

機関番号：34306

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590072

研究課題名 (和文) メタボリックシンドロームの進展要因となる HDL の産生抑制と
肝脂肪蓄積の発現機構研究課題名 (英文) Mechanisms for the development of atherosclerosis with low HDL
levels and of fatty liver

研究代表者

秋葉 聡 (AKIBA SATOSHI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70231826

研究成果の概要 (和文)：メタボリックシンドロームの発症から粥状動脈硬化症や非アルコール性脂肪肝への進展機構を解明するうえで、炎症反応を担う IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) がメタボリックシンドロームの進展要因である高密度リポタンパク質 (HDL) の低下および肝での脂肪蓄積に関与する可能性について IVA 型 PLA₂ 欠損マウスを用いて検索した。

(1) 本欠損マウスでは、野生型と同様に高脂肪食投与に伴い HDL が低下していたが、野生型に比し粥状動脈硬化巣の形成が軽減されていた。

(2) 本欠損マウスでは、野生型に比し高脂肪食投与による脂肪肝／肝線維化の形成が軽減されていた。

これらの結果から、IVA 型 PLA₂ は粥状動脈硬化症や脂肪肝／肝線維化の発症に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Metabolic syndrome with local inflammation progresses to atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The present study examined the possible involvement of group IVA phospholipase A₂ (IVA-PLA₂), which catalyzes the first step of the biosynthesis of inflammatory lipid mediators, in the development of (1) atherosclerosis and (2) NAFLD using IVA-PLA₂-knockout (KO) mice.

(1) Wild-type mice on high-fat diets developed the formation of atherosclerotic lesions in the aortic root with low serum levels of HDL-cholesterol (HDL-C), compared with wild-type mice fed normal diets. IVA-PLA₂-KO mice on high-fat diets exhibited resistance to the formation of lesions even with low serum levels of HDL-C. These findings indicate that a deficiency of IVA-PLA₂ alleviates the high-fat diet-induced formation of atherosclerotic lesions without improving dyslipidemia.

(2) Wild-type mice on high-fat diets developed fatty liver, compared with wild-type mice fed normal diets. However, these high-fat diet-induced alterations were markedly decreased in IVA-PLA₂-KO mice. Furthermore, high-fat diets induced liver fibrosis with the expression of collagen type I $\alpha 2$ and transforming growth factor- β mRNA in the liver of wild-type mice but not IVA-PLA₂-KO mice. These findings indicate that a deficiency of IVA-PLA₂ protected mice against the high-fat diet-induced development of NAFLD with fibrosis.

The present results suggest the possible involvement of IVA-PLA₂ in development of atherosclerosis and NAFLD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）の発症・進展過程には、高脂肪食・過食に起因した内臓脂肪の蓄積（肥満）とこれに伴う血中アディポカイン類の増大、これらの因子によるリポタンパク質の異常（組成の変動）が関与している。さらに、これらの病態は、粥状動脈硬化症や非アルコール性脂肪肝（NAFLD）へと進展していく。この一連の進展過程のうち、近年、特に高密度リポタンパク質（HDL）の低下がメタボリックシンドロームを粥状動脈硬化症へと顕著に進展させる要因であると考えられるようになった。一方、NAFLDの発症機構に関してはほとんど解明されていないのが現状である。申請者は、メタボリックシンドロームの進展機構を解明するうえで、HDLの低下を介した粥状動脈硬化症の発症とNAFLDの発症のいずれも炎症反応を伴うことに着目し、炎症反応を担うIVA型ホスホリパーゼA₂（PLA₂）がメタボリックシンドロームの進展要因であるHDLの低下および肝での脂肪蓄積の発現に関与する可能性を考えた。そこで本研究では、この可能性を明らかにし、メタボリックシンドローム関連疾患の治療標的分子として、IVA型PLA₂の位置づけを明確にすることを当初の目的とした。

2. 研究の目的

(1) 粥状動脈硬化症の発症過程へのIVA型PLA₂の関与

メタボリックシンドロームの発症から粥状動脈硬化症への進展機構を解明するうえで、炎症反応を担うIVA型PLA₂が、メタボリックシンドロームの進展要因であるHDLの低下と、それに引き続く粥状動脈硬化巣の形成に関与する可能性についてIVA型PLA₂欠損マウスを用いて検索した。

