

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614018

研究課題名(和文)生活習慣病発症の機序におけるステロール代謝の分子栄養学的制御

研究課題名(英文) Nutritional regulation of sterol metabolism in development of lifestyle-related diseases

研究代表者

横山 信治 (Yokoyama, Shinji)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：10142192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本人における血漿HDL濃度調節の特徴を、主要な制御因子であるCETPとABCA1の分子栄養学的制御の面から検討した。1)日本人の血漿HDLが西欧と比べ高値を示す遺伝子背景の一つであるCETP欠損が東アジアで高頻度に見られる理由として、日本住血吸虫による肝傷害への抵抗性の分子基盤を解明した。2)我が国のHDL濃度は過去20年間著しく上昇、米国より20%近く高くなっていることを見だし、その栄養学的背景の可能性を検討した。3)HDL産生の律速膜蛋白質ABCA1の分解制御が糖尿病における高度糖化蛋白質に促進され無機栄養因子により抑制されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We investigated unique modulation of plasma HDL levels of Japanese focusing on the nutritional molecular regulation of the two major regulatory factors, CETP and ABCA1. 1) We found the resistance of genetic CETP deficiency, one of the major genetic causes for high HDL among Japanese, against development of hepatic cirrhosis in schistosomiasis and identified its molecular mechanism as the reason for its high prevalence in East Asia. 2) We discovered that HDL levels of Japanese markedly increased over the past 20 years reaching the higher levels than those in US by 20 %, and gave an insight to potential nutritional background for this transition. 3) We found that proteolytic regulation of ABCA1, a rate-limiting factor for HDL biogenesis, is accelerated by advanced glycation endproduct often found in DM and suppressed by inorganic nutritional factors such as Mn, Ba, Mg and Zn.

研究分野：生化学、代謝病学、栄養学

キーワード：コレステロール HDL 動脈硬化症 ABCA1

1. 研究開始当初の背景

血漿 HDL は動脈硬化症の「負の危険因子」であり、LDL 低下の次の動脈硬化症予防治療の重要な戦略目標とされる。我が国の疫学的臨床医学的成績の多くは、HDL 低下は LDL 上昇より強い危険因子であることを示し、HDL 増加による動脈硬化症の予防は、公衆衛生学的医療経済学的に見て LDL 低下より効率的であることが強く示唆される。コレステロールは細胞膜の機能発現に重要な役割を果たし、動物細胞は自らその生合成を行うと同時に、動物個体は食餌性または肝で産生したコレステロールを LDL により全身へ分配する。一方、その異化は体細胞では行われず、全身のコレステロールは肝に輸送され胆汁酸となって体外に出される。即ち、動物体細胞のコレステロール代謝平衡は、生合成及び LDL の取り込みと細胞からの放出により維持され、動物個体のそれは末梢コレステロールの肝への輸送により維持される。HDL は細胞コレステロールの放出と肝への輸送の両方に中心的役割を演じ、血管壁細胞へのコレステロールの病的蓄積を減少させる機能を果たす。HDL は、膜蛋白質 ABCA1 とアポ A-I など HDL 構成蛋白質の作用で細胞脂質から新生し、それ自身が細胞コレステロール放出反応となる。また血漿中では CETP などにより複雑な輸送制御を受ける。コレステロール分子はエネルギー源とはならないが、エネルギー代謝調節転写制御系である SREBP や PPAR、LXR/RXR などに代謝を調節される。ABCA1 は主に LXR に制御されるが、それはより複雑な転写制御ネットワークに制御され、またその活性は calpain 分解によっても調節される。細胞コレステロール搬出は産生する HDL のコレステロール含有量調節としても行われることも明らかにした。

2. 研究の目的

HDL は、コレステロールをその異化のために全身の細胞から肝臓に運ぶ。この機能により、HDL は動脈硬化性疾患の引き金となる血管壁へのコレステロールの蓄積を防ぎまたは除去することができると考えられている。本研究の目的は、次世代の動脈硬化症予防治療戦略の基礎となる HDL 血漿濃度制御機構の解明であり、血漿 HDL 産生の殆どを担う、膜トランスポーター ABCA1 によりヘリックス型アポリポ蛋白質と細胞脂質から HDL 粒子が新生する機構について、全身及び細胞のステロール代謝調節の観点よりその細胞生物学的制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1) HDL 粒子からコレステリルエステル (CE) を選択的に取り込む分子を同定するため、日本住血吸虫の cDNA ライブラリーから CD36 モチーフを持つ cDNA (CD36RP) をクローニング、これをもと発現させた部分ペプチドを用いて機能解析を行った。

2) 日本人の HDL 値の長期的推移を、国民栄養調査と SRL で測定された一般臨床のサンプルの HDL-C の値、および ERL 測定のアポ A-I などにより解析し、米国の全国栄養健康調査の結果の解析と比較した。

