

令和元年6月26日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00860

研究課題名(和文) Y2受容体発現を指標とする脂質異常症改善栄養素・薬剤の探索

研究課題名(英文) Search for nutrients and drugs to improve dyslipidemia by monitoring Y2 receptor gene expression

研究代表者

加治 秀介 (KAJI, Hidesuke)

神戸女子大学・看護学部・教授

研究者番号：90224401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高糖脂食かつストレスはニューロペプチドY (NPY) を交感神経から放出し、Y2受容体(Y2R) を介してメタボリックシンドロームを引き起こすが、私共はY2R遺伝子転写を調節する領域の1塩基多型(SNP) が血中HDL-Cと関連し、Y2R遺伝子SNPによって肝臓、マクロファージで特異的に発現、NPY-Y2Rが脂質異常に関わる可能性を報告してきた。今回は抗動脈硬化作用の知られるいくつかの栄養素のうちアスタキサンチン、イソフラボンが肝細胞で、プロトカテキ酸がマクロファージでY2Rの遺伝子発現を調節することが明らかとなり、抗動脈硬化機序の一部にNPY-Y2Rの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の遺伝子多型に基づく精密医療は癌ゲノム医療で進んでいるが、動脈硬化の病態に基づく予防・治療においても今後の応用が期待される。本研究ではストレスと高糖脂食が重なって起こるメタボリック症候群へのNPY-Y2Rの関与がSNPタイプによって異なり、それに応じた栄養素や薬剤の選択を考えていく契機となる成果と考えている。今後の臨床応用には動脈硬化指標をアウトカムとするSNPタイプに応じた栄養素の有用性の検証が必要である。

研究成果の概要(英文)： Stress and high caloric diet caused metabolic syndrome by neuropeptide Y (NPY) through NPY receptor 2 (Y2R). We have previously reported the relation between serum HDL-cholesterol levels and single nucleotide polymorphism (SNP)s on the regulatory region of Y2R gene as well as its causal mechanism. Human hepatom cells HepG2 and human THP-1 derived macrophages had heterozygous gene promoter SNP type that is specifically transcribed in each cell. We examined the effect of anti-atherogenic nutrients and drugs on mRNA levels of Y2R and cholesterol efflux-related molecules, ABCA1 and ABCG1 in cultured HepG2 and macrophages by using real time PCR methods. Isoflavone and astaxanthin significantly decreased Y2R mRNA levels in HepG2. Protocatechuic acids significantly increased ABCG1 and Y2R mRNA levels in macrophages. These results suggest that isoflavone, astaxanthin and protocatechuic acids might prevent atherosclerosis in part through NPY-Y2R mechanism.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：ニューロペプチドY Y2受容体 栄養素 HepG2 マクロファージ mRNA ABCG1 SNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高糖脂食とストレスでニューロペプチド Y (NPY) が交感神経末端より放出されることが知られる。NPY 受容体の一つ、Y2 受容体 (Y2R) の遺伝子上流 1 塩基多型 (SNP) と血中 HDL-C 値が健常者で関連することを報告した。血中高密度リポ蛋白 コレステロール (HDL-C) 値が低くなる健常者にみられる SNPs では培養ヒト肝癌細胞 HepG2 に一過性に遺伝子プロモーターを組み込んだルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター-pGL3 を導入することで転写活性がみられたが脂肪細胞、マクロファージ、血管の各細胞株では見られなかった。さらに Y2R の特異的拮抗薬 BII E0246 による遺伝子発現への影響についてマイクロアレイ解析を行ったところ、Y2R が HepG2 細胞においてコレステロール合成パスウェイの促進や HDL 代謝パスウェイの抑制に関わる可能性が示唆された。

(2) 一方血中 HDL-C 値が高くなる健常者にみられる SNPs では培養ヒト単球腫瘍細胞株 THP-1 をホルボールエステルで分化させたマクロファージに一過性に遺伝子プロモーターを組み込んだルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター-pGL3 を導入することで転写活性がみられたが肝、血管、脂肪の各細胞株ではみられなかった。そこでマクロファージで BII E0246 による遺伝子発現への影響についてマイクロアレイ解析を行った結果、レプチン受容体の発現増加、レプチンシグナリング関連遺伝子群がパスウェイ解析や NLM ネットワーク解析で有意に含まれることが明らかとなった。マクロファージにおけるレプチン作用には acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT1) を介するコレステロール逆転送抑制作用が知られており、Y2R はマクロファージにおいてレプチンシグナル抑制を介してコレステロール逆転送を促進する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 背景で述べたことから、Y2R を肝細胞で発現する SNPs 保持者では Y2R を介する NPY 作用を抑制すると動脈硬化の進展に予防的となる可能性がある。そこで動脈硬化の予防に関連することが知られる栄養素の Y2R 遺伝子発現への影響を検討した。

