

平成21年 4月 10日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591040
研究課題名（和文） 代謝関連核内受容体による冠動脈危険因子制御の解明と治療
研究課題名（英文） Regulation of Cardiovascular Risk Factors by Metabolism-associated Nuclear Receptors
研究代表者 野原 淳 (NOHARA ATSUSHI) 金沢大学・医学系研究科・助教 研究者番号：50313648

研究成果の概要：核内受容体は関連した遺伝子群を協調して制御する転写因子で、Retinoid-X-receptor (RXR)とヘテロダイマー形成する核内受容体群は脂質および糖質代謝を制御する。我々はこれらの核内受容体群の遺伝子変異検索を行い、同定された変異の機能解析を行った。その結果いくつもの遺伝子変異が本邦において存在し、これらが脂質および糖代謝異常症における遺伝的背景になっていること、また薬物治療においてその効果を規定する因子となっていることを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：内科，脂質，ゲノム，糖尿病，遺伝子，Retinoid-X-receptor，動脈硬化学

1. 研究開始当初の背景

核内受容体は機能的に関連した遺伝子群を協調して促進や抑制する転写因子だが、近年 Retinoid-X-receptor (RXR)とヘテロダイマー形成する核内受容体群はメタボリックシンドロームをはじめとする代謝異常症の研究・治療の極めて有望なターゲットとなりつつある。(Shulman AI and Mangelsdorf DJ. Retinoid-X-receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome. N Engl J Med. 2005;353:604-15. Review) フィブレート剤およびチアゾリジン剤のターゲットでもある Peroxisome Proliferator-activated

Receptor (PPAR) α および PPAR γ は詳細に検討されているが、PPARs 以外の RXR ヘテロダイマー形成核内受容体については注目され始めた段階で、臨床的意義などは不明な点が多い。

2006年に動物実験から胆汁酸受容体 Farnesoid X receptor (FXR)は正常血糖維持に必須であること (Ma K et al. J Clin Invest. 2006; 116(4):1102-9), FXR 活性化が糖尿病マウスの高脂血症と高血糖を改善すること (Zhang Y et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(4):1006-11), 代謝の重要臓器である肝組織再生に胆汁酸を介し重要な役割が

あること(Huang W et al. Science. 2006; 312 (5771):233-6)が相次いで報告された。また胆汁酸が高脂肪食におけるエネルギー消費を制御していることが明らかとなり(Watanabe M et al. Nature 2006;439 (7075):484-9),胆汁酸代謝は予想外に多岐にわたる重要な働きがあることが示された。またステロール受容体であるLiver-X-receptor(LXR)はFXRと機能的に対をなすようにコレステロールからの胆汁酸合成,腸肝循環,コレステロール逆転送系を司ると理解されている。RXR subtypeの代謝制御は十分理解されていないがRXR γ 欠損マウスで高脂肪食時の体重増加や高脂血症,リポ蛋白リパーゼ(LPL)活性に関与することが報告されている。

しかし動物実験の結果は示されていても,これらの代謝関連核内受容体の「ヒトにおける臨床的重要性」はPPARs以外ほとんど明らかとされていない。特に脂質代謝はヒトと齧歯類では大きく異なっており,マウスの実験結果はヒトにそのまま当てはまらないことはしばしばある。

日常診療で遭遇する糖尿病,高血圧や高脂血症で家族歴が少なからず認められることから,これらが遺伝因子と生活習慣など環境因子の双方を背景として発症することはよく理解できる。

早発性冠動脈硬化症患者の過半数は何らかの遺伝的脂質代謝異常を有するとされているが,十分に解明されているのは一部であり,その多くのメカニズムの解明は不十分で,さらなる遺伝子レベルの病態の解明が重要である。我々は遺伝性高脂血症の代表疾患である家族性高コレステロール血症(FH)において,その原因遺伝子LDL受容体の遺伝子解析を行い,これまで北陸地方FH患者の62.5%の遺伝子異常を明らかにし,遺伝子異常の種類による臨床像および治療効果の違いを実際の診療に役立ててきた。(Yu W, Nohara A et al. Atherosclerosis. 2002)もう一つの代表的遺伝性高脂血症である家族性複合型高脂血症(FCHL)は,一般人口の1%と極めて高頻度であるが,複数の遺伝子が関与するとされ,その遺伝因子は十分明らかになっていない。FCHLは同一個人の間で経過中に脂質型が大きく変動する特徴があり,我々は酵素やアポ蛋白の遺伝子異常よりも,制御の上流に位置する転写因子などによる調節障害の方が説明しやすいと考えている。

