

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850070

研究課題名(和文)疾患を誘発する炎症反応のHDL形成による制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulation of inflammation responses by HDL formation

研究代表者

長尾 耕治郎(Nagao, Kohjiro)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40587325

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)：Apolipoprotein A-I(apoA-I)変異体を環境感受性プローブPOLARIC-maleimideにより標識することでapoA-I-POLARICを作製した。ApoA-I-POLARICの蛍光強度変化により炎症反応に関わるヒトマクロファージ培養細胞によるHDL形成を簡便に評価することに成功した。さらに、apoA-I-POLARICとインキュベートした細胞を共焦点顕微鏡観察することで、細胞内でのHDL形成の可視化が可能であることが示された。今後、本方法を応用することで、細胞内でのHDL形成と炎症反応の連関のさらなる解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：ABCA1 mediates the efflux of cholesterol and phospholipids into apoA-I to form HDL, which is important in not only the prevention of atherosclerosis but also the regulation of inflammation responses. To develop a novel method for the evaluation of HDL formation, we prepared an apoA-I-POLARIC by labeling the apoA-I variant with a hydrophobicity-sensitive fluorescence probe that detects the environmental change around apoA-I during HDL formation. THP-1 macrophage-mediated HDL formation could be measured using apoA-I-POLARIC. These results demonstrate that HDL formation by ABCA1-expressing cells can be specifically detected by sensing hydrophobicity change in apoA-I, thus providing a novel method for assessing HDL formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：コレステロール

1. 研究開始当初の背景

炎症反応は本来、生体異物除去のための生体防御のシステムであるが、過剰な炎症反応は多くの疾患の引き金になる。動脈硬化症は動脈壁内のマクロファージが引き起こす過剰な炎症反応により疾患が進行する。また、ドーパミンニューロンが欠落するパーキンソン病の発症では、脳内のマクロファージ様細胞であるミクログリアが引き起こす炎症反応が発症機序の一つであることが明らかになってきた。このように、マクロファージやミクログリアでの過剰な炎症反応は疾患の原因になるため、これらの細胞での炎症反応を抑制することが疾患の予防と治療につながると考えられる。

動脈硬化症の発症部位の炎症反応は悪玉コレステロールとして知られる低密度リポタンパク質 (LDL) が酸化修飾によりさらに悪性化した酸化 LDL をマクロファージが貪食することで引き起こされる。マクロファージ細胞内に酸化 LDL 由来のコレステロールが過剰に蓄積すると、炎症シグナル及び炎症性サイトカインの放出が活性化され炎症反応が惹起される。近年、善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質 (HDL) の生産によりマクロファージの過剰コレステロールを除去することで炎症反応が抑制されることが報告された。この HDL の形成は抹消組織に発現する ABC 輸送porter の ABCA1 がコレステロールとリン脂質を細胞外の apolipoprotein A-I (apoA-I) に受け渡すことで行われる。このように、ABCA1 による HDL 形成には“過剰コレステロールの除去”と“炎症反応の抑制”の2つの役割がある。

これまでに申請者は細胞生物学的、生化学的手法により ABCA1 輸送porter による HDL 形成機構を研究し、HDL 形成の新規の機構を提唱してきた。しかし、コレステロールが過剰に蓄積し、炎症反応を引き起こしている組織でのコレステロール恒常性の制御は定常状態の組織とは異なることが示されており、炎症反応が活性化している動脈硬化症やパーキンソン病の発症部位での HDL 形成についてはよくわかっていない。これらの疾患の予防、改善のためには疾患発症部位での HDL の形成機構を解明し、HDL 形成による炎症反応の抑制機序を明らかにすることが不可欠である。

2. 研究の目的

そこで本研究ではマクロファージやミクログリアでの HDL 形成を可視化するために、新規の HDL 形成検出法の開発を目指した。また、マクロファージやミクログリアでの ABCA1 に依存した HDL 形成と炎症反応との連関を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究に用いた組換え apoA-I は大腸菌発

現・精製系により作製した。タンパク質部位特異的蛍光標識の蛍光色素として POLARIC-maleimide (五稜化学) を使用した。ミクログリア株化細胞、BHK/ABCA1 細胞および THP-1 マクロファージでの HDL 形成を蛍光測定、コレステロール蛍光酵素法、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび抗 apoA-I 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて評価した。蛍光測定は FP-6600 型蛍光分光光度計 (Jasco) およびマイクロプレートリーダー infinite M200 (TECAN 社) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 新規 HDL 形成検出法の開発とその応用

ApoA-I V53C 変異体を POLARIC-maleimide で標識することにより apoA-I-POLARIC を作製した。また、作製した apoA-I-POLARIC を用いてコール酸透析法により apoA-I-POLARIC HDL を調製した。ApoA-I-POLARIC が HDL を形成することによって、apoA-I-POLARIC の蛍光スペクトルが変化することを確かめるため apoA-I-POLARIC と apoA-I-POLARIC HDL の蛍光スペクトルをそれぞれ測定した (図 1)。HDL を形成することで apoA-I-POLARIC の蛍光強度が増加し、500 nm ~ 700 nm 区間の曲線下面積が 3.9 倍に増加した。この結果より、apoA-I-POLARIC は HDL を形成することによって標識した POLARIC の周囲の環境が変化すること、そして apoA-I-POLARIC の蛍光強度変化を用いて HDL 形成を評価できるということが示された。

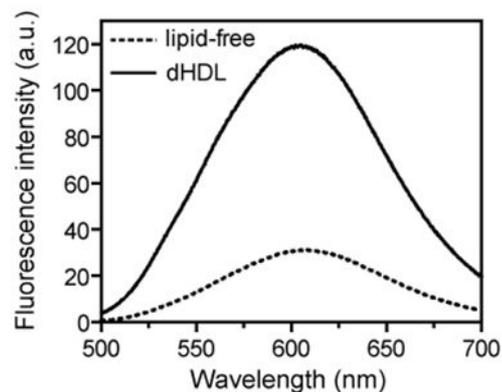


図 1 蛍光スペクトル測定

点線は apoA-I-POLARIC、実線は apoA-I-POLARIC HDL を示す。

ABCA1 発現細胞における HDL 形成を POLARIC 蛍光測定により評価できるのかを確かめるため、濃度 0.625 μ g/ml ~ 5 μ g/ml の apoA-I-POLARIC を BHK/ABCA1 細胞に添加しその培養培地の POLARIC 蛍光を測定した (図 2)。ABCA1 発現細胞 (Mifepristone) においてはどの

apoA-I-POLARIC 濃度においても、POLARIC 蛍光強度が培養前と比較して増加した。一方、ABCA1 非発現細胞 (DMSO) では培養前と比べて POLARIC 蛍光の増加はみられなかった。これらのことより、ABCA1 の発現に依存して POLARIC の蛍光強度が増加することが示された。

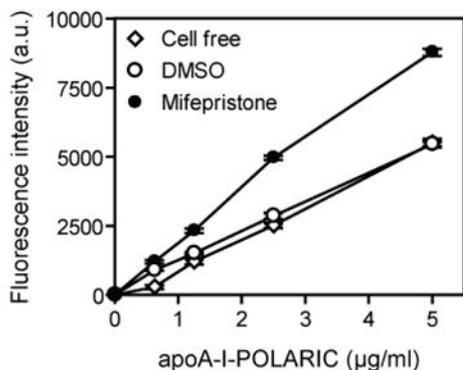


図2 BHK/ABCA1 細胞における HDL 形成の apoA-I-POLARIC による評価

BHK/ABCA1 細胞を DMSO または 10 nM Mifepristone で 20 時間処理し、その後 0~5 μg/ml の apoA-I-POLARIC と 6 時間培養し、培地中の POLARIC 蛍光を測定した。白ダイヤは細胞非添加培地、白丸は DMSO、黒丸は Mifepristone 処理した BHK/ABCA1 細胞での値を表す。

次に THP-1 マクロファージによる HDL 形成の apoA-I-POLARIC により評価を試みた。まず、LXR のアゴニストである TO901317 で処理することによって ABCA1 を発現誘導した細胞と誘導していない細胞での ABCA1 量をウエスタンブロッティングにより評価した。これにより THP-1 マクロファージは ABCA1 発現誘導を行っていないものでも ABCA1 を発現しており、発現誘導を行うことにより ABCA1 の量が 2.2 倍になることが示された。続いて、THP-1 マクロファージの培地の apoA-I-POLARIC 蛍光を測定したところ、ABCA1 の発現を誘導することにより apoA-I-POLARIC の蛍光強度が増加した(図3)。

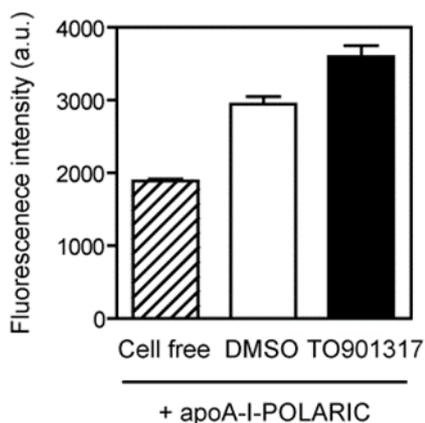


図3 THP-1 マクロファージによる HDL 形成の apoA-I-POLARIC による評価

THP-1 マクロファージを 10 μM の TO901317 で 24 時間処理し、その後 2.5 μg/ml の apoA-I-POLARIC と 6 時間培養し、培地中 POLARIC 蛍光を測定した。斜線は細胞非添加の培地、白は DMSO、黒は TO901317 処理した THP-1 マクロファージでの値をそれぞれ表す。

これらの結果より、apoA-I-POLARIC の蛍光強度増加は内因性の ABCA1 発現細胞でも同様に HDL 形成を評価できることが示された。

次に apoA-I-POLARIC を用いて細胞での HDL 形成の可視化を試みた。図4のように、ABCA1 発現細胞を apoA-I-POLARIC と培養後に共焦点顕微鏡観察を行ったところ、apoA-I-POLARIC に起因する蛍光が ABCA1 発現細胞の細胞膜と細胞内ベシクルにおいて観察された。

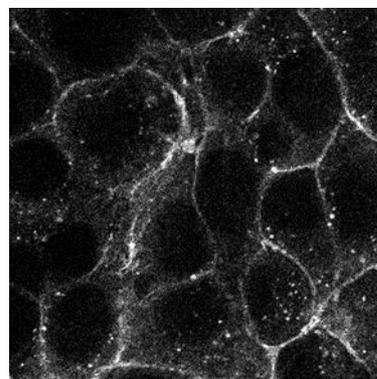


図4 BHK/ABCA1 細胞における HDL 形成の apoA-I-POLARIC による可視化

10 nM Mifepristone で 20 時間処理した BHK/ABCA1 細胞を 5 μg/ml の apoA-I-POLARIC と 15 分間培養した後、共焦点顕微鏡観察を行った。

(2) ミクログリア細胞における HDL 形成を介した炎症反応制御機構の解析

まず、ミクログリア株化細胞においても ABCA1 に依存した HDL 形成が起こるのかを評価した。ミクログリア株化細胞を TO901317 で処理した後、10 μg/ml の apoA-I とインキュベートした。その結果、apoA-I と TO901317 に依存した HDL 形成活性が観察された(図5)。さらに、ミクログリア株化細胞における LPS 誘導性の IL-1β の発現誘導を評価したところ、TO901317 存在下で IL-1β の発現が低下した(図6)。以上の結果から、ミクログリア株化細胞においても ABCA1 に依存した HDL 形成が起こり、その活性化により LPS への応答が抑制されることが示唆された。

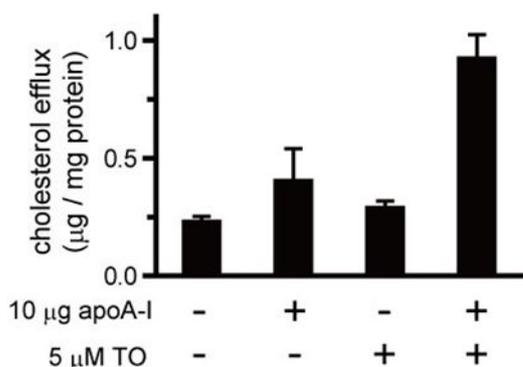


図5 ミクログリア株化細胞における HDL 形成活性

ミクログリア株化細胞を TO901317 で処理した後、apoA-I (10 µg/ml) とインキュベートした。培地中のコレステロール量を評価した。

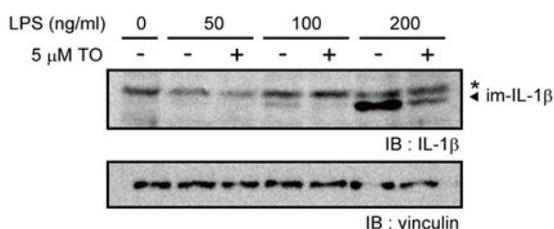


図6 ミクログリア株化細胞における IL-1β 発現制御

ミクログリア株化細胞を TO901317 で処理した後、0-200 ng/ml の LPS とインキュベートした。

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2件)

(1) “Direct detection of ABCA1-dependent HDL formation based on lipidation-induced hydrophobicity change in apoA-I”

Risa Omura, Kohjiro Nagao*, Norihiro Kobayashi, Kazumitsu Ueda, Hiroyuki Saito

Journal of Lipid Research, 55 (11), 2423-2431 (2014) 査読有り

DOI : 10.1194/jlr.D049445

(2) “The roles of C-terminal helices of human apolipoprotein A-I in formation of high-density lipoprotein particles”

Kohjiro Nagao*, Mami Hata, Kento Tanaka, Yuki Takechi, David Nguyen, Padmaja Dhanasekaran, Sissel Lund-Katz, Michael C. Phillips, Hiroyuki Saito

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1841 (1), 80-87 (2014) 査読有り

*責任著者

〔学会発表〕(計1件)

“Apolipoprotein A-I 周囲環境変化に着目した新規 HDL 形成測定法の開発”

長尾耕治郎, 大村理紗, 齋藤博幸

日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 27 日 ~ 30 日, 明治大学 (神奈川県)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/szi/>

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/umeda-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾耕治郎 (NAGAO, Kohjiro)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 40587325