(2) 背景で述べたことから、Y2R をマクロファージで発現する SNP 保持者では Y2R を介する NPY 作用を増強させると動脈硬化の進展に予防的となる可能性がある。そこでマクロファージからのコレステロール逆転送を促進することが報告されている栄養素ないし薬剤の逆転送関連遺伝子発現や Y2R 遺伝子発現への影響を検討した。

3. 研究の方法

ヒト肝癌細胞株 HepG2、ヒト単球腫瘍細胞株 THP-1 は国立研究開発法人 医療基盤・健康栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。なおこれらの細胞の Y2R 遺伝子転写調節領域の塩基配列を決定したところ各々の細胞に特異的に Y2R を発現させる SNPs がヘテロに存在した。これらの細胞を HepG2 は 10% 牛胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco 's Modified Eagle Medium で、THP-1 は 10% FCS を含む RPMI1640 培地で 37 °C、5% CO₂ 下で培養した。マクロファージは培養 THP-1 にホルボールエステルを添加して分化させた。各種栄養素や薬剤の添加群を vehicle のみの非添加対照と比較した。Real time PCR には Y2R, ATP-binding cassette A1 (ABCA1), ATP-binding cassette G1 (ABCG1) mRNA を増幅するプライマーを合成 (バイオロジカ)、細胞溶解には RealTime ready Cell Lysis kit, 逆転写には Transcriptor Universal cDNA Master, PCR には FastStart Essential DNA Green Master の各試薬キット (Roche Diagnostics, USA) を用い、LightCycler Nano (Roche Diagnostics, USA) を使用して real time PCR を実施した。アクチンを内部コントロールとした。各テスト試薬は和光純薬、東京化成工業より入手した。対照との差の統計学的検定にはノンパラメトリック法 (2 条件の差は Mann Whitney U、3 条件以上の差は Kruskal Wallis) を用い、P < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1)培養 HepG2 細胞において各々10 μMのポリフェノールのフェノール酸であるクロロゲン酸(CGA)、カロテン類のゼアキサンチンはY2R mRNA 発現を有意に促進し、フラボノイドのイソフラボン、キサントフィルのアスタキサンチンは有意に Y2R mRNA 発現を抑制した (表1)。

表1 Effect of varying nutrients on relative Y2R mRNA levels in cultured human hepatoma cells HepG2

| | Mean | SD | P-value vs. control |
|------------------|-------|-------|---------------------|
| control | 1 | 0.99 | |
| chlorogenic acid | 62.1 | 63.6 | 0.009 |
| zeaxanthin | 40.6 | 52.8 | 0.021 |
| isoflavone | 0.56 | 0.78 | 0.023 |
| astaxanthin | 0.018 | 0.035 | 0.002 |

Representative result was shown (mean ± SD, n=5) among 3 determinations. Statistical significance of difference (P < 0.05) was analyzed by Kruskal Wallis test.

これらの結果より、Y2Rが肝臓で発現するSNPタイプの場合はクロロゲン酸やゼアキサンチンはY2R発現を促進し、Y2Rを介するNPY作用の増強により、抗動脈硬化的とはならない可能性がある。一方イソフラボンやアスタキサンチンはY2Rを介するNPY作用を抑制し、ストレス・過食によるメタボリックシンドローム や動脈硬化に防御的となる可能性が示唆された。

(2)ポリフェノールのフラボノイドであるアントシアニンは吸収された後、プロトカテク酸 (PCA)に代謝される。PCAやCGAの抗動脈硬化作用の機序に血管内皮に移行したマクロファージから輸送体ABCA-1やABCG-1を介してコレステロールをHDLで肝臓に逆転送する作用があることが報告されている。THP-1由来マクロファージを培養し、10 μM CGA, PCAのABCA-1やABCG-1 mRNAへの影響をreal time PCRで検討した。その結果PCAはABCG1 mRNAを有意に増加させた。PCAはABCA1 mRNAを、CGAもABCA1, ABCG1 mRNAを増加させる傾向があったが有意ではなかった(図1)。

