

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790226

研究課題名(和文) HDLの抗動脈硬化作用におけるアポリポ蛋白 AII の役割

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of apolipoprotein AII on athero-protective functions of HDL

研究代表者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：40432158

研究成果の概要：

善玉コレステロールとして知られる HDL(低比重リポ蛋白)の抗動脈硬化作用を明らかにするため、HDL を構成する蛋白のひとつである、アポリポ蛋白 AII(アポ AII)に着目して研究を行った。アポ AII 遺伝子を導入した遺伝子改変ウサギを作製して、アポ AII の役割を検討した結果、アポ AII が多いほど、血中の中性脂肪が増え、HDL-コレステロールが減少してしまうことが明らかになった。本研究により、アポ AII は脂質代謝に悪影響を与えることが判明し、今後、アポ AII を標的とした治療法の開発が必要と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：高比重リポ蛋白(HDL)、アポリポ蛋白 AII、トランスジェニックウサギ、リポ蛋白リパーゼ(LPL)、脂質異常症

1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白(HDL)は、心筋梗塞をはじめとする動脈硬化性疾患の防御因子である。HDL の主な構成蛋白には、アポリポ蛋白(アポ)AI と AII があり、それぞれ HDL の蛋白成分のおよそ 70% (アポ AI)、20-25% (アポ AII) を占めている。

しかし、多くの機能が既に解明されているアポ AI と比べ、アポ AII の生理機能については、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

ヒトアポAII機能の解明のため、アポAII遺伝子導入ウサギを用いて、以下の点を明らかにする。

- (1) HDL代謝を含むリポ蛋白代謝における、アポAIIの役割
- (2) 動脈硬化の発生、進展における、アポAIIの役割

3. 研究の方法

(1) アポAII トランスジェニック (Tg) ウサギの系統確立

準備実験の段階で、肝臓特異的にヒトアポAII を過剰発現するコンストラクト (アポE プロモーター並びに肝臓特異的発現エレメントを使用) を受精卵へと注入するマイクロインジェクションにより、3羽の founder ウサギを得ていた。アポAII Tg ウサギの系統確立のため、founder ウサギを元に、我々の確立したウサギの人工授精法による繁殖を行った。生まれた子ウサギの遺伝子検査を、耳組織を採取しゲノムDNAを抽出してPCRを行った。交配により得られたF1ウサギについて、基礎的表現型解析のため、血中アポAII濃度 (ラテックス比濁法)、脂質測定 {総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)、HDL-コレステロール(HDL-C)、Wako キット} を行った。

(2) アポAII の脂質代謝に及ぼす影響の解明

交配により確立したアポAII Tg ウサギ系統を用いて、アポAII の脂質代謝に及ぼす影響を検討した。雌雄アポAII Tg ウサギと同腹の non-Tg ウサギが12週齢の時点で、16時間絶食後と再摂食6時間後に採血し、血中脂質 {TC, TG, HDL-C, リン脂質(PL)} を測定した。リポ蛋白代謝に対する役割を検討するため、超遠心法によりリポ蛋白分画を採取し、それぞれのコレステロール含量とTG含量を測定するとともに、アガロースゲルに泳動し、FatRed7Bで脂肪染色した。リポ蛋白はさらにSDS-PAGEで泳動し、Coomassie Brilliant Blueで染色してアポリポ蛋白の分布を解析した。肝臓でのVLDL合成量を、Triton WR-1339注射により検査した。血中の脂質代謝関連酵素として、リポ蛋白リパーゼ(LPL)、肝性トリグリセリドリパーゼ(HTGL)、コレステリルエステル転送蛋白(CETP)、レシチン:コレステロールアシル基転移酵素(LCAT)を測定した。

(3) アポAII Tg ウサギのコレステロール負荷に対する感受性解析と動脈硬化誘導実験

雌雄のアポAII Tg ウサギ、4-5ヶ月齢に対して、0.3%のコレステロールを添加した特別食を16週間投与し、高脂血症と動脈硬化の誘導を行い、アポAIIの食事性高脂血症と動脈硬化に対する影響を検討した。特別食投与期間、毎日摂食量を測定し、毎週脂質を測定した。

4. 研究成果

(1) アポAII トランスジェニック (Tg) ウサギの系統確立

founder ウサギから人工授精を行い、3系統のアポAII Tg ウサギが得られた。このウサギのアポAII濃度と脂質を測定した結果、

アポAII濃度が高い系統ほど、TG, TCの濃度が高い傾向にあることが明らかになった(図1)。

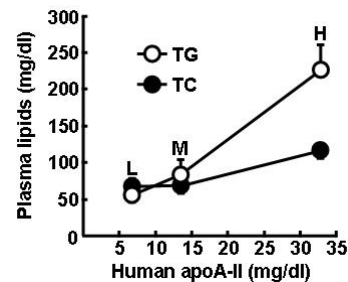


図1 3系統 Tg ウサギのアポAII濃度と脂質 L, 低発現, M, 中発現, H, 高発現, Mean +/- SEM

そこで、以降の検討では、最も変化の大きいH(高発現)群を用いて検討を行った。

(2) アポAII の脂質代謝に及ぼす影響の解明

H群の雌雄ウサギが12週齢の時点で、16時間絶食後と再摂食6時間後に採血し、各種脂質を測定した結果、アポAII Tg ウサギにおいて性別を問わず、絶食時、再摂食後の両方で、血中脂質に著明な変化が認められた。アポAII Tg ウサギでTGが2.5-4.0倍に増加し、HDL-Cは50-60%の減少が認められた(図2)。TC, PLも1.5倍以上の増加を示した。

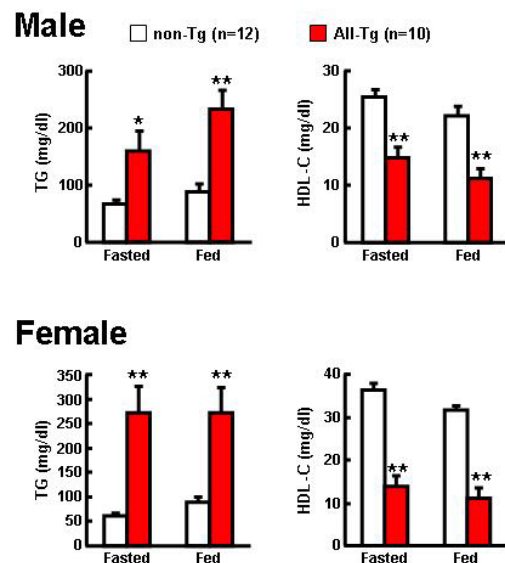


図2 アポAII Tg ウサギのTG, HDL-Cの変化 * or **, p < 0.05 or 0.01 vs non-Tg, Mean +/- SEM

超遠心法によるリポ蛋白分析により、アポAII Tg ウサギで著明に増加したTGは、主に超低比重リポ蛋白(VLDL)と中間比重リポ蛋白(IDL)の増加によるものであり、さらに低比重リポ蛋白(LDL)やHDL₁でもTGの増加が認められた。一方HDL-Cの減少は、HDL₂とHDL₃

の減少によるものであった(図3)。

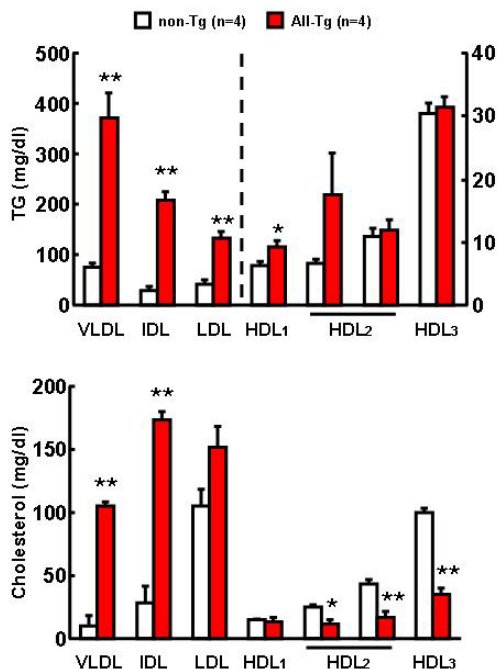


図3 リポ蛋白分画の脂質の変化
* or **, $p < 0.05$ or 0.01 vs non-Tg, Mean \pm SEM

アガロースゲル電気泳動のバンドでも、同様の脂質の変化が認められた。また、SDS-PAGEによるアポリポ蛋白分布解析の結果、Tg ウサギにおいて、著明なアポB、アポEの増加と、アポAIの減少が明らかになった。

リポ蛋白解析で明らかになった VLDL-C、VLDL-TG の著明な増加の原因を明らかにすべく、VLDL 合成能を、Triton WR-1339 を用いて検討したが、VLDL 合成には変化は認められなかった。続いて、脂質代謝に関連する酵素の活性を解析した。LPL 活性並びにHL 活性を、金沢大学小林教授の開発した新法によって、旭化成ファーマにて測定した。その結果、著明な LPL 活性の低下が認められた。この変化が VLDL の増加と HDL の減少のひとつの要因と考えられた(図4)。一方、CETP や LCAT には変化は認められなかった。

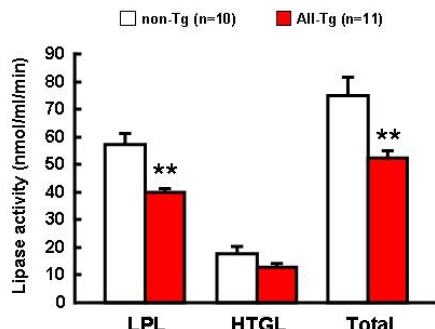


図4 酵素活性の変化
* or **, $p < 0.05$ or 0.01 vs non-Tg, Mean \pm SEM

+/- SEM

(3) アポ AII Tg ウサギのコレステロール負荷に対する感受性解析と動脈硬化誘導実験

上記のような脂質の変化を示した Tg ウサギに、コレステロール食を投与し、その反応を見ると共に、動脈硬化の発生・進展への影響を検討した。0.3%のコレステロール添加食を与えると、正常対象ウサギでも高 TC 血症が誘導されるが、Tg ウサギでは、non-Tg よりも著明な TC の増加が認められた。さらに、non-Tg では変化のなかった TG が、アポ AII ウサギでは著しく増加した。現在、コレステロール食投与が終了し、動脈硬化病変の解析中である。

本研究の結果、アポ AII 濃度の上昇は、何らかの機序により LPL 活性を抑制することにより、高 TG 血症と低 HDL 血症を主徴とする脂質異常症を引き起こすことが明らかとなった。今後、これらの脂質の変化が動脈硬化の発生進展にどのように影響するかを詳細に明らかにすることにより、アポ AII を標的とした新たな治療戦略の確立を目指す。

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6件)

<英文>

1. Yu Y, Koike T, Fan J. (他9名, 2番目). Temporal and quantitative analysis of expression of metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors in atherosclerotic lesions. *Histol Histopathol*, 査読有, 23, 2008, 1503-1516
2. Liu E, Koike T, Fan J. (他6名, 4番目). Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol*, 査読有, 18, 2007, 2094-2104
3. Kitajima S, Koike T, Fan J. (他7名, 3番目). Lp(a) enhances coronary atherosclerosis in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, 査読有, 193, 2007, 269-276

<和文>

1. 範江林, 小池智也. 動脈硬化研究のための遺伝子改変ウサギの応用. *腎と透析*, 査読なし, 63, 2007年, 96-99
2. 小池智也, 範江林. 心血管疾患における CRP の役割 -原因か結果か、双方か? 医

学のあゆみ, 査読なし, 221, 2007 年, 1112-1116

3. **小池智也**. C-reactive protein in atherosclerotic lesions Its origin and pathophysiological significance, 分子心血管病, 査読なし, 8, 2007 年, 189-191

[学会発表] (計 4 件)

1. **小池智也**, 範江林 (他 5 名). 動脈硬化病変におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の時間的・量的発現様式の解析. 第 13 回血管病理研究会, 2008 年 10 月 18 日, 日本大学医学部板橋キャンパス臨床講堂
2. Yu Ying, **小池智也** (他 4 名). ウサギの内皮リパーゼの同定及び組織発現についての検討. 第 3 回ウサギフォーラム, 2008 年 7 月 26 日, 神戸大学医学部神緑会館
3. 範江林, **小池智也**, 柴田信光. 動脈硬化の発症における CRP の役割: Marker or Maker? 第 97 回日本病理学会総会, 2008 年 5 月 15 日, ホテル日航金沢
4. **小池智也**, 範江林 (他 6 名). 動脈硬化病変の C 反応性蛋白—その由来と病態生理学的重要性. 第 24 回日本疾患モデル学会総会, 2007 年 9 月 19 日, つくば国際会議場

[図書] (計 0 件)

[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

http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 40432158

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし