

日本財団補助金による

1997年度日中医学協力事業助成報告書

－在留中国人研究者研究助成－

1998年2月27日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 梁一強
研究機関 帝京大学 内科 研究指導者 寺本民生 職名 教授
所在地 〒173-8605 板橋区加賀 2-11-1 電話 03-3964-1211 内線 1969

II. 過去の研究歴
1993年7月～1998年現在 帝京大学内科で動脈硬化について研究

III. 過去の研究実績
Clinica Chimica Acta. 247:159-166, 1996
Characterization of low-density-lipoprotein in apolipoprotein E deficiency
in a patient without coronary atherosclerosis.

IV. 本年度の研究業績
(1) 学会、研究会等における口頭発表(学会名・内容)
DDW-Japan 1997 脂肝肝炎における肝MTP活性の意義 オースター (4/8)
第29回 日本動脈硬化学会総会 肝臓におけるMTP活性の調整因子 (6/5)
XIth International symposium on Atherosclerosis PARIS
Regulatory factor of MTP activity in liver (10/6)
(2) 学会誌等に発表した論文 無・(有) (雑誌名・論文名)

J. B. Vol. 123 No.1
Defect in an intrahepatic degradation of apolipoprotein B in humans
— an animal model of hypobetalipoproteinemia —

V. 今後の研究計画及び希望
今後とも動脈硬化症とメタボリックシンドロームについて研究が続き、特に
特に血管平滑筋細胞の増殖に關する因子を重点を絞って研究したいと
考えている。

研究報告

脂肪肝の発症とMTPの役割

帝京大学内科 梁一強

スunksはトガリネズミ科に属し、体重は約70gの小動物で、24時間の絶食により容易に脂肪肝が誘発され、再摂食により速やかに脂肪肝が改善することがわかった。この脂肪肝発症メカニズムを検討していく過程で報告してきたことをまとめると1) 血清脂質は極めて低く、血清アポ蛋白Bがほとんど検出されない。2) 絶食により遊離脂肪酸は有意に上昇した。3) 肝臓におけるコレステロールのエステル化酵素であるACATは著明な低活性を示した。

一般的に脂肪肝の原因として、1) 肝臓におけるトリグリセリド (TG) の合成過剰、2) 肝臓からのTG分泌の低下が考えられるが、スunksにおける脂肪肝について以上の結果を考慮すると肝臓からのTG分泌低下すなわち超低比重リポ蛋白 (VLDL) の形成不全により肝臓からTGを放出できないことが主な原因と考えられる。肝臓で合成されたアポ蛋白BはVLDLの形成に利用されないと一部が細胞内異化を受けていることが報告されている。従って、アポ蛋白Bの細胞内異化が亢進していると血清アポ蛋白Bは低くなり、脂肪肝が発症することが予測される。この点について検討したところスunksにおいてアポ蛋白Bの細胞内異化は亢進していないことが確認された。一方、VLDLの分泌にコレステロールエステル (CE) の合成が関与していることも報告されており、スunksでもACAT活性が低いいためCEの合成が低く、VLDLの分泌が低下している可能性も考えられる。また、VLDLの形成にはMicrosomal triglyceride transfer protein(MTP)が重要な役割を演じていることも報告されている。

そこで、本研究ではスunksを飢餓状態にした際発症する脂肪肝のメカニズムを解明するため、VLDLの統合にキー蛋白と考えられるMTP活性、そしてACAT活性との関連について検討した。

【方法】雄性スunksと雄性Wistar系ラットを用いて、対照群、絶食群、再摂食群の3群について検討した。従来の方法で肝臓並びに小腸粘膜よりMicrosome分画を分離し、MTP活性はWetterauらの方法にてliposome間の ^{14}C -TGと ^3H -PCの転送率から計算した。また、肝細胞実験では体重160~180gの雄性Wistar系ラットから肝細胞を分離し、3日間培養した後、実験に供した。HMG-CoA還元酵素阻害薬 (CS514) は1ng/ml、10ng/mlの濃度で添加して1時間培養し、MTP活性に及ぼす影響について検討した。また、CEの合成阻害薬としてACAT阻害薬58-035 (Sandoz) を0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加して20時間培養した。また、細胞内CEを増加させる目的でLDLの添加効果も検討した。ヒトLDLは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加して14時間培養した。

