

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591335

研究課題名(和文) ヒト分泌型VLDL受容体濃度測定 of 臨床的意義とその生理機能の解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of secretory form of VLDL receptor

研究代表者

高橋 貞夫 (Takahashi, Sadao)

福井大学・医学部・特別研究員

研究者番号：50303376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：VLDL受容体遺伝子が選択性スプライシング機構によりO-結合糖ドメインの有無による全長型の1型VLDL受容体とO-結合糖ドメインが欠如する2型VLDL受容体の2種類の蛋白が産生されている。我々は、2型VLDL受容体が血中に存在することを見出し、ヒト血中分泌型VLDL受容体測定法(2抗体ELISA法)を確立した。正常者 5.29 ± 1.41 ng/ml、糖尿病患者 7.80 ± 3.64 ng/mlで、糖尿病患者において血中分泌型VLDL受容体濃度が高値である症例が存在することを確認した。また、成長やマクロファージ泡沫化過程で1型VLDL受容体蛋白が優位に発現されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In vivo and in vitro studies have shown that the VLDL receptor bind TG-rich lipoprotein (TGRL) but not LDL and function as a peripheral lipoprotein receptor even though the LDL receptor bind both TGRL and LDL. Two VLDL receptor proteins (type1 and type2) are produced by alternative splicing mechanism. We elucidated that type2 VLDL receptor lacking the O-linked sugar domain bound lower affinity for TGRL than type1 VLDL receptor. Type1 VLDL receptor was expressed predominantly during monocyte-macrophage differentiation and growth. Type2 VLDL receptor was secreted into medium and we established the method for measurement of human secretory form of VLDL receptor (sVLDL-R). Level of human sVLDL-R in diabetes was higher than healthy control.

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：VLDL受容体 選択的スプライシング ヒト血中分泌型VLDL受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 超低比重リポ蛋白 (VLDL: very low-density lipoprotein) 受容体の発見とその特徴

世界でもっとも多い遺伝子病の 1 つである家族性高コレステロール血症 (FH: familial hypercholesterolemia) の病態とその病因の解明は、テキサス大学の Goldstein と Brown 両博士により解明され、1985 年にノーベル医学生理学賞が授与された。1984 年に Goldstein・Brown 研究室で、FH の原因遺伝子である低比重リポ蛋白 (LDL: low-density lipoprotein) 受容体 cDNA クローニングに成功し、日本に帰国した山本徳男博士 (現: 東北大学加齢医学研究所) のもとで、ウサギとヒトの超低比重リポ蛋白 (VLDL) 受容体 cDNA クローニングが行われた。VLDL 受容体は日本で発見された遺伝子である。

(2) 構造と組織分布

VLDL 受容体は LDL 受容体とその構造上の相同性が高く、リガンド結合ドメイン・EGF 前駆体相同ドメイン・O-結合糖ドメイン・細胞膜貫通ドメイン・細胞質ドメインの 5 つのドメインより構成されているタンパク質である。LDL 受容体が第 19 染色体上に存在するのに対して、VLDL 受容体は第 9 染色体に存在している。VLDL 受容体と LDL 受容体の構造上の特徴的な相違は、リガンド結合ドメインの 40 アミノ酸の繰り返し構造の数が、VLDL 受容体が 8 回存在するのに対して LDL 受容体は 7 回であることである。VLDL 受容体は LDL 受容体に 1 つエクソンが加えられた構造となっている。組織分布は LDL 受容体が肝臓を中心に幅広い臓器に発現されているのに対して、VLDL 受容体は心臓・筋肉・脂肪組織の脂肪酸代謝の活発な臓器に高発現され、脳・脾臓・肺・マクロファージ細胞・内皮細胞にも発現されている。LDL 受容体と異なり、VLDL 受容体の肝臓での発現が見られないことも大きな特徴の一つである。

(3) リポ蛋白受容体としてのリガンド特異性

VLDL 受容体の LDL 受容体との高い構造上の相同性から、VLDL 受容体もリポ蛋白受容体として機能していることが想像され、LDL 受容体 cDNA と VLDL 受容体受容体 cDNA を LDL 受容体欠損 CHO (Chinese hamster ovary) 細胞である Id1A-7 細胞に強発現させてリポ蛋白取り込み能を検討した。LDL 受容体はコレステロールに富む LDL 粒子と共に TG (中性脂肪) リッチリポ蛋白である VLDL・ β -VLDL を認識し細胞内に取り込むが、VLDL 受容体の LDL の認識・取り込みはなく、TG リッチリポ蛋白である VLDL・ β -VLDL のみを認識し細胞内に取り込むことが判明した。VLDL 受容体はアポ B (LDL 粒子の唯一のアポ蛋白) を認識せず、ア

