

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目

核内受容体 Liver X-receptor (LXR)により誘発される高中性脂肪血症への脂質代謝制御因子 Angiopoietin-like 3 (Angptl3)関与に関する研究

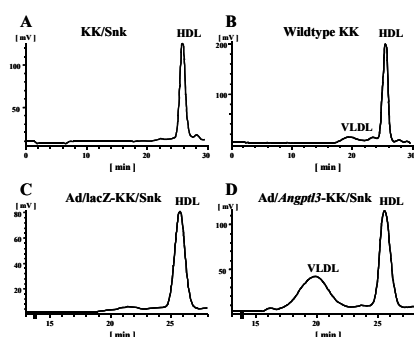
氏 名 稲 葉 寿 守

KK マウスは、高血糖、高インスリン血症および高脂血症を発症するインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)モデル動物である。三共株式会社にて自家繁殖を続けていた KK マウス (KK/Snk マウス)は、他の KK マウスに比べ血中脂質レベルが顕著に低下していた。この KK/Snk マウスの解析から、Angiopoietin-like 3 (Angptl3)遺伝子の発現低下が本マウスの血中脂質レベルの低下に直接関与していることが報告されている。

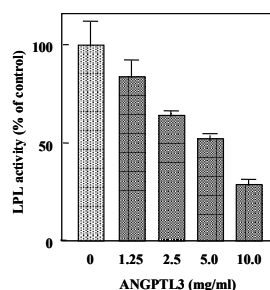
マウスあるいはヒト Angptl3 遺伝子を KK/Snk マウスに過剰発現させると、血中の中性脂肪(TG)値が 1g/dL 以上にまで上昇した。このとき、血中のリポ蛋白プロファイルを解析してみると、TG 含有量に富む超低比重リポ蛋白(VLDL)の画分が著しく増加していた(図 1)。この TG 上昇の増加の原因には以下の二つの理由が推定された。すなわち、肝臓からの VLDL-TG の分泌が亢進している可能性と、血中からの VLDL-TG の消失速度が遅くなっている可能性である。これらの可能性を検証するために、まず肝臓からの VLDL-TG 分泌速度を野生型 KK マウスと KK/Snk マウスで比較してみた。マウスの尾静脈より Triton WR1339 を投与したのち、VLDL-TG の分泌速度を測定してみたが両者に違いは認められなかった。以上の結果より、Angptl3 は肝臓での VLDL の合成および分泌には関与していないことがわかった。そこで、つぎに血中からの VLDL-TG 消失速度におよぼす Angptl3 の影響を調べて

みた。マウスの尾静脈より<sup>3</sup>H 標識 TG を含む VLDL を投与してその消失速度を測定したところ、KK/Snk マウスにおいては野生型 KK マウスに比べて VLDL の消失速度が著しく亢進していた。また、VLDL 粒子自体の血中からのクリアランスもわずかながら KK/Snk マウスで亢進していた。すなわち、KK/Snk マウスにおける Angptl3 の欠損は、VLDL の血中からの消失を亢進させることにより、血中の TG を低下させていたのである。血中の VLDL は、毛細血管の内皮細胞表面に存在するリポ蛋白リパーゼ(LPL)によって TG が加水分解を受けて異化される。そこで、Angptl3 が LPL に対して阻害活性を有するかについて調べてみた。図 2 に示す様に、Angptl3 蛋白は濃度依存的に LPL 活性を阻害していた。

以上の結果から、Angptl3 蛋白は LPL 活性を阻害することにより血中での VLDL の異化を抑制し、血中脂質、特に TG を上昇させていることを明らかにすることができた。



**Figure 1. Lipoprotein profiles by HPLC.**  
Lipoprotein profiles obtained by HPLC of KK/Snk mice (A), wild-type KK mice (B), KK/Snk mice injected with Ad/lacZ (C), and KK/Snk mice injected with Ad/Angptl3 (D). Plasma samples were collected 5h after fasting.

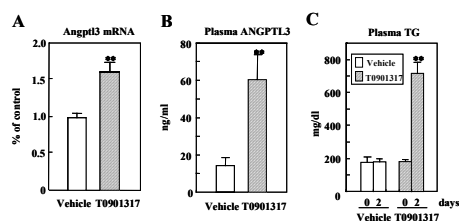


**Figure 2. Effects of ANGPTL3 on LPL enzyme activity.**  
LPL activity was determined in the presence of recombinant ANGPTL3 at the indicated doses. A post-heparin medium of rat adipocytes was used as the enzyme source. Fetal bovine serum was used as a cofactor for LPL activation. The values represent means  $\pm$  S.E. expressed as a percentage of the control activity determined in the absence of recombinant ANGPTL3.

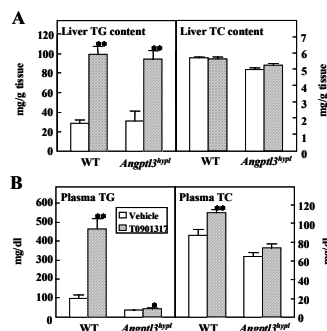
Liver X receptor (LXR)は、脂質の代謝に関与している ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1)、fatty acid synthase (FAS)、sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)などのさまざまな遺伝子の発現を制御している。LXR は、これらの標的遺伝子のプロモーター領域に存在する DR4 element と呼ばれる LXR 結合配列を通して発現を制御していると考えられている。齧歯類に合成 LXR ligand T0901317 を投与すると、血中 TG の上昇および肝臓における TG 蓄積を引き起こすことが報告されている。この肝臓における TG 蓄積は、LXR 標的遺伝子である SREBP-1c および FAS の発現増加によって説明することができる。SREBP-1c 活性型遺伝子を過剰発現したマウスでは、肝臓における TG 蓄積が認められるが、血中 TG レベルは正常である。したがって、高 TG 血症への他の因子の関与が示唆されるが、発症機序は不明のままである。そこで、本研究では、LXR を介して引き起こされる高 TG 血症の機序解析を目的としている。

ヒト Angptl3 遺伝子のプロモーター領域には、DR4 element と呼ばれる LXR 結合配列が存在している。T0901317 は、ヒト hepatoma 細胞株(HepG2)において、Angptl3 遺伝子のプロモーターを活性化して同蛋白の培養液中への分泌を増加させた。マウス(C57BL/6J)に T0901317 を投与すると、肝臓への TG 蓄積と高 TG 血症が誘発された(図 3)。この時、肝臓での Angptl3 mRNA 発現と血中 Angptl3 蛋白レベルも顕著に増加していた。しかしながら、

Angptl3 蛋白が欠損している *hypl* 変異マウス (*C57BL/6J-Angptl3<sup>hypl</sup>*)では、図 4 に示す様に T0901317 を投与しても血中 TG レベルは変化しない(肝臓への TG 蓄積は同等に起こる)。LXR により制御され、肝臓の脂肪酸合成酵素の発現制御に関与する SREBP-1c や FAS の mRNA 発現を調べてみると、いずれの遺伝子も LXR ligand を投与した両方のマウスで顕著に増加しており、肝臓への TG 蓄積の主な要因であると考えられる。LXR ligand による血中 TG の上昇は、LPL 活性を抑制している Angptl3 蛋白の増加の結果であると推察される。以上のことから、LXR ligand による血中 TG の上昇に、LXR により制御される Angptl3 遺伝子が深く関与していることを明らかにすることができた。



**Figure 3. Treatment with T0901317 increased hepatic Angptl3 mRNA, plasma ANGPTL3 protein and plasma triglyceride levels in C57BL/6J.** Mice were orally administered either vehicle (open bar) or 10 mg/kg/day of T0901317 for 2 days (n=5 per group). At day 2, mice were sacrificed. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. \*\*, p<0.01, compared with the control group using Dunnett's multiple comparison test (plasma TG) and Student's t test (Angptl3 mRNA and plasma ANGPTL3).



**Figure 4. Mutation of Angptl3 abolished T0901317-induced plasma TG elevation but increased hepatic triglyceride content.** C57BL/6J (WT) and C57BL/6J-*Angptl3<sup>hypl</sup>* (*Angptl3<sup>hypl</sup>*) mice were orally administered either vehicle (open bar) or 10 mg/kg/day of T0901317 for 2 days (n=5 per group). Each value represents the mean  $\pm$  S.E. \*\*, p<0.01, compared with the control group using

本研究において、KK/Snk マウスにアデノウイルス発現系を用いて ANGPTL3 を過剰産生させた結果、血中 TG レベルを上昇させること、さらに Angptl3 の血中 TG に対する作用機序が、血中 TG を水解する酵素である LPL の活性抑制であることを明らかにした。一方、Angptl3 が LXR の標的遺伝子であること、および LXR ligand が肝臓における Angptl3 mRNA 発現と ANGPTL3 産生を促進することを明らかにした。Angptl3 欠損マウスでは、LXR ligand は血中 TG レベルには影響を与えなかった。LXR ligand により引き起こされる高 TG 血症は、血中 TG 分解を阻害する ANGPTL3 の肝臓における産生促進による血中 ANGPTL3 の増加に起因することを明らかにした。Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、エストロゲン受容体(ER)などの核内受容体は、創薬の標的になり各種疾患の治療薬として臨床において使用されている。強力な薬効があり、幅広い適用症が期待できる反面、副作用の問題を抱えている。LXR ligand は、アテローム性動脈硬化症モデルマウス(LDL 受容体欠損マウスおよび apoE 欠損マウス)において、動脈硬化病変形成を顕著に抑制することが報告されている。さらに最近の研究から、抗炎症作用があることが明らかになっている。従って、LXR ligand はアテローム性動脈硬化症治療薬として期待されているが、齧歯類で認められている様に高 TG 血症を惹起する危惧があり、創薬開発の障害となっている。本研究において、LXR ligand により引き起こされる高 TG 血症の原因が肝臓特異的な標的遺伝子である Angptl3 であることを明らかにした。LXR ligand により引き起こされる肝臓における TG 蓄積は、脂肪酸合成酵素に関与する SREBP-1c, FAS などの遺伝

子転写亢進に起因する。従って、本研究において LXR ligand による高 TG 血症の原因因子と肝臓における TG 蓄積の原因因子が異なることを明らかにした。本研究から肝実質細胞ではなく、マクロファージおよび小腸上皮を選択的に標的にした組織選択的 LXR ligand、あるいは Angptl3, SREBP-1c, FAS ではなく ABCA1 のみを選択的に制御する標的遺伝子選択的 LXR ligand の開発が、アテローム性動脈硬化症および高コレステロール血症の治療に有効であることが明らかになった。