【結果】図1に示したようにラットでは添加microsome蛋白を25、50、75 μg とするとMTP活性は直線的に上昇したが、スunksでは75 μg までは転送活性が観察できず、MTP活性が極めて低い可能性が考えられた。そこで、図2に示したようにスunksで

microsome蛋白を200 μ gまで増やして測定したところ初めて直線的な増加を示した。その活性はmicrosome蛋白あたりで計算すると、ラットの約30%と計算された。unksでは24時間の絶食で脂肪肝が起こることから次に、絶食のMTP活性に及ぼす影響についてラットと比較して観察した。図3に示すようにラットでは対照、絶食、再摂食の3群間でMTP活性の変動が認められなかった。一方、unksでは、絶食による影響は認められなかったが再摂食によりMTPの活性が有意に上昇しラットの約80%となっていることが判明した。

unks肝におけるMTP活性の著明な低下が肝臓に特異的であるのか検討する目的で小腸粘膜についても検討してみた。表1に示したようにunks小腸のMTP活性はラットとほぼ同等であり、肝臓において特異的に低活性を示すものと考えられた。

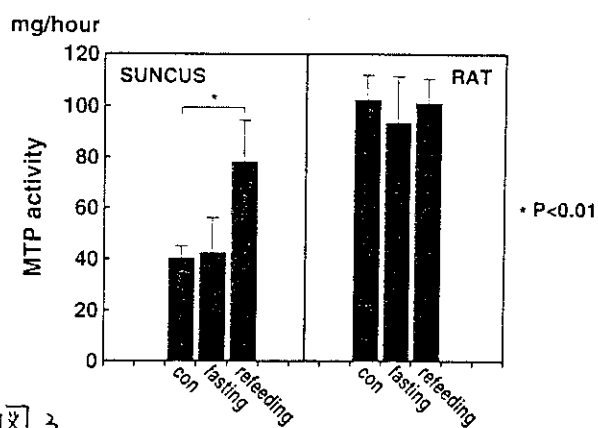
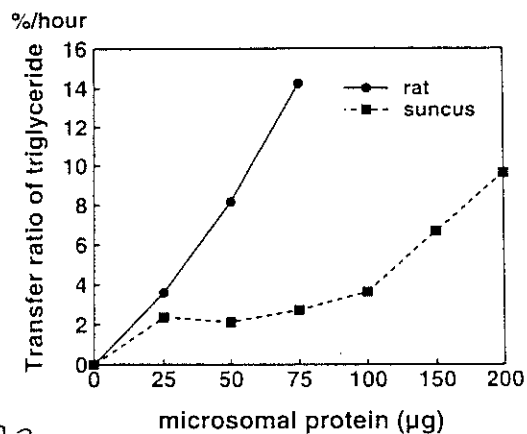
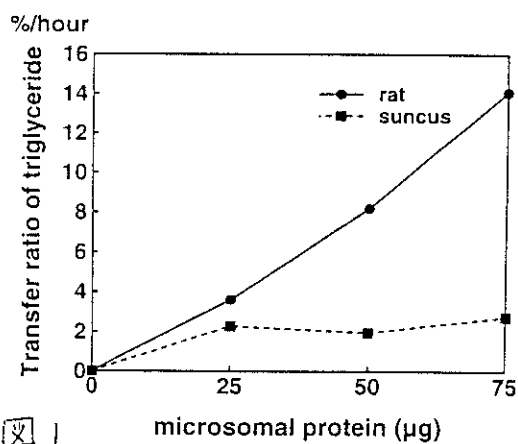
unksにおけるMTP活性の低下がコレステロールエステルの合成酵素であるACAT活性と関係がないか検討する目的で、ラットの初代培養肝細胞を用いてMTP活性の調節因子について検討した。

MTP活性に及ぼすコレステロールの影響を観察するためにHMG-CoA還元酵素阻害薬を用いて検討した。HMG-CoA還元酵素阻害薬の添加により、ラット初代培養肝細胞のMTP活性はコントロールの約50%と有意に低下した。^(図6)次にACAT阻害薬の影響を検討した。図4に示すようにACAT阻害薬の添加により、細胞内のCEは著明に低下しており、それと同時にMTP活性はコントロールの約70%と有意な低下が認められた。この二つのデータは、肝内CEの含量がMTP活性を制御している可能性を示唆するものと考えられる。そこでCEの濃度上昇を目的としてLDL添加の影響を観察した。図5に示すようにラット初代培養肝細胞にLDLを添加するとMTP活性は濃度依存的に有意に上昇した。

