

次に、artificial viral envelopeを用いた改良型HVJ-liposome法によりTGF- $\beta$ に対するアンチセンスあるいはスクランブルオリゴをラット尿管より逆行性に腎臓へ導入した。10分間の尿流・腎静脈血流同時遮断を行った後、尿管のみ結紮し、一側尿管結紮モデルラットを作製した。尿管結紮後4日目に腎間質へのマクロファージの浸潤をED-1抗体を用いた免疫組織化学により、間質のmyofibroblast出現を $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) に対する抗体を用いて免疫組織化学により検討した。腎間質細胞へのアンチセンスオリゴ導入が尿管結紮後7日目にTGF- $\beta$ , Type I Collagen mRNAの発現を抑制しうるかを、Northern blot法, in situ hybridization法および免疫組織化学により検討した。TGF- $\beta$ アンチセンスオリゴが一側尿管結紮モデルラットにおける腎間質線維化を抑制しうるか病理組織学的に検討した。

## 結果

20分間の尿流遮断群において、すでにFITCラベルしたオリゴDNAは腎髄質の間質細胞の核に集積していることが確認された。また、HVJ-liposome溶液のincubation時間が長いほど(40,60分間)、導入された細胞数が多いことが確認された。また、腎局所の圧を高めるため、10分間の尿流・腎静脈血流同時遮断を行った群では、10分後、すでにFITCラベルしたオリゴDNAが、腎髄質のみならず皮質の間質細胞の核にも集積していることが確認された。導入された細胞の同定のために、type IV collagenでcounter stainingを行ったところ、導入された細胞の核は尿管基底膜の外側に存在し、間質細胞であり、その形態的特徴から線維芽細胞であることが推定された。

改良型HVJ-liposome法を用いて、ラット尿管より逆行性に腎間質細胞へ遺伝子を導入することが可能となったことから、TGF- $\beta$ に対するアンチセンスオリゴにより間質線維化に対する治療が可能か検討した。尿管結紮後4日目に腎間質へのマクロファージの浸潤をED-1抗体を用いた免疫組織化学により検討したところ、disease control群およびアンチセンスオリゴ、スクランブルオリゴ導入群において差は認められなかった。一方、 $\alpha$ -SMAの発現は

disease control群、スクランブルオリゴ導入群で強く認められたが、アンチセンスオリゴ導入群ではほとんど認めなかった。Northern blot法を用いた検討により、正常の腎皮質においては、TGF- $\beta$ , Type I Collagen mRNAはほとんど発現していないが、一側尿管結紮モデルラットの腎皮質ではTGF- $\beta$ , Type I Collagen mRNAは著明に増加していた。スクランブルオリゴ導入群ではmRNAの増加は全く抑制されなかったが、TGF- $\beta$ アンチセンスオリゴ導入群ではこの増加が抑制されていた。in situ hybridization法による検討では、一側尿管結紮モデルラットでは拡張した尿管細胞周囲の間質細胞でのTGF- $\beta$ , Type I Collagenの発現が著増していたが、アンチセンスオリゴ導入群では尿管が拡張しているにも関わらず、TGF- $\beta$ , Type I Collagenの発現はほとんど認めなかった。Type I Collagenに対する抗体を用いた免疫組織化学により検討したところ、disease control群、スクランブルオリゴ導入群でType I Collagenの発現を強く認めたが、アンチセンスオリゴ導入群ではType I Collagenの発現をほとんど認めなかった。マッソントリクロム染色では線維化部分が青く染色されるが、disease control群、スクランブルオリゴ導入群では青く染色された広範囲な線維化を認めたが、アンチセンスオリゴ導入群では尿管が拡張しているにも関わらず、線維化領域の拡大は抑制されていた。以上、腎間質細胞へのTGF- $\beta$ アンチセンスオリゴ導入により、TGF- $\beta$ , Type I Collagen mRNAの発現が抑制されるとともに、スクランブルオリゴを導入した群に比し、腎間質の線維化が抑制されることが確認された。

## 考察

改良型HVJ-liposome法を用いてラット尿管より逆行性に腎間質細胞へ遺伝子を導入することが可能となった。導入効率はHVJ-liposome溶液のincubation時間および腎局所の圧に依存していると考えられた。この腎間質細胞への遺伝子導入法は、間質細胞の生理状態、病的状態での機能の解析や間質線維化に対する遺伝子治療に有効な方法となりうることが示唆された。さらに、改良型HVJ-liposome法を用いた腎間質細胞へのTGF- $\beta$ アン

チセンスオリゴ導入は、間質線維化に対する遺伝子治療法として有効な方法となりうることが示唆された。

#### 文献

1. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor  $\beta$ 1. *Nature* 346: 371-4, 1990
2. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E: Inhibition of TGF- $\beta$ 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 50: 148-155, 1996
3. Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA: Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 2: 418-23, 1996
4. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp P, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS: Hepatic expression of mature transforming growth factor  $\beta$ 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Prot Natl Acad Sci USA* 92: 2572-76, 1995
5. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- $\beta$  or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92: 2597-601, 1993
6. Saeki, Y., N. Matsumoto, Y. Nakano, M. Mori, K. Awai, and Y. Kaneda: Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai Virus): Reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* 8:2133-2141, 1997

### **Abstract**

Introduction of transforming growth factor- $\beta$ 1 antisense oligodeoxynucleotides into renal interstitial cells blocks interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction

**by**

Enyu Imai, Yoshitaka Isaka, Michiko Tsujie, Yutaka Ando, Yoshitaka Akagi, Masatugu Hori, Yasufumi Kaneda\*

**from**

Department of Internal Medicine and Therapeutics, Osaka University School of Medicine

\*Division of Gene Therapy Science, Osaka University School of Medicine

Interstitial expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is important in tubulointerstitial fibrosis, a common process in most renal diseases. However, no effective therapy for progressive interstitial fibrosis is known. Here, we developed an artificial viral envelope (AVE) type hemagglutinating virus of Japan (HVJ) liposome method, which can allow us to introduce the genetic material into renal interstitial cells. We then introduced antisense oligodeoxynucleotides (ODN) for TGF- $\beta$ 1 into interstitial cells in rats with unilateral ureteral obstruction, hoping to inhibit expression of TGF- $\beta$ 1 and decrease interstitial fibrosis. TGF- $\beta$ 1 antisense or scrambled ODN were introduced by retrograde ureteral injection of AVE type HVJ-liposomes. TGF- $\beta$ 1 and type I collagen mRNA increased markedly in the interstitium of obstructed kidneys that were untreated or treated with scrambled ODN, but TGF- $\beta$ 1 antisense ODN significantly reduced levels of TGF- $\beta$ 1 and type I collagen mRNA expression. Consequently, interstitial fibrotic area of the obstructed kidneys treated with antisense ODN was significantly less than that of the obstructed kidneys untreated or treated with scrambled ODN. These findings indicate that introduction of TGF- $\beta$ 1 antisense ODN into interstitial cells can suppress the interstitial TGF- $\beta$ 1 expression, and that may be a potential therapeutics for interstitial fibrosis.

## E-セレクチン遺伝子導入によるラット大動脈への白血球接着の誘導

安河内幸雄 吉田雅幸 沼野藤夫\*

### はじめに

E-セレクチンは血管内皮細胞上に発現する接着分子で、動脈硬化症や急性炎症などの炎症反応における白血球と血管内皮細胞の接着現象に深く関与している<sup>1)</sup>。臨床的には、虚血再還流障害や動脈硬化症の発症進展に関与しているといわれ<sup>2)</sup>、セレクチンリガンド類似体の投与により、心筋梗塞巣が縮小したという報告もある<sup>3)</sup>。

最近我々は、白血球と血管内皮細胞の E-セレクチンを介する接着の過程で、E-セレクチン分子が細胞骨格と結合することを見出し<sup>4)</sup>、セレクチンを介するシグナル伝達機構の可能性を示した<sup>5)6)</sup>。

今回我々は E-セレクチン遺伝子をラット大動脈へ導入し、E-セレクチンの過剰発現系を確立し、流速存在下での白血球接着現象を観察した。

### 対象および方法

E-セレクチン cDNA をシャトルベクター pADRSV4 に組み込み、非増殖型タイプ5 アデノウイルスゲノムとともに 293 細胞にトランスフェクションし、組み換えアデノウイルスベクター (AdRSVE-sel) を回収し、E-セレクチンの発現を確認し、白血球接着機能を対照アデノベクター (AdRSVLacZ) と比較した。さらに、腎動脈分岐部以下 2 cm の腹部大動脈を Sprague Dawley Rat (雄 250-350g) より摘出、一端をクランプした後他端よりアデノウイルスベクターを注入し、72 時間後に E-セレクチンの発現を免疫組織染色法およびウエスタンブロッティング法にて確認した。白血球の接着機能は組み換えウイルスベクター導入大動脈片を還流装置に装着し、10 分間の白血球の還流を行ったのちに走査型電子顕微鏡および蛍光ラベル白血球をもちいた定量測定法にて検討した。

### 結果

ラット大動脈への導入実験ではウイルスベクター導入後 72 時間後で AdRSVE-sel 導入群にのみ E-セレクチン分子の発現が抗 E-セレクチン抗体を用いたウエスタンブロット法 (図 1) によって確認された。また、免疫組織染色でも AdRSVE-

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子遺伝

\*東京医科歯科大学医学部第3内科

sel 導入ラット大動脈上の E-セレクトリン分子の発現が確認された。

次にこのラット大動脈片を還流装置に装着し、ヒト末梢血より抽出した好中球との接着現象を流速存在下で施行し、洗浄固定後に走査型電子顕微鏡によって観察した。図2に示すように AdRSVE-sel 導入ラット大動脈に著明な好中球の接着を認めた。

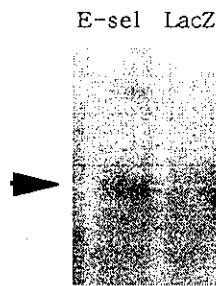


図1 ラット大動脈に対するヒトE-セレクトリン遺伝子導入 (LacZ: 対照ベクター)

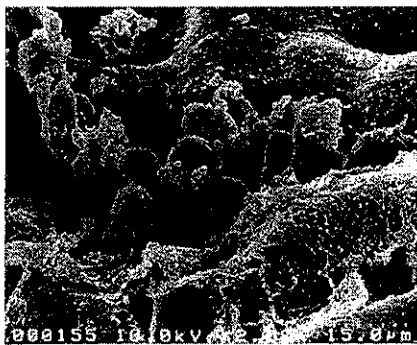


図2 E-selectin 遺伝子導入ラット大動脈に対する白血球接着の走査電顕像

この接着現象を定量化するため、蛍光ラベルした好中球を用いて還流接着実験を行ったところ、AdRSVE-sel 導入ラット大動脈への有意な好中球接着が確認された。

#### 考察

組み換えアデノウイルスベクターを利用することによって血管内皮 E-セレクトリンをラット大動

脈上に発現させることに成功し、またこの導入された E-セレクトリンが白血球の接着を特異的に誘導することがわかった。この実験システムの確立によってこれまで血管レベルでの機能解析が困難であった血管内皮 E-セレクトリンの白血球接着現象について、すでに報告したシグナル伝達機構を含め詳細にわたり検討することが可能となった。このモデルは急性炎症や動脈硬化症における白血球-内皮細胞間相互作用を研究する上で非常に重要であり、あらたな炎症性疾患の治療法の開発にも役立つものと考えられる。

#### 文献

- 1) Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J. Clin. Invest.* 91: 379-387, 1993
- 2) Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8: 504-512, 1994
- 3) Kilgore KS, Tanhehco EJ, Park JL et al. : Reduction of myocardial infarct size in vivo by carbohydrate-based glycomimetics. *J. Pharm. Exp. Therap.* 284: 427-435, 1998
- 4) Yoshida M, Westlin WF, Wang N et al. : Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 133: 445-455, 1996
- 5) Yoshida M, Gimbrone, MA: Novel roles for E-selectin in endothelial-leukocyte adhesion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811 493-497, 1997
- 6) Yoshida M., Szenté B.E, Kiely J-M, Rosenzweig A., Gimbrone, Jr. M.A Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J. Immunol.* 161, 933-941, 1998

### **Abstract**

E-Selectin overexpressed on rat aortic segment supports neutrophil adhesion under flow.

**by**

Yukio Yasukochi, Masayuki Yoshida, Fujio Numano\*

**from**

Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

\*Department of Medicine, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

E-selectin, a member of the Selectin family of adhesion molecules, plays an important role in leukocyte-endothelial (EC) interaction during inflammation and atherosclerosis. To critically examine the role of E-selectin in leukocyte-EC interaction in vascular system, we created a recombinant adenoviral vector contained the human E-selectin and overexpressed in rat aortic segment. A full length of human E-selectin cDNA (Esel) was inserted into a pAdRSV4 shuttle vector and recombinant adenovirus vector was established (AdRSVEsel). A segment of abdominal aorta (approximately 2cm in length) was isolated from male Sprague-Dewey rat (body weight 250-350g) after anesthesia with pentobarbital (20mg/kg). The isolated aortic segment was placed in DMEM containing 10% FBS and ligated on one end. The recombinant adenovirus vector (AdRSVEsel or a control vector, AdRSVLacZ), diluted into PBS was introduced into the aortic segment and a vascular clamp was placed for 24hr. The aortic segment was further incubated for 72hrs. The protein expression of transduced E-selectin from the aortic segment was measured by western blotting analysis using anti-E-selectin mAb. Immunoreactive E-selectin was detected from the aortic segment transduced with AdRSVEsel but not from those transduced with AdRSVLacZ. Immunohistochemical analysis of these segments also revealed the E-selectin expression on AdRSVEsel transduced aortic segment. The segment was connected to a blood perfusion system and fluorescently labeled human neutrophils (PMN) were perfused in the segment for 15min. Adhered PMN were examined by a scanning electron microscopy. In another experiments, adhered PMN were collected and fluorescence intensity was measured. AdRSVEsel transduced segment supported significantly higher number of PMN adhesion than control segment. These data indicate that human E-selectin transduced in rat aortic segment was able to support PMN adhesion under flow condition. This model will be a powerful tool for the study of E-selectin function in vascular system.

