

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16364

研究課題名(和文) 妊娠時高中性脂肪血症のマウスモデル確立とin vivo分子機構解明

研究課題名(英文) Hypertriglyceridemia in pregnancy: mouse model and in vivo molecular mechanisms

研究代表者

田中 督記(Tanaka, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：80876186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠時の重度高中性脂肪(TG)血症は重症膵炎・胎児死亡などの重篤な合併症を生じる。高TG血症性膵炎は妊娠中の膵炎の原因の第一位であるが、現時点で確立した治療法はない。高TG血症は遺伝的素因に二次性要因が加わることにより増悪する。我々は本研究によりapoA-V欠損マウスはヒト妊娠時高TG血症モデルマウスとして有用であることを示した。また、apoA-V;SREBP-1c両欠損マウスでは妊娠末期のTG上昇が軽減されること、遺伝子発現解析によりこの機序を説明しうる遺伝子としていくつかの候補を見出した。これらの成果をもとに作成したマウスモデルを用いた治療法の検討をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠時の重度高中性脂肪(TG)血症は重症膵炎・胎児死亡などの重篤な合併症を生じる。高TG血症性膵炎は妊娠中の膵炎の原因の第一位であるが、現時点で確立した治療法はない。その一因として適切なマウスモデルがこれまで存在しなかったことが挙げられる。我々は本研究によりapoA-V欠損マウスはヒト妊娠時高TG血症モデルマウスとして有用であることを示した。また確立したマウスモデルをもとに妊娠時高TG血症の治療を検討した。重篤かつ難治性疾患の治療法開発に貢献した研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)：Severe hypertriglyceridemia (HTG) during pregnancy results in life-threatening complications such as severe pancreatitis and fetal death. Hypertriglyceridemic pancreatitis is the leading cause of pancreatitis in pregnancy, but there is currently no established treatment. HTG is exacerbated by secondary factors in addition to genetic predispositions. In this study, we demonstrated that apoA-V-deficient mice are useful as a mouse model of severe HTG in human pregnancy. We also found that apoA-V;SREBP-1c deficient mice have reduced TG elevation during pregnancy and identified several candidate genes that may explain this rescue by gene expression analysis. These findings led us to search for therapeutic modalities using our mouse model.

研究分野：脂質異常症

キーワード：高中性脂肪血症 妊娠合併症 apoA-V 治療法開発 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

健常者の場合、妊娠末期では非妊娠時に比較し血中中性脂肪(TG)値は 2-3 倍に上昇するが¹、高 TG 血症の遺伝的素因 (*LPL*, *APOC2*, *GPIHBP1*, *LMF1*, *APOA5* など) を有する場合には重度高 TG 血症 (~7,000 mg/dL) を来す。妊娠時高 TG 血症は、妊娠中の膵炎の原因の第一位であり、重症膵炎・胎児死亡などを生じる²⁻⁶。これらの重篤な致死合併症を予防するために、妊娠時高 TG 血症の治療法開発は喫緊の課題である。

妊娠中の重度高 TG 血症の治療法は、食事指導 (脂質制限食) が基本となるが、有効性に乏しい。その他の治療法として、ヘパリン・インスリン療法、血漿交換、フィブラート (本邦では禁忌) などが報告されているが、確立した治療法はない⁷。疾患の分子メカニズムに基づいた新規治療法開発が求められる。

妊娠時の高 TG 血症のメカニズムとして、肝臓での VLDL 分泌亢進や脂肪酸 β 酸化低下、脂肪細胞での lipolysis によって放出される遊離脂肪酸 (FFA) 由来の VLDL 産生亢進、TG 含有リポ蛋白 (VLDL や CM) の TG を水解するリポ蛋白リパーゼ (LPL) の活性低下、などが示唆されている⁸⁻¹¹。しかし、これらの仮説は重度高 TG 血症モデルマウスでは検証されておらず、*in vivo* での実際の寄与は明らかではない。妊娠時重度高 TG 血症を再現したマウスモデルの確立と、その発症機序の *in vivo* での解明が、有効な治療法開発のために求められている。

