

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591331

研究課題名(和文) リポ蛋白質HDLの抗動脈硬化作用におけるAMPキナーゼの役割と循環器疾患治療薬

研究課題名(英文) Role of AMPK in HDL-induced antiarterogenic effects in endothelial cells

研究代表者

木村 孝穂 (Kimura, Takao)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90396656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)においてHDLがAMPキナーゼ(AMPK)活性化を促進した。AMPKはS1P/S1P受容体系とSR-BI/PDZK-1の二つの独立したシグナル伝達系を介してHDLにより活性化された。SR-BI/AMPK活性化にはLKB1とカルモジュリンキナーゼが関与し、S1P/S1P受容体系ではカルモジュリンキナーゼが関与していた。シンバスタチン、フェノフィブレート、AICAR、メトホルミンはeNOS、SR-BI両方の蛋白発現を増強し、シンバスタチンとフェノフィブレートで同時にHUVECを前処理するとHDLによるAMPK/Akt活性化効果が増強された。

研究成果の概要(英文)：High density lipoprotein (HDL) stimulated AMP kinase (AMPK) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HDL activated AMPK through independent two pathways. HDL-induced AMPK activation was mediated by sphingosine-1 phosphate (S1P)/S1P receptor pathway and scavenger receptor (SR-BI)/PDZK-1. S1P/S1P receptor pathway was mediated by calmodulin. SR-BI/PDZK-1 pathway was mediated by calmodulin and LKB1 in HUVECs. Simvastatin, fenofibrate, metformin and AICAR enhanced protein expression of SR-BI and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in HUVECs. Simultaneous pretreatment of simvastatin and fenofibrate enhanced HDL-induced AMPK/Akt activation in HUVECs.

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：脂質代謝異常 動脈硬化 HDL

1. 研究開始当初の背景

近年耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧を合併するメタボリック症候群が注目されており、その診断基準には低 HDL 血症が含まれる。低 HDL 血症は高 LDL 血症と独立した心血管疾患の重要な危険因子であり、低 HDL 血症改善薬の開発が期待されている。これまで HDL の抗動脈硬化作用はコレステロール逆輸送が主であるとされて来たが、近年これとは独立した血管内皮細胞の保護、機能改善作用が注目されている。しかし、一方でそのメカニズムは明らかでなかった。我々は多機能性の脂質シグナル分子であるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が HDL 中に高濃度に蓄積しており HDL 濃度と S1P 濃度の間に正の相関があること、更にコレステロール逆輸送とは独立した HDL の抗動脈硬化作用である血管内皮細胞の増殖、遊走促進作用とアポトーシス抑制作用が HDL 中 S1P/S1P 受容体を介して媒介されることを見出した。HDL 作用と S1P との関連については国外では Nofer (独) のグループ、国内では朔 (福岡大)、五十嵐 (香川医) 等も HDL の抗動脈硬化作用の一部が S1P を介しているという我々の知見を確認しており、国内外で一定の評価を得ている。一方で、S1P が動脈硬化性の細胞接着分子の発現を増加するという報告もあり、議論の多いのも事実である。そこで、我々はさらにこの S1P、HDL 作用を解析した結果、S1P には確かに細胞接着分子の発現促進作用があるが、その程度は極めて弱く、S1P には HDL と同様にサイトカイン (TNF) による細胞接着分子の発現促進作用を著明に抑制する作用があることが判明した。HDL は S1P による細胞接着分子の発現増加効果も抑制することから、HDL 作用には S1P 受容体以外の関与も示唆された。更に詳細に解析した結果、HDL は S1P/S1P 受容体 S1P₁、S1P₃ を介した系に加え、アポ蛋白/スカベンジャー受容体 (SR-BI) を介して、一酸化窒素 (NO) 合成促進、接着分子 (ICAM、VCAM) 発現抑制、単核球の血管内皮細胞への接着抑制を發揮することを見出した。これらの研究成果に基づいて、我々は「血管内皮細胞における HDL の抗動脈硬化作用にはアポ蛋白/SR-BI と S1P/S1P 受容体 (S1P₁、S1P₃) が重要な役割を果している」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

循環器疾患の代表的治療薬であるスタチ

ンが脂質代謝改善作用に加え、HDL 同様の抗炎症、抗動脈硬化作用を發揮するとの報告があるがそのメカニズムの詳細は明らかでなかった。我々はスタチンが Rho 阻害、PPAR α 活性化を通じて SR-BI 発現増強を伴い HDL の NO 産生作用を増強することにより抗炎症作用を發揮することを見出した。これらの成果は HDL 受容体 SR-BI の発現増強効果により HDL の抗動脈硬化作用を増強できることを初めて示したものである。我々はこの成果を発展させるべく糖尿病治療薬の代表的標的分子である AMP キナーゼ (AMPK) の血管内皮細胞における役割を検討した。その結果 HDL、S1P とともに AMPK 活性化を伴って NO 合成を促進することを見出した。本研究の目的は AMPK 刺激による新たな動脈硬化症治療薬開発の可能性について基礎的な検討を行うことである。

3. 研究の方法

- (1) 独自に開発した S1P 定量法やヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における S1P 受容体、SR-BI 発現抑制と作用抑制 (受容体、細胞内シグナル分子に対する特異的 siRNA 及び特異的阻害薬)、特異的受容体アゴニストを用いた解析を行い HDL 作用を仲介する SR-BI と S1P 受容体の細胞内シグナル伝達機構における AMPK の役割の解明、AMPK による血管内皮細胞におけるスカベンジャー受容体 SR-BI の発現調節機構の解明、スタチンと AMPK のクロストーク機構の解明をめざす。SR-BI アゴニストとしてアポリポ蛋白 A とコレステロール、リン脂質で再構成した HDL (rHDL) を使用する。
- (2) スタチン作用と AMPK 刺激薬との相互作用について調べる。スタチンと AMPK 刺激薬を同時添加した場合の SR-BI の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで調べる。異なるシグナル伝達系で SR-BI 発現を増強している場合、AMPK 刺激薬とスタチンの同時刺激で SR-BI 発現増強作用に相乗効果もしくは相加効果が期待される。AMPK 刺激薬としては AICAR を使用する。スタチンと同様の検討をフィブラート、メトホルミンでも並行して実施する。
- (3) 抗血小板薬であるシロスタゾールは抗血小板作用に加え、脂質代謝改善作用、血管内皮機能改善作用があると報告されている。シロスタゾールについてもスタチン同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1) HUVEC に HDL を作用させると HDL が NO 合成酵素 (eNOS) 活性化に伴い AMPK 活性化を促進することが確認できた。この HDL 作用におけるアポ蛋白/SR-BI 及び S1P/S1P 受容体(S1PR)と AMPK の役割を明らかにするためシグナル伝達系の解析を行った結果、HUVEC では S1P/S1PR/AMPK/Akt/eNOS を介するシグナル伝達系および rHDL/SR-BI/PDZK-1/AMPK/Akt/eNOS を介する系の二つの独立したシグナル伝達系が HDL 刺激により促進されることが明らかになった。rHDL/SR-BI/PDZK-1 を介した AMPK 活性化には LKB1 とカルモジュリンキナーゼが関与しているが S1P/S1PR を介して AMPK を活性化するシグナル伝達系ではカルモジュリンキナーゼが関与しているが LKB1 は関与していないことが明らかになった。引き続いてシンバスタチン、フェノフィブレート、AICAR など AMPK を活性化する薬剤を用いて HUVEC における eNOS や SR-BI の発現に及ぼす影響を調べた。

(2) シンバスタチン、フェノフィブレート、AICAR は eNOS、SR-BI 両方の蛋白発現を増強し、メトホルミンは SR-BI の蛋白発現を増強したが eNOS の蛋白発現増強効果は他の薬剤に比べて小さかった。シンバスタチン、フェノフィブレートで HUVEC を前処理すると HDL による Akt/eNOS 活性化効果が増強された。シンバスタチン、フェノフィブレート、AICAR、メトホルミンによる eNOS、SR-BI 発現増強効果を制御するシグナル伝達系を解析中である。

(3) 血管内皮機能を改善させる薬剤としてシロスタゾールが知られている。シロスタゾールは HUVEC の eNOS、SR-BI の発現を増強した。シロスタゾールはシンバスタチンと同様に AMPK を活性化した。シロスタゾールは HUVEC において cAMP 系のシグナルを介して eNOS、SR-BI の発現を増強していると考えられ現在 cAMP 以降のシグナル伝達系の解析を続けている。

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)

Kimura T, Tsunekawa K, Ogiwara T, Tokue Y, Nara M, Inoue T, Obuchi T, Suto C, Ohshima K, Murakami M. Seroprevalence of Measles- and Mumps-Specific Immunoglobulin G among Japanese Healthcare Students Increased during 2007-2012. Jpn J Infect Dis. (査読あり) 2013;66(5):411-415.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/5/66_411/_article

Ogiwara T, Kimura T, Tokue Y, Watanabe R, Nara M, Obuchi T, Yaegashi A, Yomoda S, Ohshima K, Murakami M. Tuberculosis screening using a T-cell interferon- γ release assay in Japanese medical students and non-Japanese international students. Tohoku J Exp Med. (査読あり) 2013;230(2):87-91. https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/230/2/230_87/_article

Nakahara T, Takahashi-Tateno R, Hasegawa A, Kimura T, Tsushima Y, Murakami M, Kurabayashi M. Doppler echocardiography may provide a potentially life-saving screening of anomalous origin of coronary artery in young athletes. Int J Cardiol. (査読あり) 2012;5;156(1):104-105. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167527312000071>

Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, Tomura H, Kimura T, Im DS, Yanagida K, Ishii S, Takeyoshi I, Okajima F. Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. Cancer Sci. (査読あり) 2012 Jun;103(6):1099-104.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2012.02246.x/pdf>

〔学会発表〕(計 4 件)

木村孝穂、角野博之、岡島史和、村上正巳 血清中アポリポ蛋白 M 測定の臨床的意義 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 シンポジウム (平成 25 年 7 月 19 日 京王プラザホテル)

木村孝穂、角野博之、岡島史和、村上正巳 血清中アポリポ蛋白 M 測定の臨床的意義の検討 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 (平成 25 年 11 月 2 日 神戸国際会議場)

R. Watanabe, **T. Kimura**, Y. Tokue, T. Ogiwara, M. Nara, Y. Kobayashi, T. Inoue, H. Sumino, T. Morimura, O. Araki, K. Tsunekawa, T. Aoki, T. Obuchi, Y. Yomoda, K. Ohshima, M. Murakami Tuberculosis screening by a T cell interferon- γ release assay in students of medical school and international students in Gunma University The12th meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (平成24年12月1日 京都国際会館)
T. Kimura, M. Murakami and F. Okajima. Induction of SR-BI and eNOS expression by cilostazol enhanced HDL-induced anti-atherogenic actions in endothelial cells 第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (平成23年7月15日 ロイトン札幌ホテル)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 孝穂 (KIMURA TAKAO)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：90396656

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：