

学 位 論 文 題 名

Lipoprotein Analysis in Transgenic Mice Expressing
Human Apolipoprotein (Apo) A - I and Apo CⅢ :
Use of Micromethods in Analysis of Lipoprotein System in Mice

(ヒトアポリポタンパク A - I 及び
CⅢ発現トランスジェニックマウスにおけるリポタンパクの解析)

—微量検体を用いてのマウスリポタンパクの評価—

学位論文内容の要旨

I. 緒言

アポリポタンパク A-I (アポA-I) は、High density lipoprotein コレステロール (HDL-C) を血中で搬送するアポタンパクの約70%を占め、その血中濃度は、HDL-Cの血中濃度と良く相関することが知られている。一方、アポリポタンパク CⅢ (アポCⅢ) は、血中のトリグリセライドの大部分を搬送する very low density lipoprotein (VLDL) のアポタンパクの約50%を占め、高トリグリセライド血症においては、その血中濃度の上昇が報告されている。アポタンパクの産生率が高い場合、あるいは血中からの消退率が低い場合にその血中濃度の上昇をきたすと考えられるが、産生率の増加が高リポタンパク血症の原因となりうるか否かは不明であり、それをヒトで直接研究することは困難である。そこでこれらを overexpress するトランスジェニックマウスを作成し、血中リポタンパクに対する影響を検討することにした。これまでマウスにおけるリポタンパク実験法についての報告は少ないため、従来ヒトで使用されてきた実験法をマウスに応用した場合の問題点および有用性も併せて検討することとした。

II. 方法

トランスジェニックマウス アポA-I発現トランスジェニックマウスは、5' の塩基配列を5.5kb、3' のそれを3.8kb含む全長11.5kbのヒトアポA-I遺伝子をマウス授精卵に注入作成した。アポCⅢ発現トランスジェニックマウスは、5' の塩基配列を2.5kb、3' のそれを1.1kb含む全長6.7kbのヒトアポCⅢ遺伝子を用いて作成した。

アポA-IおよびアポCⅢの分離精製 超遠心法によりアポHDLおよびアポVLDLを分離し、gelfiltration column (Suprose 12) 並びに Ion-exchange column (Mono Q) を用い分離精製した。

血中アポタンパクの測定 ヒトアポA-Iの測定には、ヤギ抗ヒトアポA-I抗体を用いたELISA、マウスアポA-Iの測定には、サル抗マウスアポA-I抗体を用いたelectroimmunoassay、ヒトアポCⅢの測定には、ヤギ抗ヒトアポCⅢ抗体を用いたelectroimmunoassay、さらにマウスアポBの測定には、家兎抗マウスアポB抗体を用いたelectroimmunoassayを使用した。ヒトアポA-I 発現トランスジェニックマウスにおけるアポA-Iの総量(マウスおよびヒトアポA-Iの累計)は血漿のSDS-PAGE パターンをレーザーデンストメーターで走査し得られた曲線下面積より算出した。

リポタンパク分画の測定 リポタンパク電気泳動、Air Fugeを用いた超遠心法およびdextran sulfate/Mg²⁺沈澱法によった。

HDL分子量の測定 Native gradient gel electrophoresis (GGE) を用いた。

In vivo turnover study ヒトアポA-IおよびマウスアポA-Iをそれぞれ¹²⁵Iおよび¹³¹Iで標識し、頸静脈より注入後、眼窩より経時的に採血し、血中よりの消退曲線を得た。

III. 成績

1. ヒトアポA-I発現トランスジェニックマウスにおける検討

ヒトアポA-Iをoverexpressしているマウスでは、血清アポA-I値(マウスおよびヒトアポA-Iの累計)が $381 \pm 18 \text{ mg/dl}$ と正常のマウスの $153 \pm 7 \text{ mg/dl}$ に比較して明かな増加を認めた(平均 $\pm$ SEM; 各々 $n=6$, $p=0.0001$)。これに伴い、HDLコレステロール値(Air Fugeによる超遠心分離により測定)も、64%増加した(90 ± 3 vs. $55 \pm 5 \text{ mg/dl}$, $p=0.0001$)。さらにHDLの詳細を検討するために超遠心法により得られたリポタンパク分画の電気泳動(GGE)を行った。その結果トランスジェニックマウスにおけるHDLの増加は、その多くが分子量232kd近傍のヒトHDL₃に準じた、通常のマウスでは殆ど存在しない、HDLの増加によることが明らかとなった。

これが、マウスのリポタンパクsystemにおけるヒトアポA-Iの非生理的な体内動態によるものか否かを検討するため、GGE後のHDLについて、ヒトアポA-I抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。この結果、ヒトアポA-Iは分子量の大きなHDLにも分布し、一部のHDLのみに局在することのないことが示された。さらにヒトアポA-IとマウスアポA-Iの血中動態の違いを検討するためにヒトおよびマウスアポA-Iタンパクのin vivo turnover試験を行った。その結果、血中からの消退率において両者に差は認められなかった。

次に、このトランスジェニックマウスを用いて、脂肪食負荷試験を行った。脂肪エネルギー比を約10%より40%に変えたところ、HDL-Cについては65%の上昇(103 ± 7 より $170 \pm 16 \text{ mg/dl}$, $n=5$, $p<0.01$; dextran-sulfate/ Mg^{2+} 沈澱法)、ヒトアポA-Iについては41%の上昇(244 ± 7 より $345 \pm 16 \text{ mg/dl}$, $p<0.01$)さらにマウスアポA-Iについても48%の上昇(33 ± 8 より $49 \pm 6 \text{ mg/dl}$, $p<0.01$)を認めた。

高脂肪食後の血漿のHDL-Cの測定では、Air Fugeを用いた超遠心法とdextran sulfate/ Mg^{2+} 沈澱法との間には大きな差が認められた(127 ± 6 vs. $170 \pm 16 \text{ mg/dl}$)。このため $d<1.063 \text{ g/l}$ の分画をAir Fugeにより分離し電気泳動(GGE)を行ったところ、脂肪食負荷後の血漿ではこの分画にHDLを認め、超遠心法による低値は、脂肪負荷後に生じた軽比重のHDLがLDLの分画に混入するためと考えられた。

2. ヒトアポCIII発現トランスジェニックマウスにおける検討

ヒトアポCIIIの遺伝子を約100コピーもつトランスジェニックマウスでは、ヒトアポCIIIの濃度が $54 \pm 11 \text{ mg/dl}$ と高値を示しこれをもたない対照群に比べ、血中トリグリセライド値も明らかに増加した(平均 $\pm$ SEM; 959 ± 217 , $n=6$ vs. $49 \pm 6 \text{ mg/dl}$, $n=7$)。ヒトアポCIIIの遺伝子を1~2コピーしかもたないトランスジェニックマウスにおいては、血中ヒトアポCIII値は $3.1 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ ($n=7$)と健常人における血中濃度($7.8 \pm 0.7 \text{ mg/dl}$, $n=8$)の半量以下の値であった。一方、血中トリグリセライド値は、マウス対照群に比較してわずかな増加を示した(67 ± 8 vs. $49 \pm 6 \text{ mg/dl}$, 各々 $n=7$, $p=0.1$)。これらのマウスにおいて、VLDLの産生を増加させる生理刺激である10%蔗糖経口負荷を行ったところ、血中トリグリセライド値は、有意差はないものの同様の増加を示した(141 ± 24 vs. $99 \pm 25 \text{ mg/dl}$)。さらに、経口脂肪のクリアランスを検討するために $400 \mu\text{l}$ のオリーブオイルを、胃内に注入してトリグリセライド値を経時的に測定した。曲線下面積は、トランスジェニックマウスにおいて有意な高値を示した($34,935 \pm 3,676$ vs. $22,224 \pm 2,510 \text{ mg/dl} \times \text{min}$, $p=0.01$)。

IV. 考案並びに結論

これらの結果からアポA-IおよびアポC-IIIのoverexpressionにより高HDL血症および高トリグリセライド血症が起り得ることが初めてin vivoで示された。このことはヒトにおいても両タンパクのoversynthesisがこのようなphenotypeに関与する可能性を示唆する結果である。測定法については一般にマウス一頭から得られる血清量が少ないことが問題とされる。しかし、本試験で用いた方法によれば、血清をプールすることなしに、主要な血中アポタンパクおよびリポタンパクの測定が可能であることが示された。さらに、in vivo turnover試験や脂肪負荷試験等は、トランスジェニックマウスが血中リポタンパクの静的な測定のみならず、代謝研究にも応用されうる可能性を示した。

現在、種々のアポタンパクおよびアポタンパク代謝酵素さらにアポタンパクレセプターの塩基配列が明らかにされており、これらを用い新しいトランスジェニックマウスを作成することが理論上可能である。従来、大動物でのみ行われていた実験法を、トランスジェニックマウスに応用する事により、今後新たな研究が展開されると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学位論文題名

Lipoprotein Analysis in Transgenic Mice Expressing Human Apolipoprotein (Apo) A-I and Apo CIII: Use of Micromethods in Analysis of Lipoprotein System in Mice
(ヒトアポリポタンパクA-I及びCIII 発現トランスジェニックマウスにおけるリポタンパクの解析 - 微量検体を用いてのマウスリポタンパクの評価-)

I 研究目的

アポリポタンパクA-I(アポA-I)は、HDL コレステロールを血中で搬送するタンパクの約70%を占め、その血中濃度は、HDL コレステロールと良く相関することが知られている。一方、アポリポタンパクCIII(アポCIII)は、血中のトリグリセライドの大部分を搬送するVLDLタンパクの約50%を占め、高トリグリセライド血症においては、血中濃度の上昇が報告されている。しかしアポタンパクの産生率の上昇が、高リポタンパク血症の原因となりうるか否かは不明であり、これをヒトで直接研究することは困難である。そこで、これらを多量に産生するトランスジェニックマウスを作成し、血中リポタンパクに対する影響を検討した。さらに従来、ヒトで使用されてきた実験法をマウスに応用した場合の有用性も併せて検討することにした。

II 方法

- 1) トランスジェニックマウス: アポA-I発現トランスジェニックマウスは、全長11.5kbのヒトアポA-I遺伝子をマウス授精卵に注入して作成し、アポCIII発現トランスジェニックマウスは、全長6.7kbのヒトアポCIII遺伝子を用いて作成した。
- 2) アポA-IおよびアポCIIIの分離精製: gelfiltration column(Suprose 12)並びに Ion-exchange column(Mono Q)を用いて分離精製した。
- 3) 血中アポタンパクの測定: ヒトアポA-Iの測定にはELISAを使用した。マウスアポA-I、ヒトアポCIII、マウスアポBの測定には、electroimmunoassayを使用した。ヒトアポA-I発現トランスジェニックマウスにおけるアポA-Iの総量(マウスおよびヒトアポA-Iの累計)は血漿のSDS-PAGEパターンをレーザーデンスitomーターで走査し得られた曲線下面積より算出した。
- 4) リポタンパク分画の測定: リポタンパク電気泳動、Air Fugeを用いた超遠心法および dextran sulfate/Mg²⁺沈澱法によった。
- 5) HDL分子量の測定: Native gradient gel electrophoresis(GGE)を用いた。
- 6) In vivo turnover study: ヒトアポA-IおよびマウスアポA-Iをそれぞれ¹²⁵Iおよび¹³¹Iで標識し、頸静脈より注入後、眼窩より経時的に採血して血中よりの消退曲線を得た。

III 結果

1) ヒトアポA-I発現トランスジェニックマウスにおける検討

ヒトアポA-Iをoverexpressしているマウスでは、血清アポA-I値(マウスおよびヒトアポA-Iの累計)が $381 \pm 18 \text{ mg/dl}$ (平均 $\pm$ SEM)と正常のマウスの $153 \pm 7 \text{ mg/dl}$ に比較して明らかな増加を認めた ($p=0.0001$)。これに伴い、HDLコレステロール値も、 $55 \pm 5 \text{ mg/dl}$ から $90 \pm 3 \text{ mg/dl}$ へと増加した ($p=0.0001$)。またトランスジェニックマウスにおけるHDLの増加は、その多くが分子量232kd近傍のヒトHDL₂に準じたHDLの増加によることが明らかとなった。更にヒトアポA-IとマウスアポA-Iの in vivo turnover 試験では、血中からの消退率において両者に差は認められなかった。

次に、このトランスジェニックマウスを用いて、脂肪食負荷試験を行った。脂肪エネルギー比を約10%より40%に変えたところ、HDLコレステロール及びヒトアポA-I、マウスアポA-Iのいずれについても上昇を認めた。

2) ヒトアポCIII発現トランスジェニックマウスにおける検討

ヒトアポCIIIの遺伝子を約100コピーもつトランスジェニックマウスでは、ヒトアポCIIIの濃度が高値を示し、これをもたない対照群に比較して、血中トリグリセライド値も $49 \pm 6 \text{ mg/dl}$ から $959 \pm 217 \text{ mg/dl}$ へと明らかに増加した。ヒトアポCIIIの遺伝子を1~2コピーしかもたないトランスジェニックマウスにおいては、血中ヒトアポCIII値は健常人における血中濃度の半量以下の値であったが血中トリグリセライド値は $67 \pm 8 \text{ mg/dl}$ と、マウス対照群の $49 \pm 6 \text{ mg/dl}$ に比較してわずかな増加を示した ($p=0.1$)。

IV 考案および結語

1. これらの結果からアポA-IおよびアポC-IIIのoverexpressionにより高HDL血症および高トリグリセライド血症の起こり得ることが初めてin vivoで明らかとなった。このことはヒトにおいても何らかの機序で両タンパクの産生が増加した場合、このような高脂血症の生じる可能性が示唆される結果と考えられた。
2. 測定法については一般にマウス一頭から得られる血清量が少ないことが問題とされるが、本研究で確立された方法によれば、血清をプールすることなしに主要な血中アポタンパクおよびリポタンパクの測定が可能であり、トランスジェニックマウスをin vivo turnover 試験や脂肪負荷試験等の代謝研究に応用しうることが示された。

以上本研究は、高脂血症の発生機序の解明に寄与するものであり、博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。