3) ABCA1 の活性調節について、HDL 産生における膜リン脂質の役割を質量分析により検討し、また ABCA1 の分解制御への影響を Mn, Ba, Mg, Zn などの無機栄養因子と終末糖化産物 (Advanced glycation endproduct, AGE) とについて検討した。

4. 研究成果

(1) CD36RP の機能解析。日本住血吸虫 cDNA ライブラリーからクローニングした CD36RP の機能解析を、発現させた部分ペプチドとその抗体を用いて解析した。CD36RP は HDL と結合するが LDL や CETP 欠損患者の HDL とは結合しない。日本住血吸虫の卵による HDL からの CE 取込みと孵化は、CD36RP の抗体によって阻害される。これは以前示した虫卵の成熟孵化は HDL に依存し LDL や CETP 欠損 HDL では進まない、と言う知見を支持し、CD36 がこの反応の責任蛋白質であることを示した [発表論文リスト 1, 8, 12]。

(2) 我が国における冠状動脈疾患のリスク上昇には、LDL の上昇よりも HDL の低下が公衆衛生的な寄与が大きく、HDL 増加による予防効果が大きく期待できる [2]。日本人の HDL コレステロールの平均値は 1990 年代始めにすでに米国人のそれより ~10% 高値を示し、その後にも最近まで 20 年にわたり上昇を続けて、米国との差は 20% にも達していることが分かった。これは apoA-I の同様の増加によって裏付けられ、測定系の標準化の経時的ずれなどではないことも示された。この原因は不明であるが、最近 20 年の食生活を含む生活習慣や環境の変化との関連を身長に解析する必要がある [6, 12]。

(3) HDL 産生因子 ABCA1 の栄養学的活性制御。ABCA1 による HDL の産生は膜リン脂質と apoA-I による粒子の形成が第一義的反応であり、栄養学的指標であるその脂肪酸組成が影響を与える可能性がある。膜リン脂質と産生 HDL の脂肪酸組成を質量分析により解析することで、HDL 産生反応への利用の選択性検討した。レシチン、スフィンゴミエリンともに、アシル鎖が短いほど、不飽和度が少ないほど利用されやすいことが分かり、食餌性脂肪酸と血漿 HDL 濃度の相関を考える上で基礎データが得られた [11]。ABCA1 活性は遺伝子制御とならび calpain による蛋白質分解によっても重要な制御を受ける [1] ので、こ

の反応の栄養学的調節を検討した。ABCA1 分解は Ca と calmodulin による調節を受けるので、相似の二価～三価の無機栄養因子 (Mn, Ba, Mg, Zn) についてその影響を検討した。これらはいずれも ABCA1 の蛋白量を増加させ、mRNA の増加を伴わない分解の抑制が認められた。従って、これらの因子の Ca と相似の機序による ABCA1 の活性制御が示唆され、さらなる検討が必要とされる。また、高血糖に合併する AGE の ABCA1 活性への影響を検証した。AGE は ABCA1 蛋白量を減少させ、これには mRNA の変化は伴わず分解速度の昂進が認められる。この変化は細胞の AGE 前処理では起こらず、AGE の存在下でのみ認められ、ubiquitin-proteasome 阻害で消失する。従ってこれは AGE 受容体を介した何らかの情報伝達により proteasome 系が促進されて起こるものと結論できた。

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 12 件)

Shinji Yokoyama. Unique features of high-density lipoproteins in the Japanese: In population and in genetic factors. *Nutrients* 7: 2359- 81, 2015. doi: 10.3390/nu7042359

Noriko Hotta, Sumiko Abe-Dohmae, Ryo Taguchi, and Shinji Yokoyama. Preferential incorporation of shorter and less unsaturated acyl phospholipids into high density lipoprotein-like particles in the ABCA1- and ABCA7-mediated biogenesis with apoA-I. *Chemistry and Physics of Lipids*. 187: 1-9, 2015. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2015.01.005

Masakazu Nakamura, Shinji Yokoyama, Yuzo Kayamori, Hiroyasu Iso, Akihiko Kitamura, Tomonori Okamura, Masahiko Kiyama, Hiroyuki Noda, Kunihiro Nishimura, Michikazu Nakai, Isao Koyama, Mahnaz Dasti, Hubert W. Vesper, Tamio Teramoto, Yoshihiro Miyamoto. HDL cholesterol performance using an ultracentrifugation reference measurement procedure and the designated comparison method. *Clin. Chim. Acta* 439: 185-90, 2015. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.039

Jin-ichi Ito, Rui Lu, Yuko Nagayasu and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein A-I induces tubulin phosphorylation in association with cholesterol release in fetal rat astrocytes. *BBA* 1841: 1234-40, 2014. doi: 10.1016/j.bbali.2014.04.010

Shinji Yokoyama. A potential screening factor for accumulation of cholesteryl ester transfer protein deficiency in East Asia: *Schistosoma japonicum*. *BBA* 1841: 495-504, 2014. doi: 10.1016/j.bbali.2013.12.014

Takashi Miida, Shinji Yokoyama. et al. Validation study of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples derived from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis*

233: 253-59, 2014. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.033.

Shinji Yokoyama, Hirotsugu Ueshima, Takashi Miida, Masakazu Nakamura, Koki Takata, Tatsuyuki Fukukawa, Takaaki Goto, Mariko Harada-Shiba, Michitaka Sano, Kiminori Kato, Kazuhiro Matsuda. High-density lipoprotein of Japanese has markedly increased over the past twenty years. *J. Atheroscl. Thromb.*21: 151-60, 2014. doi.org/10.5551/jat.20909.

Kuniko Okumura-Noji, Yutaka Miura, Rui Lu, Kiyofumi Asai, Nobuo Ohta, Paul J. Brindley, and Shinji Yokoyama. CD36-Related Protein in *Schistosoma japonicum*: Candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein for egg maturation. *FASEB Journal* 27: 1236-44, 2013 doi: 10.1096/fj.12-219816

Sumiko Abe-Dohmae, Shinji Yokoyama. ABCA7: a potential mediator between cholesterol homeostasis and the host defense system. *Clinical Lipidology* 7: 677-87, 2012. doi: 10.2217/clp.12.67

Takashi Miida, Shinji Yokoyama, et al.. A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: Comparison with a beta- quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects. *Atherosclerosis* 225: 208-15. 2012 doi: 10.1016/j.athero-sclerosis.2013. 12.033

Shinji Yokoyama, et al. Background to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan. (January 30, 2009) *J. Atheroscl. Thromb.* 19: 207-12. 2012. doi.org/10.5551/jat.11452

Shinji Yokoyama, Reijiro Arakawa, Cheng-ai Wu, Noriyuki Iwamoto, Rui Lu, Maki Tsujita, and Sumiko Abe- Dohmae. Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 182: 547-51, 2012. doi: 10.1016/j.bbali.2011.07.017.

[学会発表](計 13 件)

S. Yokoyama. A Screening Factor for High Prevalence of CETP Deficiency in East Asia: *Schistosoma japonicum*” (Invited Talk. Canadian Lipoprotein Conference 2014, October, 2014, Saskatoon)

横山信治. 栄養因子としてのコレステロールと動脈硬化の発症。(特別講演、日本栄養・食糧学会大会、2014年5月、札幌)

M. Ayaori, E. Yakushiji, S. Takiguchi, H. Uto-Kondo, M. Sasaki, M. Yogo, T. Komatsu, L. Ru, S. Yokoyama, K. Ikewaki. Probucool oxidized products, spiroquinone and diphenquinone promote reverse cholesterol transport in mice. (European Society of Cardiology Congress 2014, September, 2014, Barcelona)

田中伸享、石原弘貴、川上徹、大野泰良、横山信治. アキレス腱肥厚と冠動脈疾患の関

係（日本動脈硬化学会、2014年7月、東京）

横山信治。我が国を含む東アジアにおける CETP 欠損症高頻度発症のスクリーニング因子：日本住血吸虫症（Symposium、日本動脈硬化学会、2014年7月、東京）

呂銳、野路久仁子、横山信治：Modulation of HDL Biogenesis Through Regulation of ABCA1 degradation: Involvement of Caveolin-1.（日本生化学会、2013年9月、横浜）

横山信治、上島弘嗣、三井田孝、中村雅一、高田耕基、福川辰之、五藤孝秋、斯波真理子、佐野道孝、加藤公則、松田和博（日本動脈硬化学会、2012年7月、東京）

横山信治、野路久仁子、三浦裕、呂銳、浅井清文、太田伸生、Paul J. Brindley。CETP 欠損症における日本住血吸虫症抵抗性（日本動脈硬化学会、2012年7月、東京）

横山信治、野路久仁子、三浦裕、呂銳、浅井清文、太田伸生、Paul J. Brindley。CETP 欠損症の日本住血吸虫感染抵抗性（日本脂質生化学会 2013年6月、松島）

横山信治。脂質危険因子の測定に関する諸問題（Symposium、日本動脈硬化学会、2012年7月、福岡）

堂前純子、田中伸享、胡魏、岩本紀之、横山信治。HDL in the host defense system.（Symposium、日本動脈硬化学会、2012年7月、福岡）

Yokoyama S ABCA7 as a Linkage between sterol metabolism and host defense system. Satellite Symposium on HDL for XVIII International Symposium on Atherosclerosis (Invited Talk, March, 2012, Cairns, Australia)

Yokoyama S. Calpain-Mediated ABCA1 Degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. XVIII International Symposium on Atherosclerosis (Invited Talk, March, 2012, Sydney, Australia)

〔図書〕(計1件)

横山信治。コラム「味な提言」連載 ①～⑮
中日新聞愛知県内版 2013年9月～12月(毎日曜)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 信治 (YOKOYAMA, Shinji)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：10142192

(2) 研究分担者

呂 銳 (Lu, Rui)

中部大学・応用生物学部・助教

研究者番号：80381862