

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07310

研究課題名(和文) レムナントリポ蛋白代謝における影響から解明するapoEのCys基修飾の機能的意義

研究課題名(英文) Impact of cysteine modifications of apolipoprotein E on the remnant lipoprotein metabolism

研究代表者

山内 一由 (Yamauchi, Kazuyoshi)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：70419414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化性疾患やアルツハイマー病(AD)など様々な疾患の罹患性に差を生じさせているapoEアイソフォームの病態生理学的機能を解明する目的で、LRP1を介したレムナントリポ(RLP)蛋白代謝に及ぼすapoEアイソフォームとapoE分子内のCys-thiol基のレドックス状態の影響について検討を行った。LRP1を介したRLP代謝は分子内にCysを有するapoE2やapoE3を含有するRLPではCys-thiol基のレドックス状態の影響を受けて調節されているが、CysをもたないapoE4を含有するRLPではその調節機構が本質的に欠落している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

apoEのおもな3つのアイソフォームのうちapoE4が脂質代謝異常に伴う動脈硬化性疾患やアルツハイマー病(AD)など様々な疾患の危険因子として周知されているがその機序は不明である。また、apoEを含有するレムナントリポ蛋白の代謝を担っているLRP1は中枢神経細胞にも発現しており、apoEとともにADの発症に影響を与えていることが示唆されているがその機序についても不明である。本研究で得られた知見は、apoE4が有する有害な病態生理学的的一面を明らかにするものであり、発症にapoEが関与する種々の疾患の有効な予防法、治療法、早期診断に有用な臨床検査法の開発において有用であると言える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathophysiological functions of apoE isoforms that cause differences in susceptibility to various diseases such as atherosclerosis and Alzheimer's disease (AD), we investigated the effects of apoE isoforms and the redox status of Cys-thiol residue in the apoE molecules on the LRP1-mediated remnant lipoprotein (RLP) protein metabolism. We found that the redox modifications of Cys-thiol may function as on-off switches for the LRP1-mediated metabolism of apoE2 or apoE3 containing RLP, but apoE4, which has no Cys residue, intrinsically lacks such a regulatory system.

研究分野：病因病態検査学

キーワード：apolipoprotein E LRP1 Cys基 レドックス状態 リポ蛋白代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

apoE は種々のリポ蛋白受容体のリガンドとして血中における脂質代謝を司る重要な糖蛋白質であり、脂質代謝異常に付随する種々の動脈硬化性疾患の病態形成に関与している。また、apoE は脳神経組織でも産生され、当該組織の脂質代謝、神経細胞の成長・維持といった機能を担い、アルツハイマー病 (AD) の発症に密接に関わっていることが周知されている。しかし、apoE 関連疾患の病態メカニズムは未だ不明な点が多く、高齢化が加速化する中でそれらの予防法および早期診断法の開発とそれに不可欠な病態メカニズムの解明が喫緊の課題となっている。

タンパク質の Cys-thiol 基のレドックス変化は、生体内のレドックス変化に応答して生じる翻訳後修飾であり、種々の生体調節機能に影響を及ぼしていることが知られている。我々は、apoE においても同様であり、アイソフォーム間の最大の違いである Cys の有無および Cys-thiol 基のレドックス状態が apoE 関連疾患の病態形成において重要であると考え研究を進め、これまでに、apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態が脂質代謝に大きなインパクトをもつことを報告してきた。

動脈硬化惹起性に富むレムナントリポ蛋白 (RLP) が蓄積する III 型高脂血症では、LDL-receptor との親和性が乏しい apoE2 をホモ接合で有することが発症の必須条件となっているが十分条件ではなく、多くの apoE2 ホモ接合体保有者では、LDL-receptor を介したクリアランスの低下を LDL 受容体関連蛋白 (LRP)1 と Syndecan (SDC)1 を介した経路が代償するため正脂血症を呈することが知られている。一方、どのような要因が加わることで発症の条件が整うのかは不明である。

### 2. 研究の目的

apoE の Cys-thiol 基のレドックス変化が LRP1 を介する RLP 代謝に及ぼす影響について明らかにし、脂質代謝異常に伴う動脈硬化性疾患や AD をはじめとする apoE がその発症に密接に関与している諸疾患の病態メカニズムの解明に繋げることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) apoE の Cys-thiol 基のレドックス修飾

リコンビナント apoE2, apoE3, および apoE3 を Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) と室温で 30 分間反応させた後、PBS に対する透析により過剰の TCEP を除去した。その後、TCEP 還元処理した apoE を N, N, N', N'-tetramethylazodi-carboxamide (diamide), 2-iodoacetamide (IAM), あるいは iodoacetate (IAA) と室温で 30 分間、apoAII と 37°C で 24 時間反応させた後、PBS に対する透析によって過剰な酸化還元剤を除去した。

#### 2) apoE 含有蛍光標識エマルジョン (apoE-F-EP) の調製

トリオレイン, egg ホスファチジルコリン (PC), NBD 標識 PC がモル比 3.5 : 1.0 : 0.05 の割合からなる混合溶液を窒素ガス噴霧下で丸底フラスコの壁面に薄膜状に乾燥させ、この脂質膜を 100 mM NaCl を含む 10 mM Tris-HCl (pH7.4) に分散、55 °C で 30 分間超音波処理し、混入するリポソームを超遠心分離法で除去した後、均一な蛍光標識エマルジョン (F-EP) を得た。さらに、1) の apoE を F-EP と 37 °C で 30 分間させて apoE-F-EP とした。

#### 3) ヒト線維芽細胞を用いた binding assay および clearance/degradation assay

binding assay: ヒト線維芽細胞 GM00701 を 48 穴培養プレートに播種し、F-EP または apoE-F-EP と 4 °C で 3 時間反応させ、未結合の apoE-F-EP を除去後、RIPA バッファーで細胞を可溶化し、全細胞抽出液中の NBD の蛍光強度を測定することにより結合能を評価した。同様に、細胞の蛍光強度も蛍光顕微鏡で可視化し、Image J を用いて定量した。

#### clearance/degradation assay

細胞を F-EP または apoE-F-EP と 37 °C で 3 時間培養し、培養前後の培養液中の F-EP または apoE-F-EP および全細胞抽出液の蛍光強度を測定し、F-EP のクリアランス率 (%) と細胞内における F-EP の異化率 (%) を評価した。

### 4. 研究成果

#### 1) apoE-F-EP と細胞との結合性

F-EP または apoE-F-EP を細胞と反応させ、全細胞抽出液の蛍光強度により結合能を評価した。apoE-F-EP での蛍光強度は apoE を含まない F-EP と比較して約 3 倍高値であり ( $p < 0.01$ , 図 1a) 蛍光顕微鏡下の所見も同様であった (図 1b)。次に、apoE-F-EP と細胞の相互作用が apoE と細胞表面上の LRP1 との会合に起因することを確認するため、ラクトフェリンまたは抗 LRP1 抗体存在下、非存在下で apoE-F-EP と反応させた細胞の蛍光強度を測定した。ラクトフェリンまたは抗 LRP1 抗体存在下の蛍光強度はそれぞれが非存在下の蛍光強度の約 19% ( $p < 0.01$ ) または 22% ( $p < 0.01$ ) 有意に減少した (図 1a)。さらに、細胞に残存する SDC1 の影響を把握するため、ヘパリナーゼ処理した細胞と apoE-F-EP との結合性を評価した。ヘパリナーゼ処理後の蛍光強度は未処理の蛍光強度に比べて約 89% 減少したが、その差は統計学的に有意ではなかった (図 1a)。

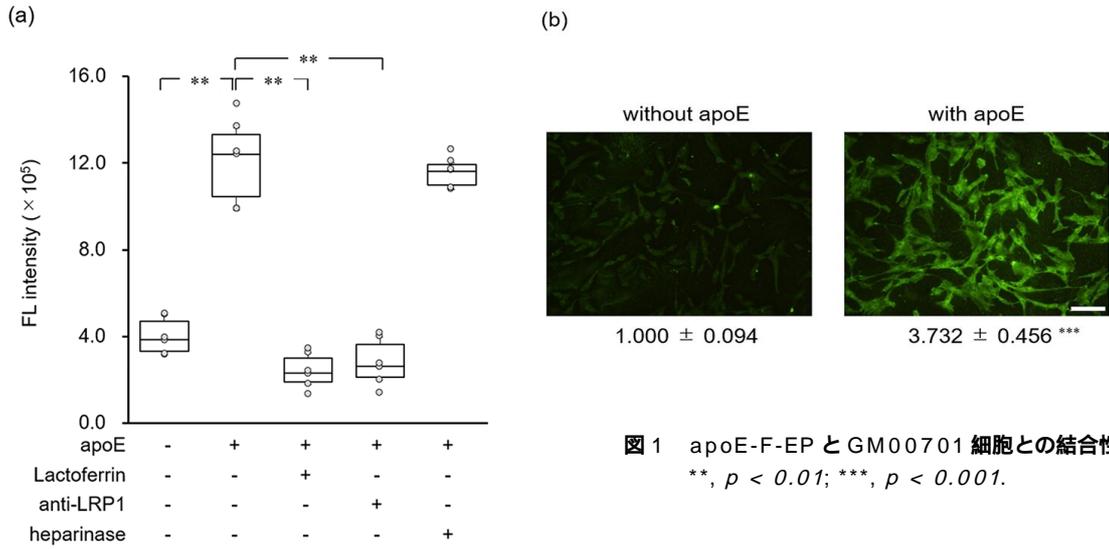
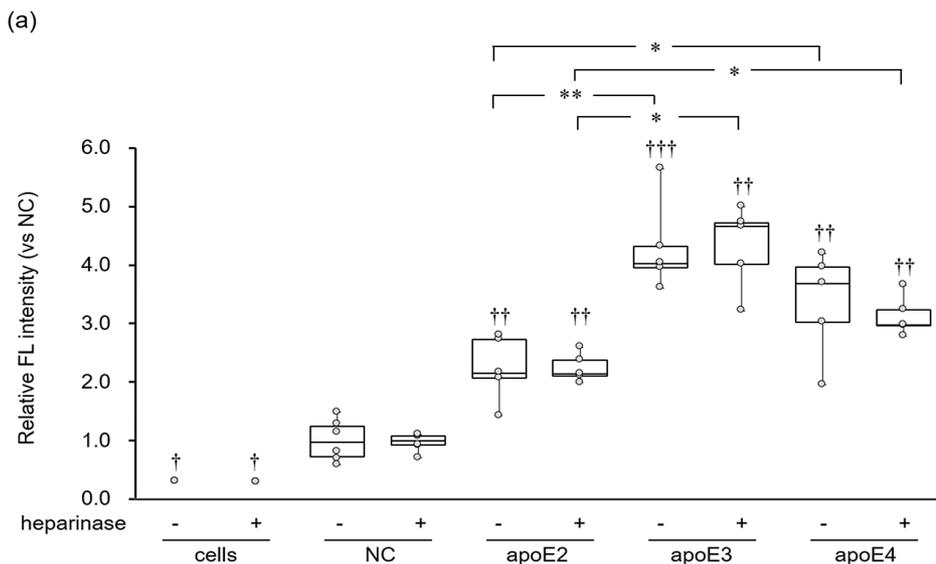


図 1 apoE-F-EP と GM00701 細胞との結合性  
\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## 2) apoE-F-EP の LRP1 を介した結合能に及ぼす apoE アイソフォームの影響

Hep 処理にかかわらず、apoE-F-EP の細胞への結合能はアイソフォーム間で有意な差が認められ (図 2a)、apoE3-F-EP の結合能は apoE2-F-EP に比べて高く、Hep 未処理細胞への結合能が 1.9 倍 ( $p < 0.01$ )、Hep 処理細胞への結合能が 1.7 倍 ( $p < 0.05$ )であった。また、apoE3-F-EP の結合能は apoE4-F-EP より 1.3 倍高かったが有意差は認められなかった。apoE2-F-EP の結合能も Hep 処理の有無に関わらず NC の 2.2 倍 ( $p < 0.01$ )であったが、apoE3-F-EP と apoE4-F-EP と比べると、それぞれ 0.5 倍、0.7 倍とアイソフォームの中で最も低かった。アイソフォーム間のこのような違いは、蛍光顕微鏡下でも観察された (図 2b)。