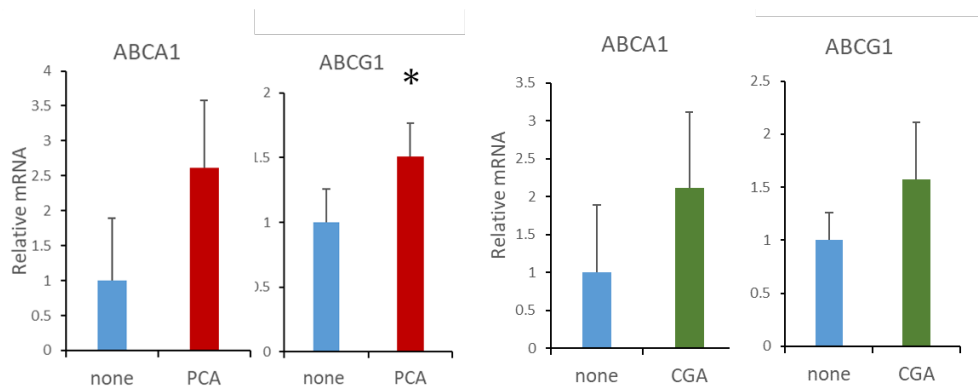


図1 Effect of protocatechuic acid (PCA) or chlorogenic acid (CGA) on ABCA1 or ABCG1 mRNA levels in cultured THP-1 derived macrophages. Each bar represents mean ± SD (n=5). Representative result among 3 determinations was shown. *: P < 0.05 vs. control (none): Difference of significance was statistically analyzed by Mann Whitney U test.

次に10 μ M CGA, PCAのY2R mRNAへの影響を検討した。その結果CGA, PCAともに有意にY2R mRNAを増加させ、PCAの効果はCGAより顕著であった(図 2)。

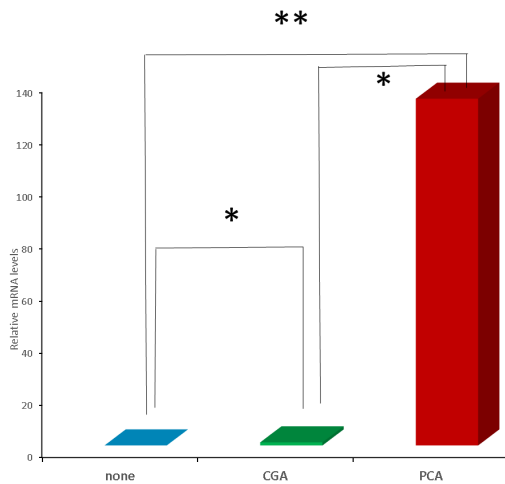


図 2 Effect of protocatechuic acid (PCA) or chlorogenic acid (CGA) on Y2R mRNA levels in cultured THP-1 derived macrophages. Each bar represents mean (n=5). Representative result was shown among 3 determinations. * P<0.05, **: P<0.01: Statistical significance of difference was analyzed by Kruskal Wallis test.

一方、Y2Rの特異的アゴニストであるpeptide YY(3-36) (PYY3-36)によるABCA1やABCG1 mRNAへの効果をreal time PCRで検討したが200nMまでのPYY3-36では有意な変化を認めず、既報のNPYとNPY+BIIE0246で比較したマイクロアレイの結果とも一致した。以上よりPCAの抗動脈硬化作用は主にABCG1発現増加によると考えられたが、一部には既報のY2Rを介するNPY作用の増強によるレプチンシグナル・パスウェイ抑制、即ちACAT1抑制解除の関与が示唆された。CGAについてはABCA1, ABCG1 mRNAへの増加傾向は認めしたが、有意ではなかった。しかしPCAに比べて軽度であるがY2R mRNAは有意に増加し、PCAと同様Y2Rを介するNPY作用の増強によるコレステロール逆転送促進の可能性が示唆された。

3) peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) アゴニストの1つであるチアゾリジン誘導体の抗動脈硬化作用機序は主にインスリン抵抗性改善作用と考えられるが、マクロファージからのコレステロール逆転送を促進する可能性について、同様に5 μ M pioglitazoneのABCA1, ABCG1 mRNAへの影響をreal time PCRで検討した。その結果いずれも有意に変化しなかった。PPAR アゴニストがABCA1の発現を増加させたとする報告と有意に変化させなかったとする報告があり、後者の結果に一致した。

<引用文献>

Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature Medicine* 13, 2007, 803-811

Tagiguchi E, Fukano C, Kimura Y, Tanaka M, Tanida K, Kaji H. Variation in the 5' -flanking region of the neuropeptide Y2 receptor gene and metabolic parameters. *Metabolism* 59,2010, 1591-1596

Okada M, Nagai M, Hamaue A, Mori M, Kaji H. Single nucleotide polymorphism- and cell type-dependent gene expression of neuropeptide Y2 receptor. *Integrated*

Molecular Medicine 2, 2015, 251-255

Kaji H, Okada M, Hamaue A, Mori M and Nagai M. Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the potent antagonist BIIIE0246 regulates gene expression levels in the lipid metabolic pathways in human hepatoma cell line HepG2 Integrated Molecular Medicine 3, 2016, 576-582

Kaji H, Okada M, Mori M, Hamaue A, Nagai M. Neuropeptide Y regulates leptin signaling pathway via receptor Y2 assessed by microarray in human macrophage. International Journal of Biochemistry Research and Review 15, 2016, 1-9.

Hongo S, Watanabe T, Arita S, Kanome T, Kageyama H, et al. Leptin modulates ACAT1 expression and cholesterol efflux from human macrophages. American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism 297, 2008, E474-E482

Kaji H, Mori M. Avidscience Advances in dyslipidemia vol.2 Chapter 1 Regulators of cholesterol efflux from macrophages to high-density lipoprotein. 2017, 2-33.

Ogata M, Tsujita M, Hossain MA, Akita N, Gonzalez FJ, Staels B et al. On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. Atherosclerosis 205, 2009, 413-419

Jiang M, Li X. Activation of PPAR does not contribute to macrophage ABCA1 expression and ABCA1-mediated cholesterol efflux to apoAI. Biochemical and Biophysical Research Communications. 22; 482(4), 2017, 849-856

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Kaji H, MiniReview: Metabolic parameters and polymorphisms of stress-related genes. Diabetes and Obesity International Journal, 査読有 Vol.1, 2016 , pp.1-3

<https://medwinpublishers.com/DOI/DOI16000109.php?id=3>

Takeda K, Yamamoto C, Kishimoto M, Kusu Y, Kaji H, Diabetic progression in obese subjects after drinking anti-obesity herbal tea. Annals of Clinical Case Reports, 査読有Vol.1, 2016, pp.1-4

<http://www.anncaserep.com/full-text/accr-v1-id1070.php>

Kaji H, Okada M, Mori M, Hamaue A, Nagai M, Neuropeptide Y regulates leptin signaling pathway via receptor Y2 assessed by microarray in human macrophages. International Journal of Biochemistry Research and Review, 査読有 Vol.15, 2016, pp.1-9

<http://journalijbcrr.com/index.php/IJBCRR/article/view/3415>

Kaji H, Neuropeptide Y regulates cholesterol metabolism through Y2 receptor in cell- and SNP-dependent manner. Journal of Medicine and Therapeutics, 査読有 Vol1, 2017, pp.1-2

DOI:10.15761/JMT.1000111

Nagai M, Kaji H, Thermal effect on human skeletal muscle-derived cell transcriptomes: Possibility of prevention against atherosclerosis. Journal of Advances in Medicine and Medical Research, 査読有 Vol.27, 2018, pp.1-12

DOI:10.9734/JAMMR/2018/42427

Nagai M, Kaji H, Evaluation method of fomentation in Japan. EC Emergency Medicine and Critical Care, 査読有 Vol.2, 2018, pp.80-91

〔学会発表〕(計1件)

Kaji H, Neuropeptide Y receptor Y2 SNPs as a predictor of plasma HDL-cholesterol levels. 3rd World Congress on Clinical Lipidology Brisbane, Australia, 2017

〔図書〕(計7件)

加治秀介 他、 南山堂、なるほどなっとく！内科学、2016,36

加治秀介 他、 南山堂、看護のための臨床病態学、2016, 40

加治秀介 他、医学書院、2017-2018 臨床検査データブック 2017,36

Kaji H et al. Avid Science, Advances in Dyslipidemia Vol.2: Regulators of cholesterol efflux from macrophages to high density lipoprotein 2017,33

加治秀介 他、 医学書院 臨床検査データブック コンパクト版 第8版 2017、18

加治秀介 他、医学書院、2019-2020 臨床検査データブック 2019,39

Nagai M, Kaji H et al. Book Publisher International, Current Trends in Medicine and Medical Research vol.2 Chapter 6. Possible thermal effect on prevention against atherosclerosis 2019, 10

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)