

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19683

研究課題名(和文) apoE-HDLがアストロサイトの脂質代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of ApoE-HDL on lipid metabolism of astrocytes

研究代表者

高橋 祐司 (TAKAHASHI, Yuji)

北海道医療大学・医療技術学部・講師

研究者番号：60804292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ApoA1-HDL、ApoE-HDLおよび酸化HDLがアストロサイトの増殖率に及ぼす影響を確認した。各HDL分画を超遠心法とアフィニティークロマトグラフィーを用いてTotal HDL、ApoA1-HDL、ApoE-HDLを分取し、硫酸銅酸化後に、HDL酸化度の確認と細胞増殖試験により検討を行った。未酸化のApoE-HDLはアストロサイトの増殖率を増加させ、酸化修飾されたTotal HDLとApoA1-HDLでも有意な細胞増殖率の増加が認められた。各HDL分画の生理的作用と、酸化度の違いによる複合的な要因がアストロサイトの増殖率に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アストロサイトの増殖特性とHDL分画の脂質・蛋白組成、酸化度との関係を明らかにした。特に酸化ApoA1-HDLがアストロサイトの増殖率を増加させることが示した。これは、脳内での酸化ストレス時にアストロサイトの増殖性において重要な知見であると考えられる。また、アストロサイトの増殖において酸化ApoE-HDLの影響は限定的であることも明らかになった。これらの知見は、脳機能の低下に關与する老化や疾患のメカニズムを解明する上で重要な一歩となる。本研究結果は、神経変性疾患や脳障害の治療・予防に向けた新たなアプローチや治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study we investigated the effects of apoA1-HDL, apoE-HDL and oxidised HDL on the growth rate of astrocytes. Total HDL, apoA1-HDL and apoE-HDL were fractionated from each HDL fraction by ultracentrifugation and affinity chromatography, and after copper sulphate oxidation, the degree of HDL oxidation was confirmed and examined by cell growth assays. Non-oxidised ApoE-HDL increased the growth rate of astrocytes, and oxidation-modified total HDL and ApoA1-HDL also showed significant increases in cell growth rate. The results suggest that the physiological effects of each HDL fraction and the combined factors of different degrees of oxidation affect the growth rate of astrocytes.

研究分野：脂質

キーワード：ApoA1 HDL ApoE HDL アストロサイト 脳内酸化ストレス 細胞増殖率

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白質 (High Density Lipoprotein: HDL) は、血漿中ではアポタンパク質 A1 (Apolipoprotein A1: ApoA1) を多く含む ApoA1-HDL と、アポタンパク質 E (Apolipoprotein E: ApoE) を多く含む ApoE-HDL として存在している¹⁾。ApoE-HDL は、コレステロール逆転送系など、血漿リポ蛋白質の代謝に関与しており、ApoA1-HDL に比べてより善玉性が高いことが報告されている²⁾。

脳内ではアストロサイトがアポ蛋白質を新生し、ApoA1-HDL や ApoE-HDL を生成して、脳内脂質代謝の中心的役割を担っている。その中でも ApoE は、細胞間の脂質運搬に関与する重要な役割を持つ糖蛋白である。HDL 中の脂質が過酸化されると ApoE 蛋白分子上のアミノ酸が酸化修飾されて不溶化する。これが細胞間質に蓄積して周囲の細胞を傷害し、アルツハイマー病や動脈硬化症の発症の一因となる³⁾。アストロサイトは、脳血液関門の形成、神経細胞への栄養供給、細胞外液のイオン調節に関与し、神経細胞の生存と働きを助けている⁴⁾。

2. 研究の目的

本研究では、ApoA1-HDL、ApoE-HDL および酸化 HDL がアストロサイトの増殖率に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

総リポ蛋白分画の分離

健康人から採血をおこない血清を分取した。血清に KBr を加え、 $D=1.225$ に調整した。180,000 g, 14 h, 15 °C で超遠心分離した (超遠心機: Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge, ローター: TLA-120.2, BECKMAN COULTER, USA)。超遠心分離後、上層を採取し、総リポ蛋白を得た。その後、回収した上層を 4°C 一晩透析を行い KBr を除去した。

Total HDL の分離

透析後の総リポ蛋白分画に PEG (PEG 6,000 FUJIFILM, Japan) 溶液を等量混合し、室温で 10 min 静置した。シリンジフィルター (MCE Syringe Filter Pore Size: 0.22 μm , USA) を 2 回通過させ、LDL と VLDL を除去した⁵⁾。これを、以降の実験で Total HDL として用いた。

ApoA1-HDL、ApoE-HDL の分離

各 HDL 亜分画は、ヘパリンアフィニティクロマトグラフィを用いた Takahashi らの方法により分離した⁵⁾。溶出液は L-5200 Fraction Collector (日立ハイテクサイエンス, Japan) を用いて、Fraction No.1-30 に分画した。

蛋白および脂質濃度の測定

各フラクションの総蛋白濃度は、プロテインアッセイブラッドフォード試薬 (FUJIFILM, Japan) を用いて測定した。脂質およびアポ蛋白濃度の測定はコレステスト N、アポ A1/B/E オート・N「第一」(積水メディカル, Japan) を用いて濃度を測定した。Fraction No.9, 10 を ApoA1-HDL、No.14, 15 を ApoE-HDL として以降の実験に用いた。

Total、ApoA1、ApoE-HDL の酸化

各 HDL 分画の蛋白濃度を 1 mg/mL に調整し、CuSO₄ を加え酸化を行った。酸化時間 (0, 1, 2, 24 h) 経過後に EDTA を加え、酸化を停止させた⁶⁾。

HDL 酸化度の確認

アガロースゲル (タイタンジェル ユニバーサルプレート, ヘレナ研究所, Japan) に試料を塗布し、90 V で 20 min 電気泳動した。Fat Red 7B により脂質染色を行い、デンストメトリを行い HDL の移動度より酸化度を確認した。

酸化 HDL の細胞増殖率への影響

アストロサイトを 30,000 cells/mL に調整し、37°C, 24 h 前培養した。その後、各酸化 HDL 分画を 10 μ L ずつ負荷し 37°C 24 h で培養した。細胞増殖率の算出には Cell Counting Kit-8 (FUJIFILM, Japan) を用いて WST8 で評価した。HDL 未添加のウェルは、透析に用いたバッファーと、同条件の硫酸銅と EDTA を加えたものを対照として各 HDL 分画の増殖率を求めた。

統計解析

統計ソフトは EZR を用いて、酸化時間の経時的変化については反復測定分散分析、各 HDL の群間比較には一元配置分散分析にて解析を行った。

4. 研究成果

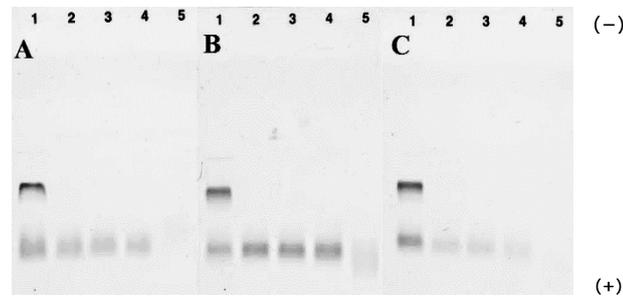


図 1. 酸化 HDL の電気泳動像 (A: Total HDL, B: ApoA1-HDL, C: ApoE-HDL). Lane 1 に総リポ蛋白, Lane 2-5 に酸化 HDL (0, 1, 2, 24h) を塗布した。24h 酸化で HDL バンドはスメア状に変化した。

Total HDL	N.S	N.S	<0.01
ApoA1-HDL	N.S	<0.01	<0.01
ApoE-HDL	N.S	N.S	N.S

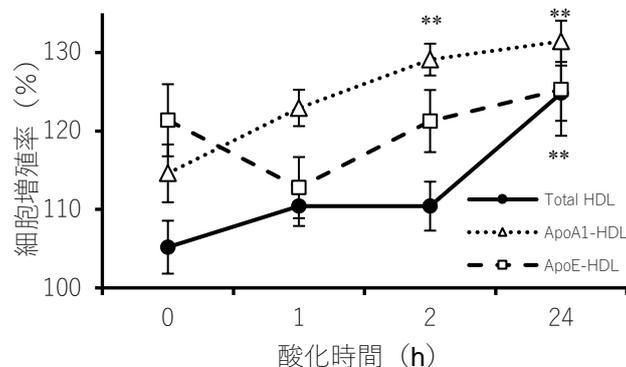


図 2. 各 HDL 分画の酸化時間と細胞増殖率への影響。Total HDL と ApoA1-HDL の 24h 酸化ではそれぞれ、 125 ± 3.5 % [平均 \pm SE]、 131 ± 2.6 % で有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.01$)。ApoE-HDL は酸化時間と増殖率の変化に有意な差は認められなかった

【考察】

アストロサイトは、脳内脂質代謝の中心的役割を担う細胞であり、通常脳内では増殖は停止しているが、脳組織が損傷を受けた際には、組織の修復のために増殖することが報告されている⁷⁾。アストロサイトは通常突起は細かく分岐し、その先端は薄いシート状の形態をとっている⁸⁾。

各 HDL 分画の酸化度では、Total HDL、ApoA1-HDL および ApoE-HDL のすべてで、24 h 酸化によりバンドがスメア状となり、酸化修飾されていた(図 1)。短時間の酸化では、ApoA1-HDL と ApoE-HDL の電気泳動移動度に大きな差は認められなかった。

この各 HDL 分画の酸化が及ぼす影響を確認するため、作製した酸化 HDL を負荷して細胞増殖率を確認した(図 2)。未酸化 HDL (0h) の増殖率を基準に、酸化時間の経過と増殖率の増減を比較したところ、Total HDL と ApoA1-HDL は 24 h 酸化で有意な増殖率の増加が認められた($p < 0.01$)。特に ApoA1-HDL では、より早期の 2 h から増加が認められていた。ApoE-HDL は 24 h まで増殖率の変化は認められておらず、酸化によるアストロサイトへの影響は小さいことが示唆された。これらは、脳内で脂質供給を担うアストロサイトの増殖性に作用したと考えられたが⁹⁻¹¹⁾、多種の receptor を持つアストロサイトは¹²⁾、HDL 酸化により異なる機序を介して細胞増殖を活性化していると考えられる。細胞は強い酸化ストレスに曝されると ATM や DNA-PKcs 等を介して細胞死へと誘導されるが、緩やかな酸化ストレスは、PI3K や MAPK 等を介して増殖や分化を促進する¹³⁾。本研究では、酸化 HDL の中でも特に酸化 ApoA1-HDL で増殖率の増加が大きいことから、ApoA1-HDL が酸化されやすく、細胞増殖を誘導する酸化 HDL 種であると考えられた。

長時間の酸化(24 h)では、元々ある ApoE-HDL の増殖作用に加えて、酸化 ApoA1-HDL に応答した増殖促進作用が加わることで各 HDL 分画間に存在した増殖率の差が消失したものと推測される。ApoE-HDL は酸化による細胞増殖率への影響が少ないと考えられたが、より詳細な遺伝子発現等を検討する必要がある。

<引用文献>

- 1) Krimbou L et al. Characterization of human plasma apolipoprotein E-containing lipoproteins in the high density lipoprotein size range: focus on pre-P₂-LpE, pre-P₁-LpE, and a-LPE. *J Lipid Res* 38: 35-48, 1997.
- 2) Matsuura F et al. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest* 116:1435-42, 2006.
- 3) 中村和行 他. ヒト VLDL の酸化修飾と 4-hydroxy 2-nonenal を介したアポリポ蛋白 E3 の分子間架橋に及ぼすヘパリンの影響. *生物物理化学* 42:27-34, 1998.
- 4) Stobart JL et al. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci* 7:38, 2013.
- 5) Takahashi Y et al. Development of homogeneous assay for simultaneous measurement of apoE-deficient, apoE-containing, and total HDL-cholesterol. *Clin Chim Acta* 454:135-142, 2016.
- 6) Hui S-P et al. Quantitative determination of phosphatidylcholine hydroperoxides during copper oxidation of LDL and HDL by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403:1831-1840, 2012.
- 7) Endo M et al. Critical role of Ror2 receptor tyrosine kinase in regulating cell cycle progression of

- reactive astrocytes following brain injury. *Glia* 65: 182–197, 2017.
- 8) 工藤佳久 他. アストロサイトの構造と機能. *Japanese J Biol Psychiatry* 28:58–63, 2017.
 - 9) Mauch DH, Nägler K et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357, 2001.
 - 10) Michikawa, M. et al. Apolipoprotein E4 Induces Neuronal Cell Death Under Conditions of Suppressed De Novo Cholesterol Synthesis. *J. Neurosci. Res* 54:58-67, 1998.
 - 11) Dietschy JM, T. S. et al. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12:105–112, 2001.
 - 12) Ito, J. et al. Mechanism for ApoE/HDL Generation and Cholesterol Homeostasis in the Brain. *Membrane* 32:259-265, 2007.
 - 13) Rhee, S. G. et al. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312:1882–1883, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------