我々の研究室では、重度高 TG 血症のマウスモデルの確立からの疾患メカニズム研究を行っている。これまで、ヒトの重度高 TG 血症の原因遺伝子 (*LPL*, *APOC2*, *GPIHBP1*, *LMF1*, *APOA5*) を遺伝子改変したモデルマウスが報告されていたが、これらのうち、apoA-V 欠損マウスが唯一、環境要因による重度高 TG 血症の研究に適することを我々は見出した (他のモデルでは胎生致死あるいは生下時からの重度高 TG 血症となってしまう)^{12,13}。この報告では、「apoA-V 欠損マウスは、二次的要因 (高炭水化物食、加齢) により重度高 TG 血症 (~5,000 mg/dL) を来す」ことを示し、さらに SREBP-1c 欠損マウスを用いて、「肝臓で脂質合成を制御する転写因子 SREBP-1c による巨大 VLDL 産生が高炭水化物食や加齢による高 TG 血症増悪に必須である」こと、を示した^{12,13}。

2. 研究の目的

本研究では、所属研究室が確立してきたこれらのモデルを用いて、妊娠時の重度高 TG 血症マウスモデルを確立し、分子機序を *in vivo* で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス

Apoa5^{-/-} マウスは Mutant Mouse Resource & Research Centers (Stock #011467-UCD, FVB.129X1 (B6) -*Apoa5*^{tm1Hgc/Mmucd}) より、*Apoa5*^{-/-};*Srebp-1c*^{-/-} マウスは The Jackson Laboratory から得た。明暗サイクルは 12/12h で、室温 22-24 °C、自由飲水摂食とした。CLEA Rodent Diet CE-2 (日本クレア株式会社) を用い、2~4 月齢の雌マウスを実験に使用した。

交配は雄マウスと雌マウスを 1 匹ずつ同ケージに入れ、プラグチェックは暗期終了前後に行った。採血はヘパリン処理した毛細管を用い、後眼窩静脈洞より採取した。5%EDTA+5%Na₃N 1 μl 添加したチューブを用いた。特に記載がない限り採血は暗期終了前後に行い、採血検体は 5000 rpm、4 °C で 10 分間遠心し血漿を -20 °C で凍結保存した。解剖は暗期終了前後に行い、必要臓器を摘出した。検体は液体窒素で凍結し、-80 °C で保存した。

飼育や実験は東京大学の倫理規定に従った。

測定

TG は L タイプワコー TG・M (和光純薬工業株式会社)、TC はコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。血漿の測定は凍結血漿を融解後に測定した。

血漿リポ蛋白のサイズは gel-permeation HPLC system (LipoSEARCH®, Skylight Biotech, Inc.) により分析した¹⁴。ゲル浸透カラムを直列に連結し、血漿リポ蛋白を分離した。カラム流出液の TG 濃度を測定し mV で示した。リポ蛋白は component peak analyses with the Gaussian curve fitting technique を用いて粒子サイズにより分類した (CM・大型 VLDL (>80 nm), 15 ~ 19.1±1.0 min; VLDL (30 ~ 80 nm), 19.1 ~ 22.7±1.0 min; LDL (16 ~ 30 nm), 22.7 ~ 25.1±1.0 min; HDL (8 ~ 16 nm), 25.1 ~ 28.0±1.0 min)。CM・VLDL についてはさらに細かく分類 (#1~#4) し、直径 80 nm 超の CM・大型 VLDL を分画 #1 とし、直径 30-80 nm の通常の VLDL をサイズが大きい順に分画 #2~#4 とし、結果の図示をした (#1>#2>#3>#4)。

RNA 抽出法、定量的 PCR 法

凍結保存した臓器を適量とりわけ、ポリトロンホモジナイザーで破碎した後、RNA を Isol-RNA Lysis Reagent (フナコシ株式会社) または TRI Reagent (Molecular Research) によって抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用

