

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11805

研究課題名(和文) ABCタンパク質による炎症反応制御と脂質栄養

研究課題名(英文) Lipid nutrition and inflammatory response by ABC proteins

研究代表者

堂前 純子 (Abe-Dohmae, Sumiko)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：70227700

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)：8種のおキシステロール(7 α -、7 β -、4 α -、22S-、22R-、24S-、25-、27-HC)の一斉分析が可能となった。コレステロールの自動酸化によるおキシステロール生成は、酸素の存在よりも保管温度の影響を強く受けることがわかった。酸化ステロール濃度はコレステロール濃度と必ずしも相関しないこと、ABCA1欠損とABCA7欠損の効果は同一でないことが明らかになった。同一飼料による飼育下でも、ABCA1、ABCA7発現の有無で腸内フローラパターンや胆汁酸排泄量が異なることから、これらの変異は腸内細菌の生育に影響する胆汁酸の量や組成を変化させている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABCタンパク質は、膜結合ドメインとそれに続くATP結合ドメインを持つ一群の膜タンパク質ファミリーである。バクテリアからヒトまで広く存在しており、トランスポーター、チャネル、レギュレーターとさまざまな機能を持つ。ABCA1、ABCA7は高い相同性を示すABCタンパク質で、動脈硬化症とアルツハイマー病の疫学的な負のリスクと考えられている。生体内での最強のステロール代謝制御因子であるおキシステロールの微量一斉定量法の確立により、遺伝子改変動物由来の試料解析、各種の条件下での比較が可能となった。

研究成果の概要(英文)：A method for simultaneous quantitative analysis of eight oxysterols (7 α -、7 β -、4 α -、22S-、22R-、24S-、25-、27-HC) was established.

Oxysterol formation by autoxidation of cholesterol was found to be more strongly affected by storage temperature than by the presence of oxygen. Generation of 4 α -HC was negligible below -80°C and other 7 oxysterols were not generated below -20°C. Serum oxysterol levels do not necessarily correlate to that of cholesterol. In addition, the effects of ABCA1 and ABCA7 deficiencies are not completely identical. Even kept on the same diet, differences in ABCA1 and ABCA7 expression resulted in different intestinal flora patterns and bile acid excretion, indicating that these mutations may alter the amount and composition of bile acids that affect the growth of intestinal bacteria.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ABCタンパク質 おキシステロール ABCA1 ABCA7 HDLコレステロール

1. 研究開始当初の背景

低 HDL 血症は、欧米諸国に比べて高 LDL 血症の少ない日本において、特に重視されるべき動脈硬化性疾患の危険因子とされている。またアルツハイマー病は、高齢化とともに急増している認知症の中で最大の領域を占めながら、予防・治療の方法が未確立である。

ABC タンパク質の一つである ABCA1 は家族性 HDL 欠損症の責任遺伝子で、細胞コレステロールからの HDL 粒子形成 (HDL 新生) に必須である。ABCA1 ノックアウト(KO)マウス血中にも、HDL は存在しない。また、慢性炎症刺激への応答も異なる<文献 1>。一方、同じく ABC タンパク質の一つである ABCA7 は、生理機能は不明ながら、近年の疫学研究により 2011 年には晩発性アルツハイマー病の遺伝的リスクであることが報告され、2015 年には患者のみに認められる機能欠失変異が確認されている。アルツハイマー病モデルマウスでは、ABCA7 欠損状態でアミロイドβ産生が高まる<文献 2>。ABCA1 と ABCA7 は高い相同性を示すにもかかわらず、両者の生体内分布は一致しておらず、脂質代謝による転写制御機構も異なる<文献 3>。従って、両者は生体内では栄養状態や病態に応じて、組織毎にも異なるレベルで協調・拮抗しながら機能しているものと考えられた。

生体内での最強のステロール代謝制御因子は、実はコレステロール本体ではなくコレステロール酸化物 (オキシステロール) である。オキシステロールの各分子種は多様な特性を示す生理活性物質で、25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) は他のオキシステロールと比べて血中濃度が低く、かつステロール代謝には最も影響の大きいことが報告されている。

2. 研究の目的

動脈硬化症とアルツハイマー病は、高齢化が進む日本ではとりわけ大きな課題である。本研究計画は、ABCA1、ABCA7 と慢性炎症ならびに脂質栄養の関係を明らかにし、両疾患の予防・治療策の足がかりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

オキシステロールはコレステロールの酸化物であり、付加した酸素の位置によって多くの種類が存在する。これらはステロール骨格に付く水酸基の数や位置、配位のみ異なる相互に類似した構造であるため、分離と微量定量を可能とするために 2-ピコリン酸を誘導体化試薬として用いる液体クロマトグラフィー/質量分析法、ならびにトリメチルシリル化による誘導体化とガスクロマトグラフィー/質量分析法の組み合わせという 2 種類の一斉分析法を構築した。通常条件および各種栄養条件下で飼育した野生型、ABCA1 KO、ABCA7 KO マウスから得られた血液、糞便や各種臓器を検体として用いた。

4. 研究成果

(1) ステロール代謝制御には 25-HC の影響が大きい (上記 1.) ことを念頭に、これの定量可能な測定系作成を最初の目標とした。重水素標識化合物を内部標準として使い、2-ピコリン酸を誘導体化試薬として用いる液体クロマトグラフィー/質量分析法<文献 4>を基とする測定法を構築し、血中濃度は、野生型マウスであれば血清 50 μ L 以下で定量可能となったが、多種類のオキシステロールの同時測定のためには一部精度不十分であることも判明した。このためトリメチルシリル化処理に続くガスクロマトグラフィー/質量分析による方法<文献 5>を採用し、操作中の吸着回避のための器具素材の変更やコレステロール分離のための前処理条件の変更等により、100 μ L 程度のマウス血清から 8 種のオキシステロール (7 α -, 7 β -, 4 β -, 22S-, 22R-, 24S-, 25-, 27-HC) とコレステロール自体の一斉分析を行うことが可能となった。

(2) 同一条件で飼育した野生型、ABCA1 KO、ABCA7 KO のマウス血清を比較すると、血清コレステロール濃度は、ABCA1 KO では野生型の 20%未満、ABCA7 KO では野生型と同レベルであり、これまでに酵素法による定量で示されていた結果と一致していた。一方オキシステロールの濃度は、全ての遺伝子型で同程度のもの、ABCA1、ABCA7 いずれの欠損でも野生型と異なるもの、ABCA1 KO のみで低いものに分かれた。これらの結果から、オキシステロール濃度はコレステロール濃度と必ずしも相関しないこと、また ABCA1 欠損と ABCA7 欠損効果は完全には同一でないことが示された。なお、25-HC 濃度に関しては 2 種類の測定方法で差がないことが確認された。

(3) オキシステロールの生成経路には、酵素反応による変換以外に自動酸化のあることが知られ

ている。保存条件によるコレステロールの自動酸化の程度を調べるため、野生型マウス血清を窒素/空気/酸素で置換して密栓の上、 $-80^{\circ}\text{C}/-20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ で28日間保存し、コレステロールならびにマウス血中主要オキシステロール8種の濃度を測定した。条件により、 7α , 7β , 4β -HCには顕著な、 25 -HCには若干の増加が見られたが、最大の増加率を示した 4β -HCでも -80°C 、他は -20°C 以下での保存であれば置換条件にかかわらず濃度は上昇しなかった。コレステロール濃度には保存条件による差はなかった。これらの結果より、採取後の検体中でのコレステロールの自動酸化によるオキシステロール生成は、酸素の存在よりも保管温度の影響を強く受けることがわかった。

(4) 血液以外でのオキシステロール分析を可能とするため、マウス肝臓ならびに糞便を用いた場合の測定条件最適化を行なった。狭雑物の多い肝臓と糞便であっても、抽出方法や希釈倍率調整等の前処理方法の改変を行うのみで血清と同様の方式を用いて測定できることがわかった。これら3種類の検体間では、オキシステロールのパターンならびにコレステロールとの比がともに異なることが示された。

(5) 野生型、ABCA1 KO、ABCA7 KOマウスの腸管内容物ならびに糞便を用いて16S rRNAを用いたT-RFLPフロー解析と胆汁酸定量を行なったところ、同一飼料による飼育下でも、ABCA1, ABCA7発現の有無で腸内フローラパターンや胆汁酸排泄量が異なることが明らかとなった。これらのABCトランスポーターの変異が、腸内細菌の生育に影響する胆汁酸の量や組成の差異をもたらしている可能性が示された。

(6) 遺伝子改変マウスの繁殖と維持に関し、KOメスマウスへの過剰排卵誘起剤投与で得た卵への人工授精、受精卵のICR偽妊娠マウスへの移植を組み合わせた繁殖方法を試み、良好な成績を得た。これにより、自然交配では妊娠の成立しづらいABCA1 KOマウスであっても、必要に応じて出生日を揃えた個体を得られるようになった。

