

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科
氏 名	岡崎啓明
研究テーマ	分子生物学及びゲノム解析の統合的研究戦略による糖尿病性脂質異常症の分子機構の解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

研究背景 メタボリックシンドローム、糖尿病、その最終的な帰結である動脈硬化症の制圧は重要な医療課題である。脂質異常症、血圧異常などの多重な危険因子の集約的治療によるリスク低減は30%~40%程度と限界に達しており、残余リスクの分子機構・遺伝的素因の理解と、その解決を目指した研究・創薬が望まれる。中でも、高中性脂肪(TG)・低 HDL-C 血症は、糖尿病における特徴的な脂質異常症であるだけでなく、心血管イベント抑制のための重要な介入ポイントである。高 TG 血症・低 HDL-C 血症は、動脈硬化惹起性 LDL である small, dense LDL の増加を伴うことが多く、この3つは、合わせて動脈硬化惹起性脂質異常症(atherogenic lipid triad)と言われるが、高 TG・低 HDL-C 血症、small, dense LDL の併発の分子メカニズム、その制御方法は未だ明らかではない。

研究目的 本研究の第一の目的は、申請者が独自に見出した動物モデルを利用して、高TG血症・低 HDL-C 血症の分子メカニズムを解明することである。本研究の第二の目的は、高 TG 血症・低 HDL-C 血症に標的を絞ったゲノム解析から、高 TG 血症発症機序の解明を目指すことである。

研究方法 ① 動脈硬化惹起性高 TG 血症の原因遺伝子として知られる apoA5 の欠損マウスの解析を行う。肝臓 SREBP-1c 活性化による大型 VLDL 産生が高 TG 血症の一因となることを申請者は以前に LDL 受容体欠損マウスを用いて見出した(Okazaki H et al. *J Biol Chem* 2010)。このメカニズムが apoA5 において果たす役割を、SREBP-1c 欠損マウスを用いて解析する。② VLDL はリポ蛋白リパーゼ(LPL)により水解され代謝されるが、その際に HDL が産生されることが知られている。しかし、どの組織の LPL が HDL 産生を促進するか明らかでない。そこで、肝臓特異的 LPL 欠損モデルを作成し、解析する。③ 脂肪細胞の TG リパーゼである ホルモン感受性リパーゼ(HSL)の欠損マウスではインスリン欠乏時の高カイロミクロン(CM)血症が著明に軽減する(予備的知見)。そこで、このマウスの解析から、高 CM 血症における HSL の役割を解析する。④ ゲノム解析から同定した apoC2 低下症による高 TG 血症の発症機序を明らかにする。

研究成果 ① apoA5 欠損マウスを用いた解析から、apoA5 欠損症の高 TG 血症は、巨大 VLDL 産生条件(LXRアゴニスト投与)、加齢、ある種の食餌負荷モデルで増悪すること、これらが SREBP-1c 欠損ではほぼ完全に rescue されることがわかった(図)。一方、オリーブオイル投与での高 TG 血症(CM の蓄積に由来)は SREBP-1c 欠損では全く rescue されなかったことから、SREBP-1c は CM でなく VLDL 特異的に高 TG 血症を制御している可能性が示唆された。

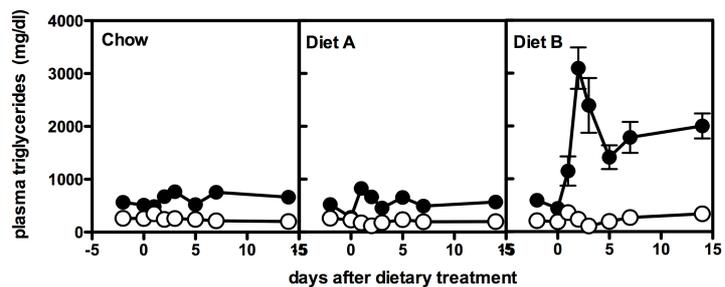


図. apoA5欠損マウスモデルにおける高TG血症は特殊な食餌(DietB)下で誘発され、SREBP-1cの欠損によりほぼ完全にrescueされる。

●: apoA5欠損マウス、○: apoA5; SREBP-1c両欠損マウス

② 肝臓特異的 LPL 欠損マウスでは LXR アゴニスト投与時の HDL 産生が起きなかったことから、少なくとも LXR アゴニスト投与による HDL 産生は肝臓 LPL 依存的であること、肝臓 LPL の制御が HDL 産生を調節していることが示唆された。③ HSL 欠損マウスではオリーブオイル投与での高 TG 血症が著明に改善していたこと、LPL の阻害条件(Triton WR1339 投与)下でもこの減少が認められたことから、HSL は小腸のカイロミクロン合成を低下させている可能性が示唆された。④ 高カイロミクロン血症(TG > 1,000 mg/dl)の外來症例、特に apoC2 の低下を来す症例を対象としたゲノム解析から、未知の原因遺伝子探索と併せ、申請者らが見出した apoC2 低下症の普遍性についても検討を進めている。以上、apoA5、SREBP-1c 阻害、肝臓 LPL 活性亢進、HSL 阻害、apoC2 は、動脈硬化惹起性脂質異常症の新たな創薬起点となる可能性が示唆された。

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科
氏 名	岡崎啓明
研究テーマ	分子生物学及びゲノム解析の統合的研究戦略による糖尿病性脂質異常症の分子機構の解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

研究背景 全世界的に、メタボリックシンドロームの増加、糖尿病人口の増加と、その最終的な帰結である動脈硬化症の増加は、患者個人において重大な問題であるだけでなく、医療施策・医療経済的にも重要な課題である。疫学的な調査、大規模介入試験から、脂質異常症、血圧異常などの多重な危険因子があげられ、その集約的な治療によるリスク軽減が現在の標準的治療であるが、現段階の治療法によるリスク低減は3-4割程度と限界に達しており、残余リスクの分子機構と遺伝的素因の理解と、その解決を目指した研究と創薬が望まれる。中でも、高中性脂肪(TG)・低 HDL-C 血症は、糖尿病における特徴的な脂質異常症であるだけでなく、心血管イベント抑制のための重要な介入ポイントである。糖尿病患者の心血管イベントの危険因子のうち、日本人での第1位は高 TG 血症(JDCS 研究; Sone H et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2011)であり、欧米での第2位は低 HDL-C 血症である(UKPDS23; *BMJ* 1998)。また、フィブラート、エイコサペントエン酸(EPA)、ニコチン酸を用いた介入試験からは、高 TG・低 HDL-C 血症を有する群ではこれらの薬剤による治療効果が増大することが知られている(Sacks FM et al. *N Engl J Med* 2010; JELIS 研究; AIM-HIGH サブ解析 AHA abstract 2012)。実際、高 TG 血症・低 HDL-C 血症は、動脈硬化惹起性 LDL である small, dense LDL の増加につながり、この3つは、合わせて動脈硬化惹起性脂質異常症(atherogenic lipid triad)と言われる。しかし、なぜ高 TG・低 HDL-C 血症が同時に惹起されるのか、その分子メカニズムは実は明らかではない。

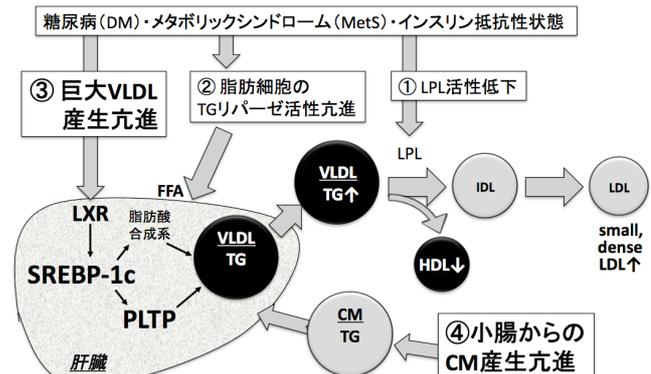


図1: DM/MetSにおける高TG・低HDL-C・高small, dense LDL血症の分子メカニズム

従来、高 TG・低 HDL-C 血症の発症機序として、①脂肪や筋肉におけるリポ蛋白リパーゼ(LPL)抑制による VLDL 異化・HDL 産生の抑制、②脂肪細胞における TG 水解酵素(ホルモン感受性リパーゼ(HSL)など)を介した脂肪分解の促進とそれによる遊離脂肪酸(FFA)の肝臓への供給増加による VLDL 産生増加、の2つのメカニズムが重要であるとされてきた(図1)。しかし、申請者はこれらでは説明できない高 TG・低 HDL-C 血症を示すいくつかの動物モデルを見出した。

研究目的 本研究の第一の目的は、申請者が独自に見出した動物モデルを利用して、高 TG 血症・低 HDL-C 血症の分子メカニズムを解明することである。本研究の第二の目的は、高 TG 血症・低 HDL-C 血症に標的を絞ったゲノム解析から、高 TG 血症発症機序の解明を目指すことである。

研究方法 ① 動脈硬化惹起性高 TG 血症の原因遺伝子として知られる apoA5 の欠損マウスの解析を行う。肝臓 SREBP-1c 活性化による大型 VLDL 産生が高 TG 血症の一因となることを申請者は以前に LDL 受容体欠損マウスを用いて見出した(Okazaki H et al. *J Biol Chem* 2010)。このメカニズムが apoA5 において果たす役割を、SREBP-1c 欠損マウスを用いて解析する。② VLDL はリポ蛋白リパーゼ(LPL)により水解され代謝されるが、その際に HDL が産生されることが知られている。しかし、どの組織の LPL が HDL 産生を促進するか明らかでない。そこで、肝臓特異的 LPL 欠損モデルを作成し、解析する。③ 脂肪細胞の TG リパーゼであるホルモン感受性リパーゼ(HSL)の欠損マウスではインスリン欠乏時の高カイロミクロン(CM)血症が著明に軽減する。そこで、このマウスの解析から、高 CM 血症における HSL の役割を解析する。④ ゲノム解析から同定した apoC2 低下症による高 TG 血症の発症機序を明らかにする。

研究結果・考察

① 動脈硬化惹起性高 TG 血症の新規治療標的:肝臓 SREBP-1c-巨大 VLDL 産生経路の重要性

高 TG 血症は動脈硬化のリスクであるが、実際に高 TG 血症が直接動脈硬化を増悪させるのか、それともその交絡因子(肥満、低 HDL-C 血症など)が重要なのか明らかでなかった。しかし、近年のゲノム研究から同定された apoA5 遺伝子変異は、高 TG 血症の原因となると同時に、動脈硬化のリスクとなることが報告され(Sarwar N et al. *Lancet* 2010; Do R et al. *Nature* 2015)、apoA5 は動脈硬化惹起性高 TG 血症の原因遺伝子として注目されている。ヒトの apoA5 欠損症は重度な IV/V 型高 TG 血症を来すことも知られているが、難治性であり有効な治療法に乏しい。特徴的なこととして、この疾患の浸透率は高くなく、apoA5 欠損症の高 TG 血症発症には、何らかの遺伝的、環境的誘因があると考えられているがその発症機序は明らかでない。

申請者は、これまでに、IV/V 型高 TG 血症における肝臓での巨大 VLDL 産生の重要性、特に、LXR-SREBP-1c-PLTP(リン脂質転送蛋白)経路の役割を明らかにした(Okazaki H et al. *J Biol Chem* 2010)。そこで、apoA5 欠損モデルにおける巨大 VLDL 産生の役割に着目した解析を行い、次の成果を得た:①apoA5 欠損マウスに LXR アゴニスト(T0901317)を投与すると、巨大 VLDL 産生とともに、著しい高 TG 血症を呈する;②apoA5 欠損マウスでは加齢に伴う高インスリン血症と共に、著明な高 TG 血症を呈する;③これらの負荷による apoA5 欠損マウスの高 TG 血症は SREBP-1c 欠損によりほぼ完全に rescue される(apoA5 と SREBP-1c の両欠損マウスの樹立と解析による)。さらに、④apoA5 欠損マウスの高 TG 血症はある種の生理的な食餌負荷モデル(図中の diet B)で増悪すること、これらが SREBP-1c 欠損ではほぼ完全に rescue されることがわかった(図)。

SREBP-1c-巨大 VLDL 経路の制御は、難治性の apoA5 欠損による高 TG 血症の新たな治療標的となりうることが示唆された。apoA5 は動脈硬化のリスク遺伝子でもあることが分かってきていること、apoA5 の遺伝子異常は、特にアジア人において高頻度で認められることから、SREBP-1c 経路の制御は動脈硬化惹起性脂質異常症の新たな治療標的としても期待される。

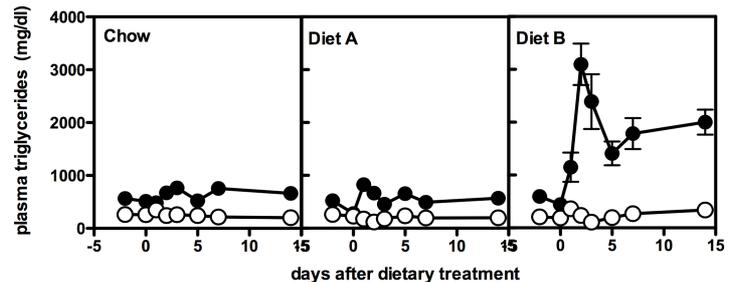


図. apoA5欠損マウスモデルにおける高TG血症は特殊な食餌(DietB)下で誘発され、SREBP-1cの欠損によりほぼ完全にrescueされる。

●: apoA5欠損マウス、○: apoA5; SREBP-1c両欠損マウス

② HDL 産生の新たなメカニズム:肝臓 LPL 経路の重要性

HDLにはいくつかの産生経路がある。小腸や肝臓から apo-AI が産生されるのに伴う HDL の *de novo* 産生経路が有名であるが、それ以外に、TG-rich リポ蛋白が LPL で水解されるのに伴う HDL の産生経路があることも知られている(Tall AR et al. *J Lipid Res* 1985)。糖尿病では、VLDL の増加と HDL-C の低下を同時に認めることから、後者の LPL 依存性 HDL 産生経路が抑制されていると考えられている。

上記①の結果の通り、申請者らによる研究から、糖尿病での VLDL 増加のメカニズムとして、肝臓からの巨大 VLDL 産生の重要性が示唆されている(Adiels M et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; Okazaki et al. *J Biol Chem* 2010)。さらに申請者は、巨大 VLDL 産生が誘導される条件では、肝臓の LPL の発現も誘導される事を見出した(LXR アゴニストによる巨大 VLDL 産生モデルでは肝臓 LPL の発現が亢進;肝臓 LPL の発現は *ob/ob* マウスで 3-4 倍に増加;人の脂肪肝の患者では肝臓 LPL の発現が増加(Westerbacka J et al. *Diabetes* 2007))。

そこで、「糖尿病などで増加する巨大 VLDL は肝臓 LPL で代謝され HDL が産生される」という仮説をたて、これを検証するため、肝臓特異的 LPL 欠損マウス(Alb-Cre;LPL^{f/f})を樹立した。その結果、肝臓 LPL 欠損では、LXR アゴニスト投与に伴って巨大 VLDL は産生されるがそれに伴って HDL が産生されないことを見出した。

LPL は従来、脂肪や筋肉において重要であるとされてきたが、肝臓 LPL は、少なくとも LXR アゴニスト投与における HDL 産生に必須であることが分かった。肝臓 LPL は、糖尿病性低 HDL-C 血症の新規治療標的となる可能性が示唆された。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

