量を Oil Red O 染色で評価した。

2) グルコース取り込み能についての検討

細胞へのグルコース取り込み能についても 3T3-L1 細胞を用いて検討した。既報に基づき分化誘導を行ったのち、蛍光グルコース類似体 (2-NBDG) を含む培地にアポ E-rich HDL を添加し、一定期間培養を行った。細胞へのグルコース取り込み量は蛍光マイクロプレート法で評価し、アポ E-rich HDL がグルコースの細胞内取り込みに関与するか否かを調べた。

3) 肝におけるアポ E-rich HDL の生成に及ぼすグルコース濃度の影響の検討

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞 (JCRB 細胞バンク) をグルコース濃度の異なる培地 (5.5~100mM) により 1~4 日間培養し、その培養上清のリポ蛋白質をゲル濾過 HPLC で分析した。また、肝臓におけるアポ E-rich HDL の生成に關与すると予測される遺伝子について、発現量を調べた。

アポ E-rich HDL の臨床的測定意義についての検討

冠動脈 CT を受診した 36 名を対象にアポ E-rich HDL 測定が肥満や糖尿病などの生活習慣病のリスク評価や診断に有用な新しい臨床指標になり得るかを検討した。

4. 研究成果

精製アポ E-rich HDL の生化学的性状

陽イオン交換カラムに吸着しなかった unbound HDL は、HDL の主なアポリポ蛋白成分であるアポ A-I を含有しアポ E を含まなかったが (アポ E-poor HDL), bound HDL はアポ A-I, アポ E 共に含有している (アポ E-rich HDL) ことが SDS-PAGE (CBB 染色) で確認された。アポ E-rich HDL はアポ A-I とアポ E に対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法でも検出できたことから、同一粒子内にアポ A-I とアポ E を含んでいることが確認できた。また、アポ E-rich HDL とアポ E-poor HDL は、粒子径がそれぞれ 14.2 と 11.2 nm, アポ E/アポ A-I 比が 1.09 ± 0.315 と 0.010 ± 0.011 であった。アポ E-rich HDL の脂質組成はアポ E-poor HDL に比べ、遊離コレステロールとトリグリセリドが多い傾向があった。

質量分析計による分析では、HDL の主要構成蛋白であるアポ A-I, アポ A-II はいずれの HDL にも含まれていたが、Clusterin とアポ L がアポ E-rich HDL のみに含まれることが明らかになった。また、HDL 代謝に深く關与する肝性リパーゼ (HTGL) がアポ E-rich HDL に多く含まれている可能性があることを ELISA 法で確認した。これらの結果は今後、アポ E-rich HDL の新たな機能を解析する上で有益な情報であると思われる。

生活習慣病モデルマウスのリポ蛋白分析

一匹のマウスから採取できる血清量は少ないため、個々のマウスの HDL を分析する方法はこれまで限られていた。しかし、本研究で開発した陽イオン交換カラム法により、個々のマウスのアポ E-rich HDL-コレステロールの定量が可能となった (図 1)。db/db マウス (10 週齢) は野生型マウスに比べ総 HDL-

コレステロールは高値であったが (98.7 ± 11.1 vs. 63.9 ± 7.9 mg/dL, $P < 0.001$)、予想に反してアポ E-rich HDL-コレステロールには有意差が認められなかった (10.1 ± 2.2 vs. 8.0 ± 1.5 mg/dL, $P = 0.08$)。一方、ob/ob マウス (10 週齢) は野生型マウスや db/db マウス、DIO マウスよりもアポ E-rich HDL-コレステロールが有意に高値であった (図 2)。db/db と ob/ob マウス間では体重に有意差がなく、血清グルコース濃度や肝臓重量が ob/ob マウスで増加傾向があった。ob/ob マウスの肝臓では野生型マウスに比べ、肝臓 X 受容体 (LXR) や HDL 受容体 (SR-BI), HTGL の mRNA 発現が減少していたことから、肝臓での HDL 代謝がアポ E-rich HDL の血清濃度へ關与していることが示唆された。特に、SR-BI と HTGL の発現低下は大型 HDL の代謝遅延を引き起こし、これが血中アポ E-rich HDL の増加の原因になった可能性が考えられる。しかし、db/db マウスと ob/ob マウス間では肝臓における mRNA 発現に差が見られなかったことから、ob/ob マウスで顕著にアポ E-rich HDL が増加した要因が他にあると考えられ、今後のさらなる検討が必要である。

