

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08490

研究課題名(和文) 多面的な作用をもつHDLと細胞とのインタラクションの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the interaction between cells and HDL with multifaceted actions

研究代表者

入野 康宏 (Irimo, Yasuhiro)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10415565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HDL(high-density lipoproteins)機能の分子機序を明らかにした。今回新たに同定したApoA1結合タンパク質は、HDLを産出するときの機序を制御していることが示唆された。次に、HDLにはフィブロネクチンが含まれており、このHDLはFAK(Focal adhesion kinase)を活性化させることがわかり、HDLとがんとの関連性が示唆された。最後に、HDL機能はHDL中のリン脂質濃度、HDL中のリン脂質のアシル基組成、LCAT(lecithin-cholesterol acyltransferase)依存的なコレステロールエステル化に影響されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年盛んにHDL機能の多様性が報告されており、多種多様なタンパク質が存在していることが、HDLの多面的作用の理由として考えられるが、HDLの制御機構は十分に解明されているとは言い難い。

本研究成果は、HDLの存在意義、生物学的意義を明らかにすることにつながり、ヒト疾患におけるHDL機能の理解にパラダイムシフトをもたらすだけでなく、食の欧米化などで心疾患疾患の罹患者やその予備軍が増加している現状を打破することにつながり、健やかに生活できる活力ある社会を実現する。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of HDL (high-density lipoproteins) function was clarified. The newly identified ApoA1-binding protein regulates the mechanism of HDL production. Next, HDL contains fibronectin, which activates FAK (focal adhesion kinase), suggesting an association between HDL and cancer. Finally, HDL function was found to be affected by phospholipid concentration in HDL, acyl group composition of phospholipids in HDL, and LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase)-dependent cholesterol esterification.

研究分野：生化学

キーワード：高比重リポタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

リポタンパク質の中でも LDL (low-density lipoproteins: 低密度リポタンパク質)は、高脂血症との関連が指摘されており、LDL に含まれるコレステロール(LDL-C)を低下させることはその治療の基本となっている。内科的治療によって LDL-C をコントロールすることが可能になった現在においても、高脂血症が原因となる心血管疾患の発症は 30~40%しか低下しない。そこで、HDL (high-density lipoproteins: 高密度リポタンパク質)の役割が脚光を浴びている。

多くの観察・疫学的研究によって、HDL コレステロール (HDL-C) 値は、肥満や糖尿病、喫煙などに伴って低下し、心血管疾患の負の危険因子となることが証明されてきた。しかし、コレステロールエステル転送タンパク阻害薬やニコチン酸製剤などの HDL-C 値の上昇薬を用いた大規模臨床試験では、これまでのところ心血管疾患の予防効果は証明されていない。そもそも HDL の量的指標として用いられてきた HDL-C 値は、HDL 重量の 20~30%を占めるコレステロール量であり、HDL 機能を反映したものではない。最近の研究結果から、HDL コレステロール(HDL-C)値ではなく HDL のコレステロール引き抜き能 (HDL 機能) が冠動脈疾患の独立した危険因子であることが報告された (N Engl J Med. 364 : 127-35, 2011)。したがって、HDL の重要性は、量 (HDL-C 値) から質 (HDL 機能) であると認識されつつあり、近年盛んに HDL 機能の多様性が報告されているが、その制御機構は十分に解明されているとは言い難い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、HDL が多面的な作用を有している理由を解明することである。

## 3. 研究の方法

HDL が多面的な作用を有している理由を解明するために、HDL の主要構成タンパク質である ApoA1 と結合するタンパク質の同定を試みた。取り込まれた HDL を定量可能な実験系を構築したのちに、ApoA1 と結合するタンパク質との関連性を調べた。また、他のリポタンパク質とは異なり HDL には含有タンパク質が多いことから、細胞の受容体を介して HDL が多面的な作用を發揮しているのではと考えて、HeLa 細胞に HDL を添加したときの細胞内シグナル伝達機構を調べた。最後に、HDL を構成する脂質と HDL 機能の関連性を検討した。

## 4. 研究成果

### 4-1. ApoA1 と結合するタンパク質との同定と HDL 機能の関連性の検討

組換え ApoA1 と細胞抽出液を反応させたのちに、質量分析計を用いて、タンパク質 X を ApoA1 結合タンパク質として同定した。HDL の細胞内の取り込み能とタンパク質 X の関連性を調べるために、HDL の細胞内の取り込み能を評価可能な実験系を構築した。蛍光ラベルした HDL を細胞に取り込ませたのちに、界面活性剤を用いて細胞を溶解させた溶解液に含まれる蛍光物質の蛍光強度を測定することで、細胞に取り込まれた HDL を定量した。ApoA1 結合タンパク質をノックダウンさせたときに、HDL の取り込み能を調べてみたが、はっきりとした関連性は認めら

れなかった。次に、HDL の産出と ApoA1 結合タンパク質の関連性を調べた。肝細胞である HepG2 細胞を無血清培地で培養したときの培養上清に含まれる ApoA1 を産出された HDL 量とした。ApoA1 結合タンパク質をノックダウンさせたときでは、産出された HDL 量に変化が認められた。これらのことから、今回新たに同定した ApoA1 結合タンパク質は、HDL の取り込みでなく HDL を産出するときの機序を制御していることが示唆された。

#### 4-2. 受容体を介した HDL の細胞内シグナル伝達経路の解明

他のリポタンパク質とは異なり HDL には含有タンパク質が多い。細胞の受容体を介して HDL が多面的な作用を発揮しているのではと考えて、HeLa 細胞に HDL を添加したところ、FAK のリン酸化が確認できた。この HDL にはフィブロネクチンが含まれていることを明らかにした。(Figure 1)。

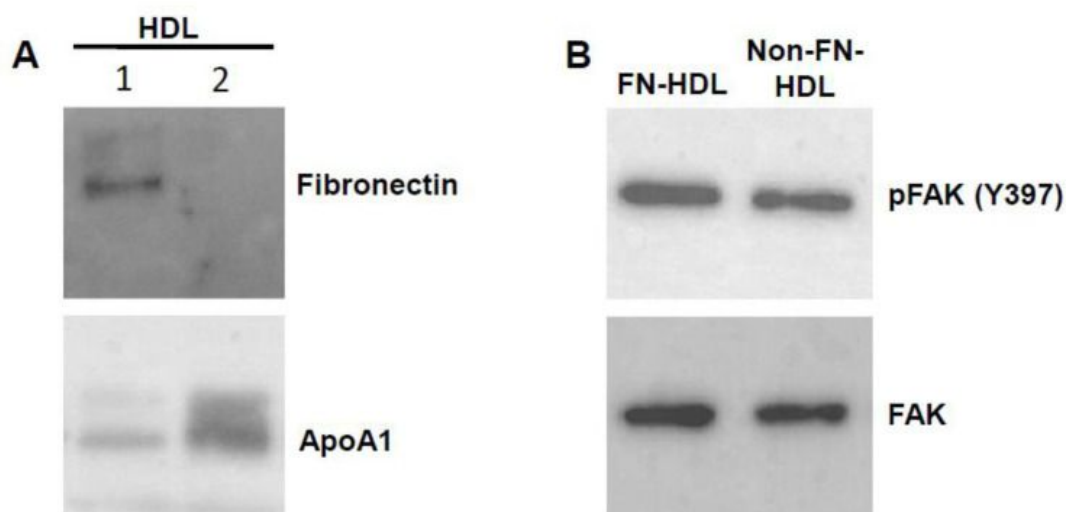


Figure 1. HDL に含まれるフィブロネクチン(FN-HDL)は、FAK をリン酸化させる (A) HDL に含有するフィブロネクチン (B)フィブロネクチン含有 HDL(FN-HDL)を HeLa 細胞に添加すると FAK の Y397 がリン酸化された。

このフィブロネクチンを含む HDL を添加した細胞は、細胞増殖が活性化され、同時に接着能を亢進させていることが分かり、HDL とがんとの関連性が示唆された。

#### 4-3. HDL を構成する脂質と HDL 機能の関連性の検討

HDL を構成する脂質と HDL 機能の関連性を検討するために、冠動脈造影または経皮的冠動脈インターベンション後の患者の HDL 機能と HDL リン脂質中に含まれるエライジン酸を測定し、人工 HDL を用いた解析により、HDL リン脂質が HDL 機能に与える影響を調べた。

