

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08783

研究課題名(和文) アポリポ蛋白E 遺伝子欠損ウサギモデルを用いたアポEの機能解析

研究課題名(英文) Function of apoE in lipoprotein metabolism and atherosclerosis: insight from apoE-deficient rabbit model

研究代表者

新見 学 (NIIMI, Manabu)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80644898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アポリポ蛋白E(アポE)は分子量34 kDaの糖蛋白質で脂質代謝における役割は血中リポ蛋白が肝臓へ取り込まれる際のリガンドとして機能する。我々はマウスに比べヒトにより近いリポ蛋白代謝系を持つウサギを用いて、アポE欠損モデルを作製した。アポEのリポ蛋白代謝及び動脈硬化形成・進展における役割をアポE欠損ウサギを用いて検討した。高コレステロール食負荷条件下でアポE欠損ウサギは野生型ウサギに比べて、血漿総コレステロール及びトリグリセリドが上昇した。この上昇は血漿 VLDLの増加に由来し、VLDL中のアポBは主にアポB-48であった。大動脈における動脈硬化はアポE欠損により促進されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常症は動脈硬化を引き起こす原因の一つで、心筋梗塞などの心血管疾患における重要な危険因子である。脂質異常症は遺伝素因、生活習慣などさまざまな原因で発症する。アポリポ蛋白E(アポE)もその原因の一つで、アポEに変異や欠損が生じると血中リポ蛋白の肝臓での受容体結合能が低下し、型高脂血症を引き起こす。これまでにアポE欠損マウスを用いた研究が盛んに行われてきた。本研究ではマウスに比べてヒトにより近いリポ蛋白代謝系を持つウサギを用いてアポEのリポ蛋白代謝及び動脈硬化形成・進展における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Apolipoprotein E (apoE) is a 34 kDa glycoprotein and its role on lipid metabolism is a ligand for lipoprotein receptor on the liver. We created apoE-deficient model using rabbits, which have more similar lipoprotein metabolism to humans than mice. To investigate the role of apoE in lipoprotein metabolism and atherosclerosis, we analyzed plasma lipids, lipoproteins and susceptibility to a diet-induced atherosclerosis of apoE-deficient rabbits. ApoE-deficient rabbits showed higher plasma total cholesterol and triglycerides levels than those of wild-type rabbits on a high cholesterol-diet. This increase was due to an elevated plasma VLDL, and the VLDL showed enriched apoB-48. Our studies revealed that deficiency of apoE in rabbits promotes aortic atherosclerosis.

研究分野：病態医化学

キーワード：脂質異常症 リポタンパク代謝 アポE ウサギ 遺伝子欠損

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アポリポ蛋白 E (アポ E) は分子量 34 kDa の糖蛋白質で肝臓の他に脳、腎臓、脂肪組織、マクロファージなどで発現する。アポ E は血中リポ蛋白が肝臓へ取り込まれる際のリグンドとして機能する。アポ E に変異又は欠損が生じると、血中リポ蛋白の肝臓での受容体結合能が低下し、血中にレムナトリポ蛋白がうっ滞して脂質異常症 (Ⅳ型高脂血症) を引き起こす。

マウスでアポ E をノックアウト (KO) すると、著しい高コレステロール血症を呈し、大動脈に容易に動脈硬化が形成されるため、アポ E-KO マウスは動脈硬化研究のモデル動物として汎用されるようになった。しかし、マウスはヒトと比べてリポ蛋白代謝が異なるため、マウスを用いてアポ E の脂質代謝における役割をヒトに外挿するのは容易ではない。

一方、ウサギはその脂質代謝のヒトへの類似性からヒト脂質代謝・動脈硬化研究に古くから用いられてきた。マウスとは異なり、ウサギはヒトと同様に肝臓より分泌されるリポ蛋白である VLDL の構造蛋白質としてアポ B-100 のみを含み、リポ蛋白間の脂質転送を媒介するコレステリルエステル転送蛋白質 (CETP) の活性もヒトと同様に認められる。モデル動物としてのウサギの弱点は、キメラ形成能を有する ES 細胞が確立していないことから遺伝子ターゲティングが困難なことであった。しかし、近年のゲノム編集技術の進歩によりウサギにおいてもノックアウト動物の作製が可能となった。

これまでに我々の研究グループでは、ゲノム編集によりアポ E 欠損 (アポ E-KO) ウサギを作出し、その脂質表現型を報告した (Yang D *et al.* *J Mol Cell Biol.* 2014, Niimi M *et al.* *Atherosclerosis.* 2016)。本研究ではアポ E-KO ウサギを用いて、アポ E のリポ蛋白代謝及び動脈硬化形成・進展における役割を検討する。

2. 研究の目的

アポ E のリポ蛋白代謝及び動脈硬化形成・進展における役割をアポ E-KO ウサギを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

・ 人工授精によるアポ E-KO ウサギの繁殖

雄性アポ E-KO ウサギから人口腔を用いて精液を採取し、 100×10^6 個/mL に調整した精子 0.5 mL を雌性アポ E-KO ウサギに経腔で子宮口付近に注入した後にヒト絨毛性ゴナドトロピンを 100 U 静脈内注射した。産仔は生後 1 月齢で離乳し、耳組織を採取し遺伝子型解析に供した。

・ 遺伝子型解析

定法により耳組織からゲノム DNA を抽出し、プライマー: Forward 5'-CGCAGGCGGGAAGATGAAGGTGTG-3', Reverse 5'-CCGAGAAAGCCCCGCCCCCATAG-3' を用いて PCR を行った。PCR 産物を 20% TBE-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、バンドサイズ (野生型: 79 bp、アポ E 欠損: 66 bp) により遺伝子型を判定した。

・ ウサギ

15 週齢の雌雄アポ E-KO ウサギ及び対照野生型ウサギ (ニュージーランドホワイト種) を使用した。飼料は普通食 (CR-3M、日本クレア) 又は高コレステロール食 (CR-3M に 0.3% コレステロール、3% 大豆油を添加) を 150 g/日 で給餌し自由摂取させた。飲水は自動給水により自由摂取させた。

・ 血漿脂質、リポ蛋白解析

16 時間絶食したウサギの耳動脈より採血し EDTA 血漿を分取した。血漿中の総コレステロール (TC) 及びトリグリセリド (TG) を酵素法測定キット (富士フィルム和光純薬) にて測定した。段階的超遠心法により血漿リポ蛋白を分画した。比重 1.006, 1.02, 1.04, 1.06, 1.08, 1.10, 1.21 のリポ蛋白分画を卓上超遠心機 Optima MAX-TL (ベックマン・コールター) を用いて、段階的に分画した。リポ蛋白分画中の TC 及び TG を測定するとともに、アポ蛋白組成を 4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動、CBB による蛋白染色により解析した。

・ 食餌誘発性動脈硬化

アポ E-KO 及び対照野生型 (WT) ウサギに高コレステロール食を 16 週間負荷し、高脂血症を惹起させ動脈硬化を誘発した。負荷期間中、血漿脂質を経時的に測定するとともに、血漿リポ蛋白を分画しその脂質・アポ蛋白組成を解析した。負荷 16 週目にウサギを安楽死させ、大動脈、心臓などの各臓器を採取し中性緩衝ホルマリン中で固定した。

・ 動脈硬化病変解析

長軸方向に切り開いた大動脈 (大動脈起始部から腸骨動脈分岐部まで) を SudanIV により脂質染色を施し、肉眼的な脂質沈着面積を測定した。また、大動脈各部位 (大動脈弓部、胸部大動脈、腹部大動脈) の薄切標本作製し、顕微鏡的な病理組織学解析を行った。HE 及び EVG 染色標本により内膜肥厚面積を測定するとともに、病変中の細胞成分を免疫染色 (マクロファージ: RAM11、平滑筋細胞: HHF-35) により解析した。

4. 研究成果

(1) 血漿脂質

高コレステロール食負荷前及び負荷 8、16 週間での血漿 TC を表 1、TG を表 2 に示した。雄性ウサギにおいて、血漿 TC はアポ E-KO ウサギが WT ウサギに比べ有意に上昇した。雌性アポ E-

KO ウサギにおいては、血漿 TC は WT ウサギと同様に推移した。血漿 TG は雄性及び雌性アポ E-KO ウサギで野生型ウサギに比べ有意に上昇した。

表 1 血漿総コレステロール, TC (mg/dL)

