

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08072

研究課題名(和文) 網羅的手法を用いたHDL機能を規定する因子の基礎臨床融合研究

研究課題名(英文) Elucidating molecular mechanisms of HDL functionality

研究代表者

石田 達郎 (Ishida, Tataro)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：00379413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高比重リポタンパク質(HDL)の量的指標であるHDL-C値は心血管疾患の負の危険因子である。他方、HDLは「量」のみならず「質」も重要であることが示唆されている。本研究では細胞によるHDLの取り込み機序の解明に取り組み、ApoA1と結合するタンパク質XがHDLと細胞との相互作用に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

一方、HDL-Cの低下により発癌リスクが上昇するとの報告がある一方、含有する分子によってHDLは癌の発生・進展に対しむしろ負の方向に働く可能性が示唆されている。本研究ではフィブロネクチンを含むHDLが癌の増殖・浸潤に促進的に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、HDL機能が心血管疾患のリスク因子として注目を集めている。炎症を基盤とする病態ではHDL構成脂質組成が変化したり、化学的修飾を受けたりすることで、HDLの機能は低下しているがその分子機序は不明な点が多い。本研究成果は、HDL機能がどのような要因・メカニズムで影響されているかについての解明へとつながることが期待される。

一方、動脈硬化性疾患のみならず癌領域でもリポ蛋白質の代謝障害と種々の臓器の発癌との関連が示唆されているが、本研究では含有する分子によってHDLは癌の発生・進展に対しむしろ負の方向に働く可能性を示し、新たな診断・治療戦略に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：A large amount of evidence suggests that high-density lipoprotein (HDL) has anti-atherosclerotic properties. HDL-cholesterol (HDL-C) has also been widely used as a marker of cardiovascular disease. Recently, it was reported that plasma HDL-C levels are inversely correlated with cancer risk. However, the relationship between HDL and cancer pathophysiology remains unknown. We focused on fibronectin, an essential extracellular matrix glycoprotein, as an HDL-associated protein. Our study showed the possible mechanism by which fibronectin-containing HDL enhanced cancer cell proliferation and adhesion via the focal adhesion kinase signaling pathway. Further investigation of the roles of HDL components in tumorigenesis might provide novel insight into cancer pathophysiology.

研究分野：脂質代謝異常

キーワード：高比重リポたんぱく質(HDL)

## 1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白 (**high-density lipoprotein; HDL**)は末梢組織の余剰コレステロールを肝臓に回収するコレステロール逆転送系に関わっており、**HDL**の量的指標であるコレステロール(**HDL-C**)値は心血管疾患の負の危険因子である。しかしながら、心血管疾患の予防において**HDL-C**が単に高いだけでは不十分であることが明らかになってきた。他方、**HDL**は「量」のみならず「質」も重要であることが、示唆されている。炎症を基盤とする病態では**HDL**構成脂質組成が変化したり、化学的修飾を受けたりすることで、**HDL**の機能は低下しているがその分子機序は不明な点が多い。

一方、**HDL**側にアプローチしたコレステロールエステル転送タンパク阻害薬やニコチン酸製剤などの**HDL-C**値の上昇薬を用いた大規模臨床試験では、これまでのところ心血管疾患の予防効果は証明されていない。したがって、**HDL**側だけの研究では不十分であり、**HDL**と細胞との相互作用の分子機序を明らかにすることも必要であった。

動脈硬化性疾患のみならず癌領域でもリポ蛋白質の代謝障害と種々の臓器の発癌との関連が示唆されている。**HDL**に関しては、**HDL-C**の低下により発癌リスクが上昇するとの報告がある一方、含有する分子によって**HDL**は癌の発生・進展に対しむしろ負の方向に働く可能性が示唆されている。**HDL**が含有する蛋白質についてプロテオミクス解析を行った研究では、細胞接着性糖タンパク質である“フィブロネクチン”を含む**HDL**の存在が報告されている。フィブロネクチンは癌の増殖、浸潤、転移に関わることが知られているが、担癌状態における**HDL**の病態生理学的役割にどのような影響を及ぼすのかについては不明であった。

本研究では**HDL**機能がどのような要因・メカニズムで影響されているかを解明し、得られた知見を実臨床現場へ応用することを目指すこととした。

## 2. 研究の目的

1) **HDL**構成タンパク質・脂質組成からの機能評価ならびに**HDL**シグナル伝達を制御する分子機序を解明する。

2) 担癌状態における**HDL**の病態生理学的役割にフィブロネクチンがどのような影響を及ぼすのかについて解明する。

## 3. 研究の方法

1) **HDL**機能の分子機序を明らかにするために、**HDL**の主要タンパク質であるApoA1と結合するタンパク質の同定を試みた。**HDL**の取り込み能を定量的に評価できる実験系を構築し、ApoA1と結合するタンパク質をRNAi法でノックダウンさせたときに**HDL**の取り込み能がどのように変化するかを調べた。

2) 神戸大学病院にて入院加療を行った、27人の安定狭心症患者の血漿から**HDL**を超遠心法によって抽出した。各患者の**HDL**中に含まれるフィブロネクチンの検出にはウエスタンブロット法を用いた。またFocal adhesion kinase (FAK)のリン酸化も、同じくウエスタンブロット法で評価した。

ヒト子宮頸癌由来の細胞株であるHeLa細胞における、フィブロネクチン含有**HDL**と非含有**HDL**添加による細胞増殖能の変化をクリスタルバイオレット染色によって評価した。また、細胞接着能に与える影響についても評価した。

## 4. 研究成果

1) **HDL**の取り込み機序についての検討

**HDL**機能の分子機序を明らかにするために、**HDL**の主要タンパク質であるApoA1と結合するタンパク質の同定を試みた。その結果、タンパク質XがApoA1と結合することがわかった。タンパク質Xは、細胞接着や細胞運動に関与していることが広く知られているが、ApoA1と結合することの意義は依然不明である。炎症を誘導するとタンパク質Xの発現量が増加傾向にあり、**HDL**が持つ抗炎症作用との関連性が示唆された。

**HDL**の取り込み能を定量的に評価できる実験系を構築した。蛍光標識した**HDL**を細胞に添加し、その蛍光強度を測定することで細胞内に取り込まれた**HDL**量を評価することを試みた。蛍光強度を測定する方法を検討した結果、**HDL**を取り込んだ細胞を界面活性剤で溶解した後に、その溶解液中の蛍光強度を測定することが、再現性もよくスループット性も高いことがわかった。

ApoA1 と結合するタンパク質 X についてノックダウン法を用いて細胞内の存在量を減少させると、HDL の取り込み能に変化が認められた。

今後、構成成分を変化させた HDL を作製して、これらの細胞内への取り込み量を測定することで、どのような HDL が細胞に取り込まれやすいか、取り込まれにくいかを調べる予定である。

## 2) フィブロネクチン含有 HDL が癌の増殖・進展過程に及ぼす影響の解明

安定狭心症患者 27 名から抽出した HDL の内、2 名 (7.4%) の HDL がフィブロネクチンを含有していた。これらのフィブロネクチン含有 HDL (FN-HDL) と非含有 HDL (Non-FN-HDL) によって HeLa 細胞を刺激したところ、FN-HDL 群で FAK のリン酸化が亢進した (図 1)。FAK は非レセプター型チロシンキナーゼの一種であり、成長因子や細胞接着分子であるインテグリンを介したシグナルを調整し、細胞の増殖・分化などに関わっている。FAK のリン酸化が HDL 中に含まれるフィブロネクチンによる作用であるかどうかを検討するため、Non-FN-HDL にリコンビナントヒトフィブロネクチンを添加した。フィブロネクチン添加 Non-FN-HDL は無添加のものとは比べて、FAK のリン酸化を亢進させる傾向が認められた。また、このリン酸化は FN-HDL に対して、容量依存性を示した。一方で、フィブロネクチン単体を HeLa 細胞に添加しても FAK のリン酸化は亢進せず、HDL の存在がシグナル経路の活性化に重要であることがわかった。

フィブロネクチンはインテグリンのリガンドの一つとして知られている。このインテグリンシグナルを EGTA によって阻害した後、FN-HDL で HeLa 細胞を刺激した。EGTA 添加群では FN-HDL による FAK のリン酸化が抑制されており (図 2)、FN-HDL による FAK のリン酸化はインテグリンを介した作用であることが明らかとなった。

図 1

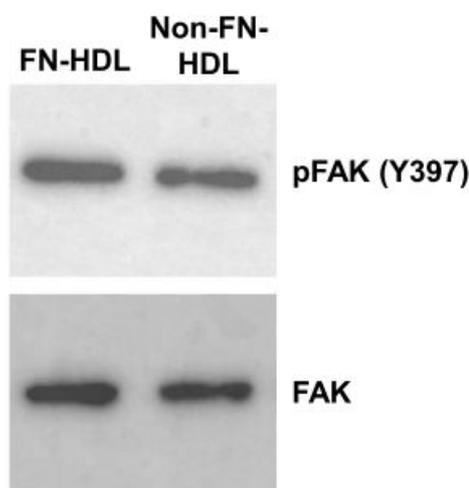
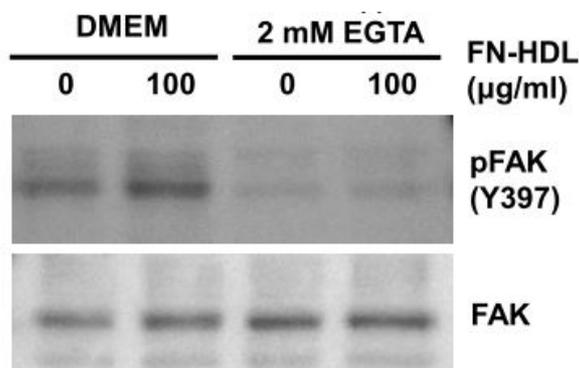
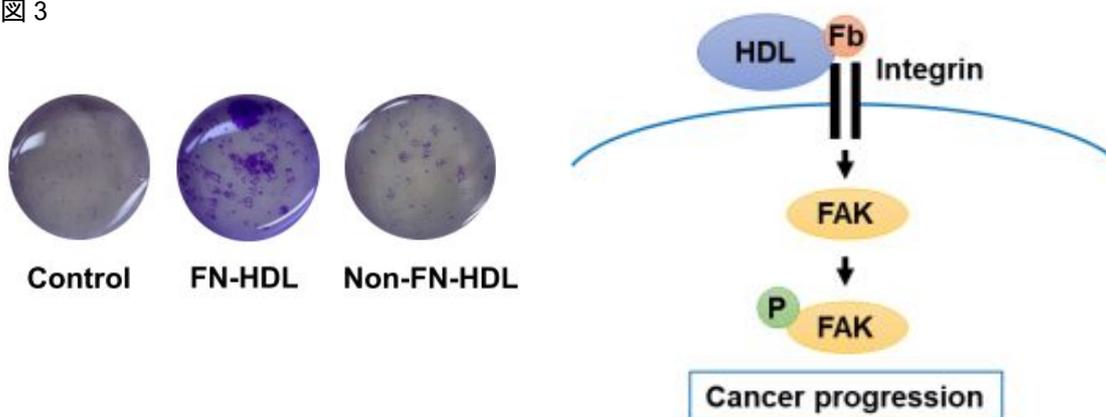


図 2



最後に FN-HDL による細胞増殖能・接着能への影響を検討したところ、FN-HDL を添加した HeLa 細胞では Non-FN-HDL 群に比べて、細胞増殖が活性化し (図 3)、同時に接着能も亢進していた。

図 3



本研究により、循環血液中の HDL 粒子にフィブロネクチンを含有する症例が存在することが

わかった。フィブロネクチン含有 HDL は FAK のリン酸化を介して、癌細胞の接着能・増殖能を亢進させることを明らかにした。

本研究で着目したフィブロネクチンは種々の癌で過剰発現していることや、転移や患者の生命予後と相関することが報告されてきた。FAK に関しても、肺、膵臓、消化管、卵巣癌等で高度に発現していることやリン酸化が亢進していることも証明されている。フィブロネクチンがインテグリンを介した FAK のリン酸化に寄与していることを考慮すると、フィブロネクチン含有 HDL が FAK のリン酸化を亢進させることは妥当であると思われる。一方で、興味深いことに本研究ではフィブロネクチン単独による細胞刺激では、FAK のリン酸化は亢進せず、フィブロネクチンを含有させた HDL ではリン酸化が亢進していた。この原因の解明には至っていないが、血清アミロイド A 蛋白と同様にフィブロネクチンが HDL に積載されることによって、受容体への親和性や組織への移行性が変化している可能性を考えた。

本研究ではいくつかの制約がある。HDL を抽出した患者群が狭心症患者に限られていたことと、サンプルサイズが小さかったことにより、リアルワールドでのフィブロネクチン含有 HDL 保持比率が不明である。また、各症例の血中フィブロネクチン濃度を測定しておらず、血中フィブロネクチン濃度と HDL への含有の相関を検討できていない。さらには、フィブロネクチン含有 HDL を認めた 2 例について、実際に発癌イベントがあったかどうかを追跡できておらず、前二者と併せて今後の検討課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oshita T, Toh R, Nagano Y, Kuroda K, Nagasawa Y, Harada A, Murakami K, Kiriya M, Yoshikawa K, Miwa K, Kubo T, Iino T, Nagao M, Irino Y, Hara T, Shinohara M, Otake H, Shinke T, Nakajima K, Ishida T, Hirata Ken-ichi	4. 巻 503
2. 論文標題 Association of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality, and coronary plaque properties: An optical coherence tomography-based observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 136 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Manabu, Miyashita Kazuya, Mori Kenta, Irino Yasuhiro, Toh Ryuji, Hara Tetsuya, Hirata Ken-ichi, Shinohara Masakazu, Nakajima Katsuyuki, Ishida Tatsuro	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum concentration of full-length- and carboxy-terminal fragments of endothelial lipase predicts future cardiovascular risks in patients with coronary artery disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 839 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2019.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda Koji, Otake Hiromasa, Shinohara Masakazu, Kuroda Masaru, Tsuda Shigeyasu, Toba Takayoshi, Nagano Yuichiro, Toh Ryuji, Ishida Tatsuro, Shinke Toshiro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of rosuvastatin and eicosapentaenoic acid on neoatherosclerosis: the LINK-IT Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EuroIntervention	6. 最初と最後の頁 e1099 ~ e1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4244/EIJ-D-18-01073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagano Y, Otake H, Toba T, Kuroda K, Shinkura Y, Tahara N, Tsukiyama Y, Yanaka K, Yamamoto H, Nagasawa A, Onishi H, Sugizaki Y, Takeshige R, Harada A, Murakami K, Kiriya M, Oshita T, Irino Y, Kawamori H, Ishida T, Toh R, Shinke T, Hirata K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Impaired Cholesterol Uptake Capacity of HDL Might Promote Target Lesion Revascularization by Inducing Neoatherosclerosis After Stent Implantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.119.011975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiomi Masashi, Takeda Hiroaki, Irino Yasuhiro, Kimura Norie, Yamada Satoshi, Kuniyoshi Nobue, Kikumori Akio, Koike Yu, Koike Tomonari, Yoshida Masaru, Izumi Yoshihiro, Shinohara Masakazu, Bamba Takeshi, Ishida Tatsuro	4. 巻 284
2. 論文標題 Identification of novel serum markers for the progression of coronary atherosclerosis in WHLM rabbits, an animal model of familial hypercholesterolemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 18 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KIMURA Norie, KIKUMORI Akio, KAWASE Daisuke, OKANO Mitsumasa, FUKAMACHI Kumiko, ISHIDA Tatsuro, NAKAJIMA Katsuyuki, SHIOMI Masashi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Species differences in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities: comparative studies of animal models of lifestyle-related diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Manabu, Nakajima Hideto, Toh Ryuji, Hirata Ken-ichi, Ishida Tatsuro	4. 巻 25
2. 論文標題 Cardioprotective Effects of High-Density Lipoprotein Beyond its Anti-Atherogenic Action	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 985 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shin-ichiro, Fujioka Yoshio, Tsujino Takeshi, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Impact of serum cholesterol esterification rates on the development of diabetes mellitus in a general population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	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) 10.1186/s12944-018-0822-5	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 Oshita Toshihiko, Toh Ryuji, Shinohara Masakazu, Mori Kenta, Irino Yasuhiro, Nagao Manabu, Hara Tetsuya, Otake Hiromasa, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Elevated Serum Elaidic Acid Predicts Risk of Repeat Revascularization After Percutaneous Coronary Intervention in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-1175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eriko Hisamatsu, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takuya Iino, Tetsuya Hara, Hidekazu Tanaka, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Ken-Ichi Hirata	4. 巻 66
2. 論文標題 Fibronectin-containing High-Density Lipoprotein is Associated with Cancer Cell Adhesion and Proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kobe Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 E40-E48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toshihiko Oshita, Ryuji Toh, Mitsumasa Okano, Koichi Watanabe, Yuichiro Nagano, Amane Harada, Katsuhiro Murakami, Seimi Kobayashi, Masakazu Shinohara, Tetsuya Hara, Yasuhiro Irino, Hiromasa Otake, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata.
2. 発表標題 Cholesterol Uptake Capacity, a Novel Indicator for HDL Functionality, Versus Cholesterol Efflux Capacity in Association with Coronary Plaque Lipid Burden
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Oshita, Ryuji Toh, Mitsumasa Okano, Shigeyasu Tsuda, Koichi Watanabe, Seimi Kobayashi, Tetsuya Hara, Masakazu Shinohara, Yasuhiro Irino, Katsuhiro Murakami, Amane Harada, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata
2. 発表標題 Searching for modulating factor of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality
3. 学会等名 第50回 日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾下寿彦、杜隆嗣、入野康宏、黒田浩史、永野雄一郎、長澤圭典、大竹寛雅、新家俊郎、石田達郎、平田健一
2. 発表標題 HDL機能の新規評価法“Cholesteroluptakecapacity”とOCT解析による冠動脈プラーク病変性状の比較検討
3. 学会等名 第55回 日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杜 隆嗣、石田 達郎、	4. 発行年 2019年
2. 出版社 洋學社	5. 総ページ数 17
3. 書名 心血管病イベントと脂質リスク管理. In: 熱血循環器学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	入野 康宏  (irino Yasuhiro)  (10415565)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------