

## 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24年5月31日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790868

研究課題名（和文）脳障害修復におけるアポE遺伝子の発現制御機構

研究課題名（英文）Regulation of the apoE gene in astrocytes as a mechanism for recovery of brain injury

研究代表者

呂 鋭 (RO EI)

中部大学・生物機能開発研究所・研究員

研究者番号：80381862

研究成果の概要（和文）：脳に傷害がおこると、アストログリア細胞が反応してapoEの合成が高まりHDL粒子として放出される。我々は、これが傷害の修復に重要な役割を果たすこと、またapoE-HDL産生／放出は、脳の傷害によりアストログリア自身が合成／放出するFGF-1によるオートクリン／パラクリン反応により刺激されることを示した。アストログリアではFGF-1の刺激は、コレステロールの合成にはMEK/ERK、apoE-HDLの細胞内輸送と分泌にはPI3K/Aktでそれぞれ伝えられ、apoEの転写促進にはさらに独立の情報伝達系の関与が示唆される。本研究では、アストロサイトにおけるFGF-1によるapoE遺伝子の制御機構について、FGF-1は、LXR発現及びLXR ligand生合成によって、apoE発現を誘導することを解明した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism for FGF-1 to upregulate apoE transcription. FGF-1 was shown to enhance apoE transcription through the increase of interaction of the liver X receptor (LXR)  $\alpha$ , a nuclear receptor for oxysterol being involved in sterol homeostasis, with a conserved direct repeat 4 (DR4) sequence in LXR response element (LXRE) present in the apoE promoter. This reaction was mediated by the increase of LXR $\alpha$  expression and by the production of its ligand.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：アポリポ蛋白質 E, FGF-1, プロモーター、アストロサイト、LXR

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、マウスの脳の傷害後の修復が apoE 欠損マウスで遅延すること、また、その周辺のアストログリアではまず FGF-1 の産生が増加しその後 apoE の産生が高まることを見いだした (Neurochem. Int. 45: 23, 2004)。

さらに、一次培養アストログリアを長期培養などでストレスを与えると FGF-1 が産生放出され、これがアストログリア自身を刺激して apoE-HDL 産生を高めることが示され (BBA 1589: 261, 2002; JLR 46: 679, 2005)、この時 FGF-1 の刺激は、コレステロール合成系には MEK/ERK によって、apoE の細胞内輸送／

分泌には PI3K/Akt によって伝えられることが分かった (JLR 48: 2020, 2007; JLR 50: 1156, 2009)。しかし、FGF-1 が受容体を介して最初に利用する mediator と apoE の転写を促進する情報伝達系の詳細は未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳傷害修復における apoE-HDL の役割の詳細な研究の一環として、アストログリアにおける FGF-1 が apoE-HDL 産生を高めるための情報伝達機構を解明する。研究の課題は、1) FGF-1 による apoE 転写促進の機構の詳細な検討、2) FGF-1 による情報伝達の起動シグナルの同定、と設定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 一般的方法論

アストログリア細胞は、ラット胎児小脳細胞を各一週間一次・二次培養することで調整する。対照細胞としてマウス繊維芽細胞 3T3.L1 を用いる。FGF-1、FGF-1 受容体阻害剤 (SU5402 など)、情報伝達因子阻害剤 (Src 阻害剤の PP1 や SU6656 など)、各因子の抗体やそれらの燐酸化物の抗体、その他は市販のものを使用する。ラット apoE の抗体はカナダ・アルバータ大学 JE Vance 教授より提供された。SiRNA による遺伝子発現の抑制、Luciferase 法によるプロモータ活性の検索、クロマチン免疫沈降法などによる解析は定法による。燐脂質・コレステロールの測定は酵素学的に行う。コレステロール生合成は放射性標識酢酸からの取り込みにより測定する。

(2) FGF-1 による apoE-HDL 産生促進のためのシグナルの起動。

① FGF-1 に対する膜受容体の関与を、FGF 受容体活性を SU5402 などの阻害剤や特定の受容体の発現を siRNA により抑制し、MEK/ERK や PI3K/Akt 系刺激への影響と、標的反応であるコレステロール合成刺激、apoE の分泌促進、apoE の転写促進への影響を観察して、関与する受容体を同定。

② 受容体刺激を下流へ媒介する因子を Src と想定、特異的阻害剤と発現抑制を用いて検証する。

③ PI3K/Akt 系による apoE-HDL 分泌/放出促進の標的反応を同定する。PI3K/Akt 阻害の条件化で FGF-1 を過剰に作用させ、apoE-HDL の分泌/放出の障害がその形成と輸送、分泌/放出のどの段階に起こるのかを、同定する。これにより apoE-HDL 形成の機構の解明に繋がる情報が得られる。

④ FGF-1 による一連の情報伝達系が、apoE 合成能を持たない繊維芽細胞などの対照系でどのように起こるのかを、アストログリアと

同じ指標を用いて検証する。

(3) FGF-1 による ApoE 遺伝子の転写促進の機序を解明する。

① ApoE 遺伝子のプロモータの構造/機能相関の解析から、FGF-1 による遺伝子制御の機序を明らかにする。

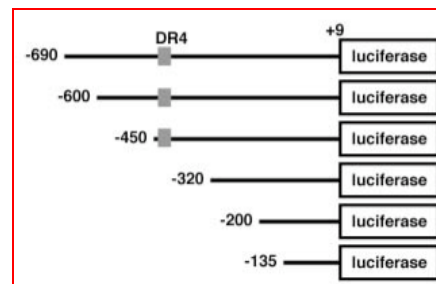
② 25-OH コレステロールの産生促進について、MEK/ERK 系シグナルの役割を同定する。これまでの検討では FGF-1 によるコレステロール 25 水酸化酵素の発現促進が同定されており、この酵素の発現や阻害が LXR の活性化を通じてどのように ApoE 遺伝子の転写促進をもたらすかを、siRNA による発現抑制などにより検証する。

③ FGF-1 の LXRalpha 遺伝子の転写促進の機構を、LXRalpha 遺伝子のプロモータ解析により、解明する。FGF-1 からこれに至る PI3K/Akt と MEK/ERK とは独立した情報伝達経路を解明する。

## 4. 研究成果

(1) FGF-1 は、apoE の発現を誘導する。FGF-1 誘導した apoE の発現は LXRα dependent である。FGFR1 inhibitor によって、LXRα 及び apoE mRNA level 完全に抑制されますが、MEK/ERK inhibitor であり U0126 によって、部分的抑制されます。PI3K/Akt pathway inhibitor であり LY294002 では影響ありません。

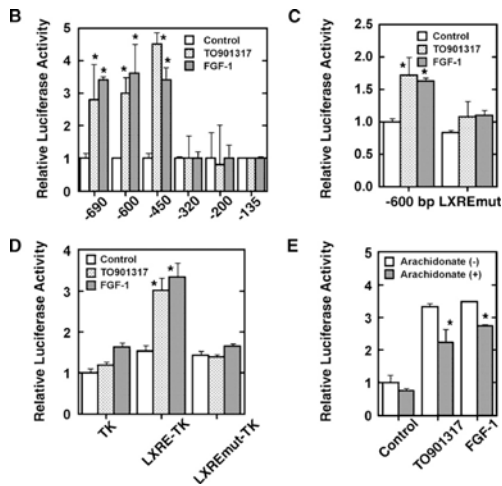
(2) FGF-1 により apoE 発現の upregulation の分子機構を調べるため、rat apoE gene promoter をクロニングし、六つ reporter gene construct を作成した。ラット apoE プロモータの解析により、FGF-1 刺激が LXR alpha を介して起こることを証明した。



### DR4 and Its Mutation

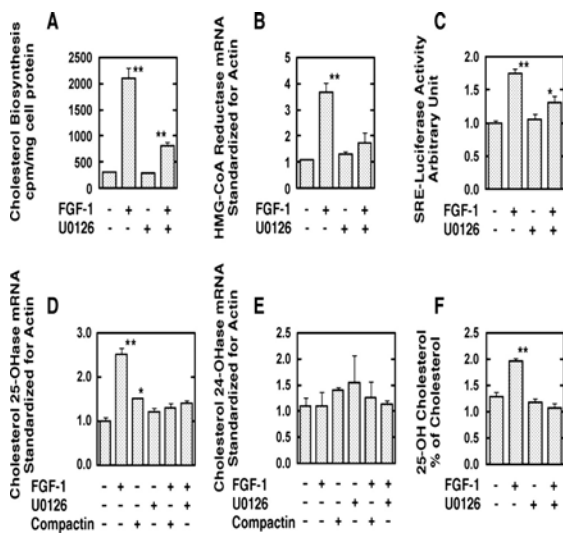
```

-450  AGAGTTCACC GTGGCAGAGG AATCACTACA
      ttaa
-420  CTACAGAGGG GCCAGGGCTA AAACACAGTT
-390  TTCATCCCAG AAGCTGAGCC TCTTAACAGA
-360  TAGAGCCCCC CACCTATTTC CATTAAAGCC
-330  TCCAGCCCTT
  
```



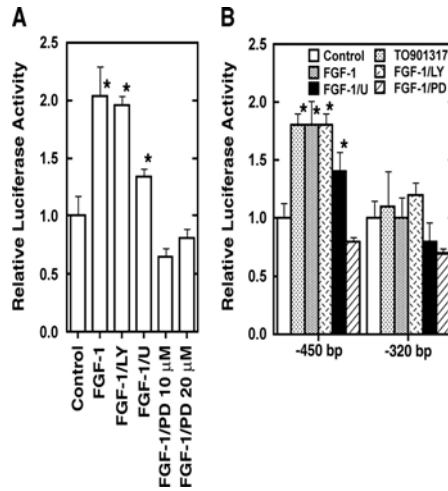
(The results of the reporter gene assays to identify the element responsible for activation by FGF-1 in the apoE promoter or in the heterologous TK promoter that contains 4X DR4s.)

(3) FGF-1によりLXR ligandのproductionについて調べた結果、FGF-1 cholesterol 生合成を促進し、HMG-CoA reductase geneの発現を促進する。FGF-1はSRE-reporter assay systemを活性化することから、これらの促進は、SRE binding protein systemによるものと考えられる。さらに、FGF-1は25-hydroxycholesterolへの転換を促進することを証明した。これらのFGF-1の一連の効果はすべてMEK/ERK inhibitorによってblockされた。これらの結果から、FGF-1はLXR ligandであり25-hydroxycholesterolを増加させ、apoE gene 発現を促進することを考えられる。



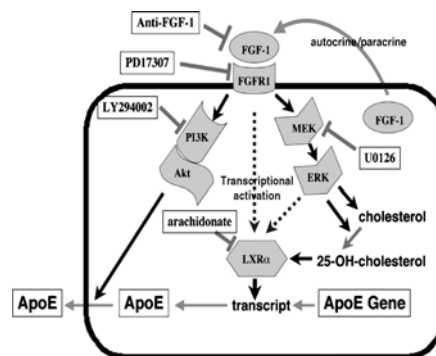
(The effects of FGF-1 to increase cholesterol biosynthesis and production of 25-hydroxycholesterol )

(4) FGF-1のapoE 転写の促進は、PI3K/Akt inhibitorとMEK/ERK inhibitorに影響されないことを報告した。これらのinhibitorがある条件下で、FGF-1に対するapoE reporter geneのresponseを調べた。FGF-1は転写を活性化しますが、FGFR1 inhibitorによって、その活性化はcancelされた。Akt inhibitorは全然影響ないが、MEK/ERK inhibitorでは、その活性化を部分的抑制した。LXREを含んでいない reporter geneでは、これらのresponseは消失した。



(The effect of inhibitors for FGFR1, the MEK/ERK pathway, and the PI3K/Akt pathway on the reactions induced by 50 ng/ml FGF-1.)

(5) まとめて、アストロサイトにおけるFGF-1によるapoE遺伝子の制御機構について、FGF-1は、LXR発現及びLXR ligand生合成によって、apoE発現を誘導することを解明した。



(A schematic model for mechanism by FGF-1 to increase production of apoE-HDL in rat astrocytes.)

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呂 銳 (RO EI)

中部大学・生物機能開発研究所・研究員

研究者番号：80381862

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし