

Fig. 6. Effect of mulberry leaf, pioglitazone, or their co-treatment for 12 weeks on oxidative stress in the liver. Levels of TBARS, Cu, Zn-SOD mRNA, and NADPH oxidase from each group of mice are shown. Data are expressed as means \pm SD. $n = 5$ or 6 . * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

observed to show the effect of ML, Pio, and their co-treatment (Fig. 6).

3.7. Effect of MLAF on glucose metabolism, oxidative stress and macrophage infiltration

We previously showed that MLAF shows the strongest anti-oxidant effect [13,15]. Therefore, we treated db/db mice with MLAF for 5 weeks. We found that MLAF ameliorated result of IPGTT (Supplementary Fig. 2A) and IP insulin tolerance test (ITT) (Supplementary Fig. 2B). Furthermore, MLAF decreased plasma and urine 8-isoprostane levels (Supplementary Fig. 3A), and TBARS levels in skeletal muscle (Supplementary Fig. 3B), which are markers of lipid peroxides. In addition, MLAF also significantly decreased the ration of F4/80 positive cells in WAT (Supplementary Fig. 4).

4. Discussion

In the present study, we have shown that ML ameliorates metabolic disorders and adipocytokine dysregulation in db/db mice. Intriguingly, these effects of ML are additive to the effects of pioglitazone. We also proposed that these effects are mediated, at least in part through inhibiting oxidative stress in WAT and liver of obese mice.

Our results indicate that ML ameliorates adipocytokine dysregulation and suppresses macrophage infiltration, which are involved in the development of obesity [8]. We also demonstrated that ML, pioglitazone, and their co-treatment attenuated TBARS concentrations and the expression of NADPH oxidase subunits in WAT. The oxidation of fatty acids is an important source of ROS in fatty liver [20]. ML also decreased hepatic TG and TBARS concentrations by inhibiting NADPH oxidase activity through decreased expression of NADPH oxidase subunits and induction of the expression of Cu, Zn-SOD in the liver. These results could indicate that the inhibition of ROS generation via NADPH oxidase in WAT and liver may be one of the mechanisms by which ML can ameliorate metabolic disorders.

In accordance with the effects of ML on adipocytokine dysregulation, ML decreased blood glucose and plasma TG levels as previously described [12]. Previous study demonstrated that ML contains α -glucosidase inhibitor, 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) [21]. Therefore, we expected that the effect of ML on glucose metabolism can be partly attributed to the inhibition of glucose absorption from intestine by 1-DNJ. However, as a novel mechanism, we propose that ML ameliorates adipocytokine dysregulation and ROS production through inhibiting oxidative stress in WAT, because we previously showed that MLAF shows the strongest anti-oxidant effect. Furthermore, we also found that MLAF ameliorated result of IPGTT and IPITT. MLAF also decreased plasma and urine 8-isoprostane levels, and TBARS levels in skeletal muscle and macrophage infiltration into WAT. These data may strengthen that ML ameliorates metabolic disorders and inflammation through its anti-oxidative effect in addition to the inhibition of glucose absorption from the gut by 1-DNJ.

We showed that administration of ML in addition to pioglitazone attenuated the body weight gain observed under pioglitazone treatment. Clinical study shows that treatment with thiazolidinediones such as pioglitazone is associated with edema and weight gain [22]. Previous study showed that pioglitazone induces fat mass by increasing the number of small adipocytes in Zucker (*fafa*) rats by an activation of PPAR- γ [23]. Another study showed that mice treated with pioglitazone experience weight gain from epithelial Na⁺ channel (ENaC)-mediated renal salt absorption [24]. In this study, ML attenuated pioglitazone-induced visceral fat mass gain. Therefore, we speculated that ML might attenuate visceral fat gain through promotion of energy consumption by increasing adiponectin. However, ML had no effect on the expression of UCP-1, 2 or β 3AR in WAT, or UCP-2 in the liver. In addition, co-treatment of ML and pioglitazone did not affect total fat mass. Thus, the ameliorative effect of ML on body weight gain might depend on another mechanism. Although we did not study the effect of ML on ENaC or urine volume, previous study shows diuretic effects of γ -aminobutyric acid [25], which is abundantly contained in ML [26]. Therefore, although we did not study the brown adipose tissue, which mainly regulates thermogenesis, this effect of ML might be

caused by amelioration of edema through its diuretic action more than promotion of energy expenditure.

The present study clearly demonstrated that ML ameliorates metabolic disorders including diabetes and dyslipidemia, and shows additive effects with pioglitazone. As an expected mechanism, we propose that ML could ameliorate adipocytokine dysregulation at least in part through inhibiting oxidative stress in WAT. In addition, we showed that ML attenuated the body weight gain caused by pioglitazone treatment. Thus, our study implicates that ML may be a basis for a pharmaceutical for the treatment of the metabolic syndrome as well as inducing effects of pioglitazone while reducing its adverse effects.

Acknowledgements

We thank Ms. Ayumi Hosotani (Kyoto University) for excellent technical assistance, Dr. Masaru Iwai (Ehime University) for advice for our experiment. This study was supported by Grants-in Aid from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology of Japan and a research grant for health sciences from the Japanese Ministry of Health and Welfare.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.021.

References

- [1] Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531–43.
- [2] Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, et al. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:29–33.
- [3] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–505.
- [4] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87–91.
- [5] Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002;106:2767–70.
- [6] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288–95.
- [7] Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944–8.
- [8] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61.
- [9] Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42–7.
- [10] Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.
- [11] Evans JL, Goldfine ID. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2000;2:401–13.
- [12] Park MY, Lee KS, Sung MK. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- α , PPAR- γ , and LPL mRNA expressions. *Life Sci* 2005;77:3344–54.
- [13] Harauma A, Murayama T, Ikeyama K, et al. Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:751–6.
- [14] Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 2005;135:729–34.
- [15] Shibata Y, Kume N, Arai H, et al. Mulberry leaf aqueous fractions inhibit TNF- α -induced nuclear factor kappaB (NF- κ B) activation and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2007;193:20–7.
- [16] Oike Y, Akao M, Yasunaga K, et al. Angiotensin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med* 2005;11:400–8.
- [17] Tomimoto S, Tsujita M, Okazaki M, et al. Effect of probucol in lecithin-cholesterol acyltransferase-deficient mice: inhibition of 2 independent cellular cholesterol-releasing pathways in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:394–400.
- [18] Tsuda M, Iwai M, Li JM, et al. Inhibitory effects of AT1 receptor blocker, olmesartan, and estrogen on atherosclerosis via anti-oxidative stress. *Hypertension* 2005;45:545–51.
- [19] Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 1997;387:90–4.
- [20] Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147–52.
- [21] Kong WH, Oh SH, Ahn YR, et al. Antiobesity effects and improvement of insulin sensitivity by 1-deoxynojirimycin in animal models. *J Agric Food Chem* 2008;56:2613–9.
- [22] Fonseca V. Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 2003;115(Suppl. 8A):42S–8S.
- [23] de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, et al. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2001;50:1863–71.
- [24] Guan Y, Hao C, Cha DR, et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med* 2005;11:861–6.
- [25] Yamakoshi J, Fukuda S, Satoh T, et al. Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:165–73.
- [26] Kang TH, Oh HR, Jung SM, et al. Enhancement of neuroprotection of mulberry leaves (*Morus alba* L.) prepared by the anaerobic treatment against ischemic damage. *Biol Pharm Bull* 2006;29:270–4.

メタボリックシンドローム
Journal of Metabolic Syndrome

Vol. 5 No. 1 2008

高尿酸血症・メタボリックシンドロームリサーチフォーラム
第4回研究集会
(2008年7月26日・大阪市)

記 録 集

一般演題 3)

メタボリックシンドロームに対する食事・運動療法による効果の検討

京都大学大学院医学研究科加齢医学

荒井 秀典

京都大学医学部附属病院に通院中の患者でメタボリックシンドロームと診断された患者に対し、食事指導・運動指導を行うことにより、メタボリックシンドロームの各パラメータがどのように変化するかを検討した。介入を行った26名の中で、食事・運動目標達成群は10名にとどまり、10名は食事目標のみ達成した。食事・運動目標達成群においては体重、ウエスト周囲径、アポB及び高感度CRPは有意に低下したが、他のパラメータは改善傾向を示すものの、有意差を示すに至らなかった。今回の介入研究により、メタボリックシンドローム患者に対する標準指導法として毎日10,000歩のウォーキングと理想体重×25カロリーの食事療法が有効であることが示された。

キーワード：メタボリックシンドローム、食事療法、運動療法、アディポネクチン

目 的

近年生活習慣の欧米化により肥満、脂質異常症、糖尿病が増加しており、動脈硬化性疾患の増加が懸念されている。なかでも内臓肥満、脂質異常症、耐糖能異常、高血圧などの危険因子が合併した病態であるメタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患のハイリスクな病態として注目され、2005年4月に8学会合同の新しい診断基準が作成された。このメタボリックシンドロームに対する治療方針としては運動と食事療法による減量が有効であると考えられているが、どの程度の運動を行い、どの程度の食事制限をすれば減量ができ、それぞれの危険因子が改善するかについては明らかになっていない。今回の研究においては新しい診断基準で診断を

行ったメタボリックシンドローム患者において運動療法と食事療法を行うことにより、どの程度体重、ウエスト周囲径が減少し、さらには血清脂質値や血糖値、血圧が改善するかについて検討する。

方 法

1. 対象

京都大学医学部附属病院に通院中で、平成17年4月に作成された日本におけるメタボリックシンドロームの診断基準を用いてメタボリックシンドロームと診断された35～75歳の男女。急性心筋梗塞発症後6ヶ月以内の患者、不安定狭心症の患者、重篤な心疾患の既往・合併のある患者、心血管再建術施行後6ヶ月以内の患者、

重篤な肝疾患または腎疾患（血清クレアチニン 2.5mg/dl 以上）を合併している患者、悪性腫瘍を合併している患者、コントロール不良の糖尿病患者あるいは高血圧患者、全身麻酔での手術を予定している患者、関節疾患などのために運動療法ができない患者、その他主治医が不適当と判断した患者は除いた。

2. 調査・観察・検査項目

運動／食事療法施行前の検査項目

年齢、性別、身長、体重、BMI、立位でのウエスト周囲径、血圧、脈拍数、喫煙歴、アルコール摂取量、既往歴、家族歴、使用薬剤

採血項目：12時間以上の絶食空腹時、血清脂質：総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、LDL コレステロール、AST、ALT、 γ -GTP、アルブミン、クレアチニン、尿酸、BUN、空腹時血糖、CPK、HbA_{1c}を必須項目とした。アディポネクチン、可溶性 LOX-1、高感度 CRP、small dense LDL は介入開始前と 6 ヶ月後に測定した。

3. 介入方法

メタボリックシンドロームの診断基準を満たし、文書による本研究への参加の同意を得たものに対し、以下の介入を行った。介入を行う期間は 6 ヶ月とした。

(A) 運動処方：原則として 30 分／日以上、3 回／週以上

1. 歩数計で 10,000 歩／日以上（週 5 日以上）を推奨した。

(B) 食事療法

食事：原則として推奨摂取エネルギーを男女とも理想体重（身長(m)²×22）×25 カロリー／日とした。

栄養士が栄養指導を行い、自己申告で月 3 日間の栄養摂取量を食事記録法により栄養士が評価した（3, 6 ヶ月後）。これにより平均のエネルギー摂取量を計算した。

原則として投与中の薬剤の変更は研究期間中行わないこととしたが、臨床的に必要な場合は変更を認めた。なお、運動療法および食事療法

を継続するにあたって、なんらかの問題が生じた場合には研究を中止した。本プロトコルに関しては京都大学医の倫理委員会において承認された（C-30）。

結果

37 歳から 75 歳までの男女 33 名から研究参加の同意を得たが、7 名が途中で脱落し、6 ヶ月間の介入を終了したのは 26 名であった。Tab.1 に参加者の臨床データを示す。平均年齢は 61.5 歳で、男性がやや多かった。26 名中 10 名の患者が食事・運動目標を達成した。食事目標のみの達成者は 10 名であった。いずれの目標を達成しなかったのは 5 名であった。Tab.2 に示すように食事・運動目標達成群において有意に体重、ウエスト周囲径、アポ B、高感度 CRP が減少し

Tab.1 対象患者のベースラインデータ

	平均	SD or Median
年齢 (歳)	61.5	63
男女比	男性 57.7%	
体重 (kg)	73.6	11.3
腹囲 (cm)	97.6	7.1
収縮期血圧 (mmHg)	142	20.7
拡張期血圧 (mmHg)	82.4	12.5
総コレステロール (mg/dl)	197	33.6
HDL コレステロール (mg/dl)	50.2	10
LDL コレステロール (mg/dl)	121	31
トリグリセリド (mg/dl)	130	122
空腹時血糖 (mg/dl)	124	28
AST (IU/L)	26	9.5
ALT (IU/L)	34	19.9
γ -GTP (IU/L)	52	38.6
Alb (g/dl)	4.3	0.3
Cre (mg/dl)	0.8	0.2
尿酸 (mg/dl)	6.0	1.2
BUN (mg/dl)	15	3.9
アポ B (mg/dl)	98	22.3
アポ A1 (mg/dl)	135	21.7
アディポネクチン (μ g/ml)	6.8	2.6
高感度 CRP (mg/L)	3.1	0.9

Tab.2 各群におけるパラメータの変化

	食事・運動達成群		食事達成群		未達成群	
	平均値	減少率 (%)	平均値	減少率 (%)	平均値	減少率 (%)
体重	73.1	-6.1	75.0	-2.2	74.2	1.9
ウエスト周囲径	96.1	-5.7	97.4	-0.4	102.2	0.7
収縮時血圧	143.2	-5.2	144.1	-3.7	132.4	-3.6
拡張時血圧	84.0	-3.7	83.5	0.7	76.2	1.6
総コレステロール	209.5	-7.3	201.3	1.3	170.0	-1.6
HDL コレステロール	46.2	5.5	53.0	2.1	49.2	6.1
LDL 直接	124.9	-9.9	118.6	-3.6	95.6	-8.4
LDL 計算	128.7	-8.2	126.4	1.5	99.0	-10.3
トリグリセリド	166.0	-26.6	112.1	20.2	109.0	20.0
AST	26.2	-11.1	26.3	-9.5	26.4	19.7
ALT	32.4	-20.7	38.1	-22.8	30.2	31.8
γ -GTP	45.5	-13.2	67.8	-2.5	31.4	31.2
空腹時血糖	115.9	-1.6	128.3	-3.2	135.2	1.2
HbA _{1c}	6.3	-2.2	6.6	1.0	7.2	1.9
アポリポ蛋白 B	107.8	-14.1	98.3	-4.1	84.0	-7.4
アポリポ蛋白 A1	128.6	-1.4	142.3	1.9	131.3	7.4
アディポネクチン	5.7	8.0	6.9	3.3	6.9	-4.4
高感度 CRP (対数)	6.7	-10.9	7.4	-11.3	7.9	-8.8
UA	6.0	0	5.9	0.3	6.4	-0.1

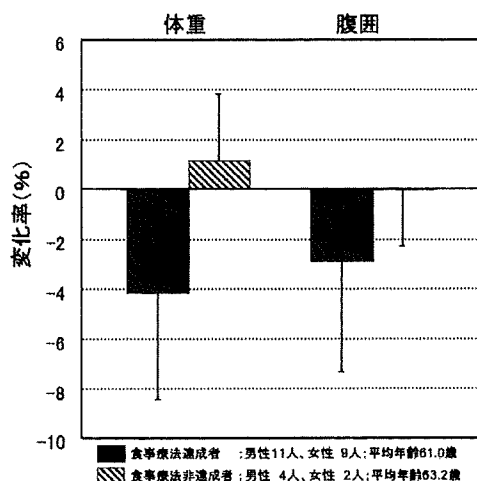


Fig.1 食事療法達成群、非達成群における体重と腹囲の変化率

た。LDL コレステロール、中性脂肪、収縮期・拡張期血圧、血糖、HbA_{1c} も低下傾向を示したが、有意差は示さなかった。HDL コレステロール、アディポネクチンは増加傾向を示した。また、目標達成群と非達成群を比較するとウエスト周囲径、HbA_{1c} が高い傾向が認められたが、統

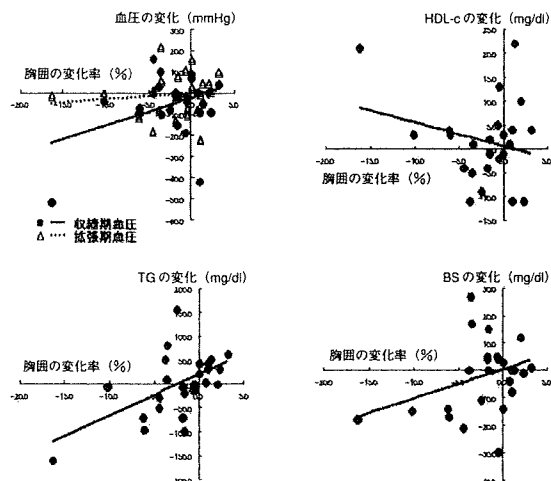


Fig.2 ウエスト周囲径の変化と各パラメータの変化との相関

計学的に有意差はなかった。

食事療法の達成と体重変化率、腹囲変化率を Fig.1 に示す。食事療法の達成群では非達成群に比して有意差をもって体重減少と腹囲の減少が得られた。また、腹囲の変化率と血圧、血清 HDL コレステロール値、中性脂肪値、空腹時血糖値

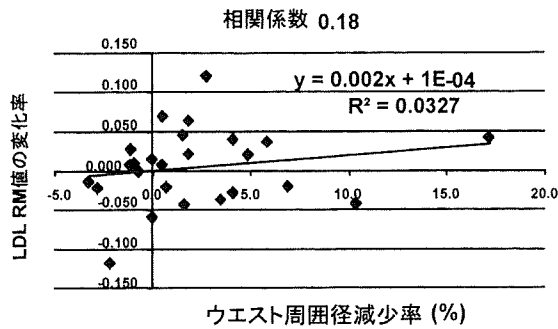


Fig.3 ウエスト周囲径と LDL RM 値の変化

それぞれの変化との相関を Fig.2に示す。腹囲の減少は高血圧、脂質異常症、耐糖能異常いずれの改善を伴うことが明らかとなった。すなわち、腹囲の減少は収縮期血圧、拡張期血圧の低下、血清 HDL コレステロール値の増加、中性脂肪値の減少、空腹時血糖値の低下を伴った。

リポ蛋白分画精密測定（ポリアクリルアミドゲル・ディスク電気泳動）により、LDL の peak の相対移動度（RM; VLDL から LDL peak までの移動度 / VLDL から HDL までの移動度）を計算し、0.4以上を small dense LDL とすると、2名の患者のみがこの基準を満たした。両名とも運動・食事目標を達成し体重とウエスト周囲径はそれぞれ 2～4.2%、0.5～5.9%減少し、6ヶ月後には0.441→0.405、0.405→0.336と、ともに LDL の RM 値が改善した。一方、介入により、0.293→0.411と RM 値が悪化した患者が1名いたが、この患者は運動目標のみの達成で、体重は0.4%、ウエスト周囲径も2.2%増加していた。

リポ蛋白分画精密測定を行った25名について、介入によるウエスト周囲径の減少(%)と、LDL の RM 値の変化についての相関分析を行うと、Fig.3に示すように、弱い正の相関（相関係数 0.18）が見られた。体重減少率と RM 値の間には相関はなかった（相関係数 -0.068）。

考 察

今回の介入では n が十分ではなく、体重、ウエスト周囲径、アポ B、高感度 CRP 以外に有意差は出なかったが、n を増やせば有意差が出るものと期待される。大学病院外来において栄養士による栄養指導と医師による運動指導を行ったにもかかわらず、両者を達成したのは約25%にとどまり、肥満者における生活習慣の改善の困難さが確認された。

結 論

メタボリックシンドローム患者に対する標準指導法として毎日10,000歩のウォーキングと理想体重×25 カロリーの食事療法が有効であることが示された。しかしながら、その達成率から食事指導、運動指導により行動変容を計ることの困難さが明らかとなり、行動変容を計るアプローチにより工夫が必要であると考えられた。

Effects of Walking and Dietary Management of Metabolic Syndrome

Hidenori Arai

Department of Geriatric and Ageing Medicine, the Kyoto University Graduate School of Medicine

Key words : metabolic syndrome, dietary management, walking, adiponectin

In this study we examined whether diet and exercise intervention can ameliorate each metabolic parameter as well as high sensitivity CRP and adiponectin in patients with metabolic syndrome in Kyoto University Hospital. We recruited 26 out-patients with the metabolic syndrome and asked them to comply with the life-style change: walking 10,000 steps a day and calorie restriction to $25 \text{ kcal} \times \text{ideal weight}$, and followed them for 6 months. Among them 10 patients attained the goal of diet and exercise, and 10 patients only attained the goal of diet. Only patients who attained the goals of diet and exercise showed a significant reduction in body weight, waist circumference, apolipoprotein B, and high sensitivity CRP. Other parameters also ameliorated, but the difference was not statistically significant. No significant improvement was found in other patients. Thus walking 10,000 steps a day and calorie restriction are effective for the treatment of metabolic syndrome in Japanese.

ランチョンセミナー2

平成20年9月28日(日) (12:20~13:20)

座長: 門脇 孝

(東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科)

心血管イベントの制圧を目指した新しい脂質異常症の治療戦略

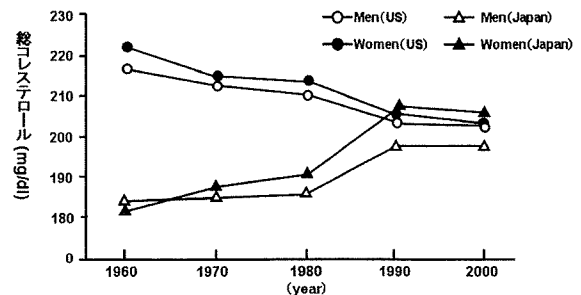
荒井 秀典

京都大学大学院医学研究科加齢医学

要 約

食生活の欧米化に伴い、日本人のコレステロール摂取量は年々増加している。それにともない血清コレステロール値も上昇傾向にあり、今や欧米人と同レベルに達し、日本人の脳・心血管イベントの増加が危惧されている。生体内のコレステロールには2つの供給源があり、1つは肝臓における合成、もう1つは小腸からの吸収であり、両者のバランスによって血中のコレステロール値は規定されている。食生活の欧米化によりコレステロールの摂取が増えている日本人ではコレステロール吸収抑制は大きな治療ターゲットと考えられる。本セミナーにおいてはコレステロール吸収において重要な役割を担うNPC1L1 (Niemann Pick C1 Like 1) 蛋白をはじめ、コレステロール吸収をめぐる最新知見とともに、最近、臨床導入された小腸コレステロールトランスポーター阻害剤エゼチミブの臨床的有用性とエビデンスを紹介する。

から7分の1であるといわれていたが¹⁾、今後は日本における総コレステロール値の増加や肥満・糖尿病の増加に伴い、その差が縮まっていくことが懸念される。また、かつて日本人においては虚血性心疾患に比べ、脳卒中が多かったが、最近の Japan Diabetes Complication Study (JDCS)²⁾の結果を見ると少なくとも2型糖尿病患者のイベント発症を見る限り、脳血管障害と虚血性心疾患の発症率は逆転しており(図2)、その要因として脂質異常症

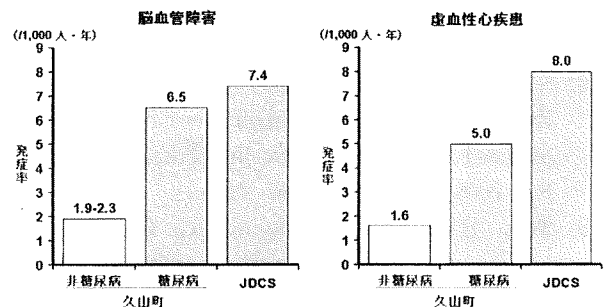


米国国民健康調査(NHES) / 米国国民健康栄養調査(NHANES)
厚生省循環器疾患基礎調査
大倉ら: 動脈硬化 1973; 1: 101 / 沖中ら: J Circul J 1965; 29: 505

図1 日米の平均総コレステロール値の推移

日本人におけるコレステロール値の推移

戦後食生活の欧米化により、日本人のコレステロール摂取量、脂質摂取量は増加している。その結果我々の総コレステロール値、トリグリセリド値は増加傾向にある。図1に示すように過去40年間の総コレステロール値の推移を見ると、1960年頃には日本人の総コレステロール値の平均値は180mg/dl前後であったが、その後次第に増加し、1990年からはアメリカ人とほぼ肩を並べるようになった。以前我が国における虚血性心疾患による死亡率は、欧米の5分の1



JDCS (Japan Diabetes Complications Study)
Yamada, N: Heart View 8: 907-910, 2004より改変
図2 久山町とJDCSにおける糖尿病患者の脳・心血管イベント発症率

(高脂血症) が関係していると考えられている。従って、脂質管理の重要性はますます高まることが予想される。

コレステロール代謝における小腸からのコレステロール吸収の役割

生体内においてコレステロールは細胞膜の構成成分や胆汁酸・ステロイドホルモンの原料として重要な働きを担っている。ヒトにおけるコレステロールの供給源としては図3に示すように肝臓において合成されるものと小腸から吸収されるコレステロールに分けられる。食物から1日あたり300 mg から500 mg のコレステロールが吸収されるが、一方肝臓において1日あたり800 mg 程度のコレステロールが合成される。肝臓でコレステロールから合成された胆汁酸は小腸へ分泌されるが、食物中に含まれるコレステロールをミセル化したのち、小腸から再吸収され、肝臓へ戻って再利用される(腸管循環)。ミセル化したコレステロールは図4に示すようにNPC1L1を介して腸細胞に取り込まれる。そして腸細胞内でACAT (acyl coenzymeA:cholesterol

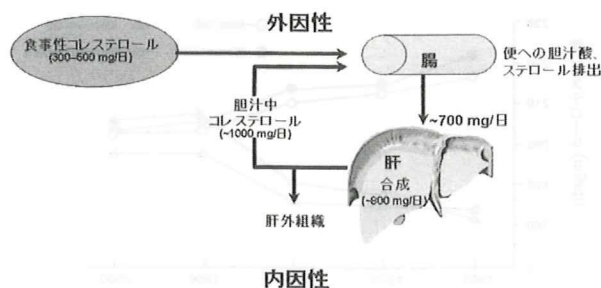


図3 コレステロールの2つの供給源としての肝臓における合成と小腸における吸収

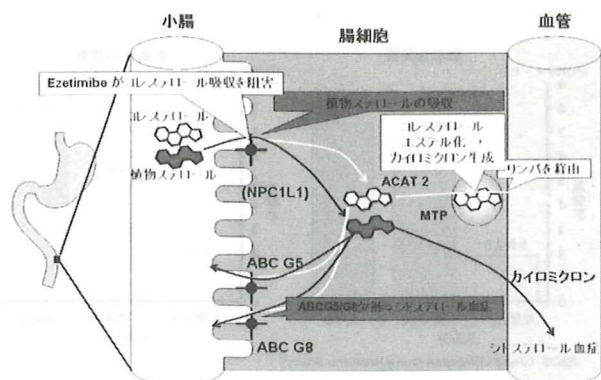


図4 コレステロール・植物ステロールの細胞レベルにおける吸収メカニズム

acyl transferase) の働きでコレステリルエステルに合成されて、カイロミクロンとなってリンパ管から血中にはいる。以前より小腸からコレステロール吸収が行われることが知られていたが、そのメカニズムは長く不明であった。2004年シェリングプラウ研究所のDavisらは、小腸におけるコレステロール吸収がNPC1L1を介して行われることを初めて報告した³⁾。その発見の約10年前に彼らは小腸におけるコレステロール吸収を抑制する薬剤としてエゼチミブを見いだしたが、そのエゼチミブがまさにNPC1L1を介したコレステロールの取り込みを特異的に抑制することが明らかになったわけである。

コレステロール吸収と心血管イベントとの関係

高コレステロール血症の原因の一つとしてコレステロール吸収の亢進があげられるが、そのほかにもコレステロール吸収と心血管イベントとの関係を示すエビデンスがある。DEBATE (Drugs and Evidence-Based Medicine in the Elderly) 試験によると、同レベルのLDL-コレステロール (LDL-C) 値であっても、コレステロール吸収亢進群では非亢進群に比し、脳・心血管イベントの発症率が高いことが明らかにされた⁴⁾。この知見から脳・心血管イベント抑制におけるコレステロール吸収制御の重要性が示唆される。そのほかにもコレステロール吸収が亢進している病態としては冠動脈疾患の既往のある患者、2型糖尿病の患者、肥満のある患者などが知られている。2型糖尿病患者においては十二指腸の生検検体の解析でNPC1L1のmRNAが非糖尿病患者に比べ増加していることが報告されている⁵⁾。

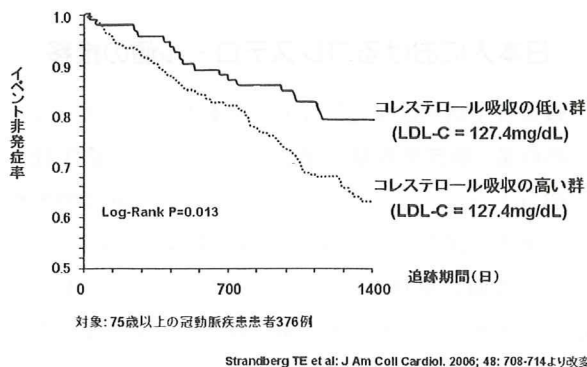


図5 Debate 研究の結果。コレステロール吸収が高い群において脳・心血管系疾患の発症頻度が多いことを示している

エゼチミブの臨床効果

エゼチミブの臨床効果についてまとめてみたい。単独で使用した場合、本薬剤は LDL コレステロールを18%低下させ、トリグリセリドを17%低下させ、HDL コレステロールを17%増加させることが明らかとなっている。またこの薬剤は超悪玉コレステロールと考えられている small dense LDL を減少させることがわかっている。また食物由来の酸化コレステロールの吸収も抑制し、酸化コレステロールの血中濃度も低下させることがわかっている。エゼチミブをスタチンと併用した際には LDL コレステロールは25%さらに低下し、併用によりスタチンを増量するより大きな LDL コレステロールの低下をもたらすことができると考えられている。

エゼチミブによるエビデンス

エゼチミブ単独治療により心血管イベント発症抑制効果を検証した研究はまだない。頸動脈内中膜肥厚 (IMT) をサロゲートエンドポイントとした研究も大規模なものはまだ行われていない。これまで報告された臨床試験はすべてスタチンとの併用療法の効果を検証したものである。最近発表された試験として ENHANCE 研究がある⁶⁾。これは家族性高コレステロール血症患者を対象としてシンバスタチン単独治療群とシンバスタチンにエゼチミブを加えた併用療法を比較し、頸動脈の IMT をエンドポイントとして併用療法による動脈硬化の進展抑制がスタチン単独治療群より優れているかどうかを検証した研究である。本研究においては併用群においてスタチン単独治療群に比べ、有意に16.5%の LDL コレステロールの低下を認めたものの頸動脈 IMT の比較では有意差を認めなかった。本試験で結果がポジティブにでなかった要因はいくつか挙げられる。一つは家族性高コレステロール血症という非常にリスクの高い集団ではあるものの、すでにほとんどの患者がスタチンによる治療を受けており、またベースラインの IMT が 1 mm 以下と正常であったこと。また、平均年齢が46歳と比較的若く、糖尿病をほとんど含んでいなかったことがあげられる。これらの要因から 2 群においていずれも IMT の進展が認められず、併用療法の優位性が証明できなかったもの

と思われる。もう一つの SEAS 試験は軽症から中等症の大動脈弁狭窄症を有し、動脈硬化性疾患のリスクの低い1873名の患者 (平均年齢68歳) を対象としてシンバスタチン+エゼチミブの併用療法がプラセボに比べ、大動脈弁狭窄症の進展及び脳・心血管イベント発症を有意に抑制できるかどうかを検証したものである⁷⁾。その結果併用療法により LDL コレステロールは61%減少し、2次エンドポイントである脳・心血管イベントの発症は22%減少した。すなわち従来のスタチンを用いた試験と同様に、スタチンとエゼチミブの併用療法で、大動脈弁狭窄症に対する有用性は確認されなかった。

エゼチミブの安全性については ENHANCE においてシンバスタチン単独治療群とエゼチミブ併用群で有害事象に差がなく、有意な副作用の増加はエゼチミブを追加することにより増加しなかった。副作用の少なさについては市販後調査などでも証明されているが、SEAS 試験においてシンバスタチン、エゼチミブ併用群で有意に癌の発症及び癌による死亡が多いという結果が出ており、懸念されている。ただ、現在進行中でより大規模な試験である SHRPE 及び IMPROVE-IT 試験の途中経過では、シンバスタチン、エゼチミブ併用群において癌の発症が多いという結果は得られておらず、コレステロール低下療法のリスクを証明するものではないと考えるが、今後の検討が必要と考えられる。

エゼチミブ単独による脳・心血管イベント抑制効果の検証

現在日本老年医学会においては75歳以上の後期高齢者を対象として、エゼチミブの単独治療が、脳・心血管イベントの発症を抑制しうるかに関する大規模臨床試験を計画しており、2009年1月より登録を開始する。本試験の結果がポジティブに出れば、エゼチミブ単独療法による LDL コレステロールの低下が脳・心血管イベント抑制効果があることが証明できる。世界で唯一のエゼチミブ単独療法によるエビデンスであり、結果が期待される。

おわりに

生活習慣の変化により、日本人における血清脂質レベルはほぼ欧米と肩を並べる程度になっており、

肥満、糖尿病の増加と相まって、今後の心血管イベントの増加が懸念される。脂質低下療法を行う上においては肝臓でのコレステロール合成の抑制とともに小腸におけるコレステロール吸収抑制も考えた治療法の選択が肝要である。

参考文献

- 1) Kromhout D. On the waves of the Seven Countries Study: a public health perspective on cholesterol. *Eur Heart J* 1999; 20: 796-802.
- 2) Komamura K, Higashi M, Yamada N. Improvement of cardiac hypertrophy and ventricular function in a man with Fabry disease by treatment with recombinant alpha-galactosidase A. *Heart* 2004; 90: 617.
- 3) Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C 1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303: 1201-4.
- 4) Strandberg TE, Tilvis RS, Pitkala KH, et al. Cholesterol and glucose metabolism and recurrent cardiovascular events among the elderly: a prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 708-14.
- 5) Lally S, Tan CY, Owens D, et al. Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C 1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G 5 and G 8, and of microsomal triglyceride transfer protein. *Diabetologia* 2006; 49: 1008-16.
- 6) Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, et al. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1431-43.
- 7) Rossebo AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2008; 359: 1343-56.

Ⅱ. アポ蛋白機能異常症

1. 家族性Ⅲ型高脂血症 (アポリポ蛋白E遺伝子変異)

奥羽大学薬学部疾患薬理学/
附属病院内科 教授
衛藤 雅昭

同 薬学部疾患薬理学
服部 由香, 寺澤 理恵,
斎藤美恵子

[Summary]

家族性Ⅲ型高脂血症はアポリポ蛋白(アポ)E2/2遺伝型(まれにアポE欠損)を基盤として発症する。レムナトリポ蛋白(レムナント)が血中に増加する典型的な疾患である。レムナントはLDLと同様に動脈硬化惹起性リポ蛋白である。アポE2/2遺伝型に加えて、糖尿病やメタボリックシンドロームを合併して発症することが多い。レムナントの増加のために、早期に冠動脈硬化症を発症する。血中トリグリセリド、総コレステロール両方高値(トリグリセリド高値が優位)、総コレステロールが高値にかかわらずLDLコレステロールが低値、かつレムナント(RLP)コレステロールが異常高値であることを確認することが診断の要点である。Ⅲ型高脂血症は治療によく反応することから、早期診断と早期治療がきわめて重要である。薬物療法としては、レムナント低下作用が最も強力なフィブラート系薬剤が第一選択薬となる。

Key Words:

家族性Ⅲ型高脂血症 □ レムナトリポ蛋白 □
アポリポ蛋白E遺伝子変異 □ アポリポ蛋白E2/2遺伝型 □
RLPコレステロール

はじめに

家族性Ⅲ型高脂血症はアポリポ蛋白(アポ)E2/2遺伝型(まれにアポE欠損)を基盤として発症し¹⁾、トリグリセリド(TG) richリポ蛋白のひとつであるレムナトリポ蛋白(レムナント)が血中に増加する典型的な疾患である。高レムナント血症・高TG血症を呈する。TG/レムナントはLDLと同様に動脈硬化惹起性リポ蛋白であり²⁾、Ⅲ型高脂血症の存在はTG/レムナントの催動脈硬化性を証明したといっても過言ではない。レムナントコレステロールが増加しており、血中総コレステロールは高値であるがLDLコレステロールは低値であることも特徴である。レムナントの増加のために、早期に冠動脈硬化症を起こしやすい³⁾。Ⅲ型高脂血症は治療によく反応することから、早期診断と早期治療がきわめて重要である。薬物療法としては、レムナント低下作用が最も強力なフィブラート系薬剤が第一選択薬となる。

家族性Ⅲ型高脂血症

1. 病因・病態

Ⅲ型高脂血症の特徴は血中レムナントの増加である。レムナントはTGとコレステロールをほぼ半々含有するので、

血中ではTGとコレステロールが増加する。レムナントはカイロミクロンレムナントとVLDLレムナント (intermediate density lipoprotein; IDL) に由来する。

カイロミクロンとVLDLはリポ蛋白リパーゼによって水解され、相対的にコレステロールとアポEに富んだレムナント (それぞれカイロミクロンレムナントとVLDLレムナント) になる。レムナントの代謝はアポEをリガンドとする肝臓レムナントレセプター (アポEレセプター) によって行われる。LDLレセプター (アポB, Eレセプター) もアポEに親和性を示し、レムナント代謝に関与している。カイロミクロンレムナントはレムナントレセプターを介して肝臓に取り込まれるが、VLDLレムナントの一部はレムナントレセプターとLDLレセプターを介して肝臓に取り込まれ、残りは肝TGリパーゼ (hepatic triglyceride lipase; HTGL) によって代謝されLDLへと変換される。Ⅲ型高脂血症はこのレムナントの代謝が障害され、血中にレムナントが蓄積する高脂血症である⁴⁾。

レムナントの表面に存在するアポEにはE2, E3, E4の3種類のイソ蛋白が存在するが、これらはアポE対立遺伝子すなわち $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ によってそれぞれコードされており、六つのアポE遺伝型/表現型 (E2/2, E3/2, E3/3, E4/2, E4/3, E4/4) が存在する。このうち、アポE3/3遺伝型が標準型であり、日本人の70%はアポE3/3遺伝型である。Ⅲ型高脂血症はアポE2のホモ接合体すなわちアポE2/2 ($\epsilon 2/\epsilon 2$) 遺伝型から発症する¹⁾。レムナントは通常そのアポEがレムナントレセプターあるいはLDLレセプターに認識されることにより血中から速やかに消失するが、アポE2のレセプターへの結合能がきわめて低い (レセプター結合活性はアポE3を100とすると、アポE2は2以下である)、アポE2のホモ接合体では血中にレムナントが蓄積し、Ⅲ型高脂血症を発症する⁴⁾。この結果、肝臓でのコレステロールプールが減少し、LDLレセプターのup-regulationが誘導され、血中LDLが減少する⁵⁾。また、アポEを介したVLDLレムナントからLDLへの変換がアポE2のホモ接合体では低下しているともいわれている⁵⁾。

表 日本人家族性Ⅲ型高脂血症患者における平均血中脂質値と背景

		(正常値)
トリグリセリド	381 mg/dL	(<150)
総コレステロール	253 mg/dL	(<220)
LDLコレステロール (直接法, 超遠心法)	74 mg/dL	(<140)
IDLコレステロール (超遠心法)	39 mg/dL	(<10)
アポE	16.6 mg/dL	(<4.6)
RLPコレステロール (超遠心法)	48.3 mg/dL	(<5.2)
RLPコレステロール/TG比	0.13	(<0.1)
糖尿病	43.8%	
肥満	75.0%	
冠動脈硬化	37.5%	

n = 16

(文献6より引用)

アポE2/2遺伝型保有者がすべて臨床的にⅢ型高脂血症を発症するわけではない。発症には他の因子すなわち糖尿病、肥満 (メタボリックシンドローム)、甲状腺機能低下、妊娠などが関与している^{3, 6)}。前二者におけるインスリン不足あるいはインスリン抵抗性によるLPL活性の低下は、アポE遺伝子変異に加えてⅢ型高脂血症の発症に大きく関与しているものと考えられる。われわれの調査では、日本人Ⅲ型高脂血症における糖尿病の合併は43.8%、肥満の合併は75.0%と高頻度であった (表)⁶⁾。

2. 臨床症状

動脈硬化性疾患の合併頻度が高く、冠動脈硬化症だけでなく下肢動脈硬化症も起こしやすい。黄色腫、特に手掌線条黄色腫が認められることがある³⁾。欧米では約半数に黄色腫が認められると報告されているが³⁾、日本人のⅢ型高脂血症ではその頻度は低い^{6, 7)}。

欧米では冠動脈硬化症の合併率は25%と報告されている³⁾。われわれの調査研究では、日本人Ⅲ型高脂血症における冠動脈硬化症の合併率は37.5%と欧米並みに高頻度であり (表)⁶⁾、冠動脈硬化症の頻度が低い国民であることを考慮するとⅢ型高脂血症、特にレムナントの高値が日本人の冠動脈硬化症の発症に強く影響しているといえる⁶⁾。

発症年齢は通常成人以降である。欧米では16~95歳と報告されているが³⁾、われわれの調査では9~81歳であった⁶⁾。

3. 検査・診断

診断は厚労省特定疾患「原発性高脂血症」調査研究班の基準により行われる。すなわち、①血漿TG、総コレステロール(TC)が共に高値を示す、②アポE2/2遺伝型(きわめてまれであるがアポEの欠損)を証明する、③血漿リポ蛋白のポリアクリルアミドゲル電気泳動ではレムナント(IDL)の増加を示す。

血中アポEは増加し10mg/dL以上であればⅢ型高脂血症を疑う(正常値<4.6mg/dL)。アポE/血中コレステロール比は0.05以上となる。またLDLコレステロールは減少し、アポBも減少する。Ⅲ型高脂血症ではLDLコレステロールをFriedewaldの式により求めることができないことに留意する。脂質を専門とする研究室などでは、血漿を超遠心法により分離しLDLコレステロールを測定することができるが、一般的には直接法によりLDLコレステロールを測定する。

Ⅲ型高脂血症の診断において最も重要なことは、アポE2/2遺伝型と血中レムナントの増加を証明することである。アポE2/2遺伝型の測定は保険適応されていないが、われわれのような大学の研究室で行われている。

血中レムナントは、現在保険適応されているRLP (remnant lipoprotein like particles; レムナント様粒子) コレステロールとして測定するのが最適である。空腹時で中嶋らの免疫吸着・酵素法により測定し、30mg/dL以上(正常値5.2mg/dL未満)であれば、Ⅲ型高脂血症の可能性が高い。さらに、RLPコレステロール/TG比0.1以上がⅢ型高脂血症の診断に有用である⁸⁾。最近、RLPコレステロールを直接法で測定することも可能になった。

日本人Ⅲ型高脂血症16名における分析結果を表に示した⁶⁾。血中TG値381mg/dL、総コレステロール値253mg/dLと両方高値であった。TG値>総コレステロール値がⅢ型高脂血症の特徴である。LDLコレステロール値は74mg/dLと

- 血中TGと総コレステロール両方高値 (TG>総コレステロール)
- アポE2/2遺伝型
- PAG電気泳動上、レムナント(IDL)増加
- 血中レムナント高値(RLP-C \geq 30mg/dL)
- 血中RLPコレステロール/TG比 \geq 0.1
- LDLコレステロール(直接法)低値

図 家族性Ⅲ型高脂血症診断の要点

TG: トリグリセリド, PAG: ポリアクリルアミドゲル

低値であった。アポE値は16.6mg/dLと高値であった。レムナントは、超遠心法によるIDLコレステロール値は39mg/dL、RLPコレステロール値は48.3mg/dLと異常高値であった。RLPコレステロール/TG比は0.13と0.1以上の症例が多く、Ⅲ型高脂血症の診断に有用と考えられた。

図にⅢ型高脂血症診断の要点を示した。血中TG、総コレステロール両方高値(TG高値が優位)、総コレステロールが高値にかかわらずLDLコレステロールが低値で、かつレムナント(RLP)コレステロールが異常高値であるということである。必ずしもアポE2/2遺伝型を証明できなくても、上記により疑うことができるが、確定診断はIEF法⁹⁾、PCR-RFLP法あるいはIEF-immunoblotting法によりアポE2/2遺伝型(表現型)を証明することにより行う。Ⅲ型高脂血症は治療によく反応することから、早期診断と早期治療がきわめて重要である。

4. 頻度

われわれの一般人口(n=576)における調査では、日本人におけるアポE遺伝子頻度は ϵ 2: 3.7%, ϵ 3: 84.6%, ϵ 4: 11.7%であり、 ϵ 2および ϵ 4遺伝子の頻度が欧米人よりも有意に少ないのが特徴であった¹⁰⁾。これよりアポE2/2の頻度は0.14% (10,000人中14人)と計算される。このうち約10%が発症すると仮定すると、家族性Ⅲ型高脂血症の頻度は10,000人中1~2人と推定される。欧米では ϵ 2遺伝子の頻度が高いためアポE2/2の頻度は約1%と高く、Ⅲ型高

脂血症の頻度は10,000人中2~10人と推定されている³⁾。わが国において、アポE2/2遺伝型のうち何%がⅢ型高脂血症を発症するか、また日本人におけるⅢ型高脂血症の頻度については今後明らかにせねばならない。糖尿病や肥満の増加、欧米型の食生活パターンによりアポE2/2遺伝型からのⅢ型高脂血症の発症はわが国でも増加しているものと予想される。

5. 治療

Ⅲ型高脂血症は治療によく反応するといわれている。すなわち食事療法を含めた生活習慣改善が有効である。肥満があれば体重是正、糖尿病があれば血糖コントロールする。しかし難治性のものも存在することは確かである。

薬物療法としては血中TG/レムナント低下作用が最強であるフィブラート系薬剤が第一選択であることはいうまでもない³⁾。Ⅲ型高脂血症の本態はレムナントの増加であり、そのレムナントを低下させるのはフィブラート系薬剤である。したがって、LDL低下作用が主たるスタチン系薬剤はⅢ型高脂血症の第一選択薬にはならない。

日本人Ⅲ型高脂血症14名における治療結果を報告した⁶⁾。4名は食事療法を中心とした生活習慣改善のみ、8名はベザフィブラート(5名)あるいはフェノフィブラート(3名)、1名は甲状腺ホルモン+フィブラート、1名は分娩後改善例である。平均血中TG値は412mg/dLから187mg/dLへ、総コレステロール値は266mg/dLから175mg/dLへ低下した。Ⅲ型高脂血症における血中脂質の目標値に関して定説はないが、動脈硬化を防ぐためには血中レムナント(RLP)コレステロールを5.2mg/dL未満にする必要があると考えられる¹¹⁾。

おわりに

家族性Ⅲ型高脂血症はアポE遺伝子変異すなわちアポE2/2遺伝型を基盤として発症し、その本態は血中レムナ

ントの増加である。家族性高コレステロール血症がLDLの動脈硬化惹起性を証明したように、家族性Ⅲ型高脂血症はレムナントの動脈硬化惹起性を証明したといえる。Ⅲ型高脂血症に限らず、一般的な高TG症の基盤をなすのもレムナントであり、日常診療におけるTG/レムナントの管理がいかに重要であるかを、本疾患は教えている。

家族性Ⅲ型高脂血症は診断が難しく(アポE2/2遺伝型の証明が必要)、また比較的まれな疾患であるため、わが国におけるその実態解明は遅れている。現在、厚労省難治性疾患克服研究事業「原発性高脂血症に関する調査研究」(筑波大学 山田信博班長)が進行中であり、筆者らもその一員として家族性Ⅲ型高脂血症の調査研究を行っており、わが国における本疾患の実態を今後明らかにしたい。

最近、われわれはⅢ型高脂血症合併糖尿病患者が腎症を早期にかつ高頻度に発症することを発見した¹²⁾。すなわち、レムナントコレステロールは腎症の危険因子でもあった¹³⁾。Ⅲ型高脂血症において冠動脈硬化症予防だけではなく、腎症予防をも念頭にいったTG/レムナント低下療法を積極的に行うことが重要であろうと考えられる。その最も有望な薬剤がフィブラート系薬剤であろう¹⁴⁾。

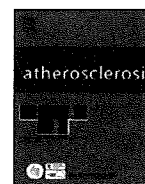
謝辞

厚労省難治性疾患克服研究事業「原発性高脂血症に関する調査研究」(平成21年度)の支援を受けた。

文献

- 1) Utermann G, Hees M, Steinmetz A: Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* **269** (5629): 604-607, 1977
- 2) Goldstein JL, Ho YK, Brown MS et al: Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very low density lipoproteins. *J Biol Chem* **255** (5): 1839-1848, 1980
- 3) Mahley RW, Rall SC: Type III hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein

- tein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism, Metabolic Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill Inc, NewYork, pp.1953-1980, 1995
- 4) Mahley RW, Innerarity TL: Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **737** (2): 197-222, 1983
 - 5) Davignon J, Gregg RE, Sing CF: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **8** (1): 1-21, 1988
 - 6) Eto M, Saito M, Nakata H et al: Type III hyperlipoproteinemia with apolipoprotein E2/2 genotype in Japan. *Clin Genet* **61** (6): 416-422, 2002
 - 7) 衛藤雅昭, 岡田瑞穂, 中田宏志ほか: III型高脂血症に関する検討. 厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班平成4年度研究報告書, pp.103-110, 1993
 - 8) Wang T, Nakajima K, Leary ET et al: Ratio of remnant-like particle-cholesterol to serum total triglycerides is an effective alternative to ultracentrifugal and electrophoretic methods in the diagnosis of familial type III hyperlipoproteinemia. *Clin Chem* **45** (11): 1981-1987, 1999
 - 9) Eto M, Watanabe K, Ishii K: A rapid flat gel isoelectric focusing method for the determination of apolipoprotein E phenotypes and its application. *Clin Chim Acta* **149** (1): 21-28, 1985
 - 10) Eto M, Watanabe K, Ishii K: A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet* **30** (5): 422-427, 1986
 - 11) Kugiyama K, Doi H, Takazoe K et al: Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **99** (22): 2858-2860, 1999
 - 12) Saito M, Eto M: Accelerated nephropathy in type 2 diabetic patients with type III hyperlipoproteinemia (apo E2/2 genotype), and the detrimental effects of their remnant lipoproteins on human mesangial cells. *Diabetologia* **50** (Suppl.1): 31-32, 2007
 - 13) Eto M, Saito M, Okada M et al: Apolipoprotein E genetic polymorphism, remnant lipoproteins, and nephropathy in type 2 diabetic patients. *Am J Kidney Dis* **40** (2): 243-251, 2002
 - 14) Eto M, Hattori Y, Terasawa R, Saito M: Bezafibrate suppresses the expression of TGF- β and type IV collagen mRNA in human mesangial cells loaded with remnant lipoproteins. *Diabetologia* **52** (Suppl 1): S412-413, 2009



On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression

Masaki Ogata^{a,b}, Maki Tsujita^a, Mohammad Anwar Hossain^a, Nobukatsu Akita^{a,b}, Frank J. Gonzalez^c, Bart Staels^{d,e,f}, Shogo Suzuki^b, Tatsuya Fukutomi^b, Genjiro Kimura^b, Shinji Yokoyama^{a,*}

^a Biochemistry, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi 1, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Japan

^b Cardio-Renal Medicine and Hypertension, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

^c Laboratory of Metabolism, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA

^d Institut Pasteur de Lille, Lille F-59019, France

^e INSERM UMR 545, Lille F-509191, France

^f Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques et Faculté de Médecine, Lille F59006, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2008

Received in revised form 7 January 2009

Accepted 8 January 2009

Available online 19 January 2009

Keywords:

ABCA1

PPAR

LXR

ABCA1

HDL

Cholesterol

ABSTRACT

Expression of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1), a major regulator of high density lipoprotein (HDL) biogenesis, is known to be up-regulated by the transcription factor liver X receptor (LXR) α , and expression is further enhanced by activation of the peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). We investigated this complex regulatory network using specific PPAR agonists: four fibrates (fenofibrate, bezafibrate, gemfibrozil and LY518674), a PPAR δ agonist (GW501516) and a PPAR γ agonist (pioglitazone). All of these compounds increased the expression of LXRs, PPARs and ABCA1 mRNAs, and associated apoA-I-mediated lipid release in THP-1 macrophage, WI38 fibroblast and mouse fibroblast. When mouse fibroblasts lacking expression of PPAR α were examined, the effects of fenofibrate and LY518674 were markedly diminished while induction by other ligands were retained. The PPAR α promoter was activated by all of these compounds in an LXR α -dependent manner, and partially in a PPAR α -dependent manner, in mouse fibroblast. The LXR responsive element (LXRE)-luciferase activity was enhanced by all the compounds in an LXR α -dependent manner in mouse fibroblast. This activation was exclusively PPAR α -dependent by fenofibrate and LY518674, but nonexclusively by the others. We conclude that PPARs and LXRs are involved in the regulation of ABCA1 expression and HDL biogenesis in a cooperative signal transduction pathway.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

High density lipoprotein (HDL) plays a central role in transporting cholesterol from extrahepatic tissues to the liver for its catabolism to bile acids, and thus it is thought to contribute to removing cholesterol from peripheral tissues and possibly lowering its deposits in atherosclerotic lesions. This idea is based on epidemiological evidence that plasma HDL concentrations are inversely related to cardiovascular risk, and on experimental results showing that HDL may remove cholesterol from vascular cells in culture. HDL removes cholesterol from cells via two independent mechanisms [1]. One is by non-specific exchange of cholesterol, in which the driving forces for its net release may be cholesterol esterification on HDL and the presence of ATP binding cassette transporter (ABC) G1 in the cell membrane. The other mechanism is through HDL biogenesis by helical apolipoproteins and cellular lipids in the presence of ABCA1 [1]. The latter is an almost exclusive source

of HDL biogenesis and one of the important rate limiting factors for plasma HDL concentration [2]. Many drug reagents are known to influence this reaction by modulating ABCA1 activity. ABCA1 is therefore an important target for development of drugs that impact atherogenesis.

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) agonists are known to increase expression of ABCA1 and enhance biogenesis of HDL in vitro and in vivo. Fibrates act mainly as PPAR α agonists [3] to increase ABCA1 gene transcription [4,5]. Fenofibrate and LY518674 exclusively activate PPAR α while bezafibrate and gemfibrozil activate PPAR δ and PPAR γ as well [6–8]. More specific activation of PPAR δ and PPAR γ also results in increased ABCA1 transcription [4,9]. All of these events seem to involve the liver X receptors (LXRs), especially LXR α [4,5,8], one of the main regulators of ABCA1 gene transcription by sensing oxysterol [10], although specific pathways for these cascades are yet to be clarified.

Fibrates are drugs widely used to decrease plasma triglyceride (TG). This effect is expected to reduce atherosclerotic disease through a decrease in TG-rich atherogenic lipoproteins as well as by reducing other risk factors secondarily caused by the increase of TG-rich lipoprotein, such as low HDL and “small and dense” LDL.

* Corresponding author. Tel.: +81 52 853 8139; fax: +81 52 841 3480.
E-mail address: syokoyam@med.nagoya-cu.ac.jp (S. Yokoyama).

Fibrates also increase HDL independently of TG reduction by direct up-regulation of the genes related to HDL biogenesis as indicated above [4,5]. Eventually, fibrates were shown to decrease secondary or primary coronary heart disease events in several large-scale prevention trials [11]. Statistical analysis of these data suggested independent contribution of HDL increase to the risk reduction [12].

Chronic inflammation is also thought to be involved in atherogenesis, such that accumulation of cholesterol-rich lipoproteins results in the recruitment of circulating monocytes, their adhesion to the endothelium and differentiation into macrophages. Lipid-loaded macrophages may produce chemokines, cytokines, and reactive oxygen species as early atherogenic process. Activation of PPARs was shown to suppress such processes.

PPARs act as ligand-activated transcription factors mainly to regulate target genes related to energy metabolism. The PPAR family consists of PPAR α , δ and γ , which display distinct expression patterns, different ligand specificities and different biological functions with some degree of overlap between PPAR α and PPAR δ . PPAR α is mainly expressed in liver, kidney, heart, and muscle, tissues with a high rate of fatty acid catabolism. PPAR α up-regulates the expression of genes involved in fatty acids oxidation, lipolysis, HDL metabolism, down-regulates very low density lipoprotein synthesis and cholesterol esterification [13], and inhibits inflammatory mediators [14]. PPAR γ is mainly expressed in adipose tissue, skeletal and cardiac muscle, and also in human monocytes [15]. It plays a role in adipocyte differentiation and fat storage; up-regulation of PPAR γ increases insulin sensitivity [16]. PPAR γ also up-regulates the expression of genes involved in HDL metabolism, down-regulates cholesterol esterification, and inhibits inflammatory mediators [4–17]. PPAR pathways are thus integrated in atherogenesis and the use of the fibrates (PPAR α agonists) and thiazolidinediones (PPAR γ agonists) may extend beyond the treatment of hyperlipidemia or insulin resistance [18]. PPAR δ is ubiquitously expressed and its role in atherogenesis is controversial. Disruption of the PPAR δ gene suggested its important roles in skin biology, lipid metabolism, and energy homeostasis [19]. PPAR δ agonist (GW501516), however, reportedly enhanced ABCA1 expression and increased apoA-I-mediated lipid release to maintain macrophage cholesterol homeostasis [20] and suppressed inflammation to reduce atherosclerosis [21]. On the other hand, a different PPAR δ agonist promoted lipid accumulation in macrophages [22].

As various PPAR agonists are clinically used, it is important to provide information about their detailed reaction mechanism with respect to signaling and cross-talk among the transcriptional factors relating the energy metabolism induced by these drugs. We therefore investigated profiles of the network of transcriptional factors by which PPAR agonists modulate ABCA1 gene expression. The results suggest that PPARs and LXRs are involved in the regulation of ABCA1 expression and HDL biogenesis in a complicated signal transduction network.

2. Methods

2.1. Cell culture

THP-1 (human monocytic leukemia) cells (4.0×10^6 cells per well) in six well plates were differentiated with 3.2×10^{-7} M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Wako) in 10% FBS (PAA Laboratories)-RPMI 1640 medium (IWAKI Glass) for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (THP-1 macrophages). WI38 human fibroblasts (RIKEN Cell Bank) were incubated in Eagle's minimum essential medium (MEM) with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Fibroblasts were prepared from C57BL6 mice and PPAR-null/C57BL6 (PPAR(-/-)) mice [23] and bred in the Nagoya City University Animal Experiment Facility. Briefly, 13–14th day fetuses were harvested and suspended

in Hank's EGTA solution containing 100 units/ml of penicillin and 0.1 mg/ml of streptomycin (PCSM). Associated membranes and placentas were dissected and rinsed thoroughly. The fetal trunks were transferred to fresh solution and finely minced. The suspension was centrifuged at 1000 rpm for 3 min and the cells were re-suspended into MEM medium containing 10% FCS and PCSM. The cells were cultured in 37°C with 5% CO₂ incubator over five passages and used for the experiments. The experimental protocol was pre-approved by the institutional Animal Welfare Committee. Cells were seeded into a 100-mm dish at a density of 1.5×10^6 cells/ml. When the WI38 cells and mouse primary fibroblasts were grown to 80% of a confluent stage, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) twice and cultured an additional 20 h in the presence of apoA-I (10 μ g/ml). PPAR α activators, fenofibric acid (Tyger Scientific, referred as fenofibrate hereafter), bezafibrate (Sigma), gemfibrozil (Sigma), and LY518674 [24] (synthesized in house), PPAR δ activator GW501516 [20] (kindly provided by Aska Pharmaceutical Co. Ltd.), PPAR γ activator pioglitazone (kindly provided Takeda Pharmaceutical Co. Ltd.), and an LXR agonist TO901317 (Sigma) were dissolved in dimethyl sulfoxide and added to the culture medium containing 0.02% bovine serum albumin (BSA) (Sigma). The experimental procedure had been approved by the animal welfare committee of the institution.

2.2. Cellular lipid release

WI38 cells and mouse primary fibroblasts were grown to 80% confluence, and twice washed with PBS. The cells were cultured for additional 20 h in the presence of apoA-I (10 μ g/ml) and PPAR activators described above. THP-1 macrophages were also treated with PPAR activators similarly for apoA-I-mediated lipid release in 0.02% BSA-RPMI 1640 medium (serum-free). Cholesterol and choline-phospholipid released into the medium by apoA-I were determined enzymatically and the apoA-I-dependent release was evaluated by subtracting the background with BSA, as described in detail previously [5].

2.3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting

Cells incubated with and without apoA-I and PPAR activators for 20 h were harvested in cold PBS and collected by centrifugation. Membrane fractions were prepared for detection of ABCA1. The cell pellet was suspended in 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.3% protease inhibitor cocktails (Sigma) and 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride and 1 mM benzamidine for 30 min in ice with vortexing at every 10 min. The cell debris and nuclei were removed by centrifugation at $800 \times g$ for 5 min at 4°C, and the supernatant was centrifuged at $99,000 \times g$ for 60 min to prepare the membrane fraction as a pellet. The pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 10 mM benzamidine, 1% Triton X-100, and 1% protease inhibitor cocktails. Membrane fraction protein (20–60 μ g) was dissolved in 9 M urea, 2% triton X-100, 1% dithiothreitol and analyzed by 6% polyacrylamide electrophoresis for immunoblotting by using specific antibodies against ABCA1 and BIP/GRP78.

2.4. RNA extraction and real time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Cellular RNA was extracted by using RNA extraction reagent (Isogen, Nippon Gene). Single strand cDNA was synthesized by High capacity cDNA archive kit (applied biosystem) from 5 μ g of the total RNA. PCR was carried out for the cDNA by using primers (sense and antisense) of human ABCA1 (5'-GAA CTG GCT GTG TTC CAT GAT-3' and 5'-GAT GAG CCA GAC TTC TGT TGC-3'), human LXR α (5'-TCT

GGA GAC ATC TCG GAG GTA-3' and 5'-GGC TCA CCA GTT TCA TTA GCA-3'), human LXR β (5'-GCG AAG TTA CTT TTG AGG GTA-3' and 5'-CTC CTT TAC AGT GGG TGA AGA-3'), human PPAR α (5'-TCG GTG ACT TAT CCT GTG GTC-3' and 5'-TTC TCA GAT CTT GGC ATT CGT-3'), human PPAR δ (5'-TCT CTC TTC CCT TCT CCC TTG-3' and 5'-GGC TCA AGT CTT TTG CTC TGA-3'), human PPAR γ (5'-TCA CAG AGT ATG CCA AAA GCA-3' and 5'-AAA CTC AAA CTT GGG CTC CAT-3'), mouse ABCA1 (5'-CTC AGA GGT GGC TCT GAT GAC-3' and 5'-CCC ATA CAG CAA GAG CAG AAG-3'), mouse LXR α (5'-TAG GGA TAG GGT TGG AGT CAG-3' and 5'-AGT TTC TTC AAG CGG ATC TGT-3'), mouse PPAR α (5'-CTG TCC TCT CTC CCC ACT GGA-3' and 5'-TGA CTG AGG AAG GGC TGG AAG-3'), mouse PPAR δ (5'-GGG AAG AGG AGA AAG AGG AA-3' and 5'-AGG AAG GGG AGG AAT TCT G-3'), mouse PPAR γ (5'-ATA AAG CAT CAG GCT TCC ACT-3' and 5'-GCA CTT CTG AAA CCG ACA GTA-3'), human and mouse β -actin (5'-CTG ACC CTG AAG TAC CCC ATT-3' and 5'-TCT GCG CAA GTT AGG TTT TGT-3' (synthesized by Hokkaido System Science, Japan). Quantification of mRNA for these primers products were accomplished by using SYBR green PCR master mix reagent in an ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystem Japan). Results were normalized to β -actin mRNA.

2.5. RNA interference

Human LXR α -specific small interfering RNA (siRNA) and scrambled control RNA oligonucleotides were purchased from Invitrogen. The transfection of siRNA was performed using Nucleofector kit (Amaxa) reagent according to the manufacturer's instructions. Scrambled control RNA oligonucleotide or human LXR α siRNA were added to WI38 cells and transfected by electroporation. The cells were incubated for 20 h, and washed with PBS, then incubated in MEM containing 0.02% BSA and indicated dose of fenofibrate, bezafibrate, gemfibrozil, LY518674, GW501516, pioglitazone were added and incubated for further 20 h. Then the cells were harvested and mRNA levels determined by RT-PCR. The oligonucleotide sequences used to construct siRNA for LXR α in this study were: siLXR α (5'-UUC UCG AUC AUG CCC AGU UGU UCC G-3') and scrambled control (5'-UUC UUC UUA GUA CCC GGA CGU UCC G-3').

2.6. Construction of luciferase reporter genes

The construct of human PPAR α promoter luciferase reporter gene (containing -1664/+83 of the PPAR α gene, relative to the transcription start site) was prepared as described previously [25]. The 5'-flanking region of this PPAR α gene (corresponding to -1664/+83) was inserted into pGL4 vector (Promega) to generate PPAR α promoter-luciferase reporter construct (pPPAR α -Luc). The reporter plasmid with a mutated and inactivated PPAR α responsive element (PPRE) (mutant PPRE) was generated by using QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). A mutation was introduced at the PPRE (-1493/-1481 GGGGCAAGTTCA to GcaGCAAGTTCA) which is identical to that reported previously (pPPAR α -mut-Luc) [25]. The luciferase reporter plasmid was prepared to contain four copies of LXRE upstream of thymidine kinase promoter (pLXRE-tk-Luc) [26]. The sequence of LXRE of the LXRE-tk-Luc vector was (ACAG TGACCG CCAG TAACCC CAG...GGA CGCCCG CTAG TAACCC CGG) \times 2 (LXREa and LXREb from sterol responsive element binding protein-1c).

2.7. Transient transfections and reporter gene assay

WI38 cells and mouse fibroblasts were co-transfected with pPPAR α -Luc or pPPAR α -mut-Luc vectors (4 μ g), and Renilla phRL-tk vector (Promega) (0.2 μ g) by electroporation using Nucleofector kit reagent (Amaxa) according to instructions supplied by the manufacturer. The activity of luciferase reporter of LXRE, pLXRE-tk-Luc, was examined in human fibroblasts and mouse fibroblasts of wild

type and of PPAR α (-/-). After 20 h transfection, the cells were washed with PBS and cultured in the presence of fenofibrate, bezafibrate, gemfibrozil, LY518674, GW 501516, pioglitazone for 20 h. Cellular luciferase activity was measured by the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Results were standardized by the Renilla luciferase activity derived from phRL-tk vector.

2.8. Other methods

Protein content of each sample was determined with bicinchoninic acid assay reagent (Pierce) using BSA as a standard. Statistical significance was evaluated using two-tailed Student's *t* test and analysis of variance Scheffe's test.

3. Results

3.1. HDL biogenesis in THP-1 macrophages and WI38 fibroblasts

The effects of PPAR agonists on HDL biogenesis were determined by measuring the expression of ABCA1 and cellular lipid release by human apoA-I (Figs. 1 and 2). Fenofibrate, bezafibrate, gemfibrozil, LY518674, GW501516 and pioglitazone increased ABCA1 mRNA and protein levels and consequently cellular lipid release. In addition,

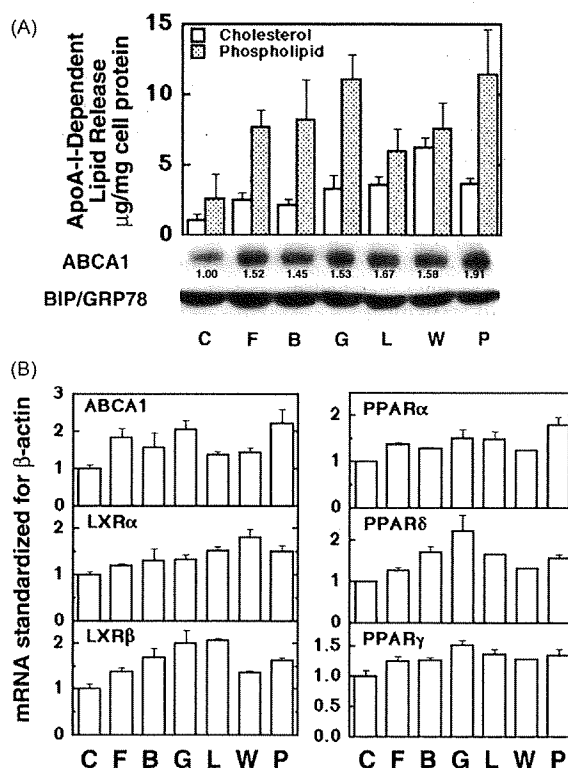


Fig. 1. Effects of PPAR α agonists fenofibrate (F), bezafibrate (B), gemfibrozil (G) and LY518674 (L) at 30 μ M, PPAR δ agonist GW501516 (W) at 0.5 μ M, and PPAR γ agonist pioglitazone (P) at 5 μ M, in comparison to control (C) in THP1 macrophages. The cells were exposed to PPAR agonists for 20 h. (A) ApoA-I-mediated release of free cholesterol and choline-phospholipid were measured in the conditioned medium as described in the text. ABCA1 protein was determined by immunoblotting after incubation with PPAR agonists for 20 h. The numbers in the ABCA1 immunoblotting photo indicate the results of digital densitometric scans of each band standardized for the loading standard and expressed as the relative value to the control. (B) Messenger RNA levels of ABCA1, LXR α , LXR β , PPAR α , PPAR δ , PPAR γ were determined by quantitative RT-PCR after incubation with PPAR agonists for 20 h and standardized with those of β -actin mRNA levels. Data represent mean \pm S.E. of three independent measurements. All the data are statistically significant for the increase from the control as $P < 0.01$.