

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591077

研究課題名（和文）

スフィンゴシン 1-リン酸受容体とスカベンジャー受容体を介するリポ蛋白質作用

研究課題名（英文） Effect of lipoprotein mediated by sphingosine-1 phosphate receptors and scavenger receptor class B type I

研究代表者

木村 孝穂（KIMURA TAKAO）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90396656

研究成果の概要（和文）：

スタチンは血管内皮細胞の SR-BI の発現を促進することにより HDL の血管内皮機能調節作用を増強した。スタチンは HMG-CoA 系の阻害効果により SR-BI の発現を増強した。In vitro の系ではスタチンは Rho 阻害/PPAR・刺激を介して SR-BI 発現を促進し HDL 作用を増強していた。マウスにおいてもスタチンは血管内皮細胞の SR-BI 発現を増強し、TNF 刺激による単球の血管内皮細胞への接着を抑制した。スタチンは脂質代謝改善に加え SR-BI 発現を調節することで HDL 作用を増強すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

HDL exerts a variety of anti-inflammatory and anti-atherogenic actions independently of the cholesterol metabolism. Here, we showed the cross-talk mechanism between statins and HDL in anti-inflammatory and anti-atherogenic actions, with a focus on scavenger receptor class B type I. Simvastatin treatment of HUVECs induces expression of SR-BI, which plays a critical role as a key molecule to enhance HDL-induced anti-inflammatory actions, including NOS activation and inhibition of adhesion molecule expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：動脈硬化、血管内皮、HDL、SR-BI、スフィンゴシン 1-リン酸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高密度リポ蛋白質 HDL の主要な機能としてコレステロール逆輸送が知られている。我々は HDL 中には S1P が高濃度に蓄積しているという発見に基づいてコレステロール代謝と独立した HDL 作用のメディエーターとして S1P が関与する可能性があることを示して来

た。

(2) S1P に加え、アポ蛋白/SR-BI 系が HDL のコレステロール輸送だけでなく血管内皮細胞の NO 合成酵素 (NOS) の活性化を促進するという新しい概念も示してきた。

## 2. 研究の目的

HDLはNO合成促進作用を介してTNFによる血管内皮細胞の接着分子発現及び単球接着促進作用を阻害していると考えられているがそのシグナル伝達系は明らかでない。このHDL作用を制御するシグナル伝達機構の解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)を用いた実験系でこのHDL作用を制御するシグナル伝達機構を解析した。

(2) 特異的な siRNA を細胞に導入して S1P 受容体及びスカベンジャー受容体 SR-BI、PDZK-1 それぞれの発現を阻害しその役割を調べた。

(3) HUVEC をスタチンで処理し HDL 及び S1P 応答に対する影響を調べた。スタチンのシグナル伝達系に関連すると思われる分子の阻害には特異的阻害剤、siRNA 及びドミナントネガティブ遺伝子を発現するアデノウイルスを用いた。分子の刺激には特異的アゴニストやコンスティテューティブアクティブ遺伝子を発現するアデノウイルスを用いた。

(4) マウスにスタチンを投与し大動脈を摘出し VCAM-1 や SR-BI 発現を調べた。

(5) マウスにスタチンを投与し大動脈を摘出し蛍光色素で標識した単球の接着を調べた。

## 4. 研究成果

(1) HUVEC では HDL による NO 合成促進作用は S1P 受容体特異的阻害剤や S1P 受容体特異的 siRNA で処理した細胞では 50%程度 of 阻害を認めた。同じ条件下では S1P 刺激による応答は消失した。

(2) HUVEC では HDL による NO 合成促進作用は SR-BI 特異的 siRNA で処理した細胞では 50%程度 of 阻害を認めた。同じ条件下で SR-BI 特異的アゴニストである再構成した HDL (rHDL) の応答は消失した。

(1)、(2)の結果から HUVEC では HDL は HDL 中 S1P/S1P 受容体及び apoA/SR-BI/PDZK1 の 2 つシグナル伝達系を介して NO 合成促進作用を発揮すると考えられた。

(3) HUVEC をスタチンで 18 時間処理した後、HDL で刺激をすると HDL による NO 合成促進作用が増強された。

(4) (3)のスタチンの作用はメバロン酸の同時添加で消失した。

(5) (3)のスタチンの作用は Rho 阻害剤及び Rho のドミナントネガティブ遺伝子を発現するアデノウイルスの導入で再現された。更に Rho のコンスティテューティブアクティブ遺伝子を発現するアデノウイルスの導入でスタチンの作用は消失した。

(6) (3)のスタチンの効果は PPAR・刺激剤で再現された。PPAR・の阻害剤、PPAR・の mRNA 特異的 siRNA 導入により(3)のスタチンの効果は消失した。

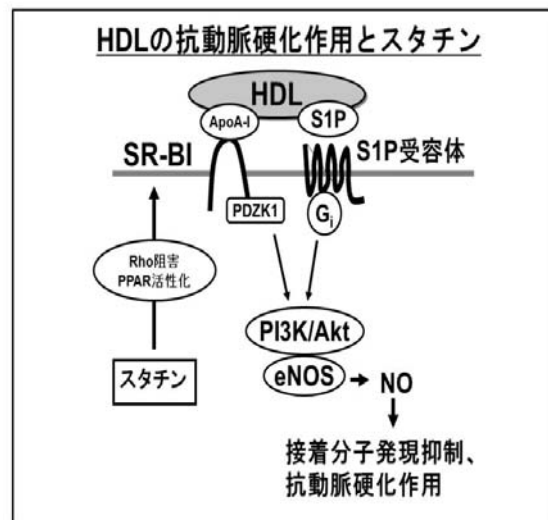
(4)~(6)の結果から HUVEC ではスタチンは Rho 阻害/PPAR・活性化を介して SR-BI 発現を促進することにより HDL の NO 合成促進作用を増強すると考えられた。

(7) マウスに TNF を投与し 2 時間後に大動脈を摘出し血管内皮への蛍光色素で標識した単球接着を調べた。TNF は大動脈内皮への単球の接着を促進した。また TNF を投与したマウスの大動脈内皮では VCAM-1 の発現が増加していた。

(8) マウスにスタチンを投与し(7)と同じ実験を行った。スタチン投与で大動脈内皮への単球の接着は抑制された。スタチン投与群では TNF 処理による大動脈内皮の VCAM-1 発現が抑制された。スタチン投与群の大動脈内皮では SR-BI の発現が増強していた。

(7)(8)の結果からスタチンはマウス大動脈内皮細胞の SR-BI 発現を促進し単球の接着を抑制したと考えられた。

下に研究成果をまとめた図を示す。



このように本研究では以下の点を明らかにした。

- ・HDL が脂質代謝と独立した抗動脈硬化作用を有していること。
- ・HDL の抗動脈硬化作用は HDL 中 S1P/S1P 受容体系とアポ A/SR-BI/PDZK1 系の 2 つの系を介して媒介されること。
- ・スタチンは脂質代謝改善作用に加え HDL 受容体発現を調節することで HDL 作用をも増強していること。

#### 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 Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, and Okajima F. Mechanism and role of high-density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem.* (査読有) 285(7), 2010. 4387-4397.
- ② Kimura T, Sato K, Tomura H, Okajima F. Cross-talk Between Exogenous Statins and Endogenous High-density Lipoprotein in Anti-inflammatory and Anti-atherogenic Actions. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* (査読有) 10(1), 2010, 8-15.
- ③ Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Mogi C, Kimura T, Kurose H, Tomura H, Okajima F. Role of Rap1B and Tumor Suppressor PTEN in the Negative Regulation of Lysophosphatidic Acid-induced Migration by Isoproterenol in Glioma Cells. *Mol Biol Cell.* (査読有) 20(24), 2009. 5156-5165.
- ④ Okajima F, Sato K, Kimura T. Anti-atherogenic Actions of High-density Lipoprotein through Sphingosine 1-Phosphate Receptors and Scavenger Receptor Class B Type I. *Endocr J.* (査読有) 56, 2009. 317-334
- ⑤ 岡島史和、木村孝穂、佐藤幸市 リポタンパク質作用のメディエーターとしての S1P 生化学 (査読有) 81 巻 5 号 2009、

393-397

- ⑥ Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, Okajima F. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol.* (査読有) 182(5), 2009. 3243-3251
- ⑦ Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Kimura T, Kuwabara A, Ohta H, Im DS, Kurose H, Takeyoshi I, Sato K, Okajima F. LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites. *Carcinogenesis.* (査読有) 30(3), 2009. 457-465
- ⑧ Kimura T, Mogi C, Tomura H, Kuwabara A, Im DS, Sato K, Kurose H, Murakami M, Okajima F. Induction of scavenger receptor class B type I is critical for simvastatin enhancement of high-density lipoprotein-induced anti-inflammatory actions in endothelial cells. *J Immunol.* (査読有) 181(10), 2008. 7332-7340

[学会発表] (計 18 件)

- ① T. Kimura, T. Aoki, K. Sato, A. Kuwabara, M. Nara, K. Tsunekawa, T. Morimura, O. Araki, H. Sumino, H. Tomura, I. Kobayashi, Y. Kondo, F. Okajima, M. Murakami. Rapid non-genomic action of thyroid hormone and the expression of deiodinase in endothelial cells. 第 14 回国際甲状腺学会 2010. 9. 12、パリ国際会議場(パリ、フランス共和国)
- ② T. Kimura, M. Murakami and F. Okajima. Enhancement of high-density lipoprotein induced anti-inflammatory and anti-atherogenic actions through modulating the expression of scavenger receptor class B type I 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010. 7. 16、

長良川国際会議場（岐阜県）

- ③ T. Kimura, H. Tomura, K. Sato, M. Murakami and F. Okajima. Mechanism and role of high-density lipoprotein-induced AMP-activated protein kinase activation in endothelial cells. 国際心血管内分泌シンポジウム 2010. 4. 1、奈良県新公会堂（奈良県）
- ④ 木村孝穂、岡島史和、村上正巳 Simvastatin、fenofibrate は血管内皮細胞の SR-BI 発現誘導を介し HDL の抗動脈硬化作用を増強する 第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2009. 10. 24、大宮ソニックシティ（埼玉県）
- ⑤ Takao Kimura, Masami Murakami, Fumikazu Okajima. Simvastatin promoted HDL-induced anti-atherogenic action through enhancement of SR-BI expression in endothelial cells. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2009. 7. 18、海峡メッセ下関（山口県）
- ⑥ 木村孝穂、岡島史和、村上正巳 HDL による血管内皮機能調節機構 第 82 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム 血管新生と心血管内分泌の新展開 2009. 4. 23、群馬県民会館（群馬県）
- ⑦ 木村孝穂、岡島史和、村上正巳 シンバスタチンは血管内皮細胞の SR-BI 発現増強を介して HDL の NO 合成を促進する 第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2008. 7. 10、つくば国際会議場（茨城県）
- ⑧ 木村孝穂、岡島史和、村上正巳 フェノフィbrate は血管内皮細胞の SR-BI 発現増強を介して HDL の NO 合成を促進する 第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2008. 7. 10、つくば国際会議場（茨城県）
- ⑨ 木村孝穂、村上正巳、岡島史和 Enhancement of High-Density Lipoprotein-induced Anti-Inflammatory Actions in Endothelial Cells by Simvastatin-induced expression of Scavenger Receptor Class B Type I 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会 2008. 3. 21、大阪国際会議場（大阪府）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 孝穂 (KIMURA TAKAO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90396656