【考察】

以上の結果をまとめるとunksでは絶食により著明に血清遊離脂肪酸が上昇し、脂肪酸プールの増大があり、相対的に肝臓でのTGの生成量は増加する可能性が考えられる。一方、unksではMTP活性が著明に低下していることから、VLDLの統合障害が常に存在するものと考えられる。従って、合成されたトリグリセリドを速やかに分泌する能力が十分でない可能性が考えられる。また、unksにおいて再摂食により脂肪肝が急速に改善することは、MTP活性の上昇により急速にVLDLとして分泌されるためと考えられた。つまりMTP活性が40%未満では肝内脂質輸送に障害を生ずるが、70%以上であれば十分な輸送効果があると考えられた。

また、ラットの肝細胞実験から、細胞内コレステロールエステルの合成がMTP活性に重要な役割を演じている可能性が示唆された。unksの肝臓では特異的にACAT,MTP両活性が低下していることを考慮すると、肝臓における特異的なMTP活性の低下はコレステロールエステルの低下に起因する可能性が考えられる。また、MTP活性の制御にはACAT活性の制御が重要である可能性が示唆された。



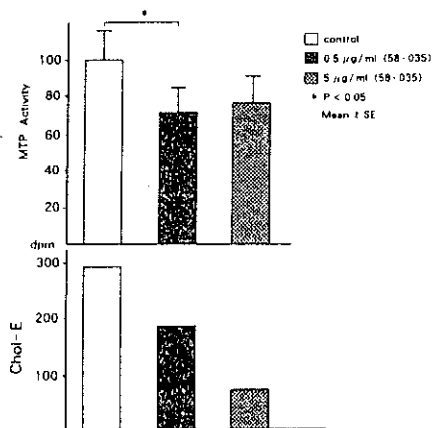
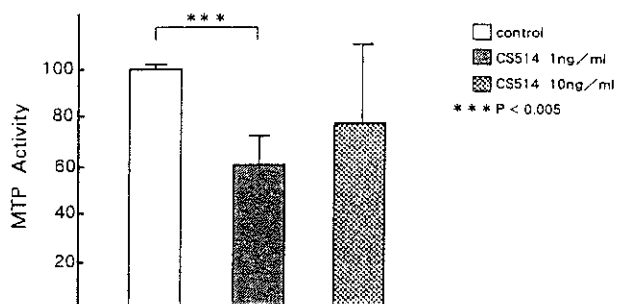
MTP activity of liver and intestine

liver	rat	0.923 ± 0.25
	suncus	$0.370 \pm 0.10^{***}$
intestine	rat	1.143 ± 0.36
	suncus	1.422 ± 0.79

(nmole/mg/hour)

*** $P < 0.005$

表 1



Effect of LDL on MTP activity in rat hepatocytes

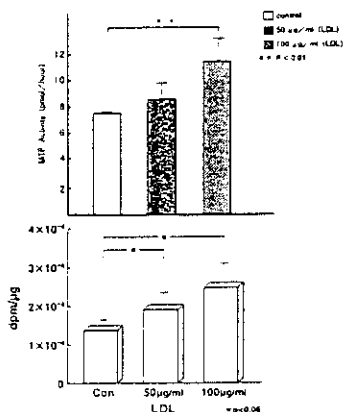


图 4

图 5

105 肝臓におけるMicrosomal Triglyceride Transfer Protein (MTP)の調節因子

帝京大学第一内科 梁一強、武藤朝美、藤田美峰子、金子和子
嶋津伸子、木下誠、山中正己、寺本民生

【目的】脂肪肝発動物であるスックスにおける肝内脂質輸送機構の検討よりVLDLの統合に関与するものとしてトリグリセリド(TG)、コレステロールエステル(CE)の合成とMTP活性が重要であることを報告してきた。特に、MTP活性が脂質分泌のキーポイントと考えられたので、本研究ではラットの肝細胞を用いてMTP活性の調節因子としてTGとCEの合成に焦点をあてて検討したので報告する。

