

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20390256

研究課題名 (和文) アディポネクチンによる HDL 新生と脂質排泄促進を介した粥状動脈硬化防御の分子機構

研究課題名 (英文) Adiponectin prevents atherosclerosis by accelerating reverse cholesterol transport and HDL synthesis

研究代表者

山下 静也 (YAMASHITA SHIZUYA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60243242

研究成果の概要 (和文)：

HDL やアポ蛋白 A-I はプラークからコレステロールを引き抜き、肝臓へ運ぶコレステロール逆転送系でコレステロール運搬役として働く。脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン (APN) 値と HDL-C 値は正相関し、その機序として HepG2 細胞に APN を添加すると、細胞内アポ A-I の遺伝子発現と分泌が増加し、ABCA1 の発現も増加した。APN の作用機序を解明する過程で、HDL 新生に関わる ApoA-I、ABCA1、VLDL 分泌に関わる ApoB100 の発現に核内受容体 COUP-TF2 の関与も我々は見出した。

研究成果の概要 (英文)：

High density lipoproteins (HDL) are known to prevent from development of atherosclerosis and the reduction of HDL is one of the risk factors for coronary heart disease. HDL and their component, apolipoprotein (Apo) A-I, take up cholesterol from atherosclerotic plaques and transport it back to the liver, a system called “reverse cholesterol transport (RCT)”. Both ApoA-I and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) are the rate-limiting factors that generate HDL in the liver. We for the first time identified adiponectin (APN) from adipocytes that inhibits the development of atherosclerosis. We found a positive correlation between plasma high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and APN concentrations in humans. We have shown that APN accelerates RCT by increasing the hepatic expression of ApoA-I and ABCA1, using HepG2 cells. In contrast, APN reduced the expression of ApoB100 mRNA and secretion of ApoB100 into the medium. We elucidated the importance of COUP-TF2, one of the nuclear receptors, a new regulator of lipoprotein metabolism, that may prevent atherosclerosis by increasing HDL synthesis by enhancing ApoA-I and ABCA1 and by reducing ApoB100 (VLDL) secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科：内科系臨床医学

細目：代謝学

キーワード： アディポネクチン、HDL コレステロール、アポ蛋白 A-I、アポ蛋白 B-100、COUP-TF2

1. 研究開始当初の背景

粥状硬化症は心血管病の基盤であり、その発症機構の解明や治療法の開発は現代循環器病学の最大の命題である。粥状動脈硬化巣にはコレステロールに富む泡沫細胞が集積し、それが豊富な不安定プラークは急性冠症候群が発症しやすい。泡沫細胞は単球由来マクロファージ (M ϕ) がスカベンジャー受容体を介して酸化 LDL 等を取り込んで形成される。従来の疫学調査により、冠動脈疾患の罹患率は血清高比重リポ蛋白 (HDL) コレステロール (HDL-C) 値と負の相関関係を示し、HDL は抗動脈硬化作用を有するリポ蛋白と考えられる。一方、泡沫細胞から HDL やその構成アポ蛋白 (アポ) であるアポ A-I を介したコレステロールの引き抜き (Cholesterol efflux, CE) が起こり、粥状動脈硬化の進展を阻止する機構が生体には備わっている。

私たちは内臓脂肪の蓄積によって糖尿病、脂質異常症、高血圧などの冠危険因子が1個人に集簇し、極めて粥状動脈硬化を発症しやすい病態として内臓脂肪症候群を世界に先駆けて提唱した。この病態は最近ではメタボリックシンドローム (MetS) と呼ばれている。近年のわが国における生活様式の欧米化に伴い MetS 患者が増加しているが、MetS では虚血性心疾患や脳卒中などの重篤な動脈硬化性疾患を高率に発症し、社会的にも極めて深刻な問題となっており、MetS に起因する動脈硬化発症の予防は極めて重要である。

主に肝臓で産生・分泌される HDL の主要構成アポ蛋白であるアポ A-I は、肝細胞に発

現する ABCA1 を介してコレステロールとリン脂質を受け取り、原始的な HDL が形成される。この過程を「HDL 新生反応」と呼ぶが、この原始的 HDL はさらに、粥状動脈硬化巣に集簇する泡沫化 M ϕ に発現している ABCA1 や同じく ABC family に属する ABCG1 などを介してコレステロールやリン脂質などを引き抜き、いわゆる「コレステロール引き抜き (CE)」の過程を経て、脂質に富む大粒子化した HDL へと成熟していく。そして、この大粒子化した成熟 HDL 内に存在するコレステロールは、コレステロールエステルの転送蛋白 (CETP) により超低比重リポ蛋白 (VLDL)、低比重リポ蛋白 (LDL) 等のアポ B-100 含有リポ蛋白へと転送され、最終的に肝臓や末梢組織に存在する LDL 受容体を介して取り込まれることにより粥状動脈硬化を防御する役割を果たしている。

MetS 患者には低 HDL-C 血症及び高 TG 血症 (高 VLDL 血症) が高率に合併し、MetS において上記に述べた脂質代謝への影響と動脈硬化との関連を明らかにすることは重要と考えられる。

2. 研究目的

最近、粥状動脈硬化の防御機構に関わる重要な分子の一つとして、私共が見出した脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン (APN) が注目されている。これまでの私共の研究により APN は血管内皮細胞における接着分子の発現、血管平滑筋細胞の増殖を抑制するとともに、様々な炎症性サイトカインの分泌やマクロファージにおけるスカベンジャー受

容体クラス A (SRA) を介した酸化 LDL 等の変性リポ蛋白の取り込みを抑制する作用を有することや、私共が開発した APN ノックアウトマウスはインスリン抵抗性を有する易動脈硬化発症モデル動物であることが明らかとなった。それに加え、注目すべきデータとして、1) 虚血性心疾患を有する患者血清の APN 値は低値を示すこと、2) 血清 APN 値と HDL-C 値の間には正の相関関係があること、3) 内臓脂肪蓄積に伴って APN と HDL-C が減少することも私共は見出している。この APN と HDL-C 値の正相関のメカニズムとして、先に述べた HDL の新生・成熟過程の APN による促進が想定されるが、従来の APN が抗動脈硬化的な作用を有することを示唆する様々な研究結果からすると、APN は肝臓における HDL 新生反応や末梢組織での CE を促進させ、血中 HDL-C を増加させる可能性も推察される。

本研究では、MetS に合併する脂質異常症の発症過程において MetS の鍵因子である APN は如何なる機序で関与しているのかを分子レベルで解明し、MetS における脂質異常症の治療法を開発することを究極の目的とする。

3. 研究の方法

1) 肝臓における HDL 新生に及ぼす APN の効果の解析

ヒト肝臓由来の系としてヒト肝癌由来の HepG2 細胞を使用し、recombinant APN を添加することにより、HDL の核となる ApoA-I の発現・分泌を、また HDL の新生に必要な関連蛋白である ABCA1・ABCG1・SR-BI の発現を mRNA・蛋白レベルにおいて解析した。mRNA は real time PCR、蛋白は western blot 法により検討した。さらに、APN ノックアウトマウスの肝臓において関連蛋白の発現を野生型マウスと比較し、また

血清リポ蛋白の濃度を HPLC で比較した。

2) 末梢血単球由来マクロファージ (M ϕ) におけるコレステロール引き抜きに及ぼす APN の効果の解析

末梢組織における変化を検討する系としては、ヒト単球由来 M ϕ を使用した。ヒト単球は健常人血清より分離し、1 週間培養して M ϕ に分化させ、APN を培養液中に添加した。

細胞中における ABCA1・ABCG1・SR-BI の発現を検討し、 $[^3\text{H}]$ で細胞・メディアム中のコレステロールをラベルすることで CE の変化を検討した。また、野生型及び APN ノックアウトマウスの腹腔由来 M ϕ を用い、野生型と関連蛋白の発現・CE の比較を行った。

3) 肝臓からの VLDL 合成・分泌に及ぼす APN の効果の解析

VLDL/TG 代謝に関してもその核となる ApoB・血清 VLDL/TG 濃度について上記同様に in vitro、in vivo において検討した。

4. 研究成果

(1) 肝臓での HDL 新生関連蛋白に及ぼす APN の影響

粥状動脈硬化の発症・進展の防御機構において、最も重要な役割を担う HDL の血中レベルは、肝臓及び M ϕ 等の末梢細胞における HDL の新生・成熟・代謝の程度により規定されている。また、ヒトの生体内に存在する HDL の約 7 割は肝臓で産生・分泌されることが知られており、肝臓での HDL 新生は動脈硬化防御機構における最も重要なステップの一つと考えられる。

① ヒト肝癌由来 HepG2 細胞における HDL 新生関連蛋白に及ぼす APN の影響

HepG2 細胞に recombinant APN を 0・5・10・30 μ g/ml 添加し、ApoA-I・ABCA1・ABCG1・SR-BI の発現の変化を検討した。APN 30 μ g/ml 添加により、ApoA-I の細胞中

の発現・メディウム中の分泌は蛋白レベルにおいて有意に増加を認め、同時に細胞中の ABCA1 の発現は mRNA・蛋白レベルともに増加を認めた。ABCG1・SR-BI の発現は mRNA・蛋白レベルともに変化を認めなかった。

また、同サンプルにおいて、核内受容体である PPAR α ・LXR α の発現を mRNA で確認したところ、LXR α の増加はみられたものの PPAR α は有意な変化を認めなかった。

②APN ノックアウトマウスの肝臓における HDL 新生関連蛋白の発現

12-13 週齢 APN ノックアウトマウスのオス(n=6)を normal chow で飼育し、肝臓における ApoA-I・ABCA1・ABCG1・SR-BI の発現を mRNA・蛋白レベルで解析した。ApoA-I、ABCA1 の発現は mRNA・蛋白レベルいずれも APN ノックアウトマウスの肝臓において野生型に比較し、有意な低下がみられた。また、PPAR α は mRNA レベルで変化はなく、LXR α mRNA は APN ノックアウトマウスで有意に発現が低下していた。

(2) 末梢組織におけるコレステロール汲み出し機構への APN の影響

粥状動脈硬化の防御機構において、粥状硬化巣に集簇する泡沫化 M ϕ の細胞内に蓄積したコレステロールを細胞外へと搬出するには、アポ A-I や HDL がその細胞表面に存在する ABCA1、ABCG1 などのトランスポーターに結合、またはそれに関連してコレステロールを受けとる作業を行わなければならない。この過程を CE と呼んでいる。

①ヒト単球由来 M ϕ における CE 関連蛋白の発現と CE に対する APN の影響

健常人の血液から単球を分離、7日間培養し、泡沫化させ、APN を添加した。APN を 0、5、10、30 μ g/ml 添加したところ、ABCA1 の発現は mRNA・蛋白レベルとも濃度依存性に増加した。

一方、ABCG1、SR-BI の mRNA・蛋白の発現レベルは有意な変化を認めなかった。その結果に伴い、ABCA1 を介した ApoA-I による CE は APN を 10 μ g/ml 添加することにより増加したが、ABCG1、SR-BI を介する HDL による CE は有意な変化を認めなかった。また、APN 10 μ g/ml 添加後の M ϕ で核内受容体の発現を mRNA で検討したところ、PPAR α ・PPAR γ ・LXR α の増加を確認した。

②APN ノックアウトマウスの腹腔 M ϕ における CE と関連蛋白の発現

一方、APN ノックアウトマウスの腹腔 M ϕ では、ABCA1 の蛋白発現・ApoA-I 由来の CE は野生型に比較し、有意な低下が確認でき、また、ABCG1・SR-BI の蛋白発現、HDL による CE では有意な変化を認めなかった。さらに、この APN ノックアウトマウスにおける ABCA1 の低下は腹腔 M ϕ を通常の培養液でしばらく培養すると消失していくことが観察された。