	遺伝子型	雄性ウサギ	雌性ウサギ
0 週	WT	36 ± 3	61 ± 6
	KO	113 ± 17 ***	119 ± 11 ***
8 週	WT	1021 ± 155	1660 ± 197
	KO	2162 ± 277 **	1896 ± 93
16 週	WT	1160 ± 191	1603 ± 147
	KO	1572 ± 305	1877 ± 250

平均値±標準誤差、*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs WT ウサギ。

表 2 血漿トリグリセリド, TG (mg/dL)

	遺伝子型	雄性ウサギ	雌性ウサギ
0 週	WT	41 ± 2	40 ± 2
	KO	33 ± 2 *	42 ± 5
8 週	WT	59 ± 7	66 ± 7
	KO	143 ± 20 **	122 ± 16 **
16 週	WT	68 ± 7	63 ± 4
	KO	100 ± 11 *	150 ± 25 **

平均値±標準誤差、*P<0.05, **P<0.01 vs WT ウサギ。

(2) 血漿リポ蛋白解析

高コレステロール食負荷 8 週時に血漿リポ蛋白を超遠心分離により段階的に分画し解析した。各分画中の TC 及び TG 濃度を表 3 に示す。雄性アポ E-KO ウサギは WT ウサギに比べ VLDL (d=1.006) 分画中のコレステロール及びトリグリセリド含量が著明に上昇した。また、IDL (d=1.02) 及び LDL (d=1.04) 分画中のコレステロール含量が有意に低下した。

表 3 血漿リポ蛋白中の TC 及び TG (mg/dL)

	遺伝子型	TC	TG
1.006 (VLDL)	WT	493.6 ± 44.0	33.5 ± 4.5
	KO	1330.7 ± 86.8 ***	123.4 ± 30.9 *
1.02 (IDL)	WT	127.6 ± 13.0	5.2 ± 0.7
	KO	80.9 ± 9.4 *	7.0 ± 1.3
1.04 (LDL)	WT	64.7 ± 8.0	3.0 ± 0.6
	KO	30.7 ± 4.2 **	2.6 ± 0.6
1.06 (LDL)	WT	14.9 ± 2.1	1.1 ± 0.3
	KO	14.9 ± 1.4	1.2 ± 0.3
1.08 (HDL)	WT	3.4 ± 0.4	0.5 ± 0.1
	KO	5.3 ± 0.6 *	0.7 ± 0.2
1.10 (HDL)	WT	3.9 ± 0.5	0.4 ± 0.1
	KO	3.9 ± 0.5	0.5 ± 0.2
1.21 (HDL)	WT	8.8 ± 0.6	0.6 ± 0.1
	KO	8.6 ± 0.6	1.0 ± 0.3

平均値±標準誤差、*P<0.05, **P<0.01 vs WT ウサギ。

VLDL 分画中のアポ蛋白組成を SDS-PAGE により分析した。アポ E-KO ウサギのアポ B はほとんど B-100 を含まず、大部分はアポ B-48 であった。また、野生型と比べてアポ A-I 及びアポ A-IV 含量の上昇を認めた(図 1)。

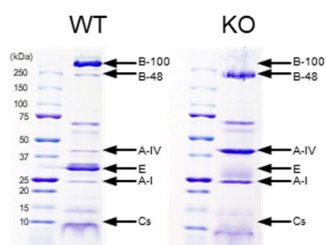


図 1 VLDL (d=1.006) 中のアポ蛋白組成
高コレステロール食飼育下の野生型 (WT) 及びアポ E 欠損 (KO) ウサギの VLDL を超遠心分離により分画し、アポ蛋白組成を分析した。SDS-PAGE 後に CBB 染色により蛋白質を検出した。代表的な泳動像を示す。