【方法】雄性Wistar系ラットの初代培養遊離肝細胞を実験に供した。脂肪酸添加実験ではmediumにoleic acidを0.5mMと1mMの濃度で添加し、2時間培養した。CEの合成阻害薬としてACAT阻害薬(58-035)を0.5mg/mlと5mg/mlの濃度で添加して20時間培養した。HMG-CoA還元酵素阻害薬(CS514)は1ng/mlと10ng/mlの濃度で添加して1時間培養した。MTP活性はWetterauらの方法にてliposome間の ^3H -TGと ^3H -PCの転送率におよぼすmicrosomal分画の添加量から計算した。

【成績】ラット培養肝細胞のMTP活性は 8.98 ± 0.81 pmoles/hと同時に測定した肝組織の 6.99 pmoles/hより高値を示した。oleic acidの添加によりMTP活性は 6.79 ± 0.57 (0.5mM)と 6.62 ± 0.70 (1mM)と有意な低下が認められた($p < 0.01$)。このとき細胞内のTGは有意に増加していたがmedium中のTGには有意な変化は認められなかった。ACAT阻害薬やHMG-CoA還元酵素阻害薬の添加でもMTP活性はそれぞれコントロールの83%、85%と有意な低下を示したが濃度依存性はなかった。

【結論】ラット培養肝細胞のMTP活性はその組織より高値を示した。これは脂肪酸無添加mediumを用いたためと考えられる。oleic acidの添加により肝組織と同等の活性を示したのはこのためと考えられる。一方、58-035やCS514の添加によりCEの合成を抑制することはMTP活性の抑制効果をもたらすものと考えられた。

106 肝臓でのコレステロール蓄積による中性脂肪合成抑制の機序

国立健康・栄養研究所臨床栄養部、東北大遺伝子実験施設*
池本真二、角田伸代、山本徳男*、江崎 浩

【目的】コレステロール代謝に関係するLDLレセプター、HMG-CoA還元酵素、HMG-CoA合成酵素の遺伝子発現はsterol regulatory element 1 (SRE1)を介してコレステロールにより抑制されることが知られている。また、SRE1に結合するSRE binding proteins 1 (SREBP1)とADD1が同一であることから、細胞内コレステロール量が脂肪酸合成や脂肪細胞の分化に関与することが推定されている。本研究では、中性脂肪の合成にコレステロール代謝が関与するかどうかを検討した。【方法及び結果】C57BL/6Jマウスを高炭水化物食(対照群)、高炭水化物+0.5%コレステロール食、高脂肪食及び高脂肪+0.5%コレステロール食で15週間飼育した。摂餌量及び脂肪の吸収量に著明な差が認められないにもかかわらず、高脂肪食で内臓性肥満と高血糖を生じた。しかし、高脂肪食にコレステロールを加えておくと、これらの発症が完全に防止された。肝臓のTC量は、コレステロール添加で、それぞれ対照群の2.6倍、高脂肪食群の3.3倍に増加したが、コレステロール添加によって対照群の83%にまで減少した。肝臓のAcyl-CoA synthetase (ACS) mRNA量は、高脂肪食によって対照群の1.4倍に増加し、コレステロール添加によって対照群の46%にまで減少した。ACS mRNAは5'-非翻訳領域の遠いから3種類(Form-A、B、C)存在することが知られているが、その中でも、Form Aは、主として肝臓に存在してTG合成に関与すると考えられており、そのプロモーター部分にSRE1領域を持つことが知られている。【結論】肝臓での中性脂肪合成に関与する酵素もコレステロールによる発現抑制が認められ、糖尿病や肥満の発症にコレステロール代謝が関与する可能性が推定された。

107 非インスリン依存性糖尿病患者における血中cholesteryl ester transfer protein濃度と血清脂質との関連性について

獨協医科大学越谷病院 一般内科
田山一己、小林秀城、藤原幸雄、麻生好正、犬飼敏彦、竹村喜弘

【目的】血漿脂質転送蛋白質のひとつであるcholesteryl ester transfer protein (CETP)は主としてCEやTGの交換・転送反応を特異的に促進し、LCAT、HTGLなどの酵素と共に、HDLを介した動脈硬化の防御機構における重要な因子であることが知られている。今回われわれは、非インスリン依存性糖尿病(NIDDM)患者に焦点を当て、血中CETP濃度と血清脂質レベルとの関連性につき検討した。

【方法】NIDDM患者193名(男性99名、女性94名、年齢 59.0 ± 10.6 歳)、健康者23名を対象とした。血中CETP濃度は抗ヒトリコンビナントCETPモノクローナル抗体とHRP標識抗ラットCETPポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により測定した(株)三菱化学ビーシーエル)。血清脂質はTC、TG、HDL-C、Apo A-I、Apo B、Apo E、LDL、VLDL、chylomicron等の測定を行った。

【結果】①NIDDM患者では健康者に比し、有意なCETP濃度の低下が認められた($P < 0.01$)。CETP濃度の下限のcut off値を $1.14 \mu\text{g/ml}$ と規定すると、NIDDM患者の10.4%に明らかなCETP濃度の低下が認められた。②女性は男性に比しCETP濃度は約13%高く、有意に上昇していた($P < 0.01$)。③NIDDM患者においてCETP濃度はTCと有意な正相関を認めた($P < 0.05$)。HDL-C高値群(80mg/dl)では、CETP濃度は低下傾向を示し、逆にLDL高値群(500mg/dl)ではCETP濃度は有意に上昇していた($P < 0.05$)。CETP濃度は、Apo B、Apo Eとそれぞれ有意な正の相関関係を示した(いずれも $P < 0.05$)。

【結論】NIDDM患者において、血漿脂質転送蛋白質であるCETPは、その血中濃度と血清TC、HDL-C、LDL-C、Apo B、Apo E値との間にそれぞれ密接な関連性を有しており、それらの脂質代謝pathwayに影響を及ぼす重要な因子のひとつであることが示唆された。

108 家兔CETPモノクローナル抗体によるELISA法を用いた血漿CETP濃度の臨床的検討

名古屋市立大学第三内科 第一生化学*
笹井冠宗、野路久仁子*、日比野剛、佐久間長彦、藤原隆夫、横山信治*

【目的】我々は、rabbit cholesteryl ester transfer protein (CETP)に対するモノクローナル抗体(mAb)を作成し、ヒトのCETPに反応する2種類の抗体(mAb 3-11D、14-8F)を用いて、CETP濃度測定ELISA法を確立した。このELISA法を用いて、シンバスタチン投与前後のCETP濃度を測定し、検討した。【方法】IIa型高脂血症22例にシンバスタチン5mg/日を4週間投与し、投与前後の早朝空腹時採血にて血清脂質を測定した。CETP濃度はCETPに対する2つのモノクローナル抗体(mAb 3-11D、14-8F)を用いたELISAサンドイッチ法を作成し、測定した。mAb 3-11DはCETPのTGとCEの転送を阻害し、mAb 14-8FはTGの転送を阻害する。CETP活性はAlbersらの方法にて測定した。【結果】Albersらの方法にて測定したCETP活性と本法でのCETP濃度は有意な相関性を認めた(前: $r = 0.446$, $P < 0.05$ 後: $r = 0.625$, $P < 0.001$)。シンバスタチン投与にてTC ($271 \pm 56\text{mg/dl}$ vs $226 \pm 45\text{mg/dl}$; $P < 0.0001$)、LDL-C ($188 \pm 61\text{mg/dl}$ vs $142 \pm 48\text{mg/dl}$; $P < 0.0001$)と有意に低下した。HDL-C ($51.7 \pm 10.9\text{mg/dl}$ vs $58.0 \pm 10.9\text{mg/dl}$; $P < 0.0001$)と有意な増加を認めた。TG ($158 \pm 95\text{mg/dl}$ vs $134 \pm 77\text{mg/dl}$; NS)と低下傾向を示した。CETP活性は($11.3 \pm 3.7\%$ /10ul/3hr vs $9.4 \pm 3.9\%$ /10ul/3hr; $P < 0.05$)、CETP濃度は($1.22 \pm 0.38\mu\text{g/dl}$ vs $1.09 \pm 0.35\mu\text{g/dl}$; $P = 0.0997$)と低下傾向を示した。【結論】シンバスタチン投与によるCETP活性の低下はCETP濃度の低下によることを示唆したが、HDL-Cの増加とCETP活性・濃度には相関性を認めなかった。