

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月5日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22590057

研究課題名（和文） 脳の恒常性維持に対する高コレステロール血症の影響とその機構

研究課題名（英文） The influence and the mechanism of hypercholesterolemia to cerebral homeostasis

研究代表者 石井 伊都子 (Ishii Itsuko)

千葉大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00202929

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高コレステロール血症による血管透過性亢進のメカニズムを明らかにすることとした。マウスに高コレステロール食を給餌すると、血液中に好中球が増加し MMP9 を分泌し ZO-1 を破壊することで BBB の透過性が亢進した。また、同様のメカニズムで腎機能も著しく低下することが明らかになった。これらの病態は薬剤投与により改善された。高コレステロール血症状態では血中にアクロレイン化リポタンパク質が存在し、これらがマクロファージの泡沫化を促進した。

研究成果の概要（英文）：

We have found that cholesterol is accumulated in a brain and renal functions reduce in mice fed a high cholesterol diet. In this research, it was aimed to clarify the mechanism of increase of the vascular permeability by hypercholesterolemia of mice fed a high cholesterol diet. In the high cholesterol fed-mice, the activity of MMP9 in blood increased intentionally. The ratio of the lymphocyte in blood decreased, and that of neutrophils statistically increased. These data suggested that the permeability of BBB might be increased by MMP9 derived from neutrophils which degrades ZO-1. When mice fed a high cholesterol diet were treated ezetimibe or cholestyramine, the blood cholesterol level, MMP9 level and the ratio of the neutrophil in blood decreased. Especially, the cholestyramine which induces bile acid excretion also recovered HDL level, inhibition of induction of BBB permeability was high, and a part of renal function was also recovered. Since we found that acrolein increased in blood of hypercholesterolemia of mice fed a high cholesterol diet, we clarify whether lipoproteins modified with acrolein induces to form foam cells from macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2011年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
2012年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：脳、コレステロール、血液脳関門、血管透過性

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症の中でも高コレステロール血症は心筋梗塞、脳梗塞などの心血管系疾患の重要なリスクファクターとして知られているだけでなく、最近ではアルツハイマーとの関連も指摘されはじめている。体循環には LDL をはじめとする複数のリポ蛋白が存在するが、脳内には主に ApoE によって産生される HDL 様の粒子が存在する。しかし、これまでの疫学調査はスタチンの投与によりアルツハイマーの発症が抑制される場合と (Lancet, 2000:356;1627, Arch. Neurol., 2000:57;1439, Neurology, 2007:60;878)、抑制は認められないとする報告 (Arch. Neurol., 2004:61;705, Neurology, 2005:64;1689) があり、関連性は示されるものの一貫した見解は得られていない。モデル動物においては、アルツハイマーモデル動物である β アミロイド ($A\beta$) 過剰発現マウスや apoEKO マウスにおいて高コレステロール給餌時の脳内 $A\beta$ の生成が促進され、コレステロール低下薬によりその生成が抑制されたという報告がある (Neurobiolo. Dis., 2000:7;321, Neurobiolo. Dis., 2001:8;890-899, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001:98;5856)。また、アルツハイマー病において神経原繊維変化を引き起こす Tau は微小管からはずれて細胞質中で重合し可溶性オリゴマー、繊維状 Tau を形成し神経原線維変化となり、アルツハイマー病の臨床症状を引き起こす執行役を果たしているのではないかと考えられる。

血液脳関門 (BBB) は中枢と末梢との間のバリアとして機能し、中枢神経系の生化学的な恒常性が極めて高度に維持されている。しかし、脳卒中やアルツハイマーになると BBB の透過性が亢進することが報告されている (Pharmacol. Rev., 1997:49;143)。BBB の透過性に関する動物実験では、高コレステロール食を負荷したウサギ (Neruchem., 2006:99;438) や apoE KO マウス (Exp. Neurol., 2001:169;13, Lab. Invest., 2001:81;953) でその亢進が観察されており、高コレステロール血症が BBB の透過性に影響を及ぼす可能性が示唆される。しかし、これまでに野生型マウスにコレステロールを負荷することにより BBB の透過性が亢進するという報告はされていない。

我々のこれまでの実験から野生型 C57Bl/6 マウスに高コレステロール食を 4 ヶ月以上給餌し、共鳴画像法 (MRI) を用いて BBB の透過性を測定すると、鋭敏な BBB 透過性の検出力をもつとされる造影剤 3-Carboxy-PROXYL が、普通食群では脳内に検出されなかったのに対して、コレステロール給餌群では脳内に強い信号が検出され