近年本邦でも急増が社会問題となっているメタボリックシンドローム(MetS)の遺伝背景の研究も急務である。MetSの家系調査ではそれぞれの冠血管危険因子が複雑な遺伝形質として認められる。先のFCHLは高トリグリセライド血症と低HDLコレステロール血症を示すことが多く,肥満や生活習慣で著明に

増悪,耐糖能障害の合併も高頻度で,動脈硬化惹起性が高いsmall dense LDLが増加する。FCHLの特徴はMetSに伴う高脂血症と共通項が多く,実際に両方の診断基準に合致する症例は多い。したがって我々は共通の遺伝的背景がある可能性が高いと考えている。MetSの代謝異常は代謝関連核内受容体が関わっている代謝経路が多く,フィブрат剤やチアゾリジン剤でMetSの複数の代謝障害が同時に改善することは偶然ではないと考えられる。

国内外ともに,基礎的な研究が先行しており,多数の代謝関連核内受容体に対する系統的な臨床研究はなされていなかった。ヒトFXR遺伝子多型に基づく臨床研究報告は国内外になく,またRXR γ 遺伝子にアミノ酸置換を生じる変異は国内外で報告がなかった。

核内受容体多型の研究が治療効果および副作用出現予測の点から患者個人に応じた適切な治療(オーダーメイド医療)にも大きく寄与することを示唆する。また核内受容体を標的とする薬剤開発の上でも極めて有用な情報となる。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの我々の研究成果をもとに,機能的遺伝子多型を切り口として,核内受容体による調節障害が冠血管危険因子となる病態の理解を深め,治療へ応用することを目標とする。また核内受容体多型のFCHLやMetSの遺伝背景への寄与を明らかとし,治療効果および副作用の検討を行うこととした。また臨床所見の観察だけでなく,培養細胞などを用いて詳細なメカニズムに迫る検討を行う。

3. 研究の方法

[代謝関連核内受容体遺伝子変異の検索] 遺伝子変異から得られる情報は極めて有用である。代謝を制御している核内受容体群の遺伝子変異を網羅的に検索した。具体的にはPPAR α , γ , δ ,FXR,LXR,これらと二量体を形成するRXR α , β , γ ,FXRと協調するsmall heterodimer partnerを候補遺伝子とした。新規変異検出にはPCR一本鎖構成体多型法(PCR-SSCP法)よりも検出感度と多数の検体処理にすぐれているPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(PCR-DGGE法)を用いた。同定された変異の多数検体スクリーニングにはPCR-RFLPを用いた。

[遺伝子変異と臨床像・相互作用] 一般人,遺伝性高脂血症患者,冠動脈造影施行患者,MetS症例を対象とし,変異の頻度および血清脂質値,耐糖能,肥満,高血圧等の冠血管危険因子,リポ蛋白リパーゼ活性やインスリン抵抗性を検討した。また血中胆汁酸はFXR活性およびエネルギー消費に影響を与えるた

め、オランダ・フローニンゲン大学 T.Claudel 博士の指導によりガスクロマトグラフ質量分析器による分析を行った。また核内受容体多型は相互作用が予測されることから、RXR は研究対象の核内受容体の多くとヘテロダイマー形成するものであり多型間の相互作用を検討した。

[冠危険因子の治療と遺伝子多型の検討]

代謝関連核内受容体は様々な機序で冠危険因子の治療に影響する可能性があり、治療効果と副作用の予測に役立てる。

4. 研究成果

最も頻度の高い遺伝性脂質代謝異常である FCHL の遺伝背景は未だ十分明らかとなっていない。FCHL はメタボリックシンドロームに伴う脂質代謝異常と共通点が指摘されるが、近年メタボリックシンドロームの治療標的として注目されている、retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマー形成をする核内受容体群は、脂質代謝においても重要な役割を果たしている。我々はこれらの核内受容体群の遺伝子変異が FCHL に影響を与えているという仮説を検討し、60 家系の FCHL 発端者を含む高脂血症 180 例において核内受容体 PPAR α 、PPAR γ 2、PPAR δ 、FXR、LXR α 、RXR γ 遺伝子の全翻訳領域の遺伝子変異を検出した。検出された変異については、スクリーニング群とは別個の冠疾患が疑われた 175 症例 (冠動脈造影 105 例を含む) において臨床像の評価を行った。スクリーニングの結果 PPAR α で Asp140Asn と Gly395Glu、PPAR γ 2 で Pro121Ala、RXR γ で Gly14Ser、FXR -1g \rightarrow t の変異を検出した。このうち今回初めて同定された RXR γ Ser14 変異のみが、他の高脂血症 (4%) やコントロール群 (5%) に比べ FCHL において有意に高頻度 (15%, $p < 0.05$) であった。RXR γ Ser14 保持者は冠疾患疑い群で 9 例に同定され、有意にトリグリセリド高値、HDL コレステロール低値、ヘパリン負荷後リポ蛋白リパーゼ (LPL) 低値で、冠動脈造影における動脈硬化症と関連を認めた。In vitro での機能解析において、RXR γ Ser14 は Gly14 よりも強力に LPL 遺伝子のプロモーターを抑制することが確認された。これらの結果は RXR γ が FCHL の遺伝的背景に関与することを示唆している。この成果は Arterioscler Thromb Vasc Biol 誌に報告した。また MetS の発症に与える影響も検討し、同変異は MetS に多い傾向があることも示している。

また LPL は動脈硬化発症の予見因子ともなりうる蛋白であることが示されており、その臨床的な重要性をさらに検討し、共同研究者の小林淳二教授とともに糖尿病患者の食後高脂血症に関与しうる Apo B48 や RLP-TG との関連を Horm Metab Res 誌に報告した。

胆汁酸受容体である FXR 遺伝子で日本人にき

わめて高頻度 (アレル頻度約 30%) の -1g \rightarrow t 多型を同定した。これは翻訳開始コドン 1 つ前の塩基置換であり、FXR 標的遺伝子の発現がこの変異の有無により変化することが判明した。我々は臨床像を詳細に検討し FXR-1t 多型保有者は -1gg 保有者に比べ有意に BMI が高いことを見いだした。脂質においては脂質異常症が少なく、脂肪肝発症が低率であり、これらはマウスに胆汁酸を投与した効果に類似することを明らかにした。(米国心臓協会 (AHA) 学術総会にて報告) また拡張期血圧にも有意の相関を認めており、FXR は副腎や腎臓にも高度に発現しているため副腎ホルモンの検討を行い、これらの血圧に影響を与えるホルモンについて FXR 多型が影響を与える傾向を認めた。FXR-1 多型が体重及び脂質代謝に与える影響は MetS の発症において、肥満においては促進的と言えるが、脂質異常症の点からは抑制的であり、複雑な影響を与えていることが明らかとなった。本変異はコーソイドでは少なく、肥満と冠疾患の関連に関して海外と本邦における差異を考える一つの遺伝背景となっているものと考えられた。

現在最も世界で使用されている高脂血症治療薬であるスタチンは、胆汁酸吸着薬であるレジンと併用することにより非常に効率よく LDL コレステロールを低下させることが出来る。FXR は胆汁酸腸肝循環を制御しているが、我々は高脂血症患者にスタチンを投与、FXR-1t 保持者は -1gg 保持者に比べ有意により強く LDL コレステロールが低下させられる。本邦ではスタチンへの反応がよい患者が多く、ほとんどの薬剤において使用用量が欧米よりもおよそ半分と低く設定されているが、我々はその遺伝背景の一つであると考えている。また同様のスタチンへの良好な反応は LDL 受容体に遺伝子異常が確認されている家族性高コレステロール血症患者でも認められた。スタチンの効果が不十分な場合に最も効果のある併用療法は胆汁酸吸着剤であるレジンであるが、胆汁酸受容体の遺伝子多型によるスタチン作用増強は、レジンの作用機序に類するメカニズムが推定される。これらの成果は XVI International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism などで報告した。

また FH ではスタチンだけでは効果不十分となることが多いため胆汁酸吸着剤であるレジンが併用されるが、さらにコレステロール吸収阻害剤である Ezetimibe 併用を含めた 3 剤の治療効果を検討して日本循環器学会総会にて報告した。