(b)

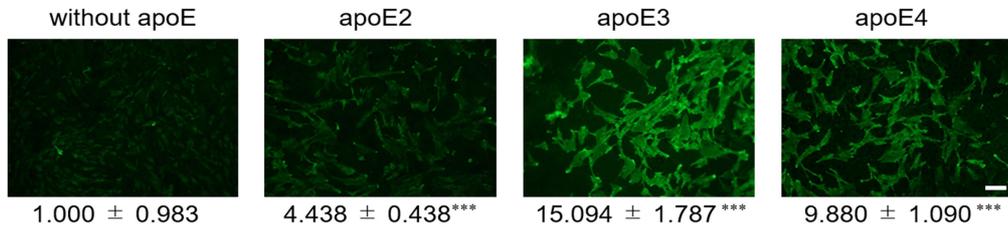


図2 細胞表面の LRP1 を介した apoE-F-EP の結合性に及ぼす apoE アイソフォームの影響  
†††,  $p < 0.001$  ††,  $p < 0.01$ , and †,  $p < 0.05$ : 細胞のみの条件と NC との比較  
\*\*,  $p < 0.01$  and \*,  $p < 0.05$ : アイソフォーム間の比較

3) LRP1 を介した apoE-F-EP のクリアランス/異化能に及ぼす apoE アイソフォームの影響  
apoE2-F-EP と apoE3-F-EP のクリアランス能は NC の 1.6 倍 ( $p < 0.05$ ) であった。統計的に有意ではなかったが、apoE4-F-EP のクリアランス能は apoE2-F-EP と apoE3-F-EP の 0.8 倍であった (図 3a)。同様に、apoE2-F-EP と apoE3-F-EP の異化能は NC の 2.0 倍 ( $p < 0.01$ ) であった。一方、apoE4-F-EP の異化能は、apoE2-F-EP と apoE3-F-EP の約 0.5 倍 ( $p < 0.05$ ) であった (図 3b)。

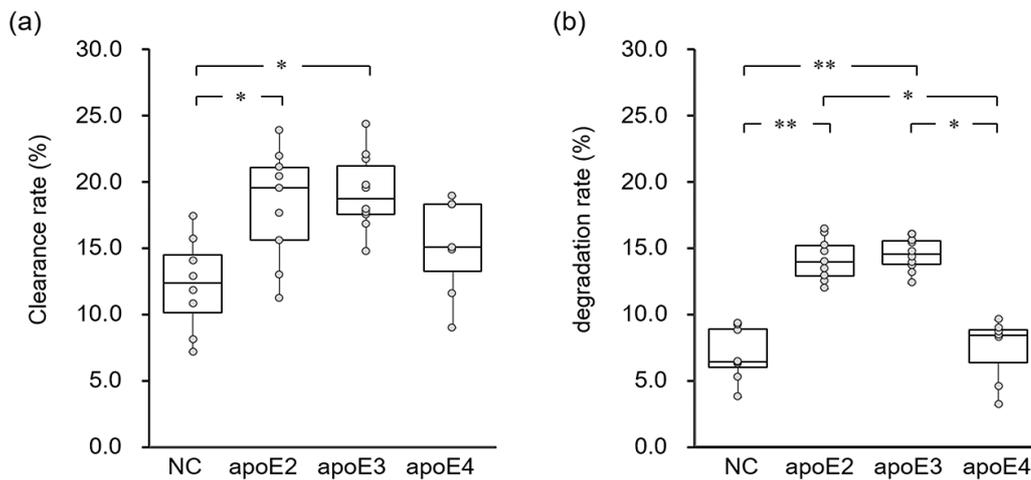


図3 LRP1 を介した apoE-F-EP のクリアランス/異化能に及ぼす apoE アイソフォームの影響  
\*\*,  $p < 0.01$  and \*,  $p < 0.05$ .

4) LRP1 と apoE-F-EP の結合性に及ぼす apoE-Cys-thiol 基のレドックス修飾の影響  
apoE-Cys-thiol の TCEP 還元は、apoE3-F-EP の細胞への結合能を約 1.5 倍 ( $p < 0.01$ ) に増強したが、apoE2-F-EP と apoE4-F-EP の結合能には影響が認められなかった。diamide 処理によるジスルフィド結合形成は、apoE3-F-EP の結合能を約 1.3 倍 ( $p < 0.05$ ) に増強したが、apoE2-F-EP と apoE4-F-EP の結合能には影響が認められなかった。ジスルフィド結合による apoAII とのヘテロ二量体の形成は、apoE2-F-EP の結合能を約 0.5 倍 ( $p < 0.01$ ) に低下させたが、apoE3-F-EP と apoE4-F-EP の結合能には影響しなかった。apoE-Cys-thiol の IAM によるアルキル化は apoE3-F-EP の結合能を約 0.5 倍 ( $p < 0.01$ ) に低下させたが、IAA によるアルキル化は約 1.3 倍 ( $p < 0.05$ ) に増強した。統計的な有意差は認められなかったが、apoE2-F-EP も apoE3-F-EP とほぼ同様であった。一方、いずれのアルキル化反応も apoE4-F-EP の結合能には影響しなかった。

5) LRP1 を介した apoE-F-EP のクリアランスと異化能に及ぼす apoE-Cys-thiol 基のレドックス修飾の影響

apoE-Cys-thiol の TCEP 還元は apoE3-F-EP のクリアランス能と異化能をそれぞれ 0.8 倍、約 0.7 倍 ( $p < 0.05$ ) に低下させたが、apoE2-F-EP と apoE4-F-EP には明らかな影響を与えなかった。diamide 処理は apoE アイソフォームに関わらずクリアランス能と異化能ともに影響を与えなかった。apoAII 処理は apoE2-F-EP のクリアランス能と異化能をそれぞれ 2.4 倍 ( $p < 0.01$ )、1.8 倍 ( $p < 0.05$ ) に増強したが、apoE3-F-EP と apoE4-F-EP のクリアランス能と異化能には影響を及ぼ

さなかった。IAM によるアルキル化は apoE2-F-EP のクリアランス能と異化能をそれぞれ 1.6 倍 ( $p < 0.05$ )、2.1 倍 ( $p < 0.01$ )、apoE3-F-EP のクリアランス能と異化能をそれぞれ 1.4 倍、1.6 倍 ( $p < 0.05$ ) に増強した。IAA によるアルキル化も apoE3-F-EP のクリアランス能と異化能をそれぞれ 1.5 倍 ( $p < 0.05$ )、1.6 倍 ( $p < 0.05$ ) に増強した。一方、統計的に有意ではなかったが、IAA によるアルキル化は apoE2-F-EP のクリアランス能と異化能を低下させた。以上、4) 5) の結果を表 1 にまとめた。

表 1 apoE-Cys-Thiol のレドックス修飾が apoE-F-EP の結合能、クリアランス能、異化能に及ぼす影響

Cys-thiol treatment	Cys-thiol status	apoE2			apoE3		
		Binding	Clearance	Degradation	Binding	Clearance	Degradation
TCEP	-SH				(×1.5)**	(×0.8)	(×0.7)*
diamide	-S-S-apoE				(×1.3)*		
apoAII	-S-S-apoAII	(×0.5)**	(×2.4)**	(×1.8)*			
IAM	-S- $\gamma$ -H <sub>2</sub> N		(×1.6)*	(×2.1)**	(×0.5)**	(×1.4)	(×1.6)*
IAA	-S- $\gamma$ -OH		(×0.8)	(×0.7)	(×1.3)*	(×1.5)*	(×1.6)*

\*\* ,  $p < 0.01$  and \* ,  $p < 0.05$

以上、apoE のアイソフォームおよび Cys-thiol のレドックス状態が LRP1 を介した RLP 代謝経路に影響を及ぼしていることを明らかにした。

#### 【本研究に関連して採択された論文】

Apolipoprotein E isoforms and their Cys-thiol modifications impact LRP1-mediated metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *FEBS Lett* (2024) 598:347-362. doi: 10.1002/1873-3468.14803.