いて complementary DNA を合成し、Light Cycler®480 システム、SYBR GreenI384- (F.Hoffmann-La Roche, Ltd.) を用いて定量的 PCR (Quantitative Real Time PCR Analysis;qPCR) を行った。mRNA は比較 CT 法を用いて計算した。不変対照としては β actin を用いた。

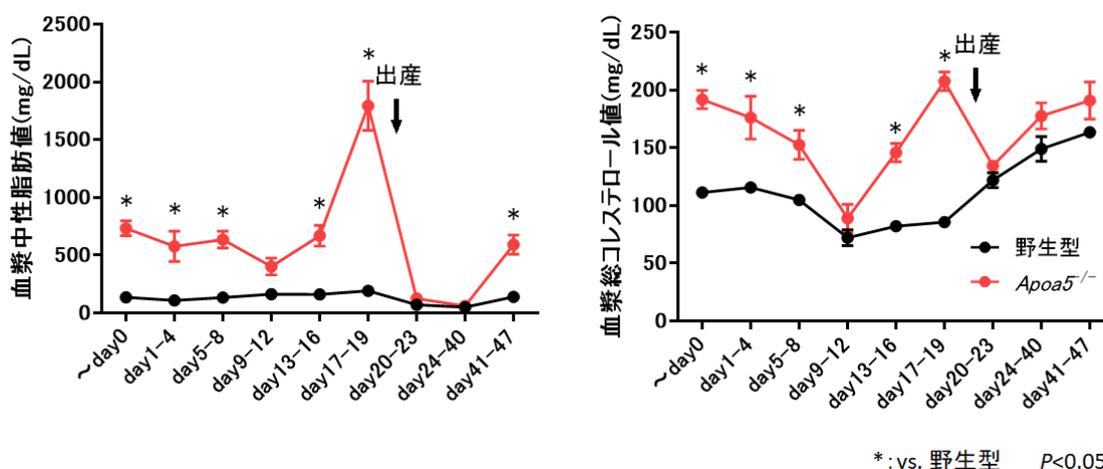
統計学的解析

統計学的解析は graphpad prism7.04 を用いて行った。結果は平均±SEM で表示した。正規分布の検定は Shapiro-Wilk 検定を用いた。正規分布のデータでは 3 群以上の有意差検定には Non-repeated measures ANOVA、Tukey 検定 (n が異なる群間比較は Tukey-Kramer 検定) を用いた。正規分布でないデータでは 3 群以上の有意差検定には Kruskal-Wallis 検定、Dunn 検定を用いた。P<0.05 で有意差ありとした。

4. 研究成果

Apoa5^{-/-} マウスによる妊娠時 HTG モデルマウスの確立

野生型マウスと *Apoa5*^{-/-} マウスにおける、周産期の自然経過での脂質代謝の変化を観察した。野生型マウス (雌) と *Apoa5*^{-/-} マウス (雌) を雄マウスと交配し、出産日まで週 2 回の採血を行った。出産日を day20 とし、採血日の妊娠日数を逆算した。雄マウスは出産前に雌マウスとケージを分離した (出産後の再交配はしていない)。生まれた仔マウスは実験中、雌マウスと同ケージ内にて飼育をし、雌マウスにより授乳を行わせた。出産後は週 1 回の採血、体重測定、血糖測定を行った。血漿 TG は *Apoa5*^{-/-} マウスにおいて day9-12 に一過性に低下した後、day17-19 に著明に上昇した。出産後、授乳中の血漿 TG は低下し、授乳終了後の Day41 以降は非妊娠時と同程度に戻った。野生型マウスにおいては同様の傾向がみられたが day9-12 の一過性の血漿 TG 低下はみられなかった。遺伝子型間の比較では day9-12、出産後授乳中は差がみられなかったが、それ以外の区間では *Apoa5*^{-/-} マウスにおいて血漿 TG が高値であった。血漿 TC は *Apoa5*^{-/-} において day9-12、出産直後に低下がみられたがそれ以外に関しては非妊娠時と同程度であった。野生型マウスにおいても同様の経過であったが、出産直後の低下はみられなかった。以上から *Apoa5*^{-/-} マウスでは野生型マウスに比べ血漿 TG が上昇し、既報のヒトにおける妊娠時 HTG と同様であることがわかった。妊娠時 HTG のマウスモデルとして *Apoa5*^{-/-} マウスが活用できる可能性が示唆された。

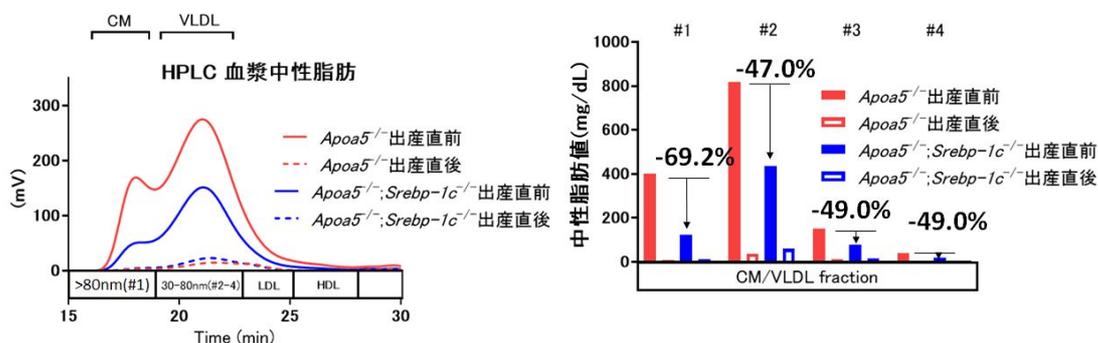
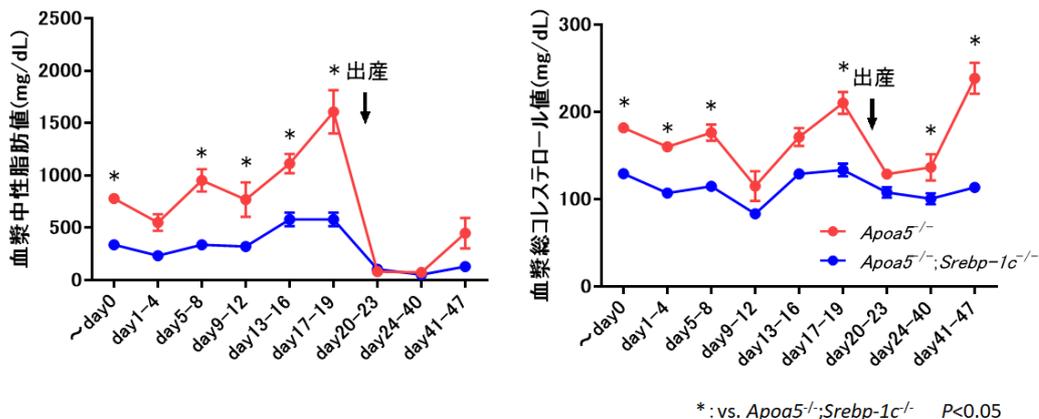


