

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590453

研究課題名(和文) 動脈硬化モデルマウスにおける脂質合成転写因子 SREBP-1 遺伝子抑制効果の検討

研究課題名(英文) The effects to suppress SREBP-1 gene as a lipid synthetic transcription factor on atherosclerotic model mice.

研究代表者

高橋 昭光 (TAKAHASHI, Akimitsu)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70344893

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)：動脈硬化モデルマウスとして知られるLDL受容体欠損マウス(LDLRKO)において脂質合成転写因子SREBP-1を欠損させると高脂肪食下での血清コレステロール、血清トリグリセリド、VLDL中のコレステロール・トリグリセリドの減少、動脈硬化巣の減少が起こり、VLDL粒子径の縮小が見られることを観察した。これらの結果より、特に過食をとる場合において、脂質合成系SREBP-1抑制が動脈硬化抑制の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LDL receptor disrupted mice (LDLRKO) were known as a model of atherosclerosis with disturbance of lipoprotein clearance from blood. But when the syntheses of lipid were suppressed in LDLRKO mice, that the atherosclerosis would be improved or not were unknown. We investigated SREBP-1 knockout mice on the background of LDLRKO, as the model of suppressed lipid syntheses. When these models were fed Western diet, they revealed that SREBP-1 deficit could decrease in cholesterol or triglyceride levels, in plasma or VLDLs, and also suppress atherosclerosis formation or decrease in the particle size of VLDLs. These results suggest that suppression of SREBP-1 could be a therapeutic target of atherosclerosis, especially in those who intake excessive high-calorie diets.

研究分野：内分泌代謝・糖尿病内科

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：肥満 メタボリックシンドローム リポ蛋白代謝 動物モデル 転写因子

1. 研究開始当初の背景

本邦における死因の1位は全身の悪性新生物(34.4万人/年)であるが、2位の心臓血管障害(17.9万人/年)および3位の脳血管障害(12.1万人/年)を全身の動脈硬化性疾患というカテゴリーで考えると、30万人/年となり、動脈硬化性疾患の脅威は悪性新生物に比肩するとも言える。2005年に動脈硬化性疾患予防の観点からメタボリックシンドロームの診断基準が定められ、検診における腹囲測定の結果から、肥満が40歳台以上の男性人口の1/2にまで蔓延していることが明らかになった。さらに動脈硬化性疾患では救命し得ても心不全や麻痺による日常生活動作の制限や誤嚥といった後遺障害の原因ともなるため、医療・介護現場の大きな労働的負担になるだけでなく、国民医療費の増大や勤労世代が家族の介護に関わらざるを得なくなることによる国内総生産の減少にも直結し、超高齢化が進む本邦においては国民が老後に備えて消費を抑制してしまう大きな不安要素になっていると考えられる。

一方、従前より我々は、生体内での脂肪酸合成関連遺伝子の発現を支配的に活性化する転写因子 Sterol-regulatory-element binding protein (SREBP)-1 についての検討を行ってきた。SREBP-1cは脂肪細胞の分化・誘導に何らかの関わりを持っていることが発見初期の報告から脂肪細胞の量的な制御に関与する可能性が示唆されているが、それに加え我々は、SREBP-1の肝臓における強発現マウスが脂肪肝(J Clin Invest 1997;99:846-54)やインスリン抵抗性(Biochim Biophys Acta. 2005;1740:427-433)を生じること、LDL受容体を欠損させたマウス(LDLRKO)を背景としてSREBP-1の肝臓における強発現を行うとLDLRKO単独変異マウスと比較して動脈硬化病変が進展する可能性を明かにしてきた(2001年度~2002年度基盤研究(C)課題番号:13671172)。また既

報のSREBP-1欠損マウス(BP1KO)では血清脂質が野生型マウスよりも低下することは知られているが、野生型マウスにおいてもその血中脂質はヒトにおける低脂血症のレベルであり、動脈硬化性病変は極めて出現しにくいいため、SREBP-1の抑制が動脈硬化発症の抑制となりうるかどうかについての動物モデルはこれまで存在していない。