遺伝子多型のいくつかは本邦においてのみ認めるものであった。我々が包括的に本邦で行った検討結果を元として、RXR ヘテロダイマー形成核内受容体の遺伝子多型と心血管

疾患危険因子の関連を J Atheroscler Thromb 誌に報告した。

また転写因子である Upstream Transcription Factor 1 遺伝子多型は FCHL の遺伝素因として注目されているが、同遺伝子の多型は冠疾患患者の HDL コレステロール値に FXR 遺伝子多型と相乗的な効果を示しており、また FH 患者においてもこの多型が血清脂質に影響していることを示して米国心臓病会議にて報告した。

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 8 件)

- ① Atsushi Nohara, (他2名, 1番目) Retinoid X Receptor Heterodimer Variants and Cardiovascular Risk Factors, J Atheroscler Thromb (in press), 査読有
- ② Kenji Miwa, Akihiro Inazu, Masa-aki Kawashiri, Atsushi Nohara(他8名, 4番目) Cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells to serum is preserved in CETP-deficient patients. Clin Chim Acta. 402(1-2):19-24. 2009, 査読有
- ③ Hayato Tada, Masa-aki Kawashiri, Tohru Noguchi, Mika Mori, Masayuki Tsuchida, Mutsuko Takata, Atsushi Nohara(他5名, 7番目) A novel method for determining functional LDL receptor activity in familial hypercholesterolemia: application of the CD3/CD28 assay in lymphocytes, Clin Chim Acta. 400(1-2):42-7. 2009, 査読有
- ④ Shoji Katsuda, Masa-aki Kawashiri, Akihiro Inazu, Hayato Tada, Masayuki Tsuchida, Yoshibumi Kaneko, Tsuyoshi Nozue, Atsushi Nohara, (他5名, 8番目) Apolipoprotein B gene mutations and fatty liver in Japanese hypobetalipoproteinemia, Clin Chim Acta. 399(1-2):64-8, 2009, 査読有
- ⑤ Atsushi Nohara, (他13名, 1番目) High frequency of a retinoid X receptor gamma gene variant in familial combined hyperlipidemia that associates with atherogenic dyslipidemia, Arterioscler Thromb Vasc Biol. ;27(4):923-8, 2007, 査読有
- ⑥ Junji Kobayashi, Katsuyuki Nakajima, Atsushi Nohara(他6名, 3番目) The

relationship of serum lipoprotein lipase mass with fasting serum apolipoprotein B-48 and remnant-like particle triglycerides in type 2 diabetic patients, Horm Metab Res. 39(8):612-6. 2007, 査読有

- ⑦ Hiroshi Mabuchi, Atsushi Nohara(他5名, 2番目) Effects of CoQ10 supplementation on plasma lipoprotein lipid, CoQ10 and liver and muscle enzyme levels in hypercholesterolemic patients treated with atorvastatin: a randomized double-blind study, Atherosclerosis. 195(2):e182-9, 2007, 査読有
- ⑧ Junji Kobayashi, Atsushi Nohara(他5名, 2番目) Serum lipoprotein lipase mass: clinical significance of its measurement, Clin Chim Acta. 378(1-2):7-12, 2007, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Atsushi Nohara, Impact of Upstream Transcription Factor 1 Gene Variant on Genetically Confirmed Familial Hypercholesterolemia (K790X), 81st American Heart Association 2008 Scientific Sessions, 2008.11.11, New Orleans, USA
- ② 野原 淳, RXR ヘテロダイマー形成核内受容体多型と脂質・糖質代謝異常, 第 40 回日本動脈硬化学会総会, 2008.07.11, つくば
- ③ 野原 淳, Maximum Lipid-lowering Therapy for Familial Hypercholesterolemia: Efficacy and Safety with High-dose Statin, Resin and Ezetimibe, 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会, 2008.03.29, 福岡
- ④ Atsushi Nohara, Impact of common variant of bile acid receptor FXR gene on cardiovascular risk factors. XVI International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, 2007.10.05, New York, USA
- ⑤ 野原 淳, RXR ヘテロダイマー形成核内受容体多型と脂質低下療法, 第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2007.07.14, 大阪
- ⑥ Atsushi Nohara, Nuclear bile acid receptor gene variant improves efficacy of lipid-lowering therapy, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007, 2007.04.19, Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野原 淳 (NOHARA ATSUSHI)
金沢大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50313648

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者