
新たな血管の老化予防法の開発をめざした コレステロール逆転送系調節機序の解明

(H11-長寿-003)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）総括・分担研究報告書

平成12年3月

主任研究者 堀内正公（熊本大学医学部生化学第二講座 教授）
分担研究者 横山信治（名古屋市立大学医学部生化学第一講座 教授）
松本明世（国立健康栄養研究所 臨床栄養部 分子栄養研究室長）
新井洋由（東京大学大学院 薬学系研究科 助教授）

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

新たな血管の老化予防法の開発をめざしたコレステロール逆転送系調節機序の解明

主任研究者 堀内 正公 熊本大学医学部生化学第二講座 教授

末梢細胞から肝臓に至るコレステロール逆転送系の調節機構の解析を行った。細胞の遊離コレステロールを調節するコレステロールエステル化酵素、ACAT-1 は活性型ビタミンDにより THP-1 細胞に発現誘導された。ヒトマクロファージ由来泡沫細胞には小胞体に由来する ACAT-1 陽性のベジクルが多数みられた。アポ A-I による HDL 新生反応には、単球・マクロファージの分化に伴って発現増加する caveolin-1 の関与が示唆された。プロブコールはアポ A-I による HDL 新生を抑制し、マウスの血中 HDL レベルを減少させた。高度不飽和脂肪酸は HepG2 細胞におけるコレステロールエステル転送蛋白質の発現を抑制した。肝細胞の HDL 受容体 (SR-BI) の結合蛋白質として同定された CLAMP は、肝臓のシヌソイド膜側で SR-BI と生理的に結合していることが示された。CLAMP は SR-BI の安定性を高めると同時に、SR-BI を介して取り込まれたコレステロールエステルの細胞内輸送及び代謝経路を決定する役割を果たしている可能性が示唆された。

分担研究者

横山 信治 名古屋市立大学医学部
生化学第一講座 教授
松本 明世 国立健康栄養研究所
分子栄養研究室長
新井 洋由 東京大学大学院
薬学系研究科 助教授

細胞に蓄積したコレステロールが、HDL 或いは HDL の主要アポリポ蛋白質であるアポ A-I によって引き抜かれ、HDL 粒子上でのコレステロールエステル (CE) への変換を経てコレステロールエステル転送蛋白質 (CETP) による LDL (低比重リポ蛋白質) や VLDL (超低比重リポ蛋白質) への CE の転送によって、或いは HDL から HDL 受容体である SR-BI を介して直接 CE が肝細胞に取りこまれる一連の過程である。結果として、動脈硬化病変の進展抑制、更には退縮が期待され、抗動脈硬化的に作用すると考えられている。

A. 研究目的

高脂血症・動脈硬化は、日本人の死因の第二位をしめる心臓病、特に虚血性心疾患の最も重要な基礎病態である。臨床疫学的な研究から、血中 HDL (高比重リポ蛋白質) コレステロール値と虚血性心疾患の発症頻度の間には、負の相関が認められている。この事実を生理学的に説明するものとして、コレステロール逆転送系 (reverse cholesterol transport) が存在する。本経路は、末梢細胞から肝臓に至るコレステロールのダイナミックな代謝系である。すなわち、動脈硬化病変のマクロファージ由来泡沫細胞などの末梢細

胞に蓄積したコレステロールが、HDL 或いは HDL の主要アポリポ蛋白質であるアポ A-I によって引き抜かれ、HDL 粒子上でのコレステロールエステル (CE) への変換を経てコレステロールエステル転送蛋白質 (CETP) による LDL (低比重リポ蛋白質) や VLDL (超低比重リポ蛋白質) への CE の転送によって、或いは HDL から HDL 受容体である SR-BI を介して直接 CE が肝細胞に取りこまれる一連の過程である。結果として、動脈硬化病変の進展抑制、更には退縮が期待され、抗動脈硬化的に作用すると考えられている。

「HDL = 善玉コレステロール」として一般に受け入れられているが、HDL がなぜ善玉でありうるのかといった基本的な問題に対する解答のないまま概念だけが先行したきらいがある。そこで本研究では、コレステロール逆転送系に関与する個々の機能分子の構造及び機能を解明することを目的としている。具体的には、堀内が総括及び HDL による引き抜きの対象となる細胞の遊離コレステロールプール

の調節機序を、横山が遊離コレステロールの細胞膜への輸送とアポ蛋白 A-I による引き抜きの分子機序を、松本が CETP 遺伝子の脂肪酸による発現調節機構を、更に新井がコレステロール逆転送系の最終ステップの HDL から肝細胞への CE の選択的輸送系の機構の解析を担当する。得られる成果は、コレステロール恒常性の理解と、HDL 機能に基づいた新たな動脈硬化剤の開発並びに予防法の確立に、基礎的な情報を提供することが期待される。

B. 研究方法

堀内は、細胞内の遊離コレステロールレベルを調節している酵素、アシル CoA:コレステロールアシル基転移酵素 (ACAT) のアイソザイムの活性調節機構を、マクロファージに発現する ACAT アイソザイムである ACAT-1 に注目して検討した。具体的には、ヒト単球白血病細胞、THP-1 細胞を 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃、9-シス-レチノイン酸などの分化誘導因子と保温し、ACAT-1 発現に対する効果を検討した。またヒト単球由来マクロファージにおける ACAT-1 の細胞内局在を、ヒト ACAT-1 特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡にて超微形態学的に検討した。同時にアセチル LDL による泡沫化による ACAT-1 の細胞内局在の変化を検討した。

横山は、マウス白血病細胞 RAW264 を用い、アポ A-I の結合と HDL 新生の関連、cAMP の HDL 新生に対する効果を検討した。また THP-1 細胞をホルボールエステ (PMA) で分化を誘導し、カベオラに存在するコレステロール結合蛋白である caveolin-1、タンジール病の原因遺伝子と目される ABC1 の発現と HDL 新生の関連を検討した。さらにマウスに抗酸化剤として動脈硬化治療に用