

論文の内容の要旨

1 目的

低比重リポ蛋白(low-density lipoprotein, LDL)コレステロール(LDL-C)濃度増加は、動脈硬化性疾患発症の独立した危険因子であることが知られている。LDLは、肝臓から血中に分泌された超低比重リポ蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)がリポ蛋白リパーゼ(lipoprotein lipase, LPL)等のリパーゼや、コレステリルエステル転送蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)の作用を介して代謝されることにより生成される。LDLは主に肝臓におけるLDL受容体(LDLR)を介した肝実質細胞への取り込みによって血中より代謝される。従って肝臓のLDLR発現は血清LDL-C濃度調節の中心的な役割を担う。

LDLRの発現量はその合成と異化のバランスによって決定される。LDLRの合成は主に細胞内コレステロール量の減少に伴い活性化するsterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2)によって制御されている。LDLR合成の制御だけでなく、異化の制御の解明を目的とした研究も進んできている。近年、LDLRの異化を促進する2つの分子Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)、Inducible Degradation of the LDLR (Idol)が注目を集めている。PCSK9はLDLRと同様にSREBP2によって発現が制御されており、主に肝臓と小腸で生成され、循環血中に分泌される。分泌されたPCSK9は細胞表面のLDLRに結合し、共に細胞内に取り込まれることで、LDLR異化促進作用を発揮する。一方では、もう一つのLDLR異化促進因子であるIdolは、LDLRに対してE3 ligase活性を有し、LDLRをユビキチン化することで異化を促進する。マウスにおいて、PCSK9およびIdolの強制発現はLDLR分解促進による著明な高LDL-C血症をもたらすことが分かっているが、両者の関連については明らかでない。また、マウスはヒトと異なりCETP活性を有していないため、そのコレステロール代謝はヒトと大きく異なる。これまで肝臓Idol過剰発現のコレステロール代謝についての報告はマウス以外の動物では行われておらず、CETP活性を有する動物での肝臓Idol過剰発現の影響は明らかではない。

本研究の目的は、CETP活性のないマウス及びCETP活性を有するハムスターを使って肝臓におけるIdol過剰発現がリポ蛋白およびPCSK9の代謝に与える影響を検討することである。

2 方法

(1) 野生型IdolおよびE3 ligase活性が不活であるC387A変異型Idol発現

アデノウィルスを作成、C57BL/6Jマウスに経静脈投与し、血清脂質濃度の変化と血中PCSK9濃度を観察した。

(2) 野生型Idolを過剰発現したC57BL/6Jマウスにおける、肝臓PCSK9発現、血中LDL代謝および血中PCSK9代謝を検討した。

(3) 野生型Idolを過剰発現したLDLRノックアウトマウスにおける、血清脂質濃度の変化と血中PCSK9濃度、肝臓PCSK9発現を検討した。

(4) 野生型Idol過剰発現がPCSK9およびLDLRプロモーター活性に与える影響を、HepG2細胞を用いてin vitroで検討した。

(5) ハムスターに野生型 Idol 発現アデノウィルスを経静脈投し、血清脂質濃度、LDL 代謝を検討した。

3 成績

(1) C57BL/6J マウスにおける野生型 Idol 過剰発現では、肝臓での Idol mRNA の過剰発現を認め、LDLR タンパクの発現低下を認めた。野生型 Idol 過剰発現により、血中 VLDL、LDL コレステロール、PCSK9 濃度の増加を認めた。C387A 変異型 Idol 過剰発現では、血中 VLDL、LDL コレステロールの変化は認めなかった。

(2) 野生型 Idol 過剰発現マウスでは、初期には肝臓 PCSK9 発現の変化を認めなかったが、後期には増加を認めた。野生型 Idol 過剰発現マウスにおいて、血中 LDL および PCSK9 代謝に遅延を認めた。

(3) 野生型 Idol を過剰発現した LDLR ノックアウトマウスでは対照と比較して、血清脂質濃度、血中 PCSK9 濃度、肝臓 PCSK9 発現に差を認めなかった。

(4) 野生型 Idol 過剰発現 HepG2 では、コレステロール除去培地で、コレステロール添加による PCSK9/LDLR プロモーター活性抑制効果は対照と比較して差を認めなかったが、LDL 添加によるプロモーター活性抑制効果は認められなかった。さらに PCSK9/LDLR プロモーターの SREBP2 の作用部位であるステロール応答性エレメント (sterol regulatory element, SRE) に変異を導入したところ、コレステロールおよび LDL の添加、および Idol 過剰発現の効果は消失した。

(5) 野生型 Idol を過剰発現したハムスターでは、血中 VLDL、LDL コレステロール濃度、PCSK9 濃度の増加を認め、血中 LDL 代謝遅延を認めた。

3 考察

本研究では、マウスにおいて肝臓特異的 Idol 過剰発現が、肝臓 LDLR の発現を低下させ血中 LDL 代謝遅延を招来し血中 LDL が増加することを示した。さらに、肝臓特異的 Idol 過剰発現は早期では LDLR 発現低下による血中 PCSK9 取り込み低下を介して PCSK9 代謝を遅延させ、後期では SREBP2 活性化による転写活性化を介して血中 PCSK9 濃度を増加させることを明らかにした。また、これらの LDL および PCSK9 に対する影響は LDLR 依存性であった。さらに、CETP を有するハムスターにおいてもマウス同様の結果を得た。

本研究は、肝臓 Idol 過剰発現が血中 PCSK9 濃度に与える影響をはじめて明らかにした。血中 PCSK9 の増加がさらに LDLR の異化を促進し、血中の LDL 増加を増悪させる可能性を示した点、CETP 活性を有するハムスターでも肝臓 Idol 過剰発現がマウス同様に脂質代謝、PCSK9 発現に影響することを明らかにした点で、本研究は意義深いと考える。ここで得られた知見は、新たな肝臓 LDLR 発現増加を介した血中 LDL 低下療法の創出に道を開くものであり、今後この領域の研究がますます発展することが期待される。

4 結論

本研究は、Idol が肝臓 LDLR 発現低下を介して血中 LDL 及び PCSK9 を増加させることを明らかにした。