

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22591004
 研究課題名（和文） ニューロメジンUの動脈硬化発症・進展における役割の解明と治療への応用
 研究課題名（英文） Elucidation of the roles of Neuromedin U on development of atherosclerosis and its therapeutic application
 研究代表者
 斯波 真理子（SHIBA MARIKO）
 独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長
 研究者番号：70271575

研究成果の概要（和文）：

ニューロメジン U(NMU)の脂質代謝および動脈硬化進展への影響を調べるため、アポリポプロテイン E ノックアウト(KO)マウスと NMU-KO マウスとを交配し、ダブル KO マウスを作製した。ダブル KO マウスは、顕著な高コレステロール症を示すものの、動脈硬化症の進展度および生存曲線はアポ E-KO マウスと同等であった。NMU は、コレステロール代謝および動脈硬化症の進展に大きな役割を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：

In order to study the effect of NMU on cholesterol metabolism and development of atherosclerosis, double knockout mice of NMU and Apolipoprotein E was synthesized. Apo E and NMU double knockout mice showed severe hypercholesterolemia, the development of atherosclerosis and survival curve showed almost the same. NMU was shown to have significant roles in cholesterol metabolism and development of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：ニューロメジン U、動脈硬化、モデル動物

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の 3 分の 1 は、虚血性心疾患あるいは脳血管障害などの、動脈硬化をベースとした心血管疾患である。動脈硬化の発症、進展には、血中コレステロール、酸化ストレス、炎症、シェアストレス、免疫反応など多くの因子が関わっていることが知られてい

るが、実際の治療には現在のところ、ステントの留置など、対症療法的な処置がほとんどである。また、動脈硬化の予防は、血清脂質低下療法、抗凝固療法、抗酸化療法など、危険因子を減少させる非特異的な方法しかない。動脈硬化症の病因、病態を分子レベルで明らかにし、動脈硬化の成立メカニズムに立

脚した、本質的な治療法や予防法を開発することは、医学の発展、医療福祉に大きく貢献できると考えられる。

本研究でキーとなる分子のニューロメジンU(NMU)は、共同研究者の寒川らが、ブタの脊髄から子宮平滑筋の収縮活性をもとに単離、同定された神経ペプチドであり、ラット脳室内投与実験により、血圧上昇作用、摂食抑制作用などが報告されていた。その後、ノックアウト(KO)マウスの解析結果から、NMUに肥満、高インスリン血症、高血糖、高脂血症と関わりがあることが報告された。一方、NMUの作用として、最近、マスト細胞に関わる報告がなされた。マスト細胞にはNMUの受容体が豊富に存在し、NMU刺激によりカルシウムイオンの動員、脱顆粒が引き起こされることから、NMUには、マスト細胞を介した炎症惹起作用があることが示された。一方、動脈硬化薬において血管内皮下にマスト細胞が存在することが報告され、このマスト細胞を介した免疫反応が、動脈硬化の発症、進展に関わりがあるというエビデンスが、いくつか指摘されている。これらのことから、NMUが動脈硬化の成立に関連があることが予想される。

2. 研究の目的

申請者は、NMUの脂質代謝への関わりを詳しく調べるため、NMU-KOマウスに高脂血症の遺伝的負荷をかけることを考え、アポリポプロテインE(ApoE)-KOマウスとのダブル-KOマウスを作製した。NMU/ApoEダブル-KOマウスの血清総コレステロール値は、ApoE-KOマウスの約2倍もの高値(約1400 mg/dl)を示し、この値は、報告されている普通食下でのマウスの血清コレステロール値の中でも、最高である。また、このコレステロール値の上昇は、VLDLおよびLDL分画において著明であった。VLDLおよびLDLというatherogenicなリポ蛋白の著明な上昇があるにも関わらず、12週齢における大動脈の動脈硬化性病変は、ApoE-KOマウスに比べてダブル-KOマウスのほうが軽症であった。これらのことから、NMUは、(1)コレステロール代謝における未だ知られていない作用を有すること、(2)動脈硬化の発症および進展のキーとなる作用を有することが示唆された。本研究においては、NMU-KOマウスおよびNMU/ApoEダブル-KOマウスを用いて、*in vivo*および*in vitro*の実験を行い、NMUのコレステロール代謝および動脈硬化発症、進展における働きを明らかにし、動脈硬化に対する新しい治療法や予防法の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) NMU-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU/ApoE

ダブル-KOマウスの特性解析

i) マウスの作製および維持

ApoE-KOマウス、NMU-KOマウス、ApoE/NMU-ダブル-KOマウス、ApoE/LDLRダブル-KOマウスはいずれもバックグラウンドをC57B1/6Jにそろえて繁殖し、これらのラインを維持しながら、実験を行った。

ii) 遺伝子改変マウス血清のリポ蛋白分析 (Harada-Shiba et al. *Circ Res.* 95:945-952, 2004)

NMU/ApoEダブル-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU-KOマウス、LDLR-KOマウス、ApoE/LDLRダブル-KOマウスの血清脂質値を測定し、リポ蛋白をHPLCを用いてゲル濾過による分離後、脂質値を測定した。

iii) 遺伝子改変マウスのリポ蛋白ターンオーバースタディ

5匹のLDL-KOマウスの血清を採取し、超遠心分画により、LDLを分離後、0.15 M NaCl, 0.6 mM EDTA溶液にて24時間透析した。Lowry法を用いてLDL中の蛋白を定量した。NaI法にてLDLを¹²⁵Iでラベリングし、ゲル濾過にて¹²⁵I-LDLを精製した。

マウスのNMU/ApoEダブル-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU-KOマウス、LDLR-KOマウス、ApoE/LDLRダブル-KOマウス、Wild typeマウスに対し、¹²⁵I-LDLを尾静脈より注射し、2分後、2.5、5、7.5、24、48時間後に採血し、イソプロパノール加による沈澱をガンマカウンターで測定した。

iv) 尿中メバロン酸排泄量測定

メタボリックゲージを用いてマウスの24時間尿を採取し、ガスクロマトグラフィー法により、メバロン酸の定量を行った。

v) CTによる体脂肪、筋肉量の定量

各マウスを麻酔後、CT(LaTheta)にて撮像し、体脂肪量および筋肉量の定量を行った。

2) NMU-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU/ApoEダブル-KOマウスへの負荷試験

i) 高脂肪食負荷試験

NMU-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU/ApoEダブル-KOマウスに対して、2週間の高脂肪食負荷(F2HFD2)を行い、前後の採血を行い、リポ蛋白分析を行った。

ii) 無コレステロール食負荷試験

NMU-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU/ApoEダブル-KOマウス、Wild Typeマウスに対して、8週間の無コレステロール食負荷を行い、経時的に採血を行い、分析を行った。

3) 動脈硬化症の評価

NMU-KOマウス、ApoE-KOマウス、NMU/ApoEダブル-KOマウス、Wild typeマウスの大動脈組織を採取し、ホルマリン固定後、Sudan IIIにて染色した。赤く染色された動脈硬化薬の面積を定量し、全体の面積との比率で評価を行った。

4) 生存曲線

NMU-KO マウス、ApoE-KO マウス、NMU/ApoE ダブル-KO マウス、Wild type マウスを10匹ずつ高脂肪食負荷下に死亡するまで飼育し、生存曲線を得た。

4. 研究成果

1) 遺伝子改変マウス血清のリポ蛋白分析

脂質代謝および動脈硬化症におけるNMUの役割を調べるために、NMU-KO マウスとApoE-KO マウスをいずれもバックグラウンドをC57Bl/6J にそろえて繁殖し、交配にてApoE/NMU ダブル KO マウスを作製した。それぞれの血清コレステロール値を図1Aに示す(N=10)。通常餌下においてWild type マウスは、平均 117 ± 7 mg/dL、NMU マウスは 99 ± 8 mg/dL、ApoE-KO マウスは 717 ± 69 mg/dL、ApoE/NMU ダブル KO マウスは、 1374 ± 99 mg/dLであった。ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいて、著明に高値であった。通常の餌下においては、報告されたマウスの中では最高値であると言える。一方、血清トリグリセリド(TG)値を図1Bに示す。Wild type が 45 ± 8 mg/dL、NMU-KO マウスは 36 ± 5 mg/dL、ApoE-KO マウスで 65 ± 11 mg/dL、ApoE/NMU ダブル KO マウスでは 255 ± 136 mg/dLであった。HPLCにて分離した血清リポ蛋白分画中のコレステロール値は、VLDL分画を図1Cに示す。Wild type において、 4.3 ± 0.5 mg/dL、NMU-KO マウスにおいて 4.4 ± 1.1 mg/dL、ApoE-KO マウスにおいて 459 ± 140 mg/dL、ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいては、 919 ± 69 mg/dLであった。LDL分画中のコレステロール値を図1Dに示す。Wild type において 6.4 ± 0.3 mg/dL、NMU-KO マウスにおいて 7.3 ± 1.2 mg/dL、ApoE-KO マウスにおいては、 228 ± 55 mg/dL、ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいては、 410 ± 35 mg/dLであった。HDL分画中のコレステロール値を図1Eに示す。Wild type において 107 ± 6.2 mg/dL、NMU-KO マウスにおいて 88 ± 12 mg/dL、ApoE-KO マウスにおいては、 29 ± 10 mg/dL、ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいては、 43 ± 4 mg/dLであった。ApoE/NMU ダブル KO マウスの血清総コレステロール値の上昇は、VLDLおよびLDL分画に著明であることが分かった。

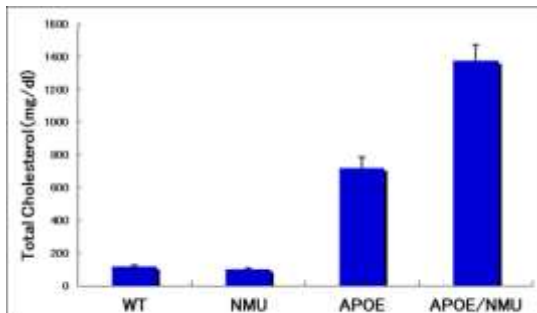


図1A 遺伝子改変マウスの血清コレステロール値の比較

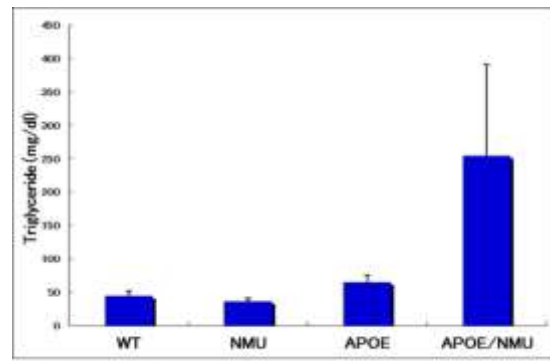


図1B 遺伝子改変マウスの血清トリグリセリド値の比較

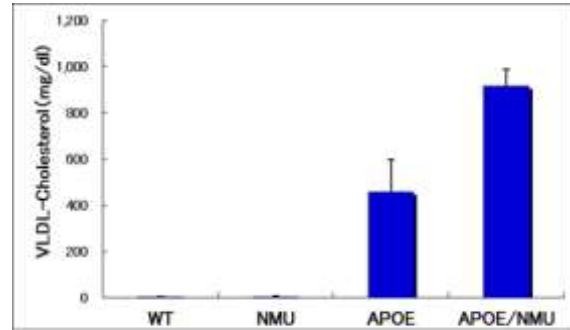


図1C 遺伝子改変マウスの血清VLDLコレステロール値の比較

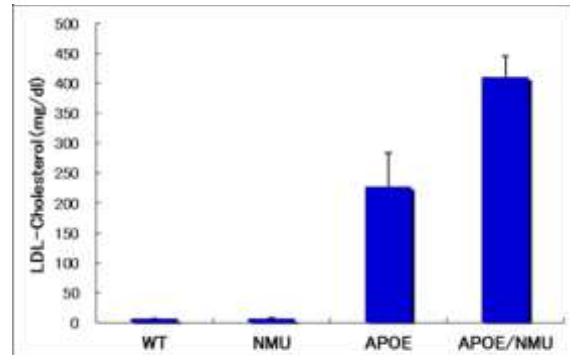


図1D 遺伝子改変マウスの血清LDLコレステロール値の比較

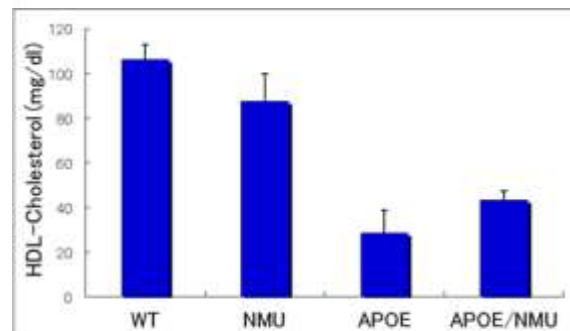


図1E 遺伝子改変マウスの血清HDLコレステロール値の比較

2) 遺伝子改変マウスの尿中メバロン酸排泄量測定結果

ApoE/NMU ダブル KO マウスの血清VLDLおよびLDLコレステロール値が著明高値である原因を探るため、1日のコレステロール合成量を反映する尿中メバロン酸排泄量を測定した結果を図2に示す(N=5)。Wild type と比べて、NMU-KO マウスにおいて低値であり、

ApoE-KO マウスにおいては Wild type と変化はなく、ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいては、やや高値であるものの、有意差は認めなかった。これらのことから、ApoE/NMU ダブル KO マウスの VLDL および LDL コレステロール値が高値であるのは、コレステロールの合成量が亢進しているのではなく、分解過程に問題があることが示唆された。

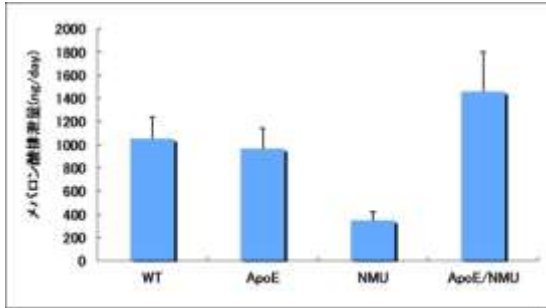


図2 遺伝子改変マウスの尿中尿酸排泄量の比較

3) 遺伝子改変マウスの ^{125}I -LDL ターンオーバースタディ

Wild type マウス、ApoE-KO マウス、NMU-KO マウス、ApoE/NMU ダブル KO マウス、LDLR-KO マウス (N=4) に対して ^{125}I -LDL を尾静脈より静脈注射し、2 分後、2.5、5、7.5、24、48 時間後に採血し、ターンオーバースタディを行った結果を図 3 に示す。NMU-KO マウスおよび ApoE-KO マウスは、Wild type と同様の曲線を描いた。LDLR-KO マウスは、7.5 時間後までの early phase の遅延を認め、LDL 受容体欠損による LDL 分解の遅延が証明された。一方、ApoE/NMU ダブル KO マウスは、24、48 時間後の、late phase の遅延を認めた。これらのことから、ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいては、LDL 受容体機能は正常であり、LDL 受容体以外のリポ蛋白分解に関わる課程に障害があることが示唆された。