ポ E のみを認識するアポ E 受容体であった。

(4) VLDL 受容体のリガンド特異性の特徴

エネルギー代謝を考えると、糖代謝と脂質代謝を利用して ATP 産生と TG 蓄積が行われている。心筋・筋肉・脂肪組織においてインスリン依存性に Glut4 (Glucose transporter 4) が糖の取り込みを行っている。一方、食事由来のリポ蛋白であるカイロミクロン (外因性リポ蛋白) と肝臓から産出される VLDL 粒子 (内因性リポ蛋白) はともに、心筋・筋肉・脂肪組織から産生され近傍の内皮細胞に Heparan sulfate proteoglycan にてアンカーされるリポ蛋白リパーゼ (LPL: Lipoprotein lipase) の作用で TG が水解を受け、脂肪酸が拡散や脂肪酸トランスポーター (CD36・FABPpm・FATP など) にて細胞内に取り込まれ

酸化に利用される。心筋・筋肉・脂肪組織に高発現されている VLDL 受容体のリガンド特異性は、LPL の作用を受けた後のレムナント粒子 (カイロミクロンレムナント・VLDL レムナント) を高親和性に取り込むことが明らかになっている。私たちが 1992 年に VLDL 受容体と命名したリポ蛋白受容体の真のリガンドはレムナント粒子であった。血清リポ蛋白リポ蛋白電気泳動上で LDL と VLDL のピークが結合した broad バンドを呈する家族性型高脂血症は、人口の 0.2% に存在する。アポ E2/2 (アポ E2 のホモ接合体) を保持する方が、糖尿病・肥満・甲状腺機能低下症などの後天性の疾患の合併を契機に脂質異常症を呈する疾患である。LDL 受容体がアポ E2/2 を認識しないことが病因の一つになっている。VLDL 受容体はアポ E2/2 もアポ E3/3 (野生型) と同程度に認識することを 1996 年に我われは報告している。一方、LDL 受容体は細胞内コレステロールが増加すると SREBP (Sterol regulatory element-binding protein) による負の発現制御がかかるが、VLDL 受容体では発現制御がかからず、細胞外に TG リッチリポ蛋白が存在する限り細胞内に取り込む過食のリポ蛋白受容体である。

2. 研究の目的

VLDL 受容体は、選択的スプライシング機構によりエクソン 16 でコードされる O-結合糖ドメインを含む全長型の 1 型 VLDL 受容体蛋白と O-結合糖ドメインを欠如した 2 型 VLDL 受容体の 2 つの蛋白が 1 遺伝子より産生されている。選択的スプライシング機構による VLDL 受容体発現制御を検討し、ヒト血中分泌型 VLDL 受容体の存在を確認する。

3. 研究の方法

RT-PCR 法・Western プロット法・免疫沈降法にて 1 型 VLDL 受容体と 2 型 VLDL 受容体の発現制御を検討した。リポ蛋白結合研究で

は、1 型 VLDL 受容体と 2 型 VLDL 受容体 cDNA を LDL 受容体欠損 CHO 細胞に強発現させた細胞を用いた。VLDL 受容体 KO マウス尾静脈からアデノウイルスを用いて、1 型 VLDL 受容体と 2 型 VLDL 受容体 cDNA を肝臓に強発現した際の血中分泌型 VLDL 受容体の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 2 型 VLDL 受容体は膜安定性が悪く、培地中に分泌される。この為、1 型 VLDL 受容体と比較して -VLDL の細胞内取り込みが悪い。

(2) 単球からマクロファージ細胞への分化過程で、VLDL 受容体 mRNA レベルの変化はないが蛋白レベルで 1 型 VLDL 受容体優位にスイッチされる。この事は、RT-PCR にても確認された。

(3) 心筋 VLDL 受容体は成長と共に 1 型 VLDL 受容体優位にスイッチされることが確認された。

(4) 1 型および 2 型 VLDL 受容体 cDNA をアデノウイルスにて肝臓に高発現させると、2 型 VLDL 受容体 cDNA 遺伝子導入時のみに血中に VLDL 受容体蛋白が分泌されていることを確認した。

(5) 培地中に分泌された 2 型 VLDL 受容体蛋白はアポ E と結合することを免疫沈降法で確認した。

(6) ヒト血中分泌型 VLDL 受容体の存在を免疫沈降法で確認した。

(7) ヒト血中分泌型 VLDL 受容体測定法 (2 抗体 ELLISA 法) を確立した。正常者 5.29 ± 1.41 ng/ml、糖尿病患者 7.80 ± 3.64 ng/ml で、糖尿病患者において血中分泌型 VLDL 受容体濃度が高値である症例が存在することを確認した。

