

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15330

研究課題名(和文) アポ蛋白Dの慢性炎症バイオマーカーとしての可能性探索と、その生理的機能の解明

研究課題名(英文) Verification of Apolipoprotein D as a Chronic Inflammatory Marker, and Analysis of its Physiological Function

研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20251233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：基礎研究：食事誘導肥満マウスの脂肪細胞においてはアポD発現量が増加するものの、3T3L1細胞を脂肪細胞へ分化させると発現が低下すること、アポDをマウスに強発現すると炎症サイトカインの低下とともにインスリン抵抗性が改善すること、LPSで誘発される炎症もアポDで抑制されることが明らかとなった。臨床研究：二つの集団データを別個に解析し、アポDはインスリン抵抗性関連マーカーやサイトカインと逆相関し、インスリン感受性関連臨床データやサイトカインと正に相関することが判明した。以上よりアポD値は体内の抗炎症状態・インスリン感受性と関連するとともに、アポD蛋白自体が抗炎症作用を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of apoD in adipose tissue increased in the DIO mice compared with the wild type mice; on the other hand, the apoD expression decreased with the differentiation of 3T3L1 cells. Over-expression of apoD in mice resulted in the amelioration of insulin resistance, which was accompanied by the suppression of inflammatory cytokines. The LPS induced inflammation, examined in vivo and in vitro, was also suppressed with the abundant apoD protein. Two clinical cross-sectional studies revealed that plasma apoD level correlated negatively with the inflammatory cytokine levels and clinical data associated with insulin resistance, and positively associated with anti-inflammatory cytokine levels and clinical data associated with insulin sensitivity. Thus, we can propose that increased plasma apoD level would be a marker of anti-inflammatory condition and insulin sensitive state, and apoD protein might possess the function of suppressing inflammation and insulin resistance.

研究分野：代謝

キーワード：アポ蛋白D 慢性炎症 糖尿病 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性炎症は膠原病やアレルギー疾患など以前から炎症の関与が指摘されていた疾患以外に、肥満、糖尿病、動脈硬化、がん、アルツハイマー病など様々な生活習慣病と関連することが主に基礎研究より確立されつつあり、これらの疾患を克服するためにその発症母地となる慢性炎症に関するバイオマーカーおよび治療標的を同定することが期待されている。そこで、申請者らのグループは、我が国における脂質、炎症関連新規蛋白質を同定することを目的に、健常人 3,041 人の 250 万 SNPs を対象として GWAS 解析を行った。その結果、新規脂質関連遺伝子を 16 個同定することができた [J Hum Genet. 2016 May; 61(5): 427-33.] が、新規 CRP 関連遺伝子も多数同定された。その中で、我々は、リポ蛋白代謝を専門とする研究グループであるためアポリポ蛋白 D (ApoD) に注目した。ApoD は、CRP と $p < 10^{-5}$ で関連する SNP が 5 つ、最低 p 値が $p = 3.7 \times 10^{-5}$ と CRP と強い関連が認められた。

この ApoD は、主に脂肪組織で発現しており、インスリン抵抗性を惹起する [Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Apr; 296(4): E802-11.] という報告がある一方、ApoD は抗酸化作用があり、抗腫瘍作用、抗アルツハイマー病作用があるという報告もあり [Cell Oncol. 2007; 29(3): 195-209]、特にその脂肪細胞における役割はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、これらの既報と、前述の GWAS 解析の結果と併せて、ApoD が炎症において重要な役割を果たしているという仮説を着想した。そこで、本研究では、ApoD の慢性炎症との関連性および関連疾患への医療応用の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、ApoD の慢性炎症における臨床応用を目指すために、臨床研究、基礎研究からの 2 つのアプローチを行った。すなわち、臨床研究では、ApoD のヒト検体における慢性炎症およびその結果惹起される動脈硬化症・糖尿病合併症に対するバイオマーカーとしての有用性の検討について、健診で得られた血清および 2 型糖尿病患者の血清を用いて検討し、基礎研究では、ApoD 含有 HDL の性質・構成脂質の解析、3T3L1 脂肪細胞およびマウスを用いた ApoD の慢性炎症およびインスリン抵抗性などにおける役割を検討した。そして、最終的には、の結果を現在すでに得ている GWAS の結果と統合して、ApoD の慢性炎症の病態生理における役割、その臨床医学への応用の可能性について明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1) 臨床研究

健診検体を用いた横断的検討

健診で収集した臨床検体 (225 検体: 糖尿病患者 46 名を含む) を用い、炎症性サイトカイン (TNF、IL-6)、アディポネクチン、PAI-1、ApoD を ELISA で測定し、またインスリン値も測定した。なお、ApoD ELISA キットの検証には、後述するヒト ApoD 発現アデノウイルスを感染させたマウスの血漿を用いて行い、ヒト ApoD を高い特異性を持って測定できることを確認した。

SPSS にて ApoD と様々な臨床指標や一般検査データおよび上記のマーカーとの関連を調べたところ、アポ D はアディポネクチン ($R=0.274$) および HDL-C ($R=0.414$) と正の相関、BMI ($R=-0.270$)、HOMA-IR ($R=-0.249$)、HbA1c ($R=-0.256$) と負の相関を示すことが示唆された。

2 型糖尿病患者を対象とした観察研究

本研究が当初予定していたテーマは、横断的に ApoD と様々な臨床指標や一般検査データ、合併症との関連を検討する物であったが、縦断的な観察も重要であろうと考慮し、「アポ蛋白 D と慢性炎症・糖尿病・糖尿病合併症・動脈硬化症との関連の検討」(UMIN R000030557) を立案し、初回登録時から 9 年後までの糖尿病合併症や動脈硬化症推移を検討する縦断的研究も加えた。

インスリン非投与の 35 歳以上 75 歳未満、HbA1c 9.0% 未満で重篤な疾患を合併していない 2 型糖尿病患者をリクルートし、本報告時点で 41 名が登録されている。41 名のデータを対象として本研究の当初のテーマである横断的解析を行ったところ、ApoD 濃度と糖尿病合併症との間には有意な相関を認めるものはなかったが、PAI-1 ($R=-0.489$, $p<0.01$)、アポ AI ($R=0.517$, $p<0.01$)、アポ A ($R=0.491$, $p<0.01$)、尿酸値 ($R=-0.435$, $p<0.05$) に関しては ApoD 値との相関が示唆された (図 1)。今後、縦断的検討で合併症進行などとの関連を検討する。

(2) 基礎研究

ApoD 発現に対する修飾要因の検討

マウスに高脂肪食、高脂肪高コレステロール食を負荷し、肝臓、脂肪組織の ApoD 発現量を検討したところ、脂肪組織でのみ ApoD 発現量が増加することが分かった (図 2)。一方、脂肪細胞のモデル細胞として 3T3L1 脂肪細胞を用い、その脂肪細胞への分化による ApoD の発現の変化を調べたところ、興味深いことに ApoD は脂肪細胞への分化に従って低下することが分かった。

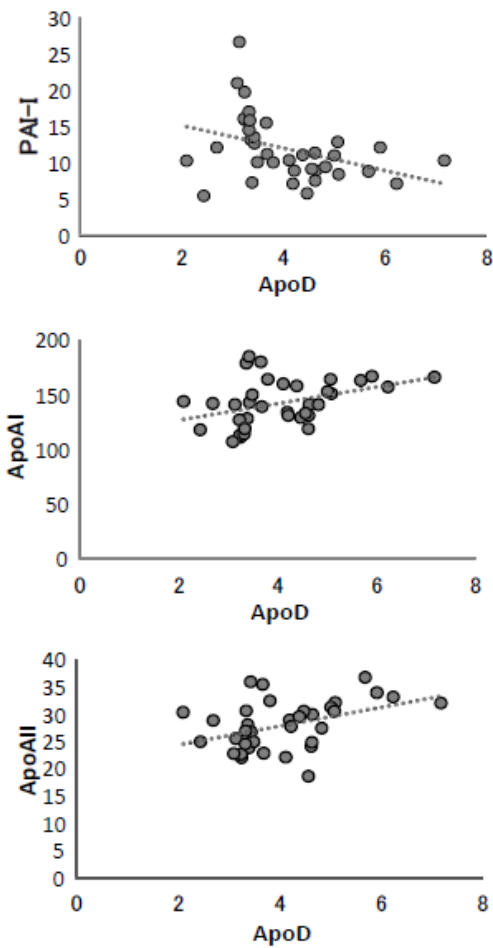


図 1 :2 型糖尿病患者における ApoD と PAI-I, ApoAI, ApoAII の相関

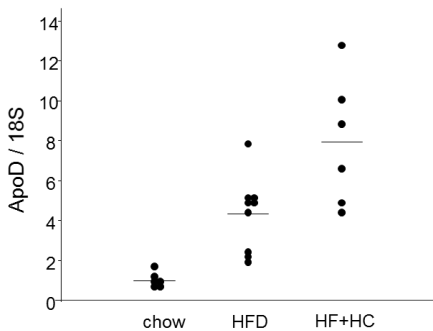


図 2 : 脂肪組織において高脂肪負荷により、ApoD 発現量が増加する。

ヒト ApoD のクローニングとヒト ApoD 発現アデノウイルスの構築

ApoD の生物学的機能を検討するためにヒト ApoD をクローニングし、ヒト ApoD 発現アデノウイルスを作成し、3T3L1 細胞、肝細胞株である HepG2 細胞、マウス肝臓に発現することを確認した。

ApoD の慢性炎症における役割の検討
ヒト ApoD をアデノウイルスを用いて、慢性炎症モデルである高脂肪食負食餌誘導肥満マウス (DIO マウス) に ApoD を過剰発現させたところ、血糖値は変化がなかったが、インスリン値は ApoD 群で低下し (図 3 上)、また、インスリン負荷テストからは、ApoD 群ではインスリン抵抗性が改善している可能性が示唆された (図 3 下)。

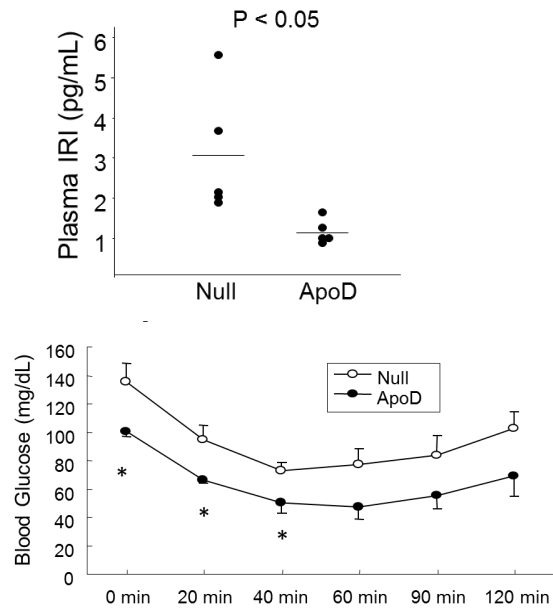


図 3 . ApoD は、インスリン抵抗性を改善させる。

上 : 空腹時インスリン濃度
下 : インスリン負荷テスト

また、血漿、組織中の炎症性サイトカインの発現を検討したところ、ApoD 群では IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカインが低下していることが分かった (図 4)。

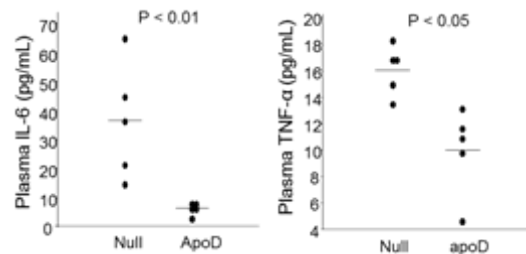


図 4 . ApoD 過剰発現は炎症性サイトカインを抑制する (DIO マウス)。

これらの結果から ApoD は慢性炎症を抑制する可能性が示唆された。

ApoD の急性炎症における役割の検討
我々は、さらに ApoD と炎症の関連を検討

するために、ApoD のリポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウスでの役割について検討した。

ApoD 発現アデノウイルス感染 5 日後、リポポリサッカライド 10 mg/kgBW 腹腔内投与したところ、クレアチニンや GPT といった臓器障害マーカーは変化なかったが、ApoD 群では、やはり炎症性サイトカインの上昇が抑制されていた (図 5)。