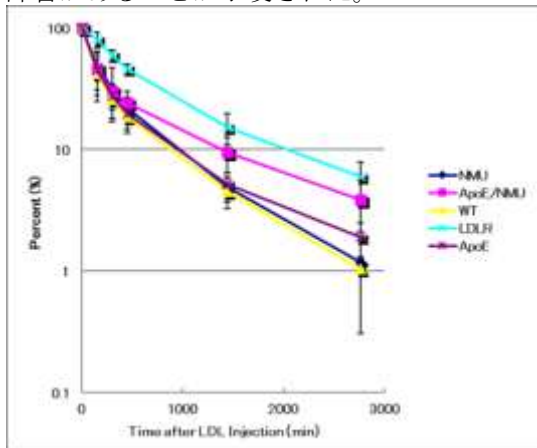


図3 遺伝子改変マウスの ^{125}I -LDL ターンオーバースタディ

4) 遺伝子改変マウスへの食餌負荷試験

それぞれの遺伝子改変マウスに対して、無コレステロール食餌負荷試験を行った結果

を図 4 に示す。無コレステロール食餌負荷により、Wild type および NMU-KO マウスの総コレステロール値はやや上昇傾向にあった。一方、ApoE-KO マウスおよび ApoE/NMU ダブル KO マウスにおいては、コレステロール値の著減を認めたものの、ApoE/NMU-KO マウスの方が ApoE-KO マウスよりも高値を保っていた。これらのことから、ApoE/NMU ダブル KO マウスと ApoE-KO マウスのコレステロール値の違いは、コレステロール吸収によるものではないことが示唆された。

それぞれの遺伝子改変マウスに対して、高脂肪食負荷試験を行い、それぞれの血清総コレステロール値を図 5A に示す。いずれのマウスも高脂肪食負荷後にコレステロール値は上昇を認めたが、ApoE/NMU ダブル KO マウスと ApoE-KO マウスでは、負荷後のコレステロール値は同等であり、図 5B に示すように、VLDL 分画において同等であることが示された。

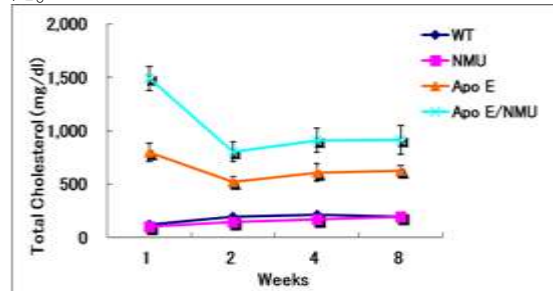


図4 遺伝子改変マウスの無コレステロール食餌負荷試験後の血清総コレステロール値の変化

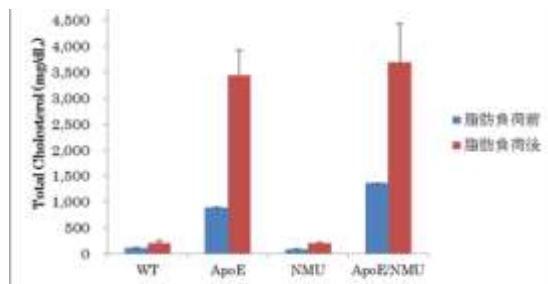


図5A 遺伝子改変マウスの高脂肪食負荷試験後の血清総コレステロール値の変化

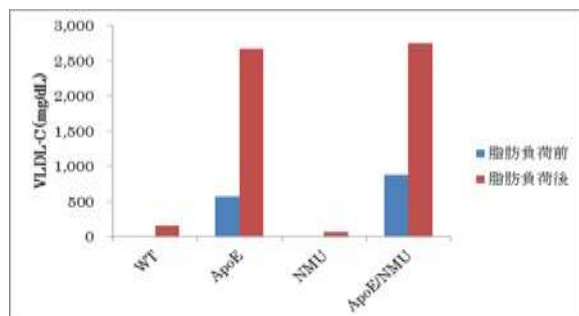


図5B 遺伝子改変マウスの高脂肪食負荷試験後の血清 VLDL コレステロール値の変化

5) 遺伝子改変マウスの CT による体脂肪、筋肉量の定量

遺伝子改変マウスの CT による筋肉量、脂肪量の定量を行った。図 6A に示すように、筋肉量はそれぞれのマウスで変化を認めなかった。体脂肪量は、ApoE-KO マウスにおいて低値を示した (図 6B)。ApoE-KO マウスにおいては、皮下脂肪および内臓脂肪ともに低値を示した (図 6C)。ApoE/NMU ダブル KO マウスは、Wild type と比較しても、変化を認めなかった。

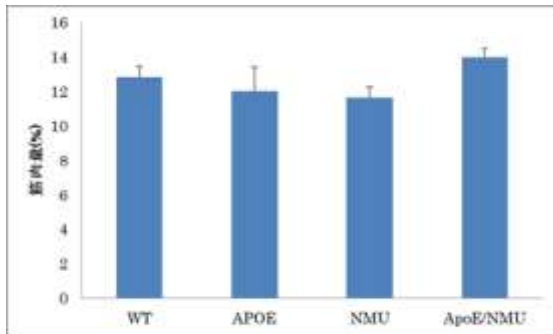


図6A CT撮像による筋肉量の定量

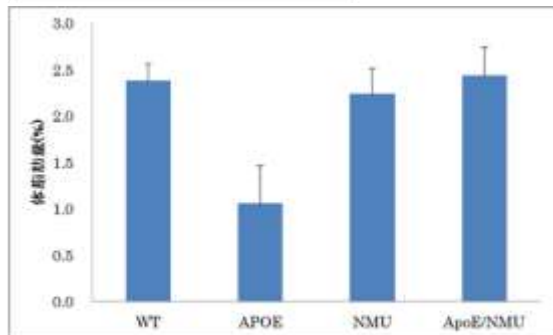


図6B CT撮像による体脂肪量の定量

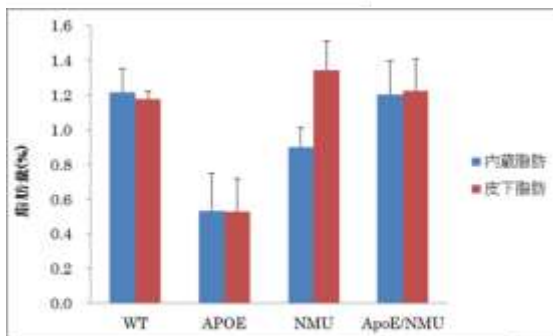


図6C CT撮像による内臓脂肪および皮下脂肪の定量

6) 遺伝子改変マウスの大動脈の動脈硬化面積率

それぞれの遺伝子改変マウスにおける大動脈の動脈硬化面積率を図 7 に示す。Wild type および NMU-KO マウスは、動脈硬化を認めなかったが、ApoE-KO および ApoE/NMU ダブル KO マウスは、ともに動脈硬化を認め、その面積率は同等であった。ApoE/NMU ダブル

KO マウスにおいて、コレステロール値が約 2 倍であるにも関わらず、ApoE-KO マウスと同等の動脈硬化を認めるということは、NMU が発現していないことが動脈硬化症に protective に働く可能性が示唆された。

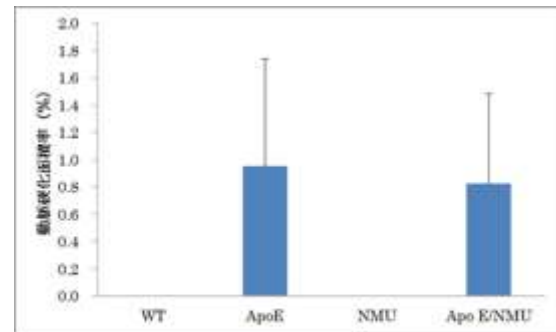


図7 大動脈の動脈硬化面積率

7) 遺伝子改変マウスの高脂肪食負荷下での生存曲線

Wild type マウスは、1 年 100 日で半分のマウスが死亡し、1 年 251 日ですべてのマウスが死亡した。ApoE/NMU ダブル KO マウスは、198 日で半分のマウスが死亡し、242 日ですべてのマウスが死亡した。ApoE-KO マウスは、200 日で半分のマウスが、220 日ですべてのマウスが死亡した。ApoE-KO マウスと ApoE/NMU ダブル KO マウスでは、生存曲線は同等であった。一方、NMU-KO マウスは、286 日出半分のマウスが、330 日ですべてのマウスが死亡した。NMU-KO マウスは、ApoE-KO マウスや ApoE/NMU ダブル KO マウスに比べて長期に生存したが、Wild type に比べては、極めて生存が短かった。

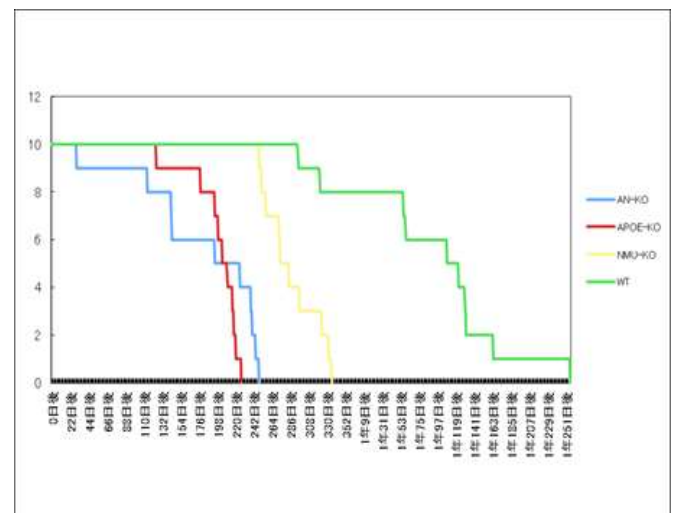


図8 高脂肪食負荷下での生存曲線

成果のまとめ

ApoE/NMU ダブル KO マウスは、ApoE-KO マウスに比べて著明な高コレステロール血症

を示し、LDL の late phase の分解の遅延が明らかとなった。コレステロール値が著明高値であるにもかかわらず、ApoE/NMU ダブル KO マウスは、ApoE-KO マウスに比べて動脈硬化の進行が同等であったため、NMU が無い状況では動脈硬化症の進行が遅い可能性が示唆された。生存曲線は、ApoE-KO マウスと ApoE/NMU ダブル KO マウスでは同等であったが、NMU-KO マウスにおいて Wild type と比べて著明に短縮を認め、NMU の動脈硬化への作用以外の生存期間への影響が示唆された。さらに、NMU の作用を検討する必要があることが明らかとなった。

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 21 件) (全て査読有)

- 1) Harada-Shiba M, Arai H, Okamura T, Yokote K, Oikawa S, Nohara A, Okada T, Ohta T, Bujo H, Watanabe M, Wakatsuki A, Yamashita S: Multicenter study to determine the diagnosis criteria of heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan: *J Atheroscler Thromb*, **19(11): 1019-1026, 2012.**
- 2) Sugisawa T, Okamura T, Makino H, Watanabe M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Iwamoto N, Yamamoto A, Yokoyama S, Harada-Shiba M: Defining patients at extremely high risk for coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*, **19(4) : 369-375, 2012.**

[学会発表] (計 89 件)

- 1) Horii M, Harada-Shiba M, The Bioactive Peptide Neuromedin U is Associated with Lipid Metabolism and Inflammation, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日~14 日, 福岡
- 2) Yuasa Y, Iwamoto N, Makino H, Osaki T, Minamide N, Usami M, Harada-Shiba M, Change of serum levels in patients of substances removed by LDL-Apheresis(LDL-A)treatment, 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2011 年 7 月 15 日~16 日, 札幌
- 3) 湯浅由美子, 榎野久士, 岩本紀之, 尾崎司, 南野直人, 宇佐美真, 斯波真理子, 「LDL-A によって除去される動脈硬化危険因子について」排液 Proteome 解析からの検討, 第 31 回日本アフェレンス学会学術大会, 2010 年 11 月 4 日~6 日,

千葉

[図書] (計 2 件)

- 1) Iwamoto N, Harada-Shiba M, Intratracheal Gene Transfer Using Polyplex Nanomicelles and Their Application to Cardiology, Nanomedicine and the Cardiovascular System, *edited by Ross J. Hunter, Victor R. Preedy, Nanomedicine and the Cardiovascular System, Science Publishers, 284-302, 2011*

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

名称: 高コレステロール血症と動脈硬化の検出方法

発明者: 斯波真理子他

権利者: 株式会社ビー・エム・エル、国立循環器病研究センター

種類: 特許権

番号: 特願 2011-100682

出願年月日: 平成 23 年 4 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 高コレステロール血症の疾患モデルマウス

発明者: 斯波真理子、寒川賢治

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許権

番号: 第 4734523 号

取得年月日: 平成 23 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斯波 真理子 (SHIBA MARIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号: 70271575