Apoa5^{-/-}; *Srebp-1c*^{-/-} マウスによる妊娠時 HTG 機序の検討

次に妊娠時 HTG における SREBP-1c の役割を明らかにするために、apoA-V;SREBP-1c 両欠損マウスについて、同様に周産期の自然経過での脂質代謝の変化を観察した。*Apoa5*^{-/-} マウス (雌) と *Apoa5*^{-/-}; *Srebp-1c*^{-/-} マウス (雌) を雄マウスと交配し、出産日まで週 2 回の採血を行った。出産日を day20 とし、採血日の妊娠日数を逆算した。出産直前の血漿、出産直後の血漿をそれぞれプールし HPLC を行った。雄マウスは出産前に雌マウスとケージを分離した。生まれた仔マウスは実験中、雌マウスと同ケージ内にて飼育をし、出産後は週 1 回の採血を行った。血漿 TG は *Apoa5*^{-/-} マウスにおいて前の実験と同様の経過をたどったが、*Apoa5*^{-/-}; *Srebp-1c*^{-/-} マウスでは day17-19 の出産直前の血漿 TG の著明な上昇がみられなかった。遺伝子型間の比較では day9-12、出産後授乳中は差がみられなかったが、それ以外の区間では *Apoa5*^{-/-} マウスにおいて血漿 TG が高値であった。血漿 TC は TG と同様の推移をたどり、*Apoa5*^{-/-}; *Srebp-1c*^{-/-} マウスでは day17-19 の出産直前の上昇がみられなかった。

同実験において出産直前・直後の血漿をプールし HPLC を行った。リポ蛋白分画の TG 測定結果からは *Apoa5*^{-/-} マウスでは出産直前に TGRL が著明に蓄積していることがわかった。TGRL のより詳細なサイズ別の分画での TG の定量的な比較では、分画#1、分画#2 の著明な蓄積がみ

られた(分画#1は直径80 nm超のCM・大型VLDL、分画#2-4は直径30-80 nmの通常のVLDLであり、数値順に大きな粒子を含む(#1>#2>#3>#4))。Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスではこの変化が部分的に改善しており、特に大型のTRGLほど蓄積が軽度となっていた。定量的な比較では、#1, #2, #3, #4分画のTGはApoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスではApoa5^{-/-}マウスに比べてそれぞれ69.2%, 47.0%, 49.0%, 49.0%低下をしていた。出産直後のHPLCでは出産前のTGRLの蓄積は改善しており、遺伝子型による差はなかった。ここまでの実験においてApoa5^{-/-}マウスはヒトの妊娠時HTGと同様に出産直前にHTGをきたし、そのHTGは大型優位のTGRLの蓄積に由来すること、またその変化はSREBP-1cに部分的に依存することがわかった。



SREBP-c 欠損による妊娠時 HTG 改善機序の遺伝子的解析

Apoa5^{-/-}マウス、Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスにおける妊娠群・対照群での脂質代謝変化を肝臓の遺伝子発現変化も含めて検討した。Apoa5^{-/-}マウス(雌)、Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウス(雌)を雌マウスと遺伝子型を一致させた雄マウスと交配し、プラグチェックを行った。プラグの確認日をday1とし、day18の時点で週齢をあわせた同遺伝子型の対照群と同時に解剖を行った。解剖時に採血を行った。それぞれのマウスの血漿につきHPLCを行った。血漿TGはApoa5^{-/-}マウスでは対照群に比べて妊娠群において有意に上昇していたが、Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスでは妊娠による血漿TGの有意な上昇を認めなかった。また遺伝子型間の比較として妊娠時血漿TGはApoa5^{-/-}マウスに比べてApoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスでは低下をしていた。

Day18の血漿についてHPLC解析を行った。リポ蛋白分画のTG測定の結果では、どちらの遺伝子型においても対照群に比べ妊娠群でTGRL由来のTG上昇がみられていた。Apoa5^{-/-}マウスでは妊娠によりサイズがより大型のVLDLが優位に蓄積していたが、Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスでは、大型VLDLの蓄積が改善していた。定量的評価ではApoa5^{-/-}マウスにおいて妊娠時#1-#4分画が上昇しており、特に大型のVLDLほど増加していたが、Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスでは大型のVLDL(#1, #2)に有意な増加は認めず、小型のVLDL(#3, #4)のみが有意に増加していた。遺伝子型間の比較ではApoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}ではApoa5^{-/-}に比べ特に妊娠時大型のVLDL(#1, #2)が有意に低下しており、それぞれ76.5%, 61.5%低下をしていたが、小型のVLDL(#3, #4)では、有意差を認めなかった。以上から、Apoa5^{-/-}マウスでは妊娠により大型サイズ優位のTGRLの蓄積がみられ、Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}では特に大型サイズのTGRLの蓄積が改善することがわかった。

また、妊娠時の肝臓のmRNA発現をqPCRにより評価を行った。特にSREBP-1c欠損によりHTGが改善するメカニズムに関連する遺伝子を検索することを目的とし、妊娠時Apoa5^{-/-}マウスと妊娠時Apoa5^{-/-};Srebp-1c^{-/-}マウスで有意差がみられた遺伝子に着目し、いくつかの候補遺伝子を同定した。

確立したモデルマウスによる妊娠時高 TG 血症の治療介入検討

確立したモデルマウスを使用し、妊娠時 HTG に対する治療法の検討を行った。現在のところ、脂肪制限・ヘパリン投与・EPA 投与による治療法検討を行い、引き続きの検討を進めている。

<引用文献>

1. Fåhræus L, Larsson-Cohn U, Wallentin L. Plasma lipoproteins including high density lipoprotein subfractions during normal pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1985;66(4):468-472.
2. Xie S-L, Chen T-Z, Huang X-L, et al. Genetic Variants Associated with Gestational Hypertriglyceridemia and Pancreatitis. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129488. doi:10.1371/journal.pone.0129488
3. Henneman P, Schaap FG, Rensen PCN, van Dijk KW, Smelt AHM. Estrogen induced hypertriglyceridemia in an apolipoprotein AV deficient patient. *J Intern Med.* 2008;263(1):107-108. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01889.x
4. Dussaillant C, Serrano V, Maiz A, et al. APOA5 Q97X mutation identified through homozygosity mapping causes severe hypertriglyceridemia in a Chilean consanguineous family. *BMC Med Genet.* 2012;13:106. doi:10.1186/1471-2350-13-106
5. Papadakis EP, Sarigianni M, Mikhailidis DP, Mamopoulos A, Karagiannis V. Acute pancreatitis in pregnancy: an overview. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;159(2):261-266. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.07.037
6. Russi G. Severe dyslipidemia in pregnancy: The role of therapeutic apheresis. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* 2015;53(3):283-287. doi:10.1016/j.transci.2015.11.008
7. Goldberg AS, Hegele RA. Severe hypertriglyceridemia in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):2589-2596. doi:10.1210/jc.2012-1250
8. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine.* 2002;19(1):43-55. doi:10.1385/ENDO:19:1:43
9. Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrange P, Schotz MC, Herrera E. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am J Physiol.* 1994;266(61):E930-935. doi:10.1152/ajpendo.1994.266.6.E930
10. Smith JL, Lear SR, Forte TM, Ko W, Massimi M, Erickson SK. Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res.* 1998;39(11):2237-2249.
11. Wasfi I, Weinstein I, Heimberg M. Hepatic metabolism of [1-14C]oleate in pregnancy. *Biochim Biophys Acta.* 1980;619(3):471-481. doi:10.1016/0005-2760(80)90099-5
12. Okazaki H, Goldstein JL, Brown MS, Liang G. LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6801-6810. doi:10.1074/jbc.M109.079459
13. Takanashi M, Kimura T, Li C, et al. Critical Role of SREBP-1c Large-VLDL Pathway in Environment-Induced Hypertriglyceridemia of Apo AV Deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(3):373-386. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311931
14. Okazaki M, Usui S, Ishigami M, et al. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(3):578-584. doi:10.1161/01.ATV.0000155017.60171.88

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中督記他
2. 発表標題 脂肪摂取制限が奏功し、正常分娩に至ったLMF1ナンセンス変異ホモ接合体による重度高中性脂肪血症性急性膵炎の一例
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中督記他
2. 発表標題 脂肪摂取制限が奏功し正常分娩に至ったLMF1ナンセンス変異ホモ接合体による重度高中性脂肪血症性急性膵炎の一例
3. 学会等名 第55回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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