以上の結果より、ApoD は急性炎症においても、抗炎症的に働くことが考えられた。

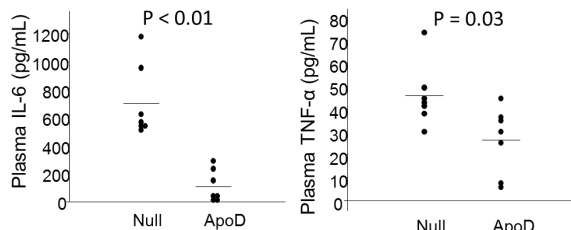


図 5 .ApoD 過剰発現は炎症性サイトカインを抑制する (リポポリサッカライド誘導敗血症モデルマウス)。

ApoD の抗炎症作用のメカニズムの検討

最後に、ApoD の抗炎症作用のメカニズムについて検討した。

まず 3T3L1 細胞を脂肪細胞に誘導したモデルにおいて、ApoD を過剰発現させたが、炎症性サイトカインの発現は変わらなかった。

次に、脂肪組織の間質細胞にあたる、マクロファージのモデルとして、RAW264.7 細胞、マウス腹腔マクロファージに ApoD を過剰発現させたが、発現細胞の割合が少なかった。そのため、HepG2 に ApoD を過剰発現させて作成した培養上清を RAW264.7 細胞に投与したところ、リポポリサッカライドによる炎症性サイトカインの誘導が著明に抑えられていた (図 6)。

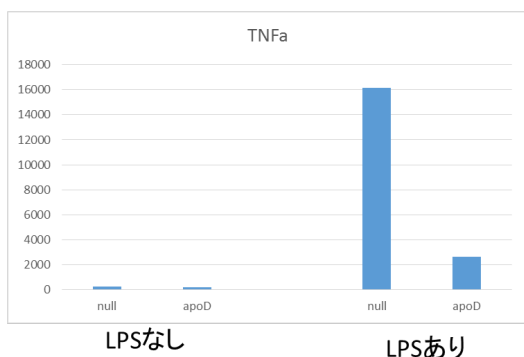


図 6 .ApoD はマクロファージからの炎症性サイトカイン分泌を抑制する。

現在、ApoD がなぜ、マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌を抑制するのか、質量分析計などを用いて検討を行っている。

(3) 結果のまとめ

以上の検討より、臨床研究からは、ApoD が肥満やインスリン抵抗性、血糖コントロール、および PAI-1 と逆相関すること、HDL 関連指標と正の相関を取ること、が示唆された。また基礎研究からは、ApoD の増加がインスリン抵抗性を改善すること、マクロファージの炎症を抑制する方向に作用していることが示唆された。今後、本研究を発展させて、臨床縦断研究にて ApoD が糖尿病合併症や動脈硬化の進展の抑制に関与するのかどうか、また炎症を抑制する分子メカニズムはどのようなものであるのか、を検討していく予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Kurano M., Tsukamoto K., Kamitsuji S., Kamatani N., Hara M., Ishikawa T., Kim B-J., Moon S., Kim Y.J., Teramoto T. Genome-wide association study of serum lipids confirms previously reported associations as well as new associations of common SNPs within PCSK7 gene with triglyceride. *Journal of Human Genetics* 査読有、61:427-433, 2016

Kurano M., Hasegawa K., Kunimi M., Hara M., Yatomi Y., Teramoto T., Tsukamoto K. Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 査読有、1863(2):191-198, 2018

[学会発表](計 4 件)

蔵野 信, 原 眞純, 矢富 裕, 塚本 和久: 肝細胞のコレステロール増加経路による糖代謝修飾の相違第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016-5 於: 京都

蔵野 信, 長谷川 浩司, 国見 基瑩, 原 眞純, 矢富 裕, 塚本 和久 植物ステロール吸収促進は、肥満による慢性炎症を抑制する 第 60 回日本糖尿病学会学術集会 2017-5 於: 名古屋

塚本 和久 シトステロール血症 第 49 回動脈硬化学会総会 シンポジウム 2017-7 於: 広島

蔵野 信, 塚本 和久, 原 眞純, 矢富 裕, 寺本 民生 GWAS より同定された新規炎症関連アポ蛋白: ApoD の機能解析. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018-5 於: 東京

〔図書〕(計 2件)

長谷川浩司、塚本和久 肥満をもたらす健康障害 脂質異常症・高尿酸血症・痛風。内科 117(1), 31-34, 2016

塚本和久 生活習慣病危険因子のコントロールと疾患予防 健診・検診・人間ドック読み方・進め方ガイドブック 内科 118(3), 347-351, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

(特になし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20251233

(2) 研究分担者

蔵野 信 (KURANO, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60621745

長谷川 浩司 (HASEGAWA, Koji)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50443867

(3) 連携研究者

(無し)

(4) 研究協力者

(無し)