(3) 動脈硬化病変解析

高コレステロール食を 16 週間負荷した後にウサギを解剖し、アポ E-KO 及び WT ウサギの大動

脈における動脈硬化の進展を比較した。SudanIV により脂質染色を施し、肉眼的な脂質沈着面積の解析を表 4 に示した。アポ E-KO ウサギの大動脈全体における病変面積率は WT ウサギに比べて雌性ウサギで 2.1 倍、雌性ウサギで 1.6 倍上昇した (P<0.05)。大動脈の部位毎に解析すると胸部大動脈及び腹部大動脈での病変進展が顕著であった。WT ウサギに比べて、アポ E-KO 雄性ウサギでは胸部で 2.8 倍、腹部で 2.5 倍、アポ E-KO 雌性ウサギでは胸部で 1.9 倍、腹部で 2.4 倍の病変面積率の上昇が認められた (P<0.05)。

表 4 動脈硬化病変解析 (肉眼的解析) 病変面積率(%)

	遺伝子型	雄性ウサギ	雌性ウサギ
大動脈全体	WT	26 ± 5	37 ± 7
	KO	54 ± 9 *	60 ± 7 *
大動脈弓部	WT	60 ± 8	84 ± 6
	KO	79 ± 5	76 ± 5
胸部大動脈	WT	18 ± 6	31 ± 8
	KO	51 ± 11 *	60 ± 8 *
腹部大動脈	WT	19 ± 5	23 ± 5
	KO	48 ± 9 *	54 ± 7 *

平均値±標準誤差、*P<0.05 vs WT ウサギ。

大動脈における顕微鏡的病変解析を表 5 に示した。大動脈各部位の薄切標本を作製し HE 及び EVG 染色を施し、内膜肥厚面積を定量した。また、動脈硬化病変中の細胞成分 (マクロファージ及び平滑筋細胞) を免疫染色により評価した。アポ E-KO ウサギの内膜肥厚面積は WT ウサギに比べて、胸部大動脈 (7.1 倍) 及び腹部大動脈 (3.6 倍) で有意に上昇した。病変中の主な構成細胞はマクロファージで一部平滑筋細胞を認めた。

表 5 動脈硬化病変解析 (顕微鏡的解析)

	遺伝子型	内膜肥厚面積 (mm ²)
大動脈弓部	WT	1.62 ± 0.37
	KO	2.41 ± 0.44
胸部大動脈	WT	0.15 ± 0.05
	KO	1.07 ± 0.39 *
腹部大動脈	WT	0.13 ± 0.04
	KO	0.48 ± 0.12 *