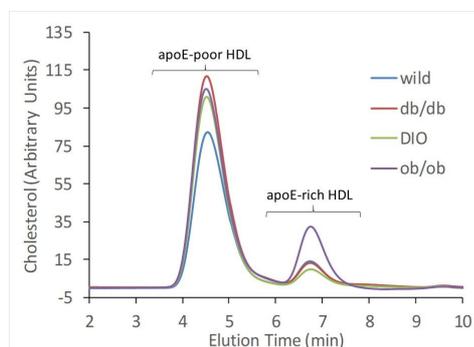


図1. 陽イオン交換カラム法によるアポ E-rich HDL 測定. マウス血清 (10 週齢) から PEG 法で分離した HDL をカラムに注入し、コレステロール検出した。

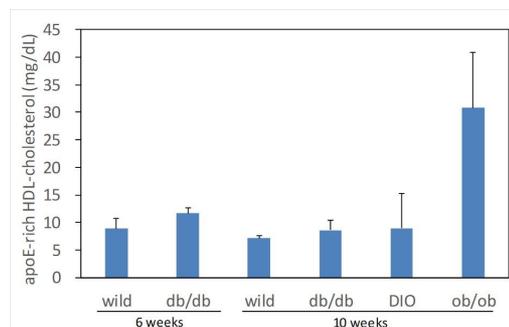


図2. アポ E-rich HDL-コレステロールの比較

3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に与えるアポ E-rich HDL の影響

健常ヒト血清から分離精製したアポ E-rich HDL とアポ E-poor HDL を異なる濃度 (25, 50, 100 µg/ml) とタイミング (分化誘導前, 分化誘導時, 分化誘導後) で培地に添加し, 脂肪蓄積量の評価を行った。その結果, 分化誘導前と分化誘導時では, アポ E-rich HDL とアポ E-poor HDL に差はみられなかった。分化誘導後の添加では, アポ E-poor HDL に比べてアポ E-rich HDL では脂肪蓄積を抑制する傾向が見られたが, その差は有意ではなかった (図3)。また, アディポネクチンや TNF- α などの mRNA 発現量も比較したが, アポ E-rich HDL とアポ E-poor HDL の間に明らかな差は認められなかった。

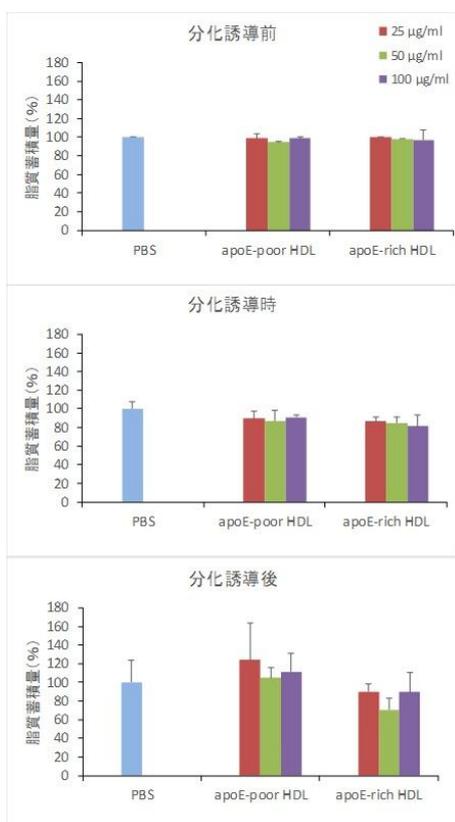


図3. 3T3-L1細胞の脂肪蓄積

3T3-L1 細胞のグルコース取り込みに与えるアポ E-rich HDL の影響

分化誘導後の 3T3-L1 細胞を健常ヒト血清から分離精製したアポ E-rich HDL またはアポ E-poor HDL で 1h 刺激した後, 2-NBDG の細胞内への取り込みを評価した。しかし, ポジティブコントロールとしてインスリン刺激を行った場合でも 2-NBDG の取り込みは促進されなかった。そこで, 2-デオキシグルコース (2-DG) を用いたグルコース細胞内取込量測定キット (コスモバイオ) に変更し, 再度検討を行った結果, インスリンによるグルコース取り込みの促進が確認できたが, アポ E-rich HDL およびアポ E-poor HDL によるグルコース取り込み促進作用は見られなかった (図4)。

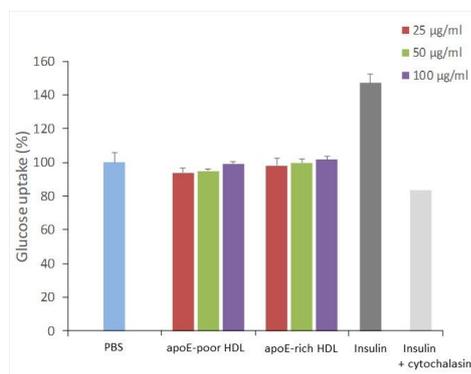


図4. 3T3-L1細胞のグルコース取り込み

肝におけるアポ E-rich HDL の生成に及ぼすグルコース濃度の影響

HepG2 細胞をグルコース濃度の異なる培地で培養し, その培養上清のリポ蛋白質を分析した。ゲルろ過 HPLC 法による分析では, 培養上清中の HDL-コレステロール濃度は, 培養4日目で濃度依存性に有意な増加を示した。ELISA による培養上清中のアポ E 濃度分析でも, 培養4日目で濃度依存性に有意な増加を示し, その分布はゲルろ過 HPLC 法のコレステロールパターンでの大型 HDL の位置に一致していた。このことから高グルコース培地 (25mM) で増加した HDL はアポ E-rich HDL であることが確認された。しかし, アポ E, アポ A-I の mRNA 発現量は, 25mM グルコース培地では通常培地に比べ減少した。一方, インスリンやグルコーストランスポーターを介した糖取り込みを阻害するサイトカリンを培地に添加すると, アポ E-rich HDL の生成が有意に抑制された。これらの結果は, 細胞内へのグルコース取り込みがアポ E-rich HDL の生成に深く関与していることを示唆しており, 糖代謝とアポ E-rich HDL の生成との関連において今後新たな展開が期待される。

アポ E-rich HDL の臨床的測定意義

アポ E-rich HDL-コレステロールは冠動脈カルシウムスコア, ヘモグロビン A1c, BMI などとは関連がなかったが, 様々な脂質指標と有意な相関を示した。重回帰分析では, 肥満に深く関わる中性脂肪 (Beta coefficient -0.395, P=0.03) とアディポネクチン (Beta coefficient 0.349, P=0.04) がアポ E-rich HDL-コレステロールの有意な予測因子であることが明らかになった。脂肪細胞は中性脂肪の貯蔵やアディポネクチンの分泌を行うことを考慮すると, 今回の結果は, 脂肪細胞での代謝がアポ E-rich HDL の血清レベルに影響を与えている可能性が示唆される。今後は, どのようなメカニズムでアポ E-rich HDL が脂肪細胞での代謝と関連しているのかを明らかにしていくことが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Ikeda T, Shinohata R, Murakami M, Hina K, Kamikawa S, Hirohata S, Kusachi S, Tamura A, Usui S. A rapid and precise method for measuring plasma apoE-rich HDL using polyethylene glycol and cation-exchange chromatography: a pilot study on the clinical significance of apoE-rich HDL measurements. Clin Chim Acta. 2017;465:112-118.

doi:10.1016/j.cca.2016.12.016. 査読有

Aoe M, Ueno-Iio T, Shibakura M, Shinohata R, Usui S, Arao Y, Ikeda S, Miyahara N, Tanimoto M, Kataoka M. Lavender Essential Oil and Its Main Constituents Inhibit the Expression of TNF- α -induced Cell Adhesion Molecules in Endothelial Cells. Acta Med Okayama. 2017;71(6):493-503.

doi:10.18926/AMO/55586. 査読有
Watanabe S, Kumazaki S, Kusunoki K, Inoue T, Maeda Y, Usui S, Shinohata R, Ohtsuki T, Hirohata S, Kusachi S, Kitamori K, Mori M, Yamori Y, Oka H. A High-Fat and High-Cholesterol Diet Induces Cardiac Fibrosis, Vascular Endothelial, and Left Ventricular Diastolic Dysfunction in SHRSP5/Dmcr Rats. J Atheroscler Thromb. 2018;25(5):439-453.

doi:10.5551/jat.40956. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Usui S, Shinohata R, Nakajima K, Miyashita K, Imamura S, Sato K, Okajima F, Kobayashi J, Shirakawa T, Shimomura Y, Machida T, Sumino H, Murakami M. Hepatic triglyceride lipase is mainly located on apoE-rich HDL in post-heparin plasma. 67th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, July 29, 2015, Atlanta (America).

Shinohata R, Ikeda T, Murakami M, Hina K, Kamikawa S, Hirohata S, Kusachi S, Nakajima K, Ikeda S, Usui S. LDL particle size associates with apoE-containing HDL in patients who undergo coronary computed tomographic angiography. 68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, August 3, 2016, Philadelphia (America).

Usui S, Shinohata R, Miyashita K, Hirohata S, Shibakura S, Fukamachi I, Nakajima K. ApoE-rich HDL in

pre-heparin plasma may be HDL remnants which remain in the circulation. 69th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, August 2, 2017, San Diego (America).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: アポE含有HDLの測定方法および測定装置

発明者: 臼井真一, 草地省蔵, 臼井綾子

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特許願 2015-158578 号

出願年月日: 平成 27 年 8 月 10 日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

臼井 真一 (USUI, Shinichi)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号: 50346417

(2)研究分担者

廣畑 聡 (HIROHATA, Satoshi)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 90332791

(3)連携研究者

篠畑 綾子 (SHINOHATA, Ryoko)

岡山大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号: 70335587