(3) APN ノックアウトマウスと野生型マウスにおける血清リポ蛋白脂質濃度の比較

APN ノックアウトマウスの血清 LDL コレステロール値、HDL コレステロール値には野生型と比較して有意差を認めなかったが、アポ A-I 値は低値、アポ B 値は高値であった。

また、HPLC 法によりリポ蛋白をさらに解析したところ、VLDL 分画中の TG は APN ノックアウトマウスにおいて有意な高値が認められた。

HDL の場合と同様の手法で、ヒト肝臓由来 HepG2 細胞の培養液に APN を添加した際に、VLDL の主要構成アポ蛋白である ApoB100 の分泌の変動を検討した結果、APN 添加により ApoB100 の分泌の減少を認めている。

(4) APN と脂質代謝異常に関連する核内受容体の関与

ヒト単球由来 M ϕ においては APN 添加により PPAR α ・PPAR γ ・LXR α の mRNA 発現増加が見られ、また APN ノックアウトマウスの腹腔 M ϕ

では PPAR γ (主に γ 2)・LXR α の発現の低下が確認できた。最近、M ϕ において PPAR γ -LXR α の関連が CE に関連しているとの報告もみられるが、APN \uparrow \rightarrow PPAR γ \uparrow \rightarrow LXR α \uparrow \rightarrow CE \uparrow である可能性が考えられた。

肝臓においては、HepG2 細胞に APN を添加したサンプルでは mRNA レベルにおいて、PPAR α の変化は確認できなかったが、LXR α mRNA の発現の増加が見られた。一方、APN ノックアウトマウスの肝臓においても LXR α の発現は有意な低下がみられた。また、同時に ApoA-I regulatory protein として発見された COUP-TF2 (Chicken Ovalbumin Upstream Proliferator-Tissue Factor 2) の発現に関しては、HepG2 細胞に APN を添加したところ、COUP-TF2 の mRNA レベルの発現は増加し、また、APN ノックアウトマウスにおいては COUP-TF2 の mRNA レベルが逆に低下していることが確認された。

(5) APN とリポ蛋白代謝の関連における COUP-TF2 の関与について

COUP-TF2 は ApoA-I の発現を制御する核内受容体として報告されている。また、最近では筋細胞 (C2C12 cell) において COUP-TF2 の発現を抑制すると、ABCA1 の発現も抑制されるとの報告があり、ApoA-I・ABCA1 に関連する蛋白として HDL 新生に関連する可能性があると考えられる。肝臓由来の細胞である HepG2 細胞においても、si-RNA を用い、COUP-TF2 の発現を抑制すると、ABCA1 の発現が低下することが確認できた。そこで、APN \uparrow \rightarrow COUP-TF2 \uparrow \rightarrow ABCA1 \uparrow の可能性を考え、HepG2 細胞において si-RNA で COUP-TF2 を抑制した上で APN を添加したところ、COUP-TF2 を抑制した方が ABCA1 の発現は増加傾向であった。COUP-TF2 は RXR α と heterodimer を形成し、作用することが知られている。ABCA1 を target gene とする LXR α もまた RXR α と heterodimer

を形成することから、何らかの均衡関係にある可能性があると考えられ、今後、検討すべき課題であると考えられる。

また、APN、COUP-TF2、TG 代謝との関連においては、HepG2 細胞に COUP-TF2 を過剰発現すると TG 分泌が低下することが確認できており、COUP-TF2 は APN と脂質代謝に関連する核内受容体の可能性が考えられ、今後更に詳細に解析の予定である。

以上の結果をまとめると、APN は肝臓における HDL 新生の亢進と M ϕ におけるコレステロール引き抜きの促進を介して、HDL コレステロールを増加させ、また肝細胞においては VLDL の合成・分泌を抑制することにより、MetS における脂質異常症を改善する可能性が示唆された。また、この APN のリポ蛋白代謝に及ぼす影響は COUP-TF2 を介する可能性も考えられた。

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 1 件)

1) Tsubakio-Yamamoto K, Matsuura F, Koseki M, Oku H, Sandoval JC, Inagaki M, Nakatani K, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Masuda D, Ohama T, Maeda N, Nakagawa-Toyama Y, Ishigami M, Nishida M, Kihara S, Shimomura I, Yamashita S: Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 375(3):390-394, 2008.