③ 糖尿病脂血症 (diabetic lipaemia) : 細胞内 TG リパーゼの新たな役割

糖尿病性脂質異常症のうち極度の TG 増加を認める糖尿病脂血症は、インスリン欠乏による LPL 活性の低下に起因すると考えられてきたが、申請者らはこの仮説では説明できない現象を見出した。すなわち、脂肪細胞における主要な TG 水解酵素であるホルモン感受性リパーゼ (HSL) の欠損マウス (HSLKO) では diabetic lipaemia が軽減、さらに、この現象は血中 LPL 活性では説明できなかった (ストレプトゾトシン 100 μ g/g-体重 (1日おき2回) 腹腔内投与によるインスリン欠乏状態では、オリーブ油 300 μ l 負荷により、野生型マウスでは高カイロミクロン (CM) 血症となるが、HSL 欠損マウスでは顕著に高 TG 血症が改善、さらにこの際の血中 LPL 活性は変化しなかった)。さらに、CM 異化の阻害条件 (Triton WR1339 投与) 下でも、HSLKO における diabetic lipaemia の軽減が認められた。このことは、HSL の欠損は、CM 異化経路非依存的に、おそらく CM 合成経路依存的に、diabetic lipaemia を軽減することを意味しており、小腸の HSL が CM 合成に関与している可能性が示唆された。小腸の HSL は、高カイロミクロン血症の新たな創薬標的となる可能性があり、さらに検討中である。

④ 著明な高 TG 血症を標的としたゲノム解析～新たな疾患概念「apoC2 低下症」の提唱～

申請者は東京大学医学部附属病院の脂質異常症外来を担う 302・311 研究室のハウプトとして、当外来の特異的症例に着目し、疾患のメカニズム解明、新たな治療法創出につながるような新規知見を目指した臨床研究、ゲノム解析研究を展開している。ここでは、著明な高 TG 血症の解析から、新規遺伝子変異が得られた研究成果について報告する。

高カイロミクロン血症 (TG > 1,000 mg/dl) の外来症例、特に apoC2 の低下を来す症例を対象としたゲノム解析から、apoC2 の coding region には異常がないが apoC2 の mRNA 転写が低下しているタイプの高 TG 血症「apoC2 低下症」を見出した (Takase S et al. *J Atheroscler Thromb* 2013)。患者の monocyte-macrophage 初代培養細胞を用いた検討から、apoC2 の mRNA 転写活性が低下していることを確認、そのゲノム解析からは、新規遺伝子変異が同定されてきている。さらに、複数の apoC2 低下症のゲノム解析から、apoC2 低下症の普遍性についても検討を進めている。

今後の課題と展望

以上、① apoA5 制御、SREBP-1c 阻害、② 肝臓 LPL 制御、③ HSL 阻害、④ apoC2 制御は、動脈硬化惹起性脂質異常症、難治性脂質異常症の新たな創薬起点となる可能性が示唆された。オリジナリティの高い本研究成果をさらに発展させることにより、動脈硬化惹起性脂質異常症の新たな治療標的の創出が期待される。具体的にはとくに以下の課題に答える必要がある。

- ① 肝臓巨大 VLDL 産生経路はどのような分子機構により担われているのか? —— 肝臓巨大 VLDL 関連蛋白のプロテオミクス解析 (apoA5・SREBP-1c 両欠損モデルを利用)、これらのマウスモデルを活用した SREBP-1c 標的遺伝子のスクリーニングから、分子機構を明らかにする。
- ② 肝臓 LPL はどのような生理的な条件において HDL 産生を担うのか? 肝臓 LPL により産生される HDL の機能は、動脈硬化促進的かそれとも予防的か? —— これらを肝臓 LPL 欠損において検討することにより、肝臓 LPL の巨大 VLDL 代謝-HDL 産生における生理的役割、その *in vivo* でのコレステロール逆転送系 (RCT)、動脈硬化における重要性を明らかにする。
- ③ CM 合成に重要な役割を果たしているのは、どこの組織の HSL か? —— 組織特異的 HSL 欠損マウスの樹立と解析から、CM 合成に重要なのは脂肪細胞の HSL か、小腸の HSL か、あるいは別の組織の HSL か、を明らかにする。
- ④ 新たに見出された apoC2 低下症の高 TG 血症リスク要因としての役割を明らかにする。その他の著明な高 TG 血症症例、家族歴のある特徴的な脂質異常症症例のゲノム解析から、新たな遺伝子変異の同定を目指す。

独創的な予備的知見に基づく分子生物学的解析、独自の臨床的着眼点に基づくゲノム研究から得られる知見を相互に活用させる統合的アプローチにより、今後も動脈硬化惹起性脂質異常症、糖尿病性脂質異常症の病態解明を行なっていきたい。

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科
氏 名	岡崎啓明

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Ikeda Y, Kumagai H, <u>Okazaki H</u> , Fujishiro M, Motozawa Y, Nomura S, Takeda N, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Komuro I, Yanagisawa M. Monitoring β -arrestin recruitment via β -lactamase enzyme fragment complementation: purification of peptide E as a low-affinity ligand for mammalian bombesin receptors. PLOS ONE 10(6):e0127445, 2015. (査読有り)
2	Nagashima S, Yagyu H, Tozawa RI, Tazoe F, Takahashi M, Kitamine T, Yamamuro D, Sakai K, Sekiya M, <u>Okazaki H</u> , Osuga JI, Honda A, and Ishibashi S. Plasma cholesterol-lowering and transient liver dysfunction in mice lacking squalene synthase in the liver. J Lipid Res 56, 998-1005, 2015. (査読有り)
3	Kumagai H, Ikeda Y, Motozawa Y, Fujishiro M, Okamura T, Fujio K, <u>Okazaki H</u> , Nomura S, Takeda N, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Yamamoto K, Komuro I, Yanagisawa M. Quantitative measurement of GPCR endocytosis via pulse-chase covalent labeling. PLOS ONE 10(5):e0129394, 2015. (査読有り)
4	Sekiya M, Yamamuro D, Ohshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, <u>Okazaki H</u> , Yagyu H, Osuga J, Ishibashi S. Absence of Nceh1 augments 25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages. J Lipid Res 55:2082-92, 2014. (査読有り)
5	Sakai K, Igarashi M, Yamamuro D, Ohshiro T, Nagashima S, Takahashi M, Enkhtuvshin B, Sekiya M, <u>Okazaki H</u> , Osuga J, Ishibashi S. Critical role of neutral cholesteryl ester hydrolase 1 in cholesteryl ester hydrolysis in murine macrophages. J Lipid Res 55:2033-40, 2014. (査読有り)
② <論文 PDF 添付なし>	
1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015年9月26日	<u>岡崎啓明</u> 「症例から診る脂質異常症-症例の提示から分子病態を考える-家族性高コレステロール血症」第16回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会(於:東京)
2	2015年5月22日	<u>岡崎啓明</u> 「糖尿病臨床の中の原因性高脂血症」第58回日本糖尿病学会年次学術集会ランチョンセミナー29(於:下関)
3	2014年11月6日	<u>Hiroaki Okazaki</u> : Searching for the molecular target of atherogenic dyslipidemia. Wakate International Symposium, Discovery of Medical Sciences(於:筑波)
4	2014年7月10日	<u>岡崎啓明</u> 、高梨幹生、野田明里、吉田浩紀、宇仁あさひ、池洲諒、 <u>岡崎佐智子</u> 、高瀬暁、門脇孝(計14名):「アポリポ蛋白A5欠損症の高中性脂肪血症の分子標的:マウスモデルからの新たな知見」第46回日本動脈硬化学会総会学術集会 シンポジウム5:原因性高脂血症研究の新展開(東京)
5	2014年3月29日	<u>Hiroaki Okazaki</u> , <u>Mikio Takanashi</u> , Guosheng Liang: Molecular Regulation of Diabetic Hyperlipidemia. The 4 th International Symposium on Chylomicrons in Disease(於:東京)
6	2014年2月6日	<u>岡崎啓明</u> 「リパーゼとメタボリックシンドローム:新たな分子標的の探索」文部科学省新学術領域研究「転写代謝システム」セミナー(於:群馬)
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	(投稿準備中)	Essential role of SREBP-1c in a mouse model of type V hypertriglyceridemia. (manuscript in preparation)
2	(投稿準備中)	Important role of liver lipoprotein lipase in lipolysis-coupled HDL generation. (manuscript in preparation)
3		
4		