2. 研究の目的

今回、我々はすでに継続的に飼育・保有しているLDLRKOマウスとBP1KOマウスを交配させ、BP1KO/LDLRKOのダブルミュータントマウスを作成し、LDLRKOが動脈硬化病変を呈することが確認されている高脂肪食摂取条件下で、SREBP-1遺伝子の有無による血清脂質パラメーターの変動、動脈硬化性病変の進展についての病理学的検討を加える。さらに動脈硬化病変の制御にSREBP-1がどのようなメカニズムで関与しているかについて、血清リポ蛋白の産生や異化に関わる酵素、レムナントリポ蛋白の性状変化についても分子生物学的検討、電子顕微鏡を用いた形態学的検討を加えて解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) SREBP-1/LDL受容体二重欠損マウス(BP1KO/LDLRKO)の作成。

すでに樹立されているBP1KOマウスとLDLRKOマウスを交配し、さらにLDLRKOマウスともう一世代交配することによってSREBP-1ヘテロ欠損のLDLRKOマウス(BP1(+/-)/LDLRKOマウス)を得た。BP1(+/-)/LDLRKOマウスを更に兄妹交配することにより、BP1KO/LDLRKOマウスならびに同胞コントロールとしてBP1(+/+)/LDLRKOマウスを得た。なお、BP1KO同士の交配は不妊または仔が得られても数日で死亡することが知られており、系統はBP1(+/-)/LDLRKOマウスで維持し、実験個体は出生後遺伝子型をPCR法で決定して用いる方法をとった。

絶食-再摂食試験は24時間絶食後、12時間

再摂食をおこなった。

トリグリセリド，総コレステロール，リン脂質はワコー製酵素法測定キットを用いて測定した。

(2) 負荷食の調整。

通常食は MF 食(オリエンタル酵母製)を用いた。高脂肪食は，ウェスタン食 D12079B[34% ショ糖，21%脂肪，0.15%コレステロール]，リサーチダイエット製)をもちいた。

(3) HPLC 分析

リポ蛋白構成分析のため，各群 4~5 尾の血清をプールしスカイライトバイオテックによる HPLC 分析を実施した(Lipid Res. 2002;43:805-814)。

(4) 動脈硬化巣の解析

8週齢の BP1KO/LDLRKO マウスならびに同胞 LDLRKO マウスにウェスタン食を 10 週負荷してから安楽死させ，心臓と大動脈を分離した。心臓は 48 時間以上ホルマリン固定を行い，心基部を OCT コンパウンド(サクラファインテック製)で包埋後，大動脈の横断面をオイルレッド-0 ならびにヘマトキシリンで染色した。大動脈は腸骨動脈~大動脈起始部までを正中切開し，ピンで平面固定としてからズダン IV で 15 分染色し，70%エタノールで脱染，その後 4%リン酸緩衝ホルマリンで固定した。動脈硬化領域はアドビ社フォトショップ CS ソフトウェアで定量化した。

(5) 電子顕微鏡による血清 VLDL の観察

VLDL 画分(比重<1.006g/ml)は超遠心法により分離し，リン酸タングステン(pH7)で 2 分間染色した。標本は JEM-1400 電子顕微鏡(JEOL)で観察した。VLDL 粒子の平均直径はイメージソフトウェアバージョン 1.41 を用いて求めた。

4. 研究成果

(1) LDLRKO マウスにおける全身の SREBP-1 欠損は，動脈硬化惹起性のリポ蛋白プロファイルを改善した。

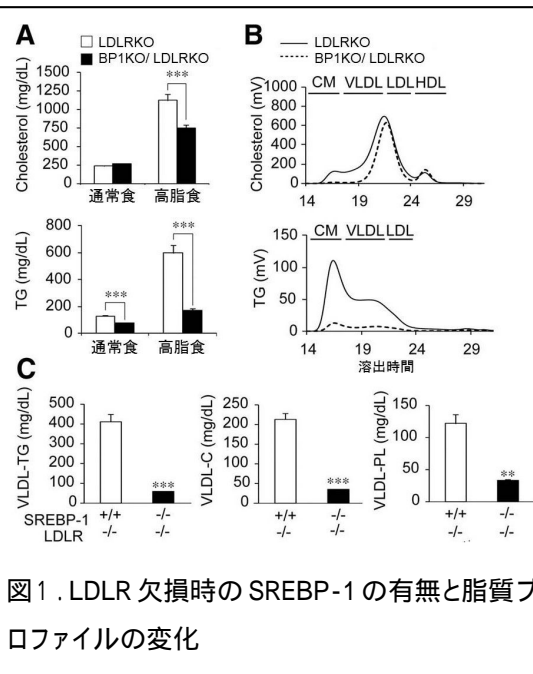


図1. LDLR 欠損時の SREBP-1 の有無と脂質プロファイルの変化

上記の交配により作成した BP1KO/ LDLRKO マウスおよび同胞の LDLRKO マウスについて，SREBP-1 欠損による動脈硬化惹起性リポ蛋白プロファイルの改善がみられるかどうかを検討した(図1)。

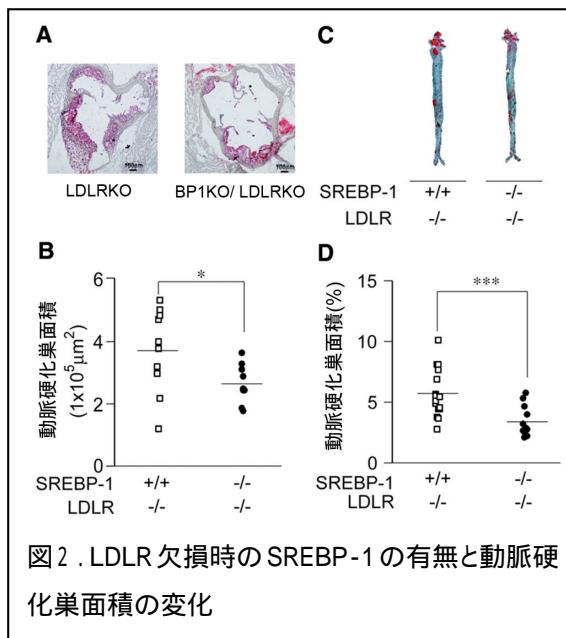
通常食飼育における血清コレステロール濃度は，SREBP-1 欠損群と対照群での有意差は認められなかったが，血清トリグリセリド(以下 TG)濃度は，LDLRKO 群と比較して BP1KO/LDLRKO 群において有意に低下を認めた(127±7 mg/dl vs. 76±5 mg/dl)。両群のマウスをさらに 4 週間高脂肪食下で飼育し再度検討した結果，LDLRKO マウスの血清コレステロール濃度は 1000 mg/dl を超え，血清 TG 濃度はおよそ 590 mg/dl と大幅に上昇したが，SREBP-1 も欠損させた BP1KO/LDLRKO 群では血清コレステロール濃度は LDLRKO 群のおよそ 2/3 に留まり，血清 TG 濃度は，LDLRKO 群の僅か 29%にしかならず，劇的な減少を示した(図1-A)。

HPLC 法による解析では，LDL 受容体欠損マウスにおける SREBP-1 遺伝子の欠損していない群と比較して，SREBP-1 欠損群は，i) カイロミクロンおよび VLDL におけるコレステロール含量の低下，ii) 全リポ蛋白における TG

含量の著しい低下を示した(図1-B)。

超遠心法により VLDL 画分を分離し、VLDL 中の脂質構成を酵素法により測定したところ、HPLC 分析の結果と矛盾せず、コレステロール、TG とともに LDLRKO 群と比較して BP1KO/LDLRKO 群で低下していることが確認出来た。またリン脂質においても同様 SREBP-1 欠損群での低下が認められた。(図1-C)。

(2) LDLRKO マウスにおける SREBP-1 欠損は、動脈硬化性病変の形成を抑制した。

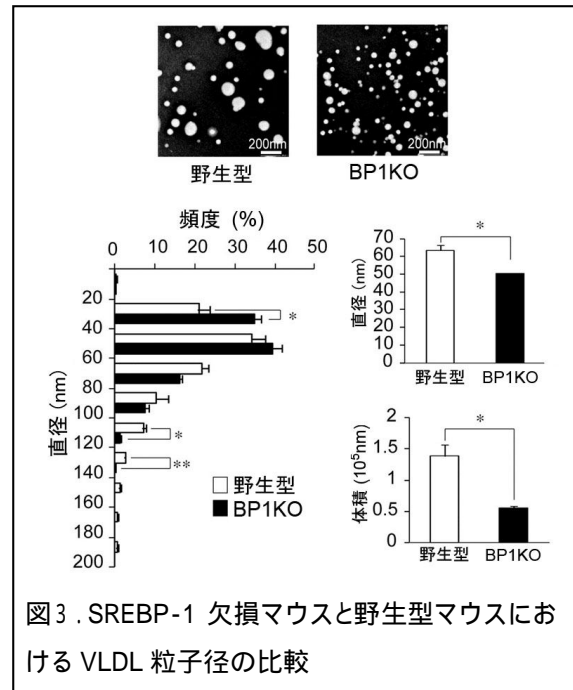


BP1KO/LDLRKO 群および同胞コントロール LDLRKO 群双方に高脂肪食を 10 週間与え、大動脈起始部横断面ならびに腸骨動脈~大動脈起始部までを正中切開し、ピンで平面固定したもの(以下、全長展開大動脈と称する)について、それぞれオイルレッド-O 染色、ズダン IV 染色を行い、動脈硬化性病変の面積を画像解析ソフトを用いて検討した(図2)。

大動脈起始部の横断面における大動脈硬化巣形成面積は、LDLR 単独欠損コントロール群よりも、BP1KO/LDLRKO 二重欠損群で 71% に抑制されており、その差は統計学的に有意であった(図2-A,B)。同様に、LDLRKO の全

長展開大動脈における動脈硬化巣形成面積は、SREBP-1 欠損により SREBP-1 非欠損群の 40% に減少していた(図2-C,D)。

(3) 全身性の SREBP-1 欠損は、VLDL 粒子の直径を減少させた。



高脂肪食 4 週飼育下の SREBP-1 欠損マウスの VLDL は、同条件飼育の野生型マウスの VLDL に比べて、電子顕微鏡観察での粒子径が小さかった(図3)。

以上(1)~(3)の研究成果より、特に現代人にみられるような高カロリー高脂肪食下の動脈硬化発症環境においては、SREBP-1 の欠損は、コレステロール/トリグリセライドの低下を招き、また、動脈硬化性病変の進展抑制をもつ可能性があると考えられた。

大径 VLDL は、血中のクリアランスが遅延して LPL による TG の抜き取りが繰り返すことにより、動脈硬化惹起性が高いと考えられる Small, dense-LDL 形成の原因になるとされる。本研究においても高脂肪食飼育による VLDL の大径化が、SREBP-1 欠損のために抑制され通常径の VLDL となった可能性があり、

SREBP-1 欠損群では、動脈硬化進展抑制が見られたことと合わせると、SREBP-1 遺伝子の有無による VLDL のサイズ変化や Small, dense-LDL の生成は興味を持たれる。しかしながら、本研究では、直接的に Small, dense-LDL を測定するなどの検討は行っておらず、SREBP-1 抑制がどのようなメカニズムで動脈硬化抑制に繋がるかについての検討は更に必要であると考えられた。

本研究では、トリグリセライド合成の鍵となる脂質合成転写因子 SREBP-1 の抑制が、単に血清脂質濃度を下げるに留まらず、動脈硬化を直接的に抑制しうる可能性があることを動物モデルで示し得た。これは今後、新たなクラスの脂質低下療法や抗動脈硬化作用をもつ薬剤の治療ターゲットとしての SREBP-1 の可能性を示唆すると考えられ、動脈硬化性疾患の進展予防において有望な知見が得られたと考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

唐澤 直義、高橋 昭光、齋藤 亮、島野 仁，
血中リポタンパク質代謝における転写因子 SREBP-1 の役割，第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日～21 日、札幌

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 昭光 (TAKAHASHI, Akimitsu)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70344893

(2)研究分担者

島野 仁 (SHIMANO, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20251241

鈴木 浩明 (SUZUKI, Hiroaki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40344890

矢藤 繁 (YATOH, Shigeru)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50451703