[学会発表] (計 9 件)

1) Yamamoto K, Yamashita S, Ohama T, Masuda D, Sandoval JC, Inagaki M, Nakatani K, Kawase M, Kawase R, Nakaoka H, Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Kihara S, Shimomura I, Komuro I: Adiponectin might prevent atherosclerosis by COUP-TF2-dependent pathway. 第 74 回日本循環器学会 (2010. 3. 7) (京都国際会議場)
2) Ohama T, Yamamoto K, Masuda D, Sandoval JC, Inagaki M, Nakatani K, Kawase M, Kawase R, Nakaoka H, Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Kihara S, Shimomura I, Yamashita S,

Komuro I: Adiponectin enhances de novo hepatic HDL synthesis through LXR alpha- and COUP-TF II-dependent pathways. 第74回日本循環器学会 (2010.3.7) (京都国際会議場)

3) Tsubakio-Yamamoto K, Yamashita S, Ohama T, Masuda D, Sandoval JC, Inagaki M, Nakatani K, Yuasa-Kawase M, Kawase R, Nakaoka H, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Kihara S, Shimomura I, Komuro I: Adiponectin enhances de novo hepatic HDL synthesis through LXR alpha- and COUP-TFII-dependent pathways. 82nd American Heart Association Annual Scientific Meeting (2009.11.14-18) (Orlando, FL, USA)

4) Ohama T, Tsubakio-Yamamoto K, Sandoval JC, Inagaki M, Nakatani K, Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Kihara S, Shimomura I, Yamashita S: Adiponectin enhances apo-AI-mediated cholesterol efflux from macrophages through ABCA1-dependent pathway. 第41回日本動脈硬化学会総会 学術集会 (2009.7.18) (海峡メッセ下関、山口)

5) Yamashita S, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T: Adiponectin enhances reverse cholesterol transport through de novo hepatic HDL synthesis and apo A-I-mediated cholesterol efflux from macrophages via ABCA1-dependent pathway. 15th International Symposium on Atherosclerosis (2009.6.14-18) (Boston, MA, USA)

6) Ohama T, Yamamoto K, Nakatani K, Inagaki M, Sandoval JC, Masuda D, Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Yamashita S: Role of adiponectin in the atheroprotective system via HDL-cholesterol. 15th International Symposium on Atherosclerosis (2009.6.14-18) (Boston, MA, USA)

7) Ohama T, Yamamoto K, Kawase R, Nakaoka H, Nakatani K, Inagaki M, Sandoval JC, Masuda D, Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Shimomura I, Yamashita S: Role of adiponectin in the pathogenesis of dyslipidemia in the metabolic syndrome. 第73回日本循環器学会総会・学術集会 (2009.3.20) (大阪国際会議場)

8) Ohama T, Matsuura F, Yamashita S: Effect of adiponectin on HDL synthesis in the liver. 第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2008.7.11) (つくば国際会議場)

9) Matsuura F, Oku H, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Maeda N, Ohama T, Ishigami M,

Nishida M, Hirano K, Kihara S, Hori M, Shimomura I, Yamashita S: Adiponectin deficiency suppresses ABCA1 expression and apoA-I synthesis in the liver. 77th Congress of European Atherosclerosis Society (2008.4.26-29) (Istanbul Lutfi Kindar Convention & Exhibition Centre)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 静也 (YAMASHITA SHIZUYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 60243242

(2) 研究分担者

大濱 透 (OHAMA TOHRU)

大阪大学・保健センター・助教

研究者番号: 20467583

(3) 連携研究者

なし