## 神経線維腫症2型 (NF2) 遺伝子産物の機能と病態の関連

佐谷秀行 荒木令江 古閑比佐志 木村麗新\* 中尾光善

### はじめに

神経線維腫症2型 (NF2) は、出生35,000~40,000人に1人の割合で見られる常染色体性優性遺伝の疾患であり、多彩な神経皮膚組織の異常に加え、多発性頭蓋内良性腫瘍をほぼ必発することで特徴づけられる。NF2の責任遺伝子は22番染色体長腕上(22q12)に存在し、コードされるタンパク質(マーリン)のアミノ末端約半分の構造はエズリン、ラディキシン、モエシン(ERMファミリー蛋白とよぶ)など細胞膜裏打ち蛋白と極めて高い相同性を示す事が見いだされた<sup>1,2)</sup>。

NF2遺伝子の欠失・変異は、NF2患者のみならず、非NF2患者における散発性の腫瘍でも高い頻度で起こっており、マーリンが細胞内で腫瘍抑制分子として機能していることが示唆される。しかし、マーリンの構造と機能の如何なる変化が、どの様に腫瘍発現に関わっているかに関しては全く不明である。本研究はNF2遺伝子変異の特徴、その遺伝子産物マーリンの細胞内における発現・局在様式、及び細胞内機能を分子レベルで解析することにより、NF2の発症機構解明と新たな診断・治療法開発の基礎を築くことを目的として行なった。

### 対象および方法

[1] NF2蛋白質(マーリン)の細胞内局在の解析  
哺乳類発現ベクターに正常及びNF2患者から得られたexonを欠いた変異型NF2 cDNAを組み込み、

VA13 cells及びCOS cellsに発現させ、その動態を共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)で観察した。さらに経時的な変化を捉えるために、発現プラスミドを核内に注入し、正常及び変異NF2遺伝子産物の詳細な細胞内分布を観察した。又、正常NF2プラスミドに種々の部位特異的変異を導入し、その細胞内での発現パターンを解析することによって、NF2タンパク質上の細胞内局在を決定する部位を同定した。

### [2] NF2結合蛋白の同定

大腸菌発現GST-マーリン融合蛋白を固相化させたアフィニティカラムを用い、牛脳抽出液よりマーリンに特異的に結合する細胞内タンパクの精製を行なった。これら結合タンパク質をペプチダーゼにより消化し、ペプチド配列を決定した。決定した配列に基づきデータベースによる検索を行い、候補となるタンパク質の同定を行った。同定されたタンパク質の抗体、及び抗マーリン抗体を調製し、免疫沈降実験、及びWestern-Blottingにより、これらのタンパク質間相互会合性の解析を行った。

### [3] NF2タンパク質の翻訳後分解機構の解析

NF2患者由来の髄膜腫(3例)、散発性の髄膜腫(6例)、NF2患者由来の聴神経鞘腫(13例)、散発性の聴神経鞘腫(2例)、陰性対照として悪性グリオーマ細胞を用いて、NF2遺伝子変異が認められなかったものについて、タンパク質翻訳後分解の有無を解析した。種々のタンパク質分解酵素阻害剤で細胞を処理し、NF2タンパク質マーリンの翻訳後のタンパクレベルの分解機構をWestern-Blottingにより

熊本大学医学部腫瘍医学

\*島根医科大学脳神経外科

解析した。又、GST-NF2リコンビナントタンパク質をin vitroでカルパインで限定分解し、その分解産物のカルボキシル基末端のアミノ酸シーケンスを施行することによって、限定分解部位の決定を行った。次に、生理的な細胞内カルシウム濃度で反応する $\mu$ -カルパインの活性化状態を髄膜腫の腫瘍組織を活性化型 $\mu$ -カルパイン特異的抗体を用いて免疫組織化学染色により解析した。

## 結 果

### [1] 正常型および変異型マーリンの細胞内局在

変異NF2、及び正常NF2cDNAをpEGFP発現ベクターに挿入し、細胞内でGFP-マーリンを発現させ、その細胞内局在を解析したところ、正常マーリンは細胞膜および細胞質全体に顆粒状に発現していることが判った。一方、高変異部位であるアミノ末端側が変異しているマーリンは、核内・及び核周囲に蓄積した形で発現することが判明した<sup>4)</sup>。これらの所見は正常培養細胞中のマーリンが細胞質や膜に、またNF2患者の腫瘍細胞中の変異マーリンが核に検出される所見と一致する。我々はマーリンの一次構造を解析し、核移行や核外輸送に関わる配列を検索したところ、1カ所の核移行シグナル(NLS)配列、及び4カ所の核外輸送シグナル(NES)配列(Exon3, 8, 9, 15; NES3, NES8, NES9, NES15)に類似する部位が存在することが判明した。そこで、NESに特異的に作用してタンパク質の核外輸送を阻害する試薬であるレプトマイシンB(LMB)で細胞を処理し、正常のマーリンの細胞内局在を観察したところ、LMB処理後12時間でマーリンは完全に核内に蓄積することが判明した。4カ所のNES類似配列をそれぞれ部位特異的に変異させ、各種の変異NES-GFP-マーリンを細胞内に発現させて細胞内局在を観察したところ、アミノ末端側上にあるNES3, NES8, NES9はそれぞれ単独の変異で核内及び核周囲に蓄積するようになることが判明した。つまり、マーリンは細胞内で細胞膜~細胞質~核~細胞質へとシャトルするタンパク質であり、変異によるNES近傍の構造変化によってこのシャトル機構が阻害されることが推測された。

### [2] マーリン結合タンパク質の同定と相互作用

GST-マーリンカラムに結合する5種の蛋白質(125KD, 90KD, 85KD, 40KD, 35KD)の中で結合活性

の著しい125KD(p125)および85KD(p85)の部分アミノ酸配列を決定したところ、p125より得られたペプチドのアミノ酸配列全てがpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)の部分配列と一致することが、またp85は全てKu85蛋白と一致することが判明した。U251細胞可溶性蛋白質に抗PARP抗体および抗Ku85抗体を反応させて得た免疫沈降物中に抗マーリン抗体陽性のバンドが検出されたことより、細胞内でマーリンとPARPならびKu85が結合することが確認された。又、同時に抗Ku70抗体に反応するバンドが検出されたことから、NF2結合タンパク質中のP70はKu-antigen p70(Ku70)であることが判明した。これらの結合タンパク質のマーリン分子上の結合部位を同定したところ、PARPの結合には19から339番目のアミノ酸配列が、又、Ku85及びKu70では、19から400番までの配列が重要であることがわかった。これらの結合部位はNF2の高変異部位であり、変異によってこれらの結合タンパク質と相互作用できなくなることが判明した。又、PARPの酵素活性をGST-マーリンの共存下で測定したところ、マーリンの濃度依存的にPARP活性が上昇し、その結果マーリンのN末端側がpoly ADP-ribosyl化されることが判った。

### [3] マーリンの翻訳後分解機構の解析

解析した約半数の散発性髄膜腫・神経鞘腫ではNF2変異が見い出されなかったにもかかわらず、マーリンタンパクがほとんど検出されなかった。このことからマーリンの翻訳後調節、特にタンパク分解が、マーリンの不活性化に関与すると推測された。そこで、我々は種々のタンパク分解酵素阻害剤、及び活性化剤を用いて、ヒト線維芽細胞、及びCOS細胞過剰発現マーリン分子の動態を解析したところ、システインプロテアーゼ阻害剤(E64d)とカルパイン阻害剤(Z-LLal)の処理で完全長のマーリンが蓄積することが判った。更に、マーリンは細胞内においてカルパイン依存性にN末端側約35Kdの限定分解フラグメントを生じ、その後速やかに分解消失することが判明した。この35Kd分解産物のアミノ酸解析の結果、マーリンのERMドメインと $\alpha$ -ヘリックス領域間の境界部2カ所; 294K-295Lと298Q-299L間が切断部位であった(図)。更に、NF2遺伝子変異が検出されない髄膜腫及び聴神経鞘



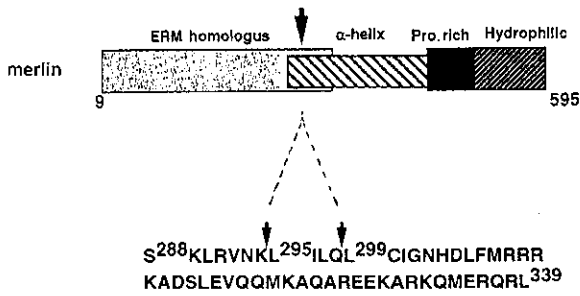


図 マーリンのカルパインによる切断部位

腫におい

て、カルパインが恒常的に活性化されており、マーリンの分解が過剰に生じていることがわかった。これらの事実から、NF2遺伝子に変異が無くても、マーリンが細胞内でカルパインによって分解を受けて不活性化されることが腫瘍化の原因となる可能性があることが示唆された<sup>9)</sup>。

### 考 察

我々はNF2遺伝子産物の細胞内局在と機能を明確にする目的で、ERM相同ドメインにexon欠如を持つ変異型マーリンと正常型マーリンの細胞内局在を詳細に検討した。その結果、正常では主に細胞質辺縁部と細胞質に発現するマーリンが、変異によって核に蓄積するようになることを明らかにした。又、マーリンのERM相同部に核外輸送シグナル(NES)配列を同定したことから、我々はNF2タンパク質は本来、核内を通過して細胞質や細胞膜にシャトルする分子として機能していることを示唆した。次に我々は、マーリンが関わる細胞内でのシグナルを明らかにするために、マーリンと会合する細胞内蛋白質(p180, p165, p125, p85, p70)の同定を試み、少なくともp125はPARP、p85はKu85、p70はKu70であることを明らかにした。PARPおよびKuは、DNA修復、細胞周期、細胞死(アポトーシス)に関連するタンパク質として知られており、マーリンがこれらの制御を介して腫瘍形成抑制に働いているという可能性が示唆された。事実、PARPおよびKuのマーリン分子上の結合部位は、NF2遺伝子の高変異部位であるN末端部であり、この部位を介して、PARPの酵素活性上昇とそれに伴うpoly ADP-ribosylationがマーリン分子上に起こることなどから、細胞内でこれらの相互作用が、マーリンを介するシグナル(増殖抑

制や生理的アポトーシスなど)のスイッチ機構になっている可能性があると考えられる。

次に私達は、正常に翻訳されたマーリン分子でも、細胞内にて何らかの機構で活性化したカルパイン等のタンパク質分解酵素依存性の過剰な分解によって、その腫瘍抑制分子としての機能が失活する可能性があることを見出した。このことは、タンパク質翻訳後の分解機構によってマーリンの腫瘍抑制シグナルが停止し、その結果腫瘍発生を導く可能性があることを示唆している。

NF2に関連した腫瘍は病理学的には良性であるが、臨床医学的には、外科手術が困難であったり再発を繰り返すために極めて重篤な疾患である。その原因因子と考えられるNF2タンパク質マーリンの腫瘍抑制機能は、マーリンを介する細胞内シグナルによる細胞増殖抑制と、脱落すべき細胞の生理的アポトーシスの誘導であると推測される。我々のこれまでの結果は、カルパイン阻害薬剤や、マーリン結合タンパク質を介した細胞内シグナルを回復させるような薬剤が、細胞増殖の抑制や再発の防止などの治療目的に応用できる可能性を示唆している。

### 文 献

- 1) Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL et al.: A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72: 791-800, 1993
- 2) Rouleau GA, Merel P, Lutchman M et al.: Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363: 515-521, 1993
- 3) Takeshima H, Izawa I, Lee P.S et al.: Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. *Oncogene* 9: 2135-2144, 1994
- 4) Koga H, Araki N, Takeshima H et al.: Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neuro-fibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17:801-810, 1998
- 5) Kimura Y, Koga H, Araki N, et al.: The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Medicine* 4:915-922, 1998

### Abstract

Analysis of relationship between functions of NF2 gene and clinical manifestations of NF2 patient

by

Hideyuki Saya, Norie Araki, Hisashi Koga, Yoriyoshi Kimura\*, Mitsuyoshi Nakao

from

Department of Tumor Genetics and Biology, Kumamoto University School of Medicine

\*Department of Neurosurgery, Shimane Medical University

The neurofibromatosis 2 (NF2) are characterized by the development of various neuroectodermal disorders and multifocal intracranial tumors. In 1993, the gene considered responsible for the genesis of NF2 was isolated on the chromosome 22q. The protein encoded by the NF2 gene, which was designated merlin, is strikingly similar in sequence to the proteins which link membrane proteins with the cytoskeleton.

Specific aim of our project is to analyze the relationship between mutations of NF2 gene and phenotypes of the cells. We first utilized a protein truncation test (PTT), which allowed rapid and sensitive detection of translation-terminating mutations, to screen for NF2 mutations. The PTT analysis demonstrated that about 80% of NF2 patients have translation-terminating mutations in the NF2 gene and that a majority of the premature terminations were caused by absence of exon(s) in the amino-terminal region of the NF2 transcript. Furthermore, we constructed mammalian expression plasmids containing wt- and various exon-missing mu-NF2 cDNAs obtained from the NF2-related tumor samples, examined the subcellular localization of each expressed protein, and compared biological responses of the wt- with the exon-mission mu-NF2 expressing cells. Our findings demonstrated that alterations in the ERM-homology domain of merlin caused a change in subcellular localization of the protein and in cell adhesion signaling.

We also found that merlin is cleaved by the calpain which is a calcium-dependent cysteine protease and considerable activation of the calpain system results in the loss of merlin expression in some schwannomas and meningiomas. Our results suggest that calpain-dependent proteolytic pathway plays a role in genesis of NF2-tumors.

## ステロール反応性転写因子 (SREBP) の 小胞体ルーブ切断プロテアーゼの精製

浜窪 隆雄    山口美峰子    白井丙午郎    児玉 龍彦

### はじめに

動脈硬化症は我が国で死亡原因の上位を占める心血管系疾患の基礎病変であり、その原因究明と予防法および治療法の確立は、高齢化社会を迎えている先進諸国にとって急務となっている。血中コレステロールレベル、とくに低比重リポ蛋白 (LDL) の濃度と急性心筋梗塞のイベント発症率とは正の相関があり血中コレステロール濃度の制御が予防および治療効果があると考えられている。実際、細胞内コレステロール合成系の律速酵素である HMG-C<sub>o</sub>A 還元酵素の阻害剤は、イベント発症率を下げ、心血管系疾患による死亡率を下げる事が報告されている。しかし、この阻害剤は酵素の阻害活性に比べ低濃度で臨床的に効果があることなどから、還元酵素阻害の直接的効果よりも、コレステロール応答性の転写調節因子 (SREBP) を介して LDL 受容体の濃度をあげ、血中コレステロール濃度を低下させている可能性が指摘されるようになった。

SREBP は bHLH 型の転写調節因子で、LDL 受容体、HMG-C<sub>o</sub>A 合成酵素および還元酵素などの細胞内コレステロール調節に重要な酵素群の、プロモーター領域に存在する SRE (ステロールレスポンシブルエレメント) を認識し結合することによって、これらの酵素の転写活性を上げる。テキサス大学のブラウンとゴールドシュタインらは、この SREBP がコレステロールによる調節を受けていることを明らかにした<sup>1)</sup>。

SREBP は分子量約 120 kD の前駆体蛋白質として合成され、小胞体膜上に 2 回膜貫通型蛋

東京大学先端科学技術研究センター

分子生物学

白として釣り針が刺さった様な形で分布する。小胞体膜は細胞膜に比べ、コレステロール含量が乏しく、細胞内コレステロールが欠乏したときは未知のプロテアーゼが活性化され、SREBP を小胞体ルーブ部で切断する (サイト 1)。この切断により、第二のプロテアーゼが働いて、SREBP の N 端断片はさらに膜貫通部分で切断を受け (サイト 2)、膜から離れて細胞質に移行し、さらに N 端に存在する核移行シグナルによって核内に輸送される<sup>2)</sup>。

以上の様に、SREBP をコレステロール濃度依存的に切断する機構が、細胞内のコレステロールフィードバック調節で最も重要な役割を果たしている。したがって、この酵素の同定およびコレステロールによる調節の分子機構の解明は新しい治療法、予防法の確立につながるものと期待される。そこでわれわれはペプチド性基質を用いた新しい *in vitro* のアッセイ法と緑色蛍光蛋白 (GFP) を活用した *in vivo* のアッセイ法を開発することにより、SREBP 変換酵素の同定に向けて蛋白精製法からのアプローチを試みた。

### 対象および方法

SREBP には 1 と 2 の 2 種類のホモロジーの高いアイソフォームが存在する。SREBP 1 は主として脂肪酸合成系の酵素の発現に関連し、SREBP 2 の発現が LDL 受容体の発現と関連していることから<sup>3)</sup>、コレステロール調節には SREBP 2 が重要であると考え、ヒト SREBP 2 の ER ループのサイト 1 切断部位を含むペプチド性の消光性基質 (Moc-GRSVLSF-Dnp) を合成した。この基質はトリプシンなどの非

特異的なプロテアーゼによっても切断を受けるため、さらにアセチル-GRSVL-アルデヒドを阻害剤として合成し、ERループアミノ酸配列特異的な活性の指標とした。

SREBPは第一膜貫通部位のN端側にアポト-シスプロテアーゼにより認識される部位があり、N端からこの部位までをGFP(緑色蛍光蛋白質)に置き換え、さらに核移行シグナル(NLS)を付加した、GFP-NLS-SREBP前駆体C端側フュージョン蛋白のコンストラクトを作成し、コレステロール代謝の研究に最適であるCHO細胞に遺伝子導入した。GFPの蛍光は、SREBP前駆体のERループでの切断により、ER膜から核内へと移行するので、これを共焦点顕微鏡で観察することにより、*in vivo*のアッセイが可能となる。

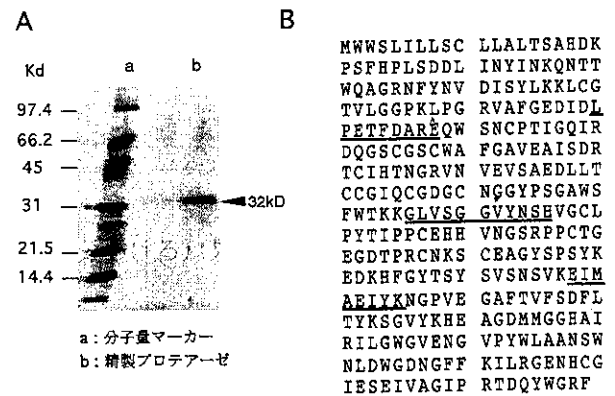
## 結果

上記の消光性ペプチド基質を用いたアッセイ系で、CHO細胞のER膜面に凍結融解により活性化される容量依存性のペプチダーゼ活性を認められた。この活性はアセチル-GRSVL-アルデヒドで阻害され( $IC_{50}$ =約50 nM)、アミノ酸配列特異性があると考えられた。そこで、ハムスター肝臓のマイクロソーム画分からこの酵素活性の精製を試みた。遠心分画したマイクロソーム画分から、0.5%MEGA9を用いて可溶化し、Superdex200のゲル濾過にかけたところ、分子量約400kd付近、および60kd、30kdの3ピークに分離され、400kd付近と30kdの2つの活性は上記の合成阻害剤で阻害された。活性量の最も多い30kd分画を陰イオン交換、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによりSDS-PAGEで単一バンド(32kd)に精製し(図1)、内部アミノ酸配列を決定したところ、得られた3種のペプチド配列はマウスカテプシンB(シングルチェーン)の配列にほぼ一致した。

また分子量40万付近の活性は0.5%lubrolにより可溶化し、陰イオン交換カラムで分離すると、活性がATP依存性(エネルギー依存性ではない)となり、アセチル-GRSVL-アル

デヒドで阻害されなくなった。さらにブルーセファロース、ConAなどのカラムクロマトグラフィーにより精製を進め、monoQカラムの活性画分のSDS-PAGE上109kdのバンドの濃度と活性の相関が認められた。そこでこの109kdの蛋白バンドをin gel digestionにより内部アミノ酸配列を決定したところ、ラットのneprilysinと一致した。

ヒトカテプシンBをGFP-NLS-SREBP恒常発現CHO細胞に強制発現させたところ、コントロールに比べ、核内GFP蛍光を持つ細胞数の増加が見られた。一方LDL受容体遺伝子プロモーター部位のルシフェラーゼによるレポーターアッセイでは、リポ蛋白欠乏血清刺激による内在性のSREBPの活性化に対して、ヒトカテプシンBによる容量依存的な抑制がみられた。



図：ハムスター肝の32kdプロテアーゼの精製。

A: SDS-PAGE B: マウスカテプシンB前駆体のアミノ酸配列。  
下線部は決定されたアミノ酸配列、\*はハムスターとの不一致部位を示す。

## 考察

SREBP2前駆体蛋白のERループ切断部位のペプチド配列をもとに消光性蛍光基質を作成し、肝マイクロソーム画分より、SREBP切断プロテアーゼを分離、同定した。今回同定したプロテアーゼで、アセチル-GRSVL-アルデヒドに特異的に阻害されるのは、32kdのカテプシンBのみであった。一方ゲル濾過で40万付近に溶出される活性はneprilysinが主体と考えられるが、分子量が大きいことと、部分精製段階

で阻害作用が消失しA T P依存性（A T Pアナログでも同様の活性化がみられる）となることなどから，特異性や活性調節には他の蛋白質あるいは補酵素との会合が必要である可能性が考えられた。

ルシフェラーゼを用いるレポーター遺伝子による内在性S R E B Pの切断アッセイ系の結果から，カテプシンBはむしろS R E B Pの分解系としての活性を持っていると考えられ，G F Pを用いた核移行のアッセイ系でみられる核移行の促進と異なる結果となった。この点に関しては，強制発現系ではプロテアーゼと基質であるS R E B Pの量比の問題があることから，現在，誘導的恒常発現の系を作成し検討中である。また最近S a k a iらによってC H O細胞のミュータントを用いてサイト1プロテアーゼ（S 1 P）が同定された<sup>5)</sup>。S 1 Pはズブチリシン様の膜プロテアーゼであり，われわれの同定したものは異なる。われわれのアッセイ系で活性が確認されるかどうかおよびカテプシン B との関連がないかどうか，今後検討したい。

protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell* 2, 505-514, 1998.

## 文 献

- 1 ) Brown, M.S. and Goldstein, J.L.: The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* 89: 331-340, 1997
- 2 ) Sakai, J, Duncan E A, Rawson R B, Hua X, Brown M S, and Goldstein, J L.: Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85: 1037-1046, 1996
- 3 ) Kawabe, Y., Honda, M. et al: Sterol mediated regulation of SREBP-1a, 1b, 1c and SREBP-2 in cultured human cells. *B.B.R.C.* 202: 1460-1467, 1994
- 4 ) Pai, J-T., Brown, M.S., and Goldstein, J.L.: Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cysteine protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5437-5442, 1996
- 5 ) Sakai, J, Rawson, R B, Espenshade, P J, Cheng D, Seegmiller, A C, Goldstein, J L, and M S Brown: Molecular identification of the sterol-regulated luminal

## Abstract

### Identification of SREBP Cleaving Enzymes in Hamster Liver

by

Takao Hamakubo, Mineko Yamaguchi, Heigoro Shirai, Tatsuhiko Kodama

from

Molecular Biology and Medicine  
Research Center for Advanced Science and Technology  
The University of Tokyo

Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) are the transcription factors for cholesterol metabolic enzymes and low density lipoprotein receptor. The SREBP precursor proteins exist in endoplasmic reticulum (ER) and nuclear membranes, and are cleaved at two sites to generate mature SREBPs when the cells are depleted of cholesterol. Thus the cleaving enzymes of SREBPs are key molecule for understanding of cholesterol feedback regulation. [Methods] The peptidic fluorescent substrate, MOAc-GRSVLSFK(Dnp)rr-NH<sub>2</sub>, was designed according to the proposed cleaving site of human SREBP2. The microsomal fraction prepared from hamster liver showed dose dependent activity to the peptidic substrate after freeze-thaw. This activity was blocked by specific inhibitor, Ac-GRSVL-aldehyde, at IC<sub>50</sub>=40 nM, whereas trypsin also cleaved this substrate but not inhibited by the same inhibitor up to 10mM. After solubilization by 0.5% mega9, active fractions were separated by superdex S200 into three major peaks(400kd, 60kd, 32kd). Among these activities, only 32kd peak was susceptible to Ac-GRSVL-aldehyde. Following several column chromatographies, 32kd activity was purified as a single band protein on SDS-PAGE. Internal amino acid sequence analyses revealed that this enzyme as a single chain cathepsin B. [Results and discussion] Using the peptidic substrate specifically designed for SREBP2 processing enzyme, we purified cathepsin B as a candidate enzyme. Recently, Brown and Goldstein's group reported subtilisin like S1P protease as a compensational enzyme for S1P deleted CHO mutant cell line. Although a possibility remains that S1P act as a processing enzyme for cathepsin B, our results of luciferase reporter gene assay supported that cathepsin B acts as degrading enzyme for SREBPs.

## 原発性低脂血症の病因に関する研究

石橋 俊、大橋 健、矢崎義雄、山田信博、  
永井良三\*、山本訓代†、湯川 進†

### はじめに

原発性低脂血症は遺伝性の低脂血症の総称であり、血清リポタンパクを構成する脂質であるコレステロール、トリグリセリド、リン脂質のすべての脂質分子種の低下をきたし得るが、主に血清総コレステロール値の低値を手がかりに診断されることが多い。更に、アポ B 含有リポタンパクが欠損するタイプとアポ A 含有リポタンパクが欠損するタイプに大別される。前者は更に、常染色体優性遺伝する低ベータリポタンパク血症(hypobetalipoproteinemia; HBLP)と同じく劣性遺伝する無ベータリポタンパク血症(abetalipoproteinemia: ABLP)が代表的疾患として知られる。両疾患とも、ホモ接合体の重症例においては脊髄小脳変性症を合併し、有棘赤血球による貧血、網膜色素変性症、脂肪吸収障害に起因する下痢などの多彩な症状を呈し得る<sup>1)</sup>。

近年、S. Young らにより HBLP はアポ B の異常に由来し<sup>2)</sup>、Wetterau らにより ABLP はマイクロゾーマルトリグリセリド転送蛋白(Microsomal triglyceride transfer protein; MTP)の異常に由来することが明らかにされた<sup>3)</sup>。各々の疾患における遺伝子異常も HBLP においては 30 余家系<sup>4)</sup>、ABLP においても 10 家系前後報告されてきた<sup>5)</sup>。しかるに、これらはすべて欧米の報告例であり、本邦における遺伝子異常の報告はない。HBLP に至っては、疾患の存在の報告すらない。このことから、我が国における HBLP の存在を懐疑視する説もあった。

原発性低脂血症研究の意義は、単に、実態の解

明や適切な治療法の開発に留まらず、より高頻度で臨床的重要性も高い高脂血症に対する新たな治療法開発に糸口を与える可能性がある<sup>6)</sup>。

最近我々は、HBLP と ABLP の家系を相次いで経験し、それぞれの遺伝子異常を同定した<sup>7)</sup>。

### 対象および方法

症例 1 は 32 歳女性。両親はいとこ婚。検診で著明な低脂血症を指摘された。幼少時から油ものを食すると下痢する傾向があり、避けてきた以外に著患なし。150cm/42kg。深部腱反射の減弱と Romberg 徴候を認めた。表 1 に示す検査値以外に、Hb 12.8g/dl で有棘赤血球が認められた。内視鏡検査にて十二指腸粘膜は粗造な白色霜降り状で、生検組織の光顕像では脂肪蓄積による多数の空胞が認められた。

症例 2 は 27 歳男性。両親は血族結婚。生来健康で、22 歳の入社検診時に低脂血症を指摘されたが、自覚症状とも異常は認められなかった。腹部超音波検査で軽度の脂肪肝が認められた。

症例 3 は 57 歳女性。肝腫瘍精査のため受診した際、低脂血症を指摘された。喘息、夜盲症、糖尿病、出血性緑内障などの既往を有する。32 歳と 30 歳の 2 人の息子に低脂血症が認められた。145cm/37.5kg、右眼失明、左眼視力低下と視野狭窄。眼底には網膜色素斑、硬性白斑、光凝固斑が認められた。Glove-stocking-type の末梢神経障害、下部腱反射の消失と Romberg 徴候が認められた。Hb 7g/dl で有棘赤血球を認め、尿蛋白陽性、腎機能低下が認められた。網

東京大学医学部、内科

\* 群馬大学医学部、第 2 内科

† 和歌山県立医科大学、第 3 内科

膜電図は平坦、腹部 CT で、腹腔、脾、総肝、腎、上腸間膜動脈および腹部大動脈の石灰化が認められた。また、肝右葉の血管腫と胆石が認められた。肝生検では軽度の脂肪変性、絶食後の十二指腸生検では、脂質沈着は顕微鏡では明らかではなかったが、電顕で中等量の脂肪滴の存在が確認された。

血漿リポ蛋白分析：段階的超遠心法により、VLDL, IDL, LDL, HDL<sub>2</sub>, HDL<sub>3</sub> を分取し脱塩・脱脂後 SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、アポ蛋白を調べた。

アポ B と MTP 遺伝子のハプロタイプ解析：末梢血は血球より調整したゲノム DNA を鋳型にして PCR を行う。アポ B 遺伝子 3'末端の variable number of tandem repeat (3'VNTR)および MTP 遺伝子イントロン 10 の CA-repeat を含む断端を増幅し、アガロースゲル電気泳動によりハプロタイプ解析を行った。

MTP 遺伝子変異の同定：プロモーター領域として 5'上流 189 塩基を含む前 18 エクソンについてエクソン-イントロン接合部を含む領域を PCR 法にて増幅し塩基配列を決定した。

ヒト MTP 発現ベクター：野生型 MTP の発現ベクター(pSV/MTP)は Shoulder 博士から供与を受けた。pSV/MTP をテンプレートとして、recombinant PCR 法により変異を導入した。COS-1 細胞に発現ベクターと pSV-β-galactosidase のコントロールベクターをエレクトロポレーション法により導入した。細胞を超音波破碎し、デオキシコール酸で MTP を可溶化した。イムノプロットとトリグリセリド転送活性を測定した。

アポ B 遺伝子変異の同定：アポ B 遺伝子の変異が推定される領域を 581 塩基 (アポ B cDNA5271-5852) にわたって PCR 法にて増幅し、塩基配列を決定した。

表 1. 検査値

	症例 1	症例 2	症例 3
性	F	M	F
年齢	32	27	57

TC (mg/dl)	42	34	98
TG (mg/dl)	0.2	2.6	66
HDL-C (mg/dl)	36	23	77
PL (mg/dl)	64.8	59.4	178
NEFA (mEq/l)	220	258	143
Apo A-I (mg/dl)	61.6	54.5	133
Apo A-II (mg/dl)	12.9	13.9	22.8
Apo B (mg/dl)	1.9	0.6	3.0
Apo C-II (mg/dl)	2.0	1.4	3.2
Apo C-III (mg/dl)	1.6	1.0	7.5
Apo E (mg/dl)	3.0	3.2	3.5
Lp(a) (mg/dl)	2.3	4.8	5.6
Vitamin E (mg/l)	<1	<1	7
Vitamin A (ng/ml)	87	301	286

## 結果

リポ蛋白解析の結果、症例 1、2 では脂質は全般に著しい低値を示し、特にトリグリセリドは殆ど存在しない。コレステロール分画では HDL-C は比較的保たれており、血漿コレステロールの 80-90% を占めていた。症例 3 の LDL コレステロールはわずか 4.6mg/dl に過ぎず、81%のコレステロールが HDL に存在した。

症例 1 ではアポ B locus はホモ (β37/β 37) で、MTP locus はヘテロであり、HBLP のホモ接合体であることが強く示唆された。一方、症例 2、3 ではアポ B locus はヘテロで MTP locus はホモであった。

症例 1 では MTP のエクソン 11 内の cDNA1385-1389 の 5 連続のアデニンの一つが欠失した結果、462 番目のコドンの後でフレームシフトを生じ、14 個のアミノ酸をコードした後、ストップコドンが出現することが判明した。

症例 2 は、エクソン 16 内の cDNA2338 番目の A-T 置換の結果、780 番目のアスパラギンからチロシンに変わるミスセンス変異 Asn780Tyr のホモ接合体であった。本変異を有する MTP の発現ベクターを構築し、COS-1 細胞において発現実験を行った。変異



MTPは殆ど活性が検出されなかった。

症例3のリポタンパク SDS-PAGEにて、分子量195kDaに相当する異常バンドがVLDL, LDL, HDLの各分画に認められ、 $d>1.21\text{g/ml}$ の分画には観察されなかった。アポB-100もアポB-48も検出されなかった。1755番目のコドンがグルタミン(CAA)からストップ(TAA)になることが判明した。その結果、短縮アポB変異体を生じその長さは正常のアポB-100の38.7%に相当する。

#### 考察

原発性低脂血症3例を経験し、それぞれの遺伝子変異を同定した。特に、症例3については、HBLPとしてもアポB変異としても本邦で初めての報告である。また、症例1, 2については、MTP遺伝子異常としては最初の報告でもある。

症例1と2の特徴は、軽微な臨床症状である。これまでに報告されてきたABLP症例の大部分は、乳児期に成長不良などで発見され、成人例では高度の神経症状を伴う例が多いが、それらの症例に匹敵する程のアポB低値、ビタミンE低値を呈しながら、我々の経験した症例は2例ともに、臨床症状は軽微であった。MTPの活性は症例1でも殆ど欠損していることが予想され、症例2でも発現実験において欠損が示されている。従って、軽症の理由はMTP欠損が不完全なためではなく、他の遺伝的素因か環境因子の影響の関与が考えられた。

症例3について特記すべきことは、多彩な合併症である。神経症状、網膜症状などはHBLPに特異的に合併することが知られ、胆石症の合併も報告されているが、糖尿病、肝血管腫、動脈石灰化の合併などの記載はこれまでにない。神経、眼、腎所見のかなりの部分は糖尿病性細小血管症で説明可能である。一般に、アポBの異常低値を示す本疾患には動脈硬化性疾患の合併は稀とされており、その意味において、本症例に観察された広汎な動脈石灰化は興味深い。

原発性低脂血症は本邦においても少なからぬ存

在が推測され、今後の実態調査を期待したい。

謝辞 pSV/MTPを供与頂きましたShoulder博士に慎んで御礼申し上げます。

#### 文献

- 1) Kane, JP, Havel RJ: Disorder of the biogenesis and secretion of lipoprotein containing the B apolipoproteins. In *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*. 7<sup>th</sup> edition, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. McGraw-Hill, New York, 1853-1885, 1995.
- 2) Young SG, Bertics SJ, Curtiss, LK et al.: Characterization of an abnormal species of apolipoprotein B, apolipoprotein B-37, associated with familial hypobetalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 79:1831-1841, 1987.
- 3) Sharp D, Blinderman L, Combs KA et al.: Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia. *Nature* 365:65-69, 1993.
- 4) Linton MF, Farese RV, Young SG: Familial hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 34:521-541, 1993.
- 5) Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, et al.: Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum. Mol. Gen.* 2:2109-2116, 1993.
- 6) Wetterau JR, Gregg RE, Harrity TW, et al.: An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. *Science* 282:751-754, 1998.
- 7) Ohashi K, Ishibashi S, Yamamoto M et al.: A truncated species of apolipoprotein B (B-38.7) in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia associated with diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1330-1334, 1998.

## Abstract

### Molecular pathogenesis of primary hypolipoproteinemia

By

Shun Ishibashi, Ken Ohashi, Yoshio Yazaki, Nobuhiro Yamada, Ryouzou Nagai, Michiyo Yamamoto, Susumu Yukawa

from

University of Tokyo, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine,  
Gumma University, Faculty of Medicine, Second Department of Internal Medicine,  
Wakayama Medical College, Third Department of Internal Medicine

[Purpose] The aim of this study is to clarify the molecular pathogenesis of two forms of primary hypolipoproteinemia: autosomal recessive abetalipoproteinemia (ABLP) and autosomal dominant hypobetalipoproteinemia (HBLP) [Method] Three cases of primary hypolipoproteinemia were investigated: case 1, a 32-year-old female; case 2, a 27-year-old male; a 57-year-old female. Lipoproteins were analyzed by ultracentrifugation. Apolipoproteins were analyzed by SDS-PAGE. Haplotype analyses were carried out by PCR for apolipoprotein (apo) B and microsomal triglyceride transfer protein (MTP). Nucleotide sequences of the respective genes were determined. A mutant MTP cDNA was expressed in COS-1 cells, and the MTP activities were measured. [Results] In case 1, an adenine was deleted in nt1385-1389 of the MTP cDNA, causing a frameshift mutation. In case 2, an A to T substitution at nt 2338 of the MTP cDNA caused Asn780Tyr missense mutation. MTP activities were not detectable in the microsomal fraction of the COS-1 cells transfected with the expression vector for this mutant MTP. In case 3, SDS-PAGE of the lipoprotein fractions revealed the presence of a truncated species of apo B in VLDL, LDL and HDL, but not in the  $d > 1.21\text{g/ml}$  fraction. A C to T substitution was found in nt 5472 of the apo B cDNA. This non-sense mutation produced a truncated apo B, apo B38.7. [Conclusion] In Japanese, we identified novel mutations in both MTP and apo B genes.

## 中枢性摂食異常症におけるエネルギー代謝調節の分子機構

細田 公則

### はじめに

エネルギー代謝調節系は中枢性摂食異常症の病態生理で重要な役割を果たしている。本研究ではエネルギー代謝調節系の分子機構、中枢性摂食異常症でのエネルギー代謝調節系の異常を検討した。肥満は中枢性摂食異常症の一つである過食症の主な表現型であり、また生活習慣病の主なリスクファクターの一つである。肥満もエネルギー代謝調節の異常により生ずるので、肥満の分子機構と病態生理の解明、診断・治療法の開発と言う視点も含めた。

レプチンは摂食調節系の主要な分子で、脂肪組織より分泌されるホルモンで、視床下部を介して摂食を抑制する。我々などにより遺伝性肥満動物でレプチン遺伝子またはレプチン受容体遺伝子の遺伝子異常が同定され、肥満の原因となっていることが明らかにされている<sup>1)</sup>。レプチン遺伝子に異常のない肥満動物やヒト肥満でレプチンの遺伝子発現と血中レプチン濃度の上昇、血中レプチン濃度を上昇させる因子としてグルココルチコイドなど、低下させる因子として絶食や交感神経系活性化などが明らかになっている。

本研究では、第一に中枢性摂食異常症の代表的疾患の神経性食欲不振症 (AN) における血中レプチン濃度を検討した。第二にレプチン遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、レプチンの生理的意義を検討した。第三にエネルギー

消費調節系の研究を行った。この背景としてエネルギー消費調節系の研究は遅れており、褐色脂肪特異的な脱共役蛋白質1 (UCP1) が知られているのみで、ヒトでは褐色脂肪がほとんど存在しないので、ヒトでのUCP1の臨床的意義が否定的である点がある。最近同定されたUCP2は全身組織に発現する<sup>2)</sup>が、エネルギー消費調節で重要な骨格筋での濃度は低く、別のサブタイプのUCPの存在が推定されていた。我々は既にUCP2とのホモロジーを用いたRT-PCR法により、骨格筋に高濃度発現するUCP3をクローニングしている<sup>3)</sup>。UCP3の遺伝子発現調節機構の解明の目的で、エネルギー代謝の状態を伝達する核内転写因子の Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) のアゴニストで、インスリン感受性増強薬のチアゾリジンによるUCP3遺伝子発現調節を検討し<sup>4)</sup>、エネルギー消費調節の転写調節機構の解明を行った。

### 対象および方法

1 中枢性摂食異常症での血中レプチン濃度の検討  
対象は17.6<BMI<24.00の非肥満非やせ健常女性26名、ANで体重が標準体重 (平田の式による) の85%以下の低体重群の女性患者20名、ANと過去2年以内に診断され、その後の治療により体重が標準体重の85%以上へ回復している回復体重群の女性患者8名である。早朝空腹時に、安静臥床で採血した。レプチンの測定には我々の確立したヒトレプチンのradioimmunoassay系で、統計解析はone-way ANOVAによる。値はmean $\pm$ SEで示し

た。

2 レプチン過剰発現トランスジェニックマウス  
マウスレプチン遺伝子を肝細胞特異的Serum amyloid component Pプロモーターで過剰発現させるベクターを作製し、BDF1マウスの受精卵にマイクロインジェクトし、トランスジェニックマウスを得た。その体重の推移を検討し、解剖学的な解析を行った。

3 チアゾリジンによるUCP3遺伝子発現調節

遺伝性肥満Wistar fatty ラットでチアゾリジンのピオグリタゾン $3\text{mg/kg/日}$ の投与を2週間行い、骨格筋、白色脂肪、褐色脂肪のUCPファミリー遺伝子発現を検討した。SDラット副精巣周囲白色脂肪初代培養でピオグリタゾン、別のチアゾリジンのトログリタゾンによるUCP3、UCP2の遺伝子発現調節を検討した。

## 結果

1 中枢性摂食異常症での血中レプチン濃度の検討

血漿レプチン濃度は非肥満非やせ健康女性で $9.22\pm 1.33\text{ng/ml}$ 、低体重群ANの患者20名中8名で $0.1\text{ng/ml}$ の感度以下、測定可能な12名で $0.42\pm 0.07\text{ng/ml}$ と著明に低値であった( $P<0.001$ )。回復体重群では $5.0\pm 0.8\text{ng/ml}$ と低体重群より明らかに高値であった( $P<0.005$ )。低体重群のすべての患者が無月経で、回復体重群のすべての患者で月経異常が認められなかった。

2 レプチン過剰発現トランスジェニックマウス

レプチン過剰発現トランスジェニックマウスの血中レプチン濃度は約 $60\text{ng/ml}$ と対照マウスの約5倍であり、その摂食量と体重は対照マウスの約70%であり、また白色脂肪組織と褐色脂肪組織の大半が欠如した"fatless mouse"であった。

3 チアゾリジンによるUCP3遺伝子発現調節

ピオグリタゾン投与Wistar fatty ラットでUCP3遺伝子発現は副精巣周囲白色脂肪、後腹膜脂肪、褐色脂肪で2.1倍、2.0倍、1.6倍に有意に上昇した。ピオグリタゾン投与Wistar lean ラットでのUCP3遺伝子発現は褐色脂肪でのみ1.3倍に有意に上昇した。UCP2遺伝子発現はいずれのラットでも有意に変化しなかった<sup>4)</sup>。ラット白色脂肪細胞初代培養系でUCP3遺伝子発現はピオグリタゾン $10^{-6}\text{M}$ 以上の濃度で、用量依存性に有意に上昇した。

トログリタゾンでも同様に上昇した。UCP2遺伝子発現はピオグリタゾン、トログリタゾンのいずれでも有意に変化しなかった<sup>4)</sup>。

## 考察

ANの治療経過の指標としてのレプチンの意義が示唆された。ANの視床下部一下垂体一性腺系の異常におけるレプチンの意義の解明が注目される。神経性食欲不振症における血中レプチン濃度の動きは従来のアッセイ系の感度付近であったが、最近我々は極めて高感度のアッセイ系の確立に成功しており、今後の臨床応用が期待される<sup>5)</sup>。

レプチン過剰発現トランスジェニックマウスの作製に成功し、これは対照の約70%の体重であり、脂肪組織の欠如したfatless mouseであった。血中レプチン濃度の慢性の高値でも摂食抑制作用が持続することが明らかになった。レプチン過剰発現トランスジェニックマウスは、その長期慢性作用の検討に有用と考えられる。

チアゾリジンは褐色脂肪、白色脂肪でUCP3遺伝子発現を増加させることが明らかとなった。増加したUCP3はチアゾリジンのエネルギー消費亢進作用、糖脂質代謝改善作用に関与する可能性が示唆された。チアゾリジンが生体でエネルギー代謝のバランスを調節することが示唆された。

今後、レプチンに代表される摂食調節系、及びUCPファミリーなどのエネルギー消費調節系の分子機構(図)で、未解明の部分を明らかにし、中枢性摂食異常症と肥満において、これらの分子機構の異常を検討することが重要である。