

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591081

研究課題名(和文) 糖尿病におけるHDL代謝—HDL受容体SR-BI/CLA-1の役割と治療戦略—

研究課題名(英文) HDL metabolism in Diabetes Mellitus-The clinical role of HDL receptor SR-BI/CLA-1-

研究代表者

村尾 孝児 (MURAO KOJI)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20291982

研究成果の概要(和文)：糖尿病、特に高血糖では肝臓におけるHDL受容体SR-BI/CLA-1の発現を減少させる。高血糖はp38-MAPKを活性化し、核内におけるSp-1を活性化する。Sp-1はHDL受容体SR-BI/CLA-1のプロモーター領域に結合し、遺伝子転写を抑制する。HDL受容体が減少することにより、HDL代謝が遅延し、糖尿病における動脈硬化を促進する。逆に糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体は、肝臓におけるSR-BI/CLA-1の発現を誘導することで、HDL代謝を活性化している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hyperglycemia suppressed the expression of HDL receptor SR-BI/CLA-1 via the activation of p38-MAPK pathway in Diabetes Mellitus. In diabetes mellitus, hyperglycemia stimulated atherosclerosis by inhibition of HDL metabolism. On the other hand, TZD stimulated the expression of SR-BI/CLA-1 in liver via the activation of PPARs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脂質異常症、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、特に高血糖は、動脈硬化性疾患発症の最も重要な危険因子であるとされている。また糖尿病患者においてはHigh density lipoprotein (HDL)コレステロールが低下し、HDL代謝異常が指摘されている。一方HDLは、動脈硬化病変よりコレステロールを引き抜き、肝臓へ転送するシステム(コレステロール逆転送系)を介して抗動脈硬化作用を発揮することが知られている。我々はヒト遺伝子CLA-1が、マウスSR-BIのホモログとしてヒ

トHDL受容体であることを同定してきた(JBC 272:17551.1997)。現在までに我々はSR-BI/CLA-1の機能として、コレステロール逆転送系を介して動脈硬化に関与すること(JBC1998, ATVB 2001, ATVB 2003, Endocrinology 2004, FEBS Lett 2006)、アポトーシス細胞を認識し生体内防御に関与すること(JBC 1997, Lab Invest 2000, J Mol Endocrinol 2004、)、細胞増殖(Cancer Res 2004, BBRC 2006)、血管内皮細胞における血管弛緩因子(NO)の産生亢進(Hypertension

2007) を示し、SR-BI/CLA-1 が様々な生命現象を仲介する多機能性受容体であることを提唱してきた。

2. 研究の目的

今回の研究は、糖尿病（高血糖状態）が惹起する HDL 代謝異常を HDL 受容体 SR-BI/CLA-1 の観点から検証する。これらの知見をもとに translational research として、SR-BI/CLA-1 遺伝子導入によるコレステロール逆転送系の賦活化をおこない、動脈硬化病変の退縮を目的とした治療戦略の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝臓細胞における SR-BI/CLA-1 の発現変動：タンパク質レベルの検討では Western blot analysis, mRNA の解析では Real-time PCR 法、プロモーターの解析では、luciferase reporter gene analysis をもちいた。

(2) in vivo の検討では、糖尿病モデルラット OLETF ラットをもちいて、糖尿病を誘導し、肝臓における SR-BI/CLA-1 の発現を Western blot analysis で解析した。

(3) 細胞内情報伝達系、転写因子の機能解析には、各種の阻害薬、および発現ベクターを作成し、発現実験をおこなった。

4. 研究成果

(1) 高血糖状態における SR-BI/CLA-1 の抑制

糖尿病は動脈硬化症の危険因子であるが、動脈硬化発症のメカニズムについての様々な機序が提唱されているが詳細は依然として不明である。我々は糖尿病における高血糖状態において生体内の抗動脈硬化作用であるコレステロール逆転送系が抑制されると仮定し検証した。肝細胞における SR-BI/CLA-1 の発現は、血糖値に応じて低下することが判明した (Figure 1)。

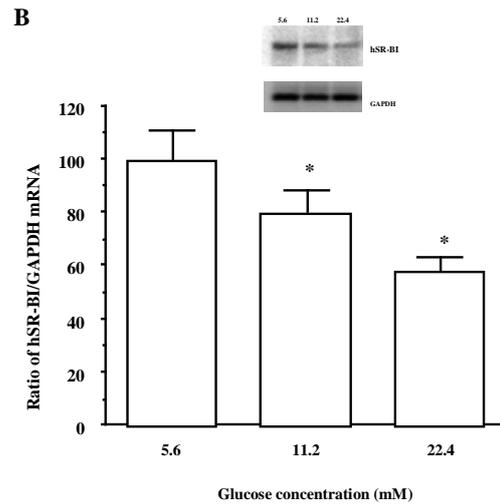
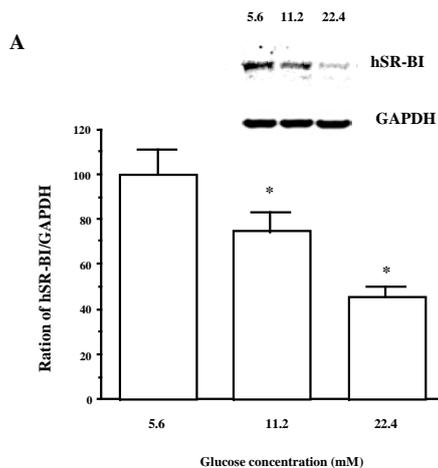
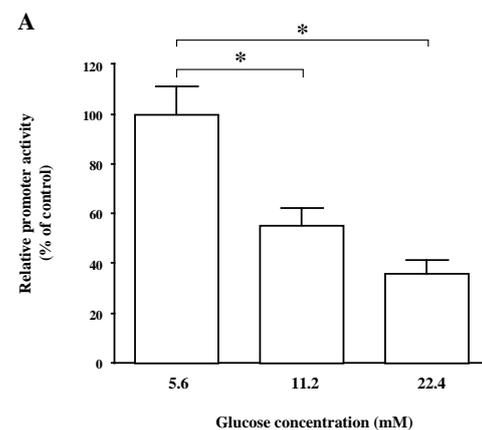


Figure 1. Effects of glucose on hSR-BI expression in HepG2 cells. (A), Dose-dependent suppression of hSR-BI protein by glucose. (B), Hyperglycemia decreases hSR-BI mRNA expression. hSR-BI mRNA was quantified by Northern blot analysis and normalized to GAPDH mRNA.

この高血糖による抑制は SR-BI/CLA-1 の転写レベルで認められ、細胞内情報伝達系の阻害剤の検討より、p38-MAPK pathway の関与が想定された (Figure 2)。

Figure 2



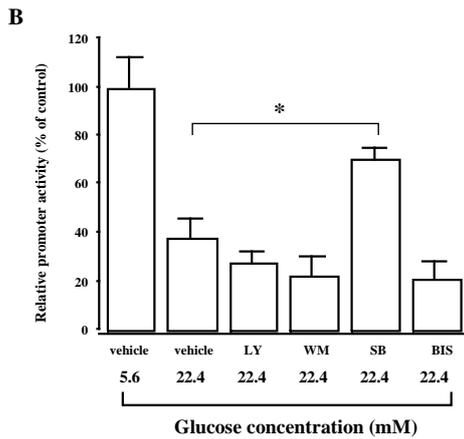


Figure 2. Effect of hyperglycemia on hSR-BI transcriptional activity in HepG2 cells. (A) Hyperglycemia decreases hSR-BI gene transcription. (B) A p38-MAPK inhibitor blocks the actions of hyperglycemia.

さらに細胞内情報伝達系 p38-MAPK pathway は転写因子 Sp1 の活性化、Sp1 による SR-BI/CLA-1 の転写抑制を介していた (Figure 3)。

Figure 3

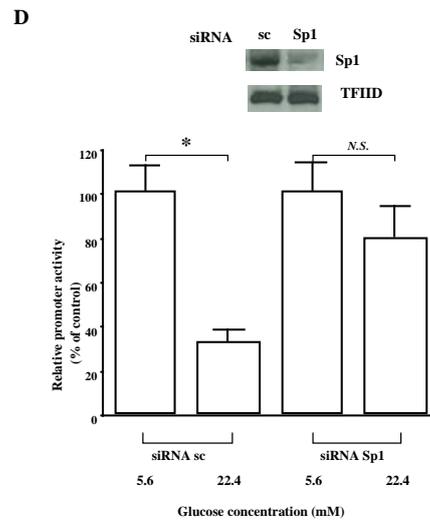
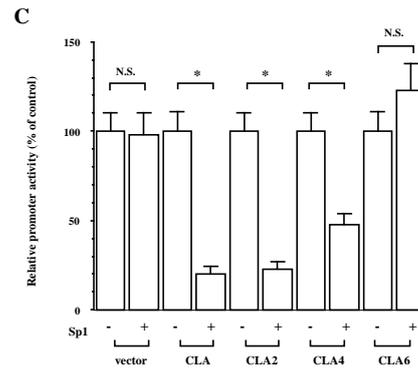
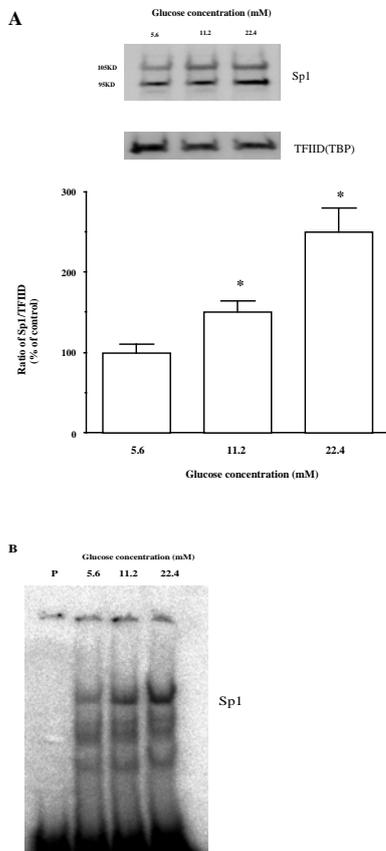


Figure 3. Transcriptional factor, Sp1 is involved in high glucose treatment-induced suppression of hSR-BI transcriptional activity. (A) Dose-dependent induction of Sp1 protein in nuclear protein by glucose. HepG2 cells were exposed to the indicated amounts of glucose for 24 h. (B) Effects of glucose on Sp1 binding to the Sp1 probe. (C) Deletion of the -476 to -210 fragment of the hSR-BI promoter abolished the response to Sp1. (D) Effects of Sp1-knock down on hSR-BI promoter activity in HepG2 cells.

(2) 糖尿病モデル動物を使用した検討でも、高血糖状態では肝臓における SR-BI/CLA-1 が低下する (Figure 4)。

Figure 4

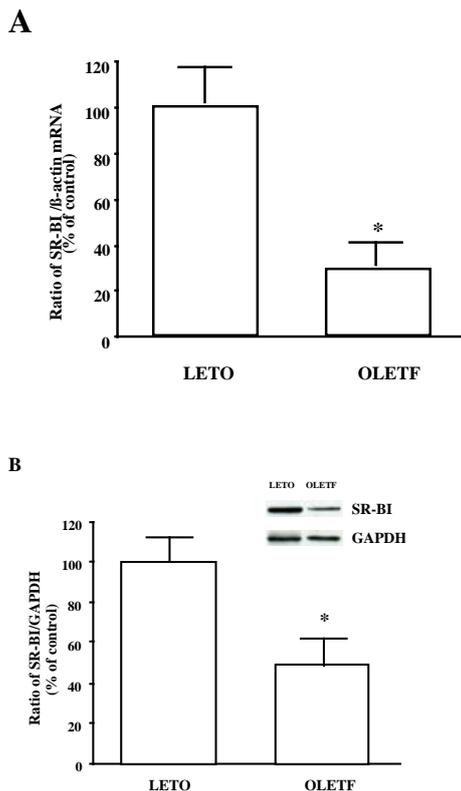


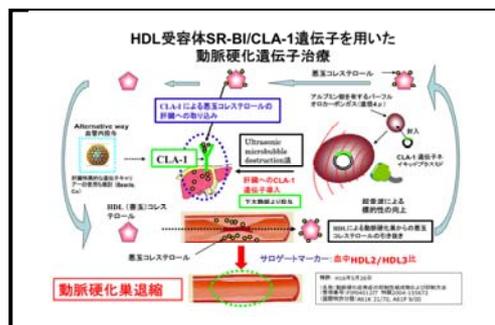
Figure 4. Decreased level of SR-BI in diabetic rats. This graph shows the level of rat SR-BI mRNA (A) and protein (B) in diabetic OLETF rats, as compared to the chow-fed control, LETO rats by a real-time PCR method and western blot analysis, respectively.

(3) 動脈硬化性病変の退縮をターゲットとした SR-BI/CLA-1 の遺伝子導入(マウスへの試み)

糖尿病の合併症としての心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は、我が国における死因の3割を占める。動脈硬化症の危険因子として、高脂血症、高血圧、糖尿病があり、個々の疾患の治療により動脈硬化のリスクを軽減する予防的な治療が行われているが、積極的に動脈硬化病変を退縮させる治療は皆無である。HDL は、動脈硬化病変よりコレステロール逆転送系を介して抗動脈硬化作用を発揮することが知られている。全身血管に病変が存在する糖尿病による動脈硬化症では、コレステロール逆転送系を賦活化する治療が望まれるが、現時点で使用できる薬剤はない。一方、実験的には肝臓に HDL 受容体 SR-BI/CLA-1 を強制発現させることで、HDL 代謝促進→コレステロール逆転送系活性化→全身の動脈硬化巣からのコレステロールを引き抜き→動脈硬化巣退縮が推定されており、ヒトでも同様のストラテジーが極めて

有効であると予測される(図 1)。しかし、本治療には導入遺伝子の長期的な発現が求められる。よって、肝臓への遺伝子導入において、ウイルスベクターなどの外来性抗原の暴露がなく、侵襲性が少ない、繰り返し遺伝子導入が可能な超音波を利用した Ultrasonic microbubble destruction 法を検討し、臨床応用に向けた SR-BI/CLA-1 遺伝子治療法の開発を行う。現在、発現ベクターに肝臓指向性 promoter を挿入し、さらには carbohydrate response element を追加挿入した SR-BI/CLA-1 発現を構築した。我々は、Ultrasonic microbubble destruction 法による遺伝子導入を、in vivo でラットを使用して行った。遺伝子導入効率、特異性をモニターするために、今回は Tag (cMyc) 遺伝子の導入をおこなった。Ultrasonic microbubble destruction 法によって肝細胞に遺伝子導入が可能であった。遺伝子導入された肝細胞には、特に際立った障害を認めなかった。

図 1 : CLA-1 遺伝子治療ストラテジー



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 31 件)

- (1) Exendin-4 regulates GLUT2 expression via the CaMKK/CaMKIV pathway in a pancreatic β -cell line.
Chen K, Yu X, Murao K, Imachi H, Li J, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, Tokumitsu H.
Metabolism. 2011 ;60(4):579-85. 査読有
- (2) Prolactin regulatory element-binding protein involved in cAMP-mediated suppression of adiponectin gene.
Li J, Murao K, Imachi H, Yu X, Muraoka T, Kim JB, Ishida T.
J Cell Mol Med. 2010 ;14(6A):1294-302. 査読有
- (3) Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance.
Imachi H, Murao K, Dobashi H, Bhuyan MM, Cao X, Kontani K, Niki S, Murazawa C,

Nakajima H, Kohno N, Yamashita H, Iwase H, Hayashi S, Ishida T, Yamauchi A. Breast Cancer Res Treat. 2010 ;122(2):395-407. 査読有

- (4) Exendin-4 regulates pancreatic ABCA1 transcription via CaMKK/CaMKIV pathway. Li J, Murao K, Imachi H, Masugata H, Iwama H, Tada S, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, Tokumitsu H. J Cell Mol Med. 2010 ;14(5):1083-7. 査読有
- (5) Hyperglycemia suppresses ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells. Yu X, Murao K, Imachi H, Li J, Nishiuchi T, Hosomi N, Masugata H, Zhang GX, Iwama H, Ishida T. Horm Metab Res. 2010 ;42(4):241-6. 査読有
- (6) Scavenger receptor class BI mediates the anti-apoptotic effect of erythropoietin. Nishiuchi T, Murao K, Imachi H, Yu X, Dobashi H, Haba R, Ishida T. Ann Med. 2010 ;42(2):151-60. 査読有
- (7) Transcriptional factor prolactin regulatory element-binding protein-mediated gene transcription of ABCA1 via 3',5'-cyclic adenosine-5'-monophosphate. Nishiuchi Y, Murao K, Imachi H, Nishiuchi T, Iwama H, Ishida T. Atherosclerosis. 2010 ;212(2):418-25. 査読有
- (8) Human scavenger receptor class B type 1 is regulated by activators of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma in hepatocytes. Ahmed RA, Murao K, Imachi H, Yu X, Li J, Wong NC, Ishida T. Endocrine. 2009 ;35(2):233-42. 査読有
- (9) PREB regulates transcription of pancreatic glucokinase in response to glucose and cAMP. Muraoka T, Murao K, Imachi H, Yu X, Li J, Wong NC, Ishida T. J Cell Mol Med. 2009 ;13(8B):2386-95. 査読有
- (10) The transcriptional factor PREB mediates MCP-1 transcription induced by cytokines in human vascular endothelial cells. Murao K, Imachi H, Yu X, Muraoka T, Hosomi N, Dobashi H, Ishida T. Atherosclerosis. 2009 ;207(1):45-50. 査読有
- (11) Exendin-4 regulates glucokinase expression by CaMKK/CaMKIV pathway in pancreatic beta-cell line.

Murao K, Li J, Imachi H, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, Tokumitsu H. Diabetes Obes Metab. 2009 ;11(10):939-46. 査読有

- (12) Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. Murao K, Yu X, Imachi H, Cao WM, Chen K, Matsumoto K, Nishiuchi T, Wong NC, Ishida T. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 ;294(1):E78-87. 査読有
- (13) Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class BI, a possible HCV receptor in hepatocytes. Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Nishiuchi T, Chen K, Li J, Ahmed RA, Wong NC, Ishida T. Gut. 2008 ;57(5):664-71. 査読有
- (14) The transcriptional factor prolactin regulatory element-binding protein mediates the gene transcription of adrenal scavenger receptor class B type I via 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate. Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Muraoka T, Dobashi H, Hosomi N, Haba R, Iwama H, Ishida T. Endocrinology. 2008 ;149(12):6103-12. 査読有
- (15) The prolactin regulatory element-binding regulates of the 11beta-hydroxylase gene. Imachi H, Murao K, Cao WM, Muraoka T, Nishiuchi T, Dobashi H, Hosomi N, Iwama H, Ishida T. Biochem Biophys Res Commun. 2008 ;21;376(3):531-5. 査読有

[学会発表] (計 35 件)

- (1) 糖尿病における HDL 代謝 (コレステロール逆転送系) 異常
村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、石田俊彦
第 52 回 日本糖尿病学会学術総会, シンポジウム、2009. 4. 27. 大阪国際会議場

[図書] (計 1 件)

- ① 村尾孝児 他, 内分泌代謝テキストブック, Springer, 2011, 印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村尾孝児 (MURAO KOJI)
香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20291982

(2) 研究分担者

井町仁美 (IMACHI HITOMI)

香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80380187

石田俊彦 (ISHIDA TOSHIHIKO)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：50159737

大森浩二 (OHMORI KOJI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：00263913