

## 論文の内容の要旨

論文題目 炭水化物摂取による高中性脂肪血症の分子機構の解明

氏名 木村 武史

高中性脂肪血症(HTG)は循環血液中の中性脂肪(TG)に富むリポ蛋白質(TRL)の蓄積から生じる。外因性起源のTGは小腸からカイロミクロン(CM)の形態で分泌され、内因性起源のTGは肝臓から very low density lipoprotein (VLDL)の形態で分泌される。これらのリポ蛋白質やTGは、循環血液中のリポ蛋白質リパーゼ(LPL)によって加水分解され、末梢組織のエネルギー源として遊離脂肪酸(FFA)を遊離する。しかし血漿TGが過剰になると、中等度HTGは心血管疾患リスクを増加させ、重度HTGは急性膵炎の原因となる。ゲノムワイド関連研究によって、HTG関連遺伝子と心血管疾患リスクとの間の関連性も明らかになってきている。しかしHTGの治療方法は限られており、分子機構のさらなる解明が必要である。

重度HTGは1,000 mg/dLを超えるHTGとして定義され、CMのみが増加するI型と、CMとVLDLの両方が増加するV型に分類される(Fredericksonの分類)。I型の高リポ蛋白質血症(HLP)は、典型的には幼児期や小児期早期に発症する珍しい(約50万~100万人に1人)単因子遺伝性疾患である。I型HLPは典型的にはLPLやAPOC2などのLPL経路遺伝子の異常・欠損によって引き起こされる。V型HLPは、より頻度が高い(約600人中1人)。V型HLPは、LPL経路の遺伝子異常・欠損(APOA5など)と環境要因(高炭水化物食、高脂肪食、加齢、肥満、糖尿病など)の組み合わせによって後天的に増悪する。環境要因によるVLDLの蓄積は、V型HLPの増悪因子として示唆されている。しかし、環境要因がVLDLを蓄積させる分子機構は完全には分かっていない。

アポリポ蛋白 A-V(ApoA-V)は主に肝臓から分泌され、血漿中のCMやVLDL、high-density lipoprotein (HDL)に乗って循環するアポリポ蛋白質である。APOA5遺伝子の変異は冠動脈疾患や早発性心筋梗塞のリスクとなることが報告されている。さらに、APOA5遺伝子の欠損や機能が喪失する変異は重度HTGをもたらす。APOA5欠損症は多くの場合、食事要因(高炭水化物食や高脂肪食など)などが加わることによってV型HLPをきたし、後天的に増悪する。しかし、APOA5欠損症でHTGが環境要因によってどのように増悪するのかは明らかではない。APOA5欠損症に伴うHTGの治療方法は限られており、新たな治療開発のために分子機構の解明が必要である。今回は食事要因に着目しHTG増悪の分子機構を解明することを目的とした。

ApoA-Vが血漿TGを制御する機序として、これまでにいくつかの作用様式が考えられてきた。①apoA-VはLPLによる血漿TGクリアランスを促進する。ApoA-VはVLDLやCMなどのTRLに結合する一方で、glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1)に結合する。GPIHBP1は内皮細胞表面でLPL

を繫留する蛋白質である。これにより TRL と GPIHBP1-LPL 複合体の間で架橋を形成し、LPL による TRL の加水分解を促進する。内皮細胞表面上の heparan sulfate proteoglycans (HSPG) もまた GPIHBP1 と同様に apoA-V と LPL の両方に結合することにより、LPL による TRL の加水分解を促進する可能性があるが、特に GPIHBP1 が apoA-V の作用において重要な役割を果たすことが分かっている。②ApoA-V は HSPG や low-density lipoprotein receptor (LDLR) ファミリー (LDLR や low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)) のリガンドとなる。これにより、これらのレセプターによる肝臓と末梢組織におけるエンドサイトーシスを促進し、細胞の TRL レムナント取り込みを促進する。③ApoA-V は細胞内で作用し、肝細胞中の脂肪滴の形成を促進することによって VLDL 合成を抑制する。

このように、apoA-V の作用機序が明らかになってきているが、それではなぜ *APOA5* 欠損症では重度 HTG の発症に環境要因の負荷が必要なのだろうか。この未解決課題を解明するために、本研究では *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスを用いた実験を行った。Chow diet により飼育された *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスの血漿 TG は 400 mg/dL 程度に留まることが知られている。そのため、このマウスモデルを用いれば、①どのような環境要因で重度 HTG が誘発されるか、②その根底にある HTG の分子機構は何か、を明らかにできると考えた。

V 型 HLP における血漿 TG 上昇の分子機構として、我々は以前に転写因子である sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) が重要な役割を果たすことを見出した。核内受容体 Liver X receptor (LXR) は SREBP-1c の転写を促進する転写因子で、LXR アゴニストを野生型マウスに与えると軽度な血漿 TG 上昇が生じ、*Ldlr*<sup>-/-</sup>マウスに与えると、重度 HTG をきたす。そして、この現象は SREBP-1c 依存的である。このメカニズムを①～③として以下に示す。①LXR は SREBP-1c の転写を促進する。②SREBP-1c は標的遺伝子である脂肪酸・TG 合成系遺伝子や肝臓のリン脂質転送蛋白 (PLTP) を介して VLDL を CM サイズ (>80 nm) に大型化する。③血漿中の大型 VLDL は主に LDLR によって肝臓に取り込まれるため、*Ldlr*<sup>-/-</sup>マウスでは血漿中に蓄積する。しかし、これらの知見は *Ldlr*<sup>-/-</sup>マウスに LXR アゴニストを投与するという人工的な系によって得られたものであり、その生理的意義は明らかでなかった。

そこで、この知見に基づいて「apoA-V 欠損の場合にも、LXR アゴニストで SREBP-1c の転写を促進させれば V 型 HLP が生じる」という仮説を立てた。この仮説に基づいて、我々の研究室では以下の (A)～(C) を明らかにしてきた。(A) LXR は SREBP-1c の転写を促進して大型 VLDL を産生させ、*Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスでも V 型 HLP を発症させる。(B) 大型 VLDL の効率的なクリアランスには apoA-V が必要である。(C) *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスにおける LXR アゴニストによる V 型 HLP は SREBP-1c 依存的である。

それでは、このような SREBP-1c 依存的な HTG の発現・制御は生理的にも重要な役割を果たすのだろうか。これを明らかにするために、今回は特に炭水化物に着目し、野生型マウス、*Apoa5*<sup>-/-</sup>マウス、*Apoa5*<sup>-/-</sup>;*Srebp-1c*<sup>-/-</sup>マウスを用いて①どのような食事要因(炭水化物

の種類などが *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスで HTG を誘発させるのか、② *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスにおける炭水化物による V 型 HLP の分子機構は何か、SREBP-1c はどの程度重要な役割を果たすのか、を明らかにすることを目的に研究を行った。

本研究ではまず炭水化物の種類の違いによって、apoA-V 欠損における HTG に与える影響が異なるか検討した。その結果、apoA-V 欠損での HTG はフルクトース依存的で、グルコースでは HTG とならないことが分かった。従来は「高炭水化物食は肝臓での脂肪合成を促進し脂肪肝をきたすとともに、VLDL 合成を促進し、VLDL が血中に蓄積する」と考えられていた。しかし、高グルコース食も高フルクトース食と同じように脂肪肝をきたすものの、HTG をきたすのは高フルクトース食のみであった。このことはフルクトース依存的な VLDL の調節機構が存在することを示唆している。本研究では、この高フルクトース食による大型 VLDL 産生には SREBP-1c が必須であることを明らかにした。すなわち、フルクトースは SREBP-1c の遺伝子発現を亢進させ、SREBP-1c は大型 VLDL の産生を介して *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスに VLDL を蓄積させることが、今回の結果から示唆された。

さらに、SREBP-1c がどのような標的遺伝子を介して大型 VLDL の産生を促進するのか明らかにするため遺伝子発現解析を行った。SREBP-1c は、第一に脂肪酸・TG 合成系遺伝子を活性化させることにより VLDL 内部の TG を増加させ、第二に VLDL 表面にリン脂質を供給する PLTP を活性化させることにより VLDL サイズを増大させると考えられている。しかし、本研究の time course と dose response の結果からは、これらの遺伝子群の発現変化だけでは SREBP-1c による VLDL 大型化が説明できない可能性が示唆された。この両方の実験において SREBP-1c 依存的にフルクトースにより発現増加した遺伝子は SCD-1、FAS、Elovl6 のみであった。しかし、これらの遺伝子は SREBP-1c 欠損下でも高フルクトース食により発現が増加しており、SREBP-1c 欠損下での HTG の完全なレスキューを部分的には説明できても、完全に説明することは困難であると考えられた。これらの他に大型 VLDL 産生を制御する SREBP-1c の下流遺伝子が存在する可能性が考えられるため、今後は DNA マイクロアレイ解析などを行うことにより、SREBP-1c による VLDL 大型化の責任分子機構を明らかにしたい。

ApoA-V 欠損では脂肪負荷でも HTG が増悪することが *APOA5* 欠損症の症例報告から示唆されている。今回はオリーブオイルの単回投与モデルを用いることにより、CM 産生亢進が *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスに与える影響を評価した。その結果、オリーブオイルによる CM 産生増加も著しい血漿 TG 増加をきたすことが明らかとなった。このことは apoA-V が CM クリアランスに必要であることを示唆している。また、*Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスと *Apoa5*<sup>-/-</sup>;*Srebp-1c*<sup>-/-</sup>マウスにオリーブオイルを与えると両遺伝子型とも同様の血漿 TG 増加が見られたことから、SREBP-1c は、CM 代謝には影響を与えないことが示唆された。

ApoA-V は LPL と TRL との間の相互作用を促進することにより TRL の LPL によるクリアランスを促進していると考えられている。LPL は血管内皮細胞の血管内腔側の表面に繫留されており、apoA-V がなければ TRL は LPL にアクセスできない。一方、ヘパリンは

この血管内皮細胞表面の LPL を血中に遊離させることが知られている。もしヘパリンによって apoA-V 欠損の高 TRL 血症が改善するならば、apoA-V は遊離した LPL の作用には必要ではなく、血管内皮細胞表面の LPL にのみ必要であることがわかる。*Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスに蓄積した CM はヘパリンの静脈注射により除去された。このことから、apoA-V は TRL と血管内皮細胞表面の LPL との間の相互作用を担っていること、この働きが apoA-V 欠損によって失われることが示唆された。高フルクトース食を与えた *Apoa5*<sup>-/-</sup>マウスでは大型 VLDL が蓄積する一方、Chow diet や高グルコース食の投与では VLDL は大型化しなかったことから、apoA-V は大型 VLDL のクリアランスには必須だが、小型 VLDL のクリアランスには必須でないことが考えられる。この仮説の直接的な証明も今後の重要な検討課題と考えている。

本研究は apoA-V と SREBP-1c の相互作用を明らかにし、*APOA5* 欠損症で炭水化物の摂取により HTG が生じる分子機構を明らかにした。*APOA5* は心血管疾患の早期発症のリスク遺伝子としてゲノムワイドスクランで *LDLR* の次にランク付けされている。炭水化物摂取と SREBP-1c に関する研究は、HTG の分子機構の解明に役立ち、SREBP-1c は HTG や HTG 関連合併症(膵炎、アテローム性動脈硬化症など)の良い治療標的となり得ると考えられる。