HDL 機能は HDL 中のリン脂質との正の相関を示したが、HDL 中のリン脂質中のエライジン酸の割合と HDL 機能には負の相関があった(Figure 2)。

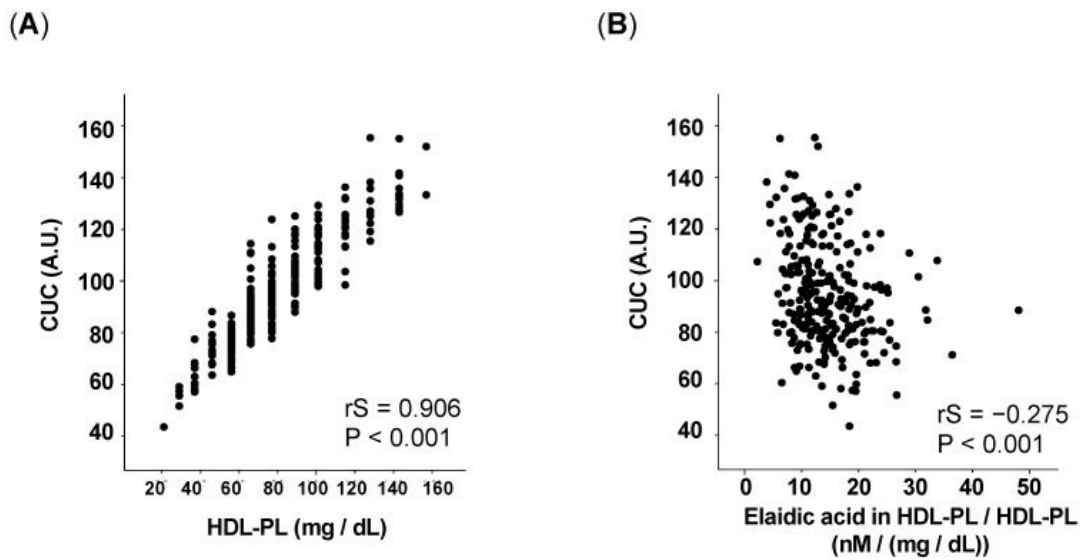


Figure 2. HDL 機能と HDL のリン脂質の関連

(A)HDL 機能(CUC)と HDL リン脂質の(HDL-PL)は正の相関を示した (B) HDL 中のリン脂質中のエライジン酸の割合(Elaidic acid in HDL-PL/ HDL-PL)と HDL 機能(CUC)は負の相関を示した

人工的に作製した HDL のエライジン酸-ホスファチジルコリン (PC) 含量を増加させると、PC にオレイン酸を含む人工 HDL と比較して、HDL の粒子径および HDL 機能に変化は認められなかった。組換えヒト・レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) は HDL 機能を亢進し、エライジン酸を PC に含む人工 HDL では LCAT 依存的な HDL 機能の促進および LCAT 依存的なコレステロールエステル化は抑制された(Figure 3)。

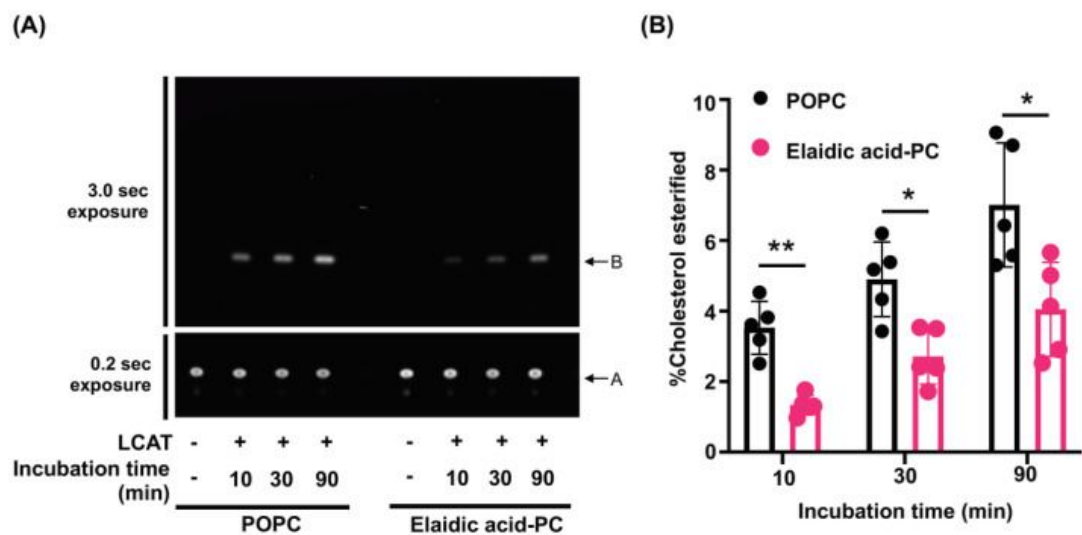


Figure 3. 人工 HDL のエライジン酸-ホスファチジルコリン (Elaidic acid-PC) は、組換えヒト・レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) によるコレステロールエステル化を抑制させる

したがって、HDL 機能は HDL 中のリン脂質濃度、HDL 中のリン脂質のアシル基組成、LCAT 依存的なコレステロールエステル化に影響されることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Eriko Hisamatsu, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takuya Iino, Tetsuya Hara, Hidekazu Tanaka, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata	4. 巻 66
2. 論文標題 Fibronectin-containing High-Density Lipoprotein is Associated with Cancer Cell Adhesion and Proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kobe J. Med. Sci	6. 最初と最後の頁 E40-E48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Irino Yasuhiro, Toh Ryuji, Ishida Tatsuro	4. 巻 26
2. 論文標題 A Novel Indicator for HDL Functionality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 945 ~ 946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.ED111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Oshita T, Toh R, Nagano Y, Kuroda K, Nagasawa Yi, Harada A, Murakami K, Kiriya Ma, Yoshikawa K, Miwa K, Kubo T, Iino T, Nagao M, Irino Y, Hara T, Shinohara M, Otake H, Shinke T, Nakajima K, Ishida T, Hirata Ken-ichi	4. 巻 503
2. 論文標題 Association of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality, and coronary plaque properties: An optical coherence tomography-based observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 136 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2020.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iino Takuya, Toh Ryuji, Nagao Manabu, Shinohara Masakazu, Harada Amane, Murakami Katsuhiro, Irino Yasuhiro, Nishimori Makoto, Yoshikawa Sachiko, Seto Yutaro, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Elaidic Acid on HDL Cholesterol Uptake Capacity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3112 ~ 3112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13093112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	杜 隆嗣  (Toh Ryuji)  (50379418)	神戸大学・医学研究科・特命准教授    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------