(2) NAFLDの発症過程へのIVA型PLA₂の関与

メタボリックシンドロームの発症からNAFLDへの進展機構を解明するうえで、IVA型PLA₂が、メタボリックシンドロームに引き続くNAFLDの発症に関与する可能性についてIVA型PLA₂欠損マウスを用いて検索した。

3. 研究の方法

(1) 粥状動脈硬化症の発症過程へのIVA型PLA₂の関与

野生型またはIVA型PLA₂欠損マウス（雌、8週齢）に高脂肪食（15%脂肪、1.25%コレス

テロール、0.5%コール酸）を24週間投与した後、大動脈基部を試料として粥状動脈硬化巣の形成をオイルレッドOでの染色にて評価した。また、血清を試料としてHDLを測定した。

(2) NAFLDの発症過程へのIVA型PLA₂の関与

野生型またはIVA型PLA₂欠損マウス（雄、8週齢）に高脂肪食（20%脂肪、1.25%コレステロール）を16週間投与した後、精巣上体脂肪組織および肝を試料としてヘマトキシリン・エオジンまたはシリウスレッドでの染色にて脂肪肝・線維化の形成を評価した。また、各組織中の種々因子のmRNAの発現の程度をRT-PCRにて解析した。

4. 研究成果

(1) 粥状動脈硬化症の発症過程へのIVA型PLA₂の関与

高脂肪食を投与した野生型マウス（B6系統）の大動脈基部でのプラーク形成がIVA型PLA₂欠損型（B6系統とのもどし交配20回）では軽減されていることを見出した。さらに、高脂肪食投与下の野生型では血清中のHDLの減少が見られたが、欠損型ではHDLが野生型と同様に減少した群とHDL量が維持されていた群に分かれた。両群の違いは以下の通りである。欠損型ではB6系統のIVA型PLA₂遺伝子の代わりに129系統マウス由来の修飾した遺伝子を有するが、その近傍に存在するアポA-II遺伝子が、前者の群ではB6系統由来であり、後者の群では129系統由来であることが判明した。これまでに、B6系統と129系統のアポA-II遺伝子の違いがHDL量の違い（B6系統<129系統）として現れ、B6系統は129系統に比し高脂肪食投与下に動脈硬化を発症しやすいことが知られている。従って、当初の予想とは異なったが、IVA型PLA₂はHDLの低下とは無関係に病巣の形成に関与している可能性があり、HDLの低下を改善できなくても病巣形成を抑制できることが示唆された。そこで、本研究で用いた欠損型マウスの両遺伝子の由来を調べ、両遺伝子がB6系統由来のIVA型PLA₂欠損マウスと野生型マウスに高脂肪食を投与したところ、いずれの遺伝子型のマウスにおいても、血清中のHDLの減少が見られたが、野生型で誘起された大動脈基部でのプラーク形成（オイルレッドO染色部位、図1上段中の矢印）は欠損型では軽減されていることを見出した（図1下段）。従って、IVA型PLA₂の欠損は、高脂肪食投与

による HDL の低下を抑制するのではなく、病巣形成に關与する何らかの細胞応答を抑制することにつながった可能性が考えられた。

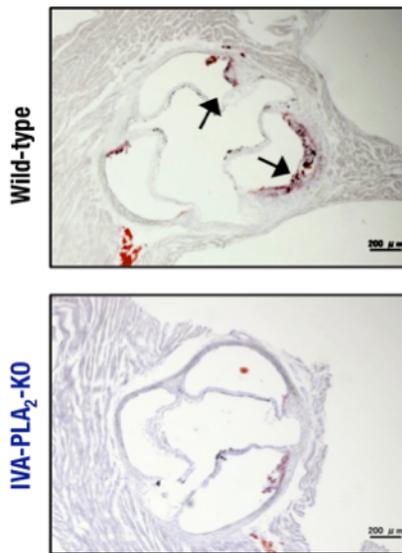


図 1. IVA 型 PLA₂ 欠損マウスでの粥状動脈硬化巣の形成抑制

そこで本研究では、病巣形成において重要となる細胞応答として、単球の浸潤からマクロファージへの分化やその泡沫化の過程に着目し、野生型および IVA 型 PLA₂ 欠損型マウスの大動脈基部の病巣部でのマクロファージの状態を比較検討した。その結果、欠損型では、野生型に比し病変部の面積の減少に伴うマクロファージが集積している部位・面積（抗 F4/80 抗体での免疫染色）も減少していた。さらに、欠損型マウスの病変部のマクロファージにおいて、アポトーシスを起こしている細胞の割合が、野生型に比し多かった（TUNEL 染色）。

粥状動脈硬化巣でのマクロファージのアポトーシスは、細胞の泡沫化に伴うネクrosis（病変形成）の抑制につながると考えられている。このことを踏まえると、本研究での結果から、IVA 型 PLA₂ は、マクロファージのアポトーシスを制御することで、病変形成に關与することが示唆された。

(2) NAFLD の発症過程への IVA 型 PLA₂ の關与
野生型マウスに高脂肪食を投与した後、肝組織切片を観察したところ、普通食投与に比し肝細胞中の空胞化が見られ（図 2 上段左）、肝組織中のトリグリセリド量が増大していたが、IVA 型 PLA₂ 欠損型ではこれらの変化は軽減されていた（図 2 上段右）。この欠損型で見られた抑制効果と、血中のアディポサイトカイン類（アディポネクチン、レジスチン、

レプチン）の変動との間に相関性は見られなかったが、血中のプロスタグランジン E₂ 量は欠損型で有意に低値であった。さらに、高脂肪食を投与した野生型マウスでは、肝組織の線維化も誘起されており（図 2 下段左）、中にコラーゲン線維の野生型で見られた肝細胞での脂肪蓄積に加えて肝線維化も IVA 型 PLA₂ 欠損型において軽減されていることを新たに見出した（図 2 下段右）。

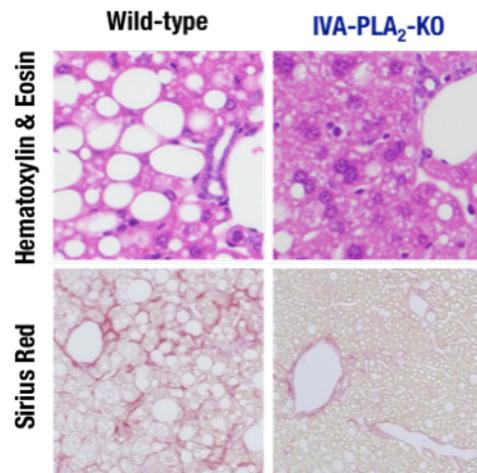


図 2. IVA 型 PLA₂ 欠損マウスでの脂肪肝形成（上段）および肝線維化（下段）の抑制

また、高脂肪食投与下の野生型マウスの肝組織では、普通食投与に比し肝線維化の指標となる TGF-β1 や I 型コラーゲンの mRNA のみならず、IVA 型 PLA₂ の mRNA の発現量が増大していた。しかしながら、IVA 型 PLA₂ 欠損マウスにおいては、高脂肪食に伴う TGF-β1 および I 型コラーゲンの mRNA の発現増大は軽減されていた。

一方、脂肪組織の重量に關しても、高脂肪食投与下において、野生型に比し欠損型の脂肪重量は低下傾向にあった。しかしながら、血清中の遊離脂肪酸量は、両遺伝子型で差は見られなかった。また、3T3L1 細胞の脂肪細胞への分化過程や脂肪蓄積過程に対して IVA 型 PLA₂ の特異的阻害剤は何ら影響を示さなかった。これらのことから、IVA 型 PLA₂ 欠損マウスでの脂肪肝形成の抑制は、脂肪組織での脂肪蓄積の減少ではなく、肝細胞での脂肪蓄積の低下によると考えられた。そこで、肝細胞（Huh-7 細胞）に遊離脂肪酸を添加しトリグリセリドを増大させる条件下に、IVA 型 PLA₂ の特異的阻害剤を作用させたが、この増大は影響を受けなかった。しかしながら、このトリグリセリドの増大に伴い、IVC 型 PLA₂ の発現増大が見られ、この増大は IVC 型 PLA₂ の阻害剤により抑制されることを見出した。

これらの結果は、高脂肪食に起因するメタボリックシンドロームから粥状動脈硬化症やNAFLDへの進展過程にIVA型PLA₂が何らかの機構を介して関与していること示唆している。その機構には、おそらく、プロスタグランジン E₂ などアラキドン酸カスケードでの生成物によるマクロファージの細胞応答が関与すると思われる。本研究の成果からは、IVA型PLA₂がこれら一連の疾患における治療標的分子の候補となる可能性が高いことが推察された。

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4件)

- (1) Keiichi Ishihara, Kengo Tachibana, Asuka Kuroda, Ayano Terakawa, Shinsuke Baba, Shiho Kanai, and Satoshi Akiba: Triacylglycerol deposition with group IVC phospholipase A₂ expression in oleate- and linoleate-stimulated Huh-7 hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, **34**, 191-196, 2011.
 - (2) Hiromi Ii, Naoki Yokoyama, Shintaro Yoshida, Kae Tsutsumi, Shinji Hatakeyama, Takashi Sato, Keiichi Ishihara, and Satoshi Akiba: Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. *PLoS ONE*. 査読有, **4**, e8089, 2009.
 - (3) Hiromi Ii, Shinji Hatakeyama, Kae Tsutsumi, Takashi Sato, and Satoshi Akiba: Group IVA phospholipase A₂ is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 査読有, **86**, 12-17, 2008.
 - (4) Mayuko Osada-Oka, Takako Ikeda, Satoshi Akiba, and Takashi Sato: Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1 α -dependent expression of thrombospondin-1. *J. Cell. Biochem.*, 査読有, **104**, 1918-1926, 2008.
- [学会発表] (計31件)
- (1) 金井志帆、重村侑哉、金又聡美、濱野稚紗、米川昌輝、石原慶一、秋葉 聡: マクロファージのアポトーシスの抑制を介した IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の粥状動脈硬化巣形成への関与. 日本薬学会第 131 年会(静岡), 2011. 3.
 - (2) 伏見英晃、宮崎 晃、横山直記、金井志帆、石原慶一、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損による肝線維化抑制. 日本薬学会第 131 年会(静岡), 2011. 3.
 - (3) 寺井建太、黒田明日香、堀内映里、杉原佳奈子、金井志帆、石原慶一、秋葉 聡: マクロファージの分化成熟過程における IVC 型ホスホリパーゼ A₂ の役割. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸), 2010. 12.
 - (4) 金井志帆、重村侑哉、金又聡美、濱野稚紗、米川昌輝、石原慶一、秋葉 聡: 高脂肪食投与下の IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスは HDL の低下を改善することなく粥状動脈硬化病変形成を軽減する. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸), 2010. 12.
 - (5) 宮崎 晃、横山直記、金井志帆、石原慶一、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスにおける高脂肪食投与に伴う脂肪肝の抑制因子の網羅的解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸), 2010. 12.
 - (6) 宮崎 晃、横山直記、金井志帆、石原慶一、秋葉 聡: プロテオミクス解析を用いた IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の欠損による非アルコール性脂肪肝形成の抑制に関連する分子の探索. 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (枚方), 2010. 10.
 - (7) 三田景子、中田裕子、金井志帆、石原慶一、秋葉 聡: 内臓脂肪組織における慢性炎症への IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の関与. 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (枚方), 2010. 10.
 - (8) Satoshi Akiba, Yuya Shigemura, and Keiichi Ishihara: Deficiency of group IVA phospholipase A₂ alleviates high-fat diet-induced atherosclerotic lesion formation without improving dyslipidemia. 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (岐阜), 2010. 7.
 - (9) Naoki Yokoyama, Keiichi Ishihara, and Satoshi Akiba: IVA PLA₂-mediated fatty liver with fibrosis in mice fed high-fat diets. 2010 Keystone Symposia Bioactive Lipids: Biochemistry and Diseases (Kyoto), 2010. 6.
 - (10) 寺井建太、馬場信輔、寺川綾乃、石原慶一、秋葉 聡: ヒト肝癌由来 HuH-7 細胞