文献

- 1) Hu W, Abe-Dohmae S, Tsujita M, Iwamoto N, Ogikubo O, Otsuka T, Kumon Y, Yokoyama S. Biogenesis of HDL by SAA is dependent on ABCA1 in the liver in vivo. *J Lipid Res.* 2008;49:386-393.
- 2) Satoh K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, St George-Hyslop P, Fraser PE. ATP-binding Cassette Transporter A7 (ABCA7) Loss of Function Alters Alzheimer Amyloid Processing. *J Biol Chem.* 2015; 290: 24152-241565.
- 3) Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Sato R, Yokoyama S. ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis. *J Lipid Res.* 2006;47:1915-1927.
- 4) Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, Shirai M, Ikegami T, Xu G, Numazawa M., Hara T, Matsuzaki Y. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J Lipid Res.* 2008; 49:2063-2073.
- 5) 中川沙織 大和進. ヒト血漿中オキシステロールの高感度分析法 *生物試料析*, 2011;35: 119-126.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Shishioh Nobue, Kiryu-Seo Sumiko, Abe-Dohmae Sumiko, Yokoyama Shinji, Kiyama Hiroshi	4. 巻 125
2. 論文標題 Expression of ATP-binding cassette transporter A1 is induced by nerve injury and its deficiency affects neurite tip morphology and elongation in cultured neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 102164 - 102164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jchemneu.2022.102164	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 Tsushima H, Yamada K, Miyazawa D, Ohkubo T, Michikawa M, Abe-Dohmae S	4. 巻 44
2. 論文標題 Comparison of the Physical Characteristics and Behavior in ABC Transporter A1, A7 or Apolipoprotein E Knockout Mice with Lipid Transport Dysfunction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1851-1859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00543	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 Sumiko Abe-Dohmae, Shinji Yokoyama	4. 巻 768
2. 論文標題 ABCA7 links sterol metabolism to the host defense system: Molecular background for potential management measure of Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2020.145316	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 Tsuboi T, Lu R, Yonezawa T, Watanabe A, Woo JT, Abe-Dohmae S, Yokoyama S.	4. 巻 297
2. 論文標題 Molecular mechanism for nobiletin to enhance ABCA1/G1 expression in mouse macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 32-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.atherosclerosis.2020.01.024.	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 堂前純子、猪飼誉友、佐藤龍一、城戸瞭、堤内要
2. 発表標題 GC-MSを用いたマウス血清オキシステロールの一斉分析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤龍一、武田侑己、堤内要、猪飼誉友、堂前純子
2. 発表標題 LC-MS/MSおよびGC-MSを用いた酸化コレステロールの定量分析
3. 学会等名 第6回日本医用マスペクトル学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abe-Dohmae S, Sato R, Ikai Y, Tsutsumiuchi K
2. 発表標題 GC-MS characterization and quantification of oxysterols in mouse serum: Change in ABCA1- or ABCA7- deficient mice.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (ISA2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井知恵、呂鋭、米澤貴之、渡辺章夫、禹濟泰、堂前純子、横山信治
2. 発表標題 柑橘類果皮由来機能性成分ノビレチンによるステロール代謝の制御
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井知恵, 呂鋭, 米澤貴之, 渡辺章夫, 禹濟泰, 堂前純子, 横山信治
2. 発表標題 柑橘類果皮由来機能性成分ノビレチンによるABCA1・ABCG1活性制御
3. 学会等名 日本動脈硬化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠本高志, 堂前純子, 田中直伸, 柏田良樹, 辻大輔, 伊藤孝司, 石田竜弘, 奥平桂一郎
2. 発表標題 天然物による膜トランスポーターABCA7の発現増強機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoe Tsuboi, Rui Lu, Takayuki Yonezawa, Akio Watanabe, Je-Tae Woo, Sumiko Dohmae, Shinji Yokoyama
2. 発表標題 Molecular mechanism of promotion of HDL production by Nobiletin, a functional ingredient in citrus peel
3. 学会等名 2019 High Density Lipoprotein (HDL) Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井知恵, 呂鋭, 米澤貴之, 渡辺章夫, 禹濟泰, 堂前純子, 横山信治
2. 発表標題 ノビレチンのHDL産生促進の分子機構
3. 学会等名 ノビレチン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤淑美, 藤井理紗子, 美尾優希, 廣瀬万里紗, 深見優衣, 堂前純子, 淺井遥, 福石信之
2. 発表標題 脂質代謝異常による骨髄由来肥満細胞の脱顆粒率低下におけるGab2経路の関与について
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	堤内 要 (Tsutsumiuchi Kaname) (50329851)	中部大学・応用生物学部・教授 (33910)	
研究分担者	横山 信治 (Yokoyama Shinji) (10142192)	中部大学・生物機能開発研究所・客員教授 (33910)	

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
---------	---------