

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504009

研究課題名(和文) 過食・ストレスとHDL代謝をつなぐニューロペプチドY受容体の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying the association between Y2 receptor SNPs and HDL metabolism

研究代表者

加治 秀介 (KAJI, Hidesuke)

兵庫県立大学・看護学部・教授

研究者番号：90224401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Y2受容体(Y2R)のSNPsと血中HDL-C値が関連することを報告した。本研究でその関連機序を検討した結果、HDL-C値が低くなるSNPを含む遺伝子を一過性導入すると培養肝細胞のHepG2では転写活性がみられた。そこでHepG2でY2R拮抗薬の遺伝子発現への影響を検討した。マイクロアレイにより743、492種類のmRNAが各々1.5倍以上増加、減少した。増加群は脂質代謝に関わる遺伝子、HDL代謝パスウェイを、減少群はコレステロール合成調節転写因子SREBPシグナルパスウェイを含んでいた。以上よりY2R拮抗薬は特定のY2R SNPsを有する対象の脂質異常症改善薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported the association between Y2R gene SNPs and plasma HDL-C levels. The present study was undertaken to clarify the mechanism of this association. Reporter with Y2R gene containing these SNPs were transiently transfected to various cell lines. Human liver cell HepG2 showed transcriptional activity of Y2R gene with the SNPs associated with lower but not higher plasma HDL-C.

HepG2 contained DNA with these SNPs, so we tested the effect of Y2R antagonist BIIE0246 on gene expression. Microarray analysis revealed BIIE0246-induced up- and down-regulation (>1.5) of 743 and 492 transcripts, respectively. Up-regulated genes were included in chylomicron remodeling and negative regulation of cholesterol/sterol transport, and also included in the pathway of HDL metabolism. Down-regulated genes were included in the pathway of SREBP signaling. These results suggest that Y2R antagonist may be a drug candidate for dyslipidemia in subjects with the specified Y2R SNPs.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：Y2 receptor (Y2R) SNPs HDL-cholesterol HepG2 BIIE0246 マイクロアレイ バイオインフォ-マティクス

### 1. 研究開始当初の背景

ストレスで肥満やメタボリック症候群 (MetS) が起こる分子機序は必ずしも明らかではない。ある種のストレスと高糖脂質が重なると、単独に比し肥満が起こり易いことが報告された<sup>1</sup>。ストレスは副腎の糖質コルチコイド産生や交感神経末端からの NPY 放出を促す。NPY は視床下部において、その受容体ファミリーの 1 つ Y1 受容体を介して摂食促進的に働くことはよく知られているが、この報告ではストレス+過食では NPY が直接脂肪組織に Y2 受容体 (Y2R) を介して作用し、内臓脂肪細胞肥大化や、その周囲の血管増生、慢性炎症をきたすマクロファージ活性化など MetS の病態が起こることが示されている。同様のことがヒトでも起こるかどうかは不明である。私共は保健所での健診者 317 名に承諾を得て、Y2R 遺伝子 SNPs のうち、日本でのマイナーアリル頻度が 5%以上の SNPs と MetS の関連性を検討した。特に転写調節領域で認められる 2 箇所の SNPs の遺伝子型が MetS の構成要素の一つである血中 HDL-C 値と有意に関連したが、その機構は不明である<sup>2</sup>。Y2R 遺伝子転写調節領域の 2 つの SNPs は転写開始点の上流 626bp にある rs6857530、上流 598bp にある rs6857715 である。対象でのアリル頻度は rs6857530 で GG 29.8、GA 45.3、AA 24.9%、rs6857715 で TT 27.6、TC 44.8、CC 27.6%であった。血中 HDL-C 値と各 SNPs の遺伝子型との関連性は多変量解析の結果、性別、年齢、BMI、ウエスト周囲径、血圧、血中トリグリセリド値、血中 LDL-C 値、空腹時血糖値などの変数とは独立していた。興味深いことに rs6857530 は A でなく G であればストレス応答転写因子の Sp1 の結合配列とより類似し、rs6857715 は T でなく C であればメチル化を受ける可能性がある CpG を含む配列となる。したがって rs6857530 が GG なら AA より、rs6857715 が TT なら CC より Y2R 発現が高いと予想される。実際 rs6857530 では GG が GA や AA より、rs6857715 では TT が TC や CC より各々血中 HDL-C レステロール (HDL-C) 値がより低かった<sup>2</sup>。

HDL は末梢組織から肝臓へのコレステロール逆転送を行うが、それに伴って抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス、抗血栓、抗感染、血管拡張などの多彩な役割が示唆されており、動脈硬化のみならず、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患等の自己免疫疾患でも血中 HDL-C 値が減少する<sup>3</sup>。血中 HDL-C 値と関連する遺伝子はゲノムワイド関連解析で多くの SNPs が確認され<sup>4,5</sup>、コレステロールエステル転送蛋白 (CETP)、ATP 結合カセット輸送体 A1 あるいは G1 (ABCA1、ABCG1)、リポプロテインリパーゼ (LPL)、肝リパーゼ (LIPC)、内皮リパーゼ (LIPG) などは特に関連性が高い。免疫細胞や血管内皮細胞膜上のコレステロールは HDL によって ABCA1 や ABCG1 を通して引き抜かれ、HDL のレシチン・コレステロールアシルトランスフ

エラーゼ (LCAT) でエステル化される。CETP は HDL からコレステロールエステルを LDL や VLDL に引き渡す。HDL は肝臓に直接的にはスカベンジャー受容体タイプ BI (SR-BI) で取り込まれる。これらの過程で未熟な HDL 粒子は中間型 HDL<sub>3</sub>、成熟 HDL<sub>2</sub> へと変化する。また肥満者の血中 HDL-C 値と脂肪細胞の発現遺伝子群との関連解析においては内臓脂肪組織ではなく、むしろ皮下脂肪組織で、特定の遺伝子群で構成される 2 種類のモジュールが関連していることが報告された<sup>6</sup>。

以上より、ストレスで交感神経から放出される NPY が肝細胞、マクロファージ、樹状細胞、T、B リンパ球などの免疫細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞などに作用し、Y2R 発現量に応じて、血中 HDL-C 値を調節する分子群の発現を変化させる可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

Y2R 遺伝子の転写調節領域の 2 SNPs が血中 HDL-C 値と有意に、また他の MetS の変数とは独立して関連する分子機構は不明である。以下の研究によりこの点を明らかにする。

(1) 血中 HDL-C 値に関連する肝、免疫、血管内皮、脂肪等の培養細胞で Y2R 遺伝子の転写活性を各 SNP の遺伝子型毎に比較する。

(2) 差異を認めた細胞に NPY 単独または Y2R 拮抗薬を同時添加し、HDL 代謝に関連する分子の遺伝子発現解析を行い比較する。

機構解明により、低 HDL-C 血症や動脈硬化症等の新たな診断・予防・治療法の進展が期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) Y2R 遺伝子の当該 SNPs の各遺伝子型を含む転写調節領域を各遺伝子型の血球 DNA より PCR で増幅し、ルシフェラーゼをレポーターとする発現ベクターに組み込む。肝、マクロファージ、脂肪、血管内皮など、Y2R を介して血中 HDL-C 値に影響を及ぼす可能性のある分子を発現する細胞株を培養し、作成したベクターを一過性に発現させ、ルシフェラーゼ活性を比較する。

(2) SNPs の遺伝子型間で転写活性に差を認めた細胞において、各 SNP の遺伝子型を含むオリゴ DNA と核抽出蛋白との結合性を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により比較する。DNA-核蛋白結合物が形成され、電気泳動上シフトするかどうかを検討する。

(3) 転写活性に差がみられた細胞を中心に培養し、Y2R 拮抗薬 B11E0246 の血中 HDL-C 値に影響する可能性のある分子の遺伝子発現量への影響をリアルタイム PCR で比較する。

(4) 同様の培養細胞において、Y2R 拮抗薬 B11E0246 の網羅的な遺伝子発現への影響を

マイクロアレイによって解析を行い、HDL 代謝に関わる全体的な分子経路を解析し比較する。

#### 4. 研究成果

(1) Y2R 遺伝子 SNPs の遺伝子型間での転写活性の比較

Y2R の発現が最も高くなると予想される rs6857530GG/ rs6857715TT と最も低くなると予想される rs6857530AA/ rs6857715 CC を含む Y2R 遺伝子上流をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、培養ヒト肝細胞 HepG2 と、ヒト単球細胞 THP-1 をホルボールエステルで分化させたマクロファージ、脂肪前駆細胞 3T3-L1 をインスリン等含有カクテルで分化させた脂肪細胞、ヒト血管内皮細胞

(HUEhT-1) に各々一過性発現させて転写活性を比較した。HepG2 では GG/TT が AA/CC に比し有意に転写活性が高かった(ベクターのみの対照との比率で GG/TT 4.90 vs. AA/CC 1.48,  $P < 0.05$ )。逆にマクロファージでは GG/TT が AA/CC に比し有意に転写活性が低かった(GG/TT 1.50 vs. AA/CC 2.72,  $P < 0.05$ )<sup>7</sup>。3T3-L1 から分化させた脂肪細胞および HUEhT-1 細胞では差を認めなかった。

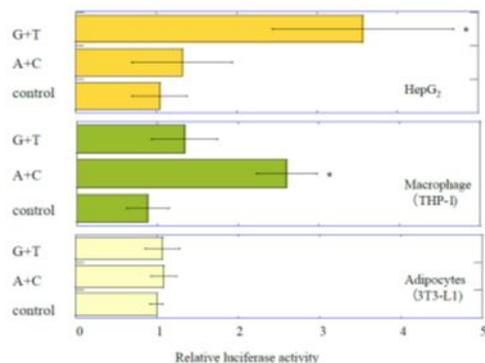


図1 Y2R 遺伝子上流 SNP rs6857530G + rs6857715T(G+T) または rs6857530A+rs6857715C (A+C) を pGL3-Basic ベクターに挿入し各細胞に一過性導入の後、ルシフェラーゼ活性を比較した。pGL3-Basic のみを導入した対照との比率で表した。上段より HepG2, THP-1 よりホルボールエステルで分化させたマクロファージ、3T3-L1 よりインスリンを含むカクテルで分化させた脂肪細胞の結果を示す。\*  $P < 0.05$  vs. 対照(文献7)

(2) 転写活性に差がある場合の機序の検討  
GG または AA を含むオリゴ DNA をビオチンで標識し、HepG2 核抽出蛋白と結合させたのち、EMSA を行った結果、特異的なシフトバンドが共通してみられた。さらに GG ではもう一つ特異的なシフトバンドを認めた。ストレスで上昇する転写因子 SP1 の結合予測配列に SNP GG は AA より近いいため、この差が生じた可能性も考えられた<sup>7</sup>。

(3) Y2R 拮抗薬 BII E0246 の遺伝子発現への影

響(リアルタイム PCR での比較)

肝細胞 HepG2 の DNA を直接シーケンスしたところ、血中 HDL-C 値が低くなる Y2R SNP をヘテロに含むことを確認した。そこで、血中 HDL-C 値に関与する肝細胞の蛋白を中心に、Y2R 拮抗薬である BII E0246 を培養 HepG2 細胞に添加し、遺伝子発現への影響をリアルタイム PCR で検討した。アポリポ蛋白 A1 (ApoA1)、ApoA1 結合蛋白 mRNA 量は有意に変化しなかった。また CETP、SR-B1、LIPC mRNA 量は BII E0246 で減少傾向を示したが、非添加、NPY、BII E、NPY+BII E 4 群間の差は有意でなかった<sup>8</sup>。

(4) Y2R 拮抗薬 BII E0246 の遺伝子発現への影響(マイクロアレイでの比較)

NPY を添加した HepG2 細胞に BII E0246 添加の影響を、マイクロアレイにより非添加と比較したところ、54,675 プローブセットで各々 743, 429 が 1.5 倍以上増加ないし減少した<sup>8</sup>。増加遺伝子群が有意に含まれたジーンオントロジー(GO)カテゴリーは3つの生物学的過程、7つの細胞構成要素、1つの分子機能であった( $P < 0.001$ )。この中で3つの生物学的過程はキロミクロンリモデリング、コレステロール輸送の陰性調節、ステロール輸送の陰性調節であった。また減少遺伝子群が有意に含まれた GO カテゴリーは 44 の生物学的過程、11 の細胞構成要素、1つの分子機能であった( $P < 0.001$ )。さらに BII E0246 によって抑制された遺伝子群は 44 のパスウェイに含まれ( $P < 0.01$ )、その中にはコレステロール合成調節に重要な転写因子である SREBP のシグナルが認められた。

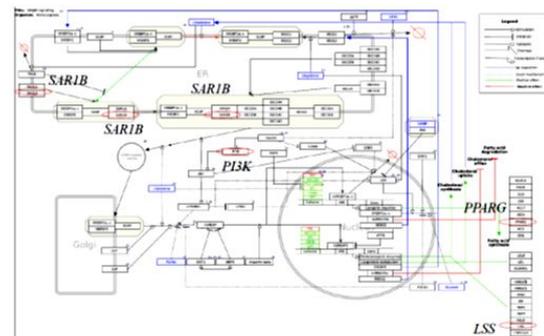


図2 SREBP シグナルパスウェイ(WikiPathway data base; WP1982)。BII E0246 によって減少した SAR1B、PI3K、PPARG、LSS 遺伝子発現がこのパスウェイに含まれていた( $P < 0.01$ ) (赤丸)(文献8)。

一方増加した遺伝子群は 22 のパスウェイに含まれ、その中にはビタミン B12/HDL 代謝パスウェイが認められた。

以上の結果より Y2R 阻害がコレステロール合成の抑制や血中 HDL-C の上昇につながる可能性がある。特定の Y2R SNP (rs6857530 GG または rs6857715 TT) を持つ対象の脂質異常症や心血管病予防・治療に向けて、Y2R 拮抗薬

が有効な個別化医療につながる可能性が示唆された。

#### 引用文献

- (1) Kuo LE, Kitlinska JE, Tilan JU et al. *Nature Medicine* 13 (7) 803-811, 2007
- (2) Takiguchi E, Kaji H, Fukano C et al. *Metabolism* 59 (11) 1591-1596, 2010
- (3) Norata GD, Pirillo A, Ammirati E et al. *Atherosclerosis* 220, 11-21, 2012
- (4) Kathiresan S, Melander O, Guiducci C et al. *Nature Genetics* 40 (2) 189-197, 2008
- (5) Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV et al. *Nature* 466 (7307) 707-713, 2010
- (6) Wolfs MGM, Rensen SS, Bruin-Van Dijk EA et al. *BMC Medical Genomics* 3(34)1-15, 2010
- (7) Okada M, Nagai M, Kaji H et al. *Integrative Molecular Medicine* 2,251-255, 2015
- (8) Kaji H, Okada M, Nagai M et al. *Integrative Molecular Medicine* 3,576-582, 2016

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 9 件)

Kaji H, Okada M, Hamaue A, Mori M, Nagai M Blockade of the neuropeptide Y2 receptor with the potent antagonist BIIIE0246 regulates gene expression levels in the lipid metabolic pathways in human hepatoma cell line HepG2. *Integrative Molecular Medicine* 査読有 3、2016、576-582

DOI:10.15761/IMM.1000207

Nagai M, Morita Y, Mori M, Sakashita R, Kaji H Effect of thigh muscle on metabolic and inflammatory biomarkers *Integrative Obesity and Diabetes* 査読有 1, 2015, 98-100

DOI:10.15761/IOD.1000122

Okada M, Nagai M, Hamaue A, Mori M, Kaji H Single nucleotide polymorphism and cell type-dependent gene expression of neuropeptide Y2 receptor. *Integrative Molecular Medicine* 査読有 2、2015、251-255

DOI:10.15761/IMM.1000150

Kaji H Editorial: Paradigm shift of obesity research. *Jacobs Journal of Obesity* 査読有 1、2015、1-3

坂下玲子、加治秀介(7名中4番目)食形態が施設入居高齢者の健康に与える影響と関連要因 単一施設の調査結果 兵庫県立大学看護学部・地域ケア開発研究所紀要 査読有 22,2015,27-39

Nagai M, Uyama O, Kaji H Daily physical activity and body composition in healthy Japanese women. *Structure and Function* 査読有 13, 2015, 1-9  
Sugiyama Y, Kaji H (11名中9番目)A

prop1-binding factor, AES cloned by yeast two-hybrid assay represses PROP-1-induced Pit-1 gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 査読有 376, 2013, 93-98

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.022>

Nagai M, Uyama O, Kaji H Dietary habits prone to lifestyle-related disease. *Health Education Journal* 査読有 72, 2013, 172-179

DOI:10.1177/0017896912 437299

Kaji H Review article; High-density lipoproteins and the immune system. *Journal of Lipids* 査読有 2013, 2013, 1-8

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/684903>

##### 〔学会発表〕(計 3 件)

Kaji H, Nagai M, Hamaue A, Mori M Blockade of neuropeptide Y2 receptor regulates gene expression in pathways of lipid metabolism in HepG2 cells. *Neuropeptide* 2015, 2015, Sep 28 ~ October 1, Aberdeen, UK

Okada M, Nagai M, Hamaue A, Kaji H The mechanism underlying the association between 5'-flanking region of neuropeptide Y2 receptor gene variant and plasma HDL-cholesterol. *The 9<sup>th</sup> Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis* 2014, Sep 12 ~ 14, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Nagai M, Morita Y, Mori M, Sakashita R, Kaji H Fomentation on thigh muscle reduced plasma soluble urokinase-type plasminogen activator receptor but not choline acetyltransferase. *The 17<sup>th</sup> EAFONS* 2014, Feb 20 ~ 21, Manila, Philippine

##### 〔図書〕(計 8 件)

Kaji H Bentham Science Publishers, *Frontiers in clinical drug research: Diabetes & obesity: volume 2 The current, emerging and future medication for type 2 diabetes and obesity*, 2016, 3-49

DOI:10.2174/97816810818541160201

加治秀介 医学書院、臨床検査データブック2015-2016 内分泌学的検査:下垂体、副甲状腺、消化管ホルモン、疾患と検査:内分泌疾患、2015、235-261、280-281、330-331、852-856

加治秀介 医学書院 臨床検査データブックコンパクト版 第8版 内分泌学的検査 2015、78-92

加治秀介 南山堂 看護のための臨床病態学 改訂2版 内分泌、2014、313-352

加治秀介 医学書院 臨床検査データブックコンパクト版 第7版 内分泌学的検査 2013、83-98

加治秀介 スーベルヒロカワ 臨床病態学2 第2版 8代謝内分泌疾患2下垂体の異常1下垂体腫瘍 2013、318-322

加治秀介 医学書院、臨床検査データブック2013-2014 内分泌学的検査:下垂体、副甲状腺、消化管ホルモン、疾患と検査:内分泌疾患、2013、245-270、289-290、339、848-850

Kaji H Nova Science Publishers, Protein biochemistry, synthesis, structure, and cellular functions: Neuropeptide Y molecular structure, role in food intake and direct/indirect effects. Chapter III Neuropeptide Y and its receptors: molecular structure and pathophysiological role in food intake and energy homeostasis. 2013,39-82

<http://www.novapublishers.com>

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://kyouin.u-hyogo.ac.jp/staff/cnas/hidesuke\\_kaji/](http://kyouin.u-hyogo.ac.jp/staff/cnas/hidesuke_kaji/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加治 秀介 (Kaji, Hidesuke)

兵庫県立大学・看護学部・教授

研究者番号：9 0 2 2 4 4 0 1