- におけるトリアシルグリセロール蓄積への細胞質ホスホリパーゼ A₂ の関与. 日本薬学会第 130 年会(岡山), 2010. 3.
- (11) 宮崎 晃、横山直記、石原慶一、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の欠損による高脂肪食誘発性脂肪肝の抑制に関連する分子の同定. 日本薬学会第 130 年会(岡山), 2010. 3.
- (12) 黒田明日香、杉原佳奈子、鈴木麻央、丹治里奈、石原慶一、秋葉 聡: 単球芽細胞 THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化成熟における細胞質ホスホリパーゼ A₂ の役割. 難病克服を目指した分子基盤創薬科学の開拓 成果発表会(京都), 2010. 3.
- (13) 重村侑哉、金又聡美、米川昌輝、濱野稚紗、石原慶一、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスにおける粥状動脈硬化症進展の抑制とその機構. 難病克服を目指した分子基盤創薬科学の開拓 成果発表会(京都), 2010. 3.
- (14) 横山直記、石原慶一、秋葉 聡: 高脂肪食投与下の IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスにおける脂肪肝形成および肝線維化の抑制. 難病克服を目指した分子基盤創薬科学の開拓 成果発表会(京都), 2010. 3.
- (15) 宮崎 晃、横山直記、石原慶一、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスの脂肪肝形成の抑制因子のプロテオミクス解析による同定. 難病克服を目指した分子基盤創薬科学の開拓 成果発表会(京都), 2010. 3.
- (16) Satoshi Akiba, Naoki Yokoyama, Hiromi Ii, and Keiichi Ishihara: Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage and adipose accumulation in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. The 1st International Congress on Abdominal Obesity (Hong Kong), 2010. 1.
- (17) 横山直記、石原慶一、秋葉 聡: 脂肪組織および肝における脂肪蓄積への IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の関与. 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会(東大阪), 2009. 10.
- (18) 重村侑哉、石原慶一、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスにおける高脂肪食投与に伴う HDL 低下と脂肪線条形成の抑制. 第 82 回日本生化学会大会(神戸), 2009. 10.
- (19) 横山直記、石原慶一、秋葉 聡: 脂肪組織および肝での脂肪蓄積への IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の関与. 第 14 回アディポサイエンス研究会シンポジウム(豊中), 2009. 8.
- (20) Satoshi Akiba: Group IVA phospholipase A₂ in adipose accumulation and fatty liver. 4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (Tokyo), 2009. 5.
- (21) Hiromi Ii, Shinji Hatakeyama, Kae Tsutsumi, Yoshie Arai, Yuya Shigemura, and Satoshi Akiba: Suppression of atherosclerosis progression in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. 4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (Tokyo), 2009. 5.
- (22) Naoki Yokoyama, Hiromi Ii, and Satoshi Akiba: Improvement of high-fat diet-induced fat accumulation with inflammation in the liver in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. 4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (Tokyo), 2009. 5.
- (23) Naoki Yokoyama, Hiromi Ii, and Satoshi Akiba: Amelioration of high-fat diet-induced fat deposition in the liver and adipose tissues in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (Tokyo), 2009. 5.
- (24) 重村侑哉、飯居宏美、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスにおける高脂肪食投与に伴う HDL 産生低下と脂肪線条形成の抑制. 日本薬学会第 129 年会(京都), 2009. 3.
- (25) 横山直記、飯居宏美、秋葉 聡: 脂肪組織および肝における脂肪蓄積への IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の関与. 日本薬学会第 129 年会(京都), 2009. 3.
- (26) Satoshi Akiba, Hiromi Ii, Naoki Yokoyama, and Takashi Sato: Amelioration of high-fat diet-induced adipose accumulation and fatty liver in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. International Symposium on Integrated Medicinal Science -On the basis of traditional medicine to biomolecular system- (Kyoto), 2008. 12.
- (27) 重村侑哉、飯居宏美、秋葉 聡: IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損マウスにおける高脂肪食投与に伴う肝障害と脂肪線条形成の抑制. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会(神戸), 2008. 12.
- (28) 横山直記、飯居宏美、秋葉 聡: 高脂肪食投与下の IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 欠損

マウスにおける脂肪組織および肝での脂肪蓄積抑制. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (神戸), 2008. 12.

(29) 飯居宏美、岡真優子、佐藤隆司、秋葉 聡: Group IVA-phospholipase A₂欠損マウスでの非アルコール性脂肪肝の抑制. 第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (つくば), 2008. 7.

(30) 飯居宏美、岡真優子、佐藤隆司、秋葉 聡: 肝での脂肪蓄積への group IVA phospholipase A₂の関与. 第50回日本脂質生化学会 (徳島), 2008. 6.

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/byoutai/byoutai-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋葉 聡 (AKIBA SATOSHI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 70231826