Apolipoprotein E-containing lipoproteins and their extracellular interactions with LRP1 affect LPS-induced inflammation. *Biol Chem* (2024) doi: 10.1515/hsz-2024-0018.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamauchi Kazuyoshi, Taira Chiaki, Kawakami Yasushi	4. 巻 41
2. 論文標題 Redox index of Cys-thiol residues of serum apolipoprotein E and its diagnostic potential	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20211060	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 Kaido Takahiro, Yoda Masahiro, Kamijo Tomu, Arai Shinpei, Yamauchi Kazuyoshi, Okumura Nobuo	4. 巻 114
2. 論文標題 A novel variant fibrinogen, A E11del, demonstrating the importance of A E11 residue in thrombin binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 591 ~ 598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-021-03200-z	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 Usami Yoko, Sugano Mitsutoshi, Uehara Takeshi, Koinuma Masayoshi, Ishimine Nau, Kawasaki Kenji, Yamauchi Kazuyoshi, Hamano Hideaki, Honda Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Cut-off values of serum IgG4 among three reagents, including a novel IgG4 reagent: a multicenter study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-86024-5	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 Kamijo Tomu, Kaido Takahiro, Yoda Masahiro, Arai Shinpei, Yamauchi Kazuyoshi, Okumura Nobuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Recombinant Y278H Fibrinogen Showed Normal Secretion from CHO Cells, but a Corresponding Heterozygous Patient Showed Hypofibrinogenemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5218 ~ 5218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22105218	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 Midorikawa Manabu, Suzuki Hiroaki, Suzuki Yasuhiro, Yamauchi Kazuyoshi, Sato Hiroyuki, Nemoto Kiyotaka, Sugano Yoko, Iwasaki Hitoshi, Sekiya Motohiro, Yatoh Shigeru, Yahagi Naoya, Hada Yasushi, Arai Tetsuaki, Shimano Hitoshi	4. 巻 2021
2. 論文標題 Relationships between Cognitive Function and Odor Identification, Balance Capability, and Muscle Strength in Middle-Aged Persons with and without Type 2 Diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Research	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/9961612	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 Matsuura Hiroto, Akahane Shogo, Kaido Takahiro, Kamijo Tomu, Sakamoto Kenta, Yamauchi Kazuyoshi	4. 巻 598
2. 論文標題 Apolipoprotein E isoforms and their Cys thiol modifications impact <sc>LRP1</sc> mediated metabolism of triglyceride rich lipoproteins	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 347~362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14803	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 Akahane Shogo, Matsuura Hiroto, Kaido Takahiro, Usami Yoko, Ishimine Nau, Uehara Takeshi, Yamauchi Kazuyoshi	4. 巻 0
2. 論文標題 Apolipoprotein E-containing lipoproteins and their extracellular interactions with LRP1 affect LPS-induced inflammation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/hsz-2024-0018	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松浦弘人、赤羽匠吾、石嶺南生、山内一由
2. 発表標題 LRP1を介したapoE含有リポ蛋白代謝におけるapoEアイソフォームの影響
3. 学会等名 日本医療検査科学会第55回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤羽匠吾、松浦弘人、山内一由
2. 発表標題 LPS誘発性炎症反応に及ぼすapoE含有リポ蛋白の影響
3. 学会等名 日本医療検査科学会第55回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦弘人、赤羽匠吾、石嶺南生、山内一由
2. 発表標題 LRP1を介したapoE含有リポ蛋白代謝におけるapoE-Cys基のレドックス修飾の影響
3. 学会等名 第63回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤羽匠吾、松浦弘人、坂本健太、山内一由
2. 発表標題 LPS誘発性炎症反応におけるLRP1の病態生理学的意義
3. 学会等名 第63回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 戸塚 実、奥村 伸生、浦山 修、松下 誠、山内 一由、大川 龍之介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 472
3. 書名 最新臨床検査学講座 臨床化学検査学 第2版	

1. 著者名 戸塚実、奥村伸生、浦山修、松下誠、山内一由、大川龍之介	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 452
3. 書名 最新臨床検査学講座 臨床化学検査学 第3版	

〔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

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