緩やかに衰退することを確認した。これらのコレステロール給餌群マウスの脳には、正常マウスで見られないコレステロールエステルの蓄積がわずかに観察された。また、高コレステロール給餌を 11 ヶ月まで行うと、脳内に発現している mRNA に種類や量に大きな変化が起きていることをマイクロアレイにて確認した。以上より、高コレステロール給餌による高コレステロール血症により、マウスの BBB の透過性が亢進し、血中の物質が脳に到達する可能性が示されている。また、高コレステロール給餌マウスは BBB だけでなく、腎機能も低下していることを事前に思いだしている。

2. 研究の目的

本研究では、高コレステロール食給餌マウスを用いて、高コレステロール血症による血管透過性亢進のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BBB の透過性亢進のメカニズムについて

C57Bl/6 マウス雄に高コレステロール給餌し、高コレステロール血症状態を作製して、以下の項目を検討した。

(1-1) BBB 破綻メカニズムの解明: BBB には ZO-1 という蛋白が存在しタイトジャンクションを形成する。この蛋白は MMP2 や MMP9 のようなゼラチナーゼ活性を有するプロテアーゼの基質となるため、血中に分泌されている MMP2 および 9 の量と活性測定から、血中コレステロール値と MMP 分泌の関係性を明らかにした。

(1-2) BBB の透過性亢進を抑制する薬剤のスクリーニングとそのメカニズムの解明: 高コレステロール食給餌 C57Bl/6 マウスに対して、血清コレステロール低下作用薬 (スタチン、エゼチミブ、コレステラミンなど) を同時投与し、BBB の透過性亢進が抑制されるかどうかを検討する。抑制する薬剤に対しては、そのメカニズムも検討した。

(2) アクロレイン化リポタンパク質が細胞に及ぼす影響

脳梗塞が起きたときに、血中の悪路レン濃度が増加することが明らかになっている。アクロレインはタンパク質のリジン残基に容易に結合し、修飾する。リポタンパク質のアクロレイン化を検出し、アクロレイン化リポタンパク質がマクロファージの泡沫化を惹起するか検討した。また、そのメカニズムについては、酸化リポタンパク質と比較しながら検討した。

(3) 腎臓由来細胞におけるリポ蛋白質の影響

SPECT を用いて高コレステロール食給餌マウスは BBB だけでなく腎臓の血管の透過性が亢進し、腎機能の評価を行った。ブタ腎臓近位尿管由来上皮細胞株 LLC-PK14 およびマウスメサングウム細胞 MES13 を用いて、それらの細胞に対するリポ蛋白質の影響を明らかにした。

4. 研究成果

特に本年度は、BBB 破綻メカニズムの解明を明らかにすることとした。BBB には ZO-1 という蛋白が存在しタイトジャンクションを形成する。この蛋白は MMP2 や MMP9 のようなゼラチナーゼ活性を有するプロテアーゼの基質となる。そこで、高コレステロール食給餌マウスの血中に分泌されている MMP2 および 9 の量と活性測定したところ、MMP9 の活性が有意に増加した。また、血液中に含まれる白血球の組成を調べたところ、リンパ球の割合が減少し、好中球の数が有意に増加していた。これまでの研究から好中球は MMP9 を分泌することが知られている。従って、マウスに高コレステロール食を給餌すると、血液中に好中球が増加し MMP9 を分泌し ZO-1 を破壊することで BBB の透過性が亢進したと考えられる (発表論文 3, 4)。

高コレステロール食給餌 C57Bl/6 マウスに、血清コレステロール低下作用薬 (プラバスタチン、アトルバスタチン、エゼチミブ、コレステラミンなど) を同時投与し、BBB の透過性亢進が抑制されるかについて MRI を用いて検討したところ、両スタチンとも効果がなく、エゼチミブやコレステラミンで BBB 透過性が抑制されていた。スタチンはマウスの高コレステロール血症に対して効果がなく、その結果と一致していた。一方、エゼチミブやコレステラミン投与群では、血中コレステロール値が有意に低下し、血中の好中球の割合が減少し、MMP9 値も低下していた。特に、胆汁酸排泄を促すコレステラミンは血中の HDL も有意に回復し、BBB 透過性亢進に対する抑制効果が高かった (発表論文 4)。このとき、腎機能の一部が回復していた (発表論文 3)。

脳内の繊維化について病理切片を用いて観察したところ、高コレステロール食給餌マウスにおいて大きな変化はなかったが、細胞が所々で脱落していた。また、高コレステロール食給餌マウスでは脳内にコレステロールエステルがわずかに蓄積していることが解ったが、普通食マウスに比べて有為差はなかった。これは、今後の検討課題である。

高コレステロールを 4 週間給餌マウスの脳下垂体前葉ホルモン mRNA の発現量が低下していることをもとに、高コレステロールを

11 週間給仕した。脳下垂体由来 mRNA に加えて、約 30 種類の mRNA の発現が増加し、約 50 種類の mRNA の発現が減少していることが明らかになっている。その内の成長ホルモンは mRNA が 1/10 以下に減少していることがわかったが、血中に分泌される成長ホルモンの濃度を ELISA にて定量することは出来なかった。成長ホルモンの定量については、今後の課題である。