平均値±標準誤差、*P<0.05 vs WT ウサギ。

(4) まとめ及び今後の展開

高コレステロール食負荷条件でのアポ E 欠損がリポ蛋白代謝及び動脈硬化進展に及ぼす影響をウサギを用いて検討した。アポ E の欠損により雄性ウサギで血漿 TC 及び TG が上昇した。この上昇は血漿 VLDL の増加に由来し、増加した VLDL 中のアポ B は主にアポ B-48 であった。また、VLDL が増加する一方で、IDL 及び LDL が減少した。雌性ウサギではアポ E 欠損により TG の上昇が認められ、TC の有意な上昇は認められなかった。雄性、雌性ウサギともにアポ E 欠損により大動脈における動脈硬化の進展が促進されることが明らかになった。今後の展開として、アポ E 欠損による TG の上昇と動脈硬化惹起の関連性や大動脈以外の他の動脈における病変形成への寄与について評価する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yan H, Niimi M, Wang C, Chen Y, Zhou H, Matsuhisa F, Nishijima K, Kitajima S, Zhang B, Yokomichi H, Nakajima K, Murakami M, Zhang J, Chen YE, Fan J.	4. 巻 27
2. 論文標題 Endothelial Lipase Exerts its Anti-Atherogenic Effect through Increased Catabolism of -VLDLs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.55244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang C, Niimi M, Kitajima S, Matsuhisa F, Yan H, Dong S, Liang J, Fan J.	4. 巻 18
2. 論文標題 Sex hormones affect endothelial lipase-mediated lipid metabolism and atherosclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids Health Dis.	6. 最初と最後の頁 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12944-019-1175-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Niimi M, Nishijima K, Kitajima S, Matsuhisa F, Satoh K, Yamazaki H, Zhang J, Chen YE, Fan J.	4. 巻 33
2. 論文標題 Macrophage-derived matrix metalloproteinase-1 enhances aortic aneurysm formation in transgenic rabbits.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 271-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7555/JBR.33.20180097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Johno H, Yoshimura K, Mori Y, Kimura T, Niimi M, Yamada M, Tanigawa T, Fan J, Takeda S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Detection of potential new biomarkers of atherosclerosis by probe electrospray ionization mass spectrometry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolomics.	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11306-018-1334-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhang J, Niimi M, Yang D, Liang J, Xu J, Kimura T, Mathew AV, Guo Y, Fan Y, Zhu T, Song J, Ackermann R, Koike Y, Schwendeman A, Lai L, Pennathur S, Garcia-Barrio M, Fan J, Chen YE.	4. 巻 37
2. 論文標題 Deficiency of Cholesteryl Ester Transfer Protein Protects Against Atherosclerosis in Rabbits.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol.	6. 最初と最後の頁 1068-1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.117.309114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang C, Nishijima K, Kitajima S, Niimi M, Yan H, Chen Y, Ning B, Matsuhisa F, Liu E, Zhang J, Chen YE, Fan J.	4. 巻 37
2. 論文標題 Increased Hepatic Expression of Endothelial Lipase Inhibits Cholesterol Diet-Induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Transgenic Rabbits.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol.	6. 最初と最後の頁 1282-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.117.309139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Z, Niimi M, Ding Q, Liu Z, Wang L, Zhang J, Xu J, Fan J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative studies of three cholesteryl ester transfer proteins and their interactions with known inhibitors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0180772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fan J, Chen Y, Yan H, Niimi M, Wang Y, Liang J.	4. 巻 25
2. 論文標題 Principles and Applications of Rabbit Models for Atherosclerosis Research.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 213-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Niimi M, Wang C, Yan H, Chen Y, Zhou H, Matsuhisa F, Nishijima K, Kitajima S, Zhang J, Chen YE, Fan J.
2. 発表標題 Endothelial lipase attenuates cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and protects against atherosclerosis in transgenic rabbits.
3. 学会等名 42nd Annual Scientific Meeting of the European Lipoprotein Club (ELC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yan H, Niimi M, Kitajima S, Zhou H, Matsuhisa F, Chen Y, Zhang J, Chen YE, Fan J.
2. 発表標題 Deletion of the apoCIII gene in knockout rabbits enhances the catabolism of triglyceride-rich lipoproteins and attenuates cholesterol diet-induced hyperlipidemia.
3. 学会等名 8th International Congress on Lipid & Atherosclerosis (ICoLA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新見 学、Yan Haizhao、Chen Yajie、Zhou Huanjin、王 川、松久 葉一、西島 和俊、北嶋 修司、範 江林
2. 発表標題 内皮リパーゼは血中脂質降下を介して抗動脈硬化作用を発揮する
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niimi M, Fan J.
2. 発表標題 China-Japan International Conference on Atherosclerosis 2018
3. 学会等名 CETP inhibition and atherosclerosis therapy: myth or fact. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yan H, Niimi M, Matsuhisa F, Kitajima S, Chen YE, Fan J.
2. 発表標題 Characterization of apolipoprotein C-III knockout rabbits.
3. 学会等名 第5回日本ウサギバイオサイエンス研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Niimi M, Nishijima K, Kitajima S, Matsuhisa F, Satoh K, Yamazaki H, Fan J.
2. 発表標題 Macrophage-derived matrix metalloproteinase-1 accelerates aortic aneurysm formation in transgenic rabbits.
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wang C, Nishijima K, Kitajima S, Niimi M, Yan H, Chen Y, Ning B, Matsuhisa F, Liu E, Zhang J, Chen YE, Fan J.
2. 発表標題 Increased hepatic expression of endothelial lipase inhibits cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in transgenic rabbits.
3. 学会等名 7th International Congress on Rabbit Biotechnology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学大学院 総合研究部 医学域 基礎医学系 分子病理学講座 https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	松久 葉一 (MATSUHISA Fumikazu) (20754253)	佐賀大学・総合分析実験センター・助教 (17201)	
連携研究者	北嶋 修司 (KITAJIMA Shuji) (70284643)	佐賀大学・総合分析実験センター・准教授 (17201)	
連携研究者	範 江林 (FAN Jianglin) (60272192)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	