(8) 血中 TG に及ぼす VLDL 受容体の役割を in vivo 系で確認するため、LDL (low-density lipoprotein) 受容体ノックアウト(KO)マウスを背景とした VLDL-R/LDL-R ダブル KO マウスを作製し、LDL-R KO マウスと血中脂質・脂肪酸・血糖値を比較検討した。LDL-R KO マウスと比較して、VLDL-R/LDL-R ダブル KO マウスの血中 TG は増加していたが、血中 TC の変化はなかった。脂肪酸・血糖値の差もなかった。

(9) L6 筋芽細胞における蛍光色素(Dil)ラベル TG リッチリポ蛋白の取り込みへの VLDL 受容体影響を siRNA 法にて検討した。L6 細胞

培地中の FCS を 24 時間欠如させると、VLDL 受容体発現の著明な低下が認められた。この発現低下作用はメトホルミンやインスリンにて回復した。Dil-⁻VLDL の取り込みの低下も回復した。特にインスリンによる作用は LY294002 で抑制され PI3 キナーゼを介する作用であった。L6 細胞は siRNA 法による VLDL 受容体の発現低下により、⁻VLDL の取り込みが抑制された。

(10) L6 細胞にて筋肉 VLDL 受容体発現へのメトホルミンとインスリンの関連を Western 法と qRT-PCR 法にて検討した。L6 細胞 VLDL 受容体発現はメトホルミンおよびインスリン依存性に発現増加を示した。

(11) AMPK 持続発現 L6 (T172D)細胞を作製し、VLDL 受容体発現を検討した。AMPK 持続発現 L6 (T172D)細胞における VLDL 受容体発現増加が確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kimura T, Suzuki J, Ichikawa M, Imagawa M, Sato S, Fujii M, Zenimaru Y, Inaba S, Takahashi S, Konoshita T, Miyamori I. Differential effects of α -glucosidase inhibitors on postprandial plasma glucose and lipid profile in patients with type 2 diabetes under control with insulin Lispro mix 50/50. Diabetes Technol. Ther. 14, 545-551, 2012. 査読有り。

Imagawa M, Takahashi S, Zenimaru Y, Kimura T, Suzuki J, Miyamori I, Iwasaki T, Hattori H, Yamamoto TT, Nakano T, Nakajima K. Comparative reactivity of remnant-like lipoprotein particles (RLP) and low-density lipoprotein (LDL) to LDL receptor and VLDL receptor: Effect of a high-dose statin on VLDL receptor expression. Clin Chim Acta 413:441-447, 2012. 査読有り。

Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Takahashi M, Takahashi M, Ishida T, Ishida T, Hirata K, Yamamoto TT, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M. Species differences of macrophage very low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 407 656-662, 2011. 査読有り。

[学会発表](計 4 件)

高橋貞夫, 銭丸康夫, 鈴木仁弥, 今川美智子, 佐藤さつき, 山本勝司, 山田実夏, 市川麻衣, 石塚 全, 服部浩明. 分泌型 VLDL 受容体の存在とヒト血中濃度測定法の確立. 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 2013.11.22-11.23..

Takahashi S, Zenimaru Y, Imagawa M, Kimura T, Ichikaewa M, Sato S, Suzuki J, Miyamori I, Iwasaki T, Hattori H. Presence of human soluble very-low-density lipoprotein (VLDL) receptor in serum. XVI International Symposium on Atherosclerosis, Sydney Convention and Exhibition Centre, Australia, 2012.3.25-3.29.

Takahashi S, Zenimaru Y, Imagawa M, Kimura T, Suzuki J, Miyamori I. Central role of lipoprotein lipase and very low-density lipoprotein receptor on macrophage foam cell formation by triglyceride-rich lipoproteins and low density lipoprotein. 47th EASD Annual Meeting, Lisbon, 2011.9.12.-9.16.

Takahashi S, Zenimaru Y, Imagawa M, Kimura T, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT, Ito T, Shiomi M. Species differences of macrophage very low-density lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. AHA, ATVB meeting 2011, Chicago Hilton Hotel, Chicago, 2011.4.18.-4.20.

〔図書〕(計 1件)

高橋貞夫
VLDLR：疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患
エル・アイ・シー出版 印刷中 2014.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高橋 貞夫(Takahashi Sadao)