高コレステロール血症状態では、血中にアクロレインが増加し、リポタンパク質を修飾することを見いだしたため、アクロレイン化リポタンパク質を用いて、動脈硬化の第一段階であるマクロファージの泡沫化が誘導されるかを明らかにした。アクロレイン化 LDL はスカベンジャーレセプターを介してマクロファージに取り込まれ、リソソームを経由した後、余剰のコレステリルエステルは細胞質中で脂質球として蓄積されることが明らかになった (発表論文 1)。生体内の血中タンパク質の酸化とアクロレイン化を比較したところ、脳梗塞がおこると圧倒的にアクロレイン化タンパク質が増加することが明らかになった (発表論文 2)。

高コレステロール食給餌マウスは BBB だけでなく腎臓の血管の透過性が亢進し、糸球体ろ過量や再吸収量が減少する等腎機能が低下していることが示された (発表論文 4)。このメカニズムを明らかにするために、ブタ腎臓近位尿管由来上皮細胞株 LLC-PK14 およびマウスメサングウム細胞 MES13 に動脈硬化惹起性リポタンパク質である β VLDL を添加したところ、LLC-PK14 は増殖が抑制された。細胞は β VLDL を取り込み、リソソームを介して細胞内に蓄積されるが、その際遊離コレステロールが有意に増加していた。従って、遊離コレステロールが細胞膜に移行し、毒性を示すため、細胞増殖がよくされたと考えられる。この結果については、現在投稿中である。

以上より、食餌性高コレステロール血症による BBB 破壊の一部は薬物で防げること、アクロレイン化蛋白によりマクロファージが泡沫化すること、動脈硬化惹起性リポタンパク質に反応し増殖が抑制される腎臓の細胞が存在することが明らかになった。

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 4 件)

1. Watanabe K, Nakazato Y, Saiki R, Igarashi K, Kitada M, Ishii I (2013) Acrolein-conjugated low-density lipoprotein induces macrophage foam cell formation. *Atherosclerosis*.

- 227(1):51-7. 読有り
2. Yoshida, M., Mikami, T., Higashi, K., Saiki, R., Mizoi, M., Fukuda, K., Nakamura, T., Ishii, I., Nishimura, K., Toida, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2012) Inverse correlation between stroke and urinary 3-hydroxypropyl mercapturic acid, an acrolein-glutathione metabolite. *Clin. Chim. Acta.* 413(7-8):753-9 読有り
 3. Tomizawa, A., Hadjidekov, G., Ishii, I., Bakalova, R., Zhelev, Z., Aoki, I., Saga, T., and Kitada, M. (2011) Nitroxide derivatives for imaging of hypercholesterolemia-induced kidney dysfunction and assessing the effectiveness of anti-lipidemic drugs. *Mol. Pharm.* 8:1962-9. 読有り
 4. Tomizawa, A., Ishii, I., Zhelev, Z., Aoki, I., Shibata, S., Kitada, M., and Bakalova, R. (2011) Carbamoyl-PROXYL-enhanced MRI detects very small disruptions in brain vascular permeability induced by dietary cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subjects* 1810:1309-16. 読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. 渡辺健太, 五十嵐一衛, 石井伊都子 (2013)アクロレイン化 LDL によるマクロファージの泡沫化経路の検討. 日本薬学会第 133 年会. (要旨集 CD-ROM 29pmC-232S, 2013)
2. Ishii, I. (2012) Kefiran Reduces Atherosclerosis in Rabbits Fed a High Cholesterol Diet (Symposium). *The 8th Congress of Toxicology in Developing Countries (SCTDC) September 10-13, 2012 - Bangkok, Thailand* (Abstract p19, 2012)
3. 石井伊都子, Rumiana Bakalova, Zhivko Zhelev, 青木伊知男, 北田光一 (2011) 食餌性高コレステロール血症由来腎機能障害に対する MR イメージングによる抗高脂血症薬の効果の評価. Nitroxide derivatives for imaging of hypercholesterolemia-induced kidney dysfunction and assessing the effectiveness of anti-lipidemic drugs. 第 84 会日本生化学会大会. [要旨集 4T8p-2(4P-0049), 2011]
4. 野村里香, 石井伊都子, 富澤宏之, 藤内真実, Bakalova Rumiana, 有吉範高, 北田光一 (2011) 食餌性高コレステロー

ル血症がマウス腎臓に及ぼす影響. 日本薬学会第 131 年会. (要旨集 3 p84, 2011)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者:石井 伊都子(Ishii Itsuko)
千葉大学・医学部附属病院・教授
研究者番号:00202929

(2)研究分担者:なし
()

研究者番号:

(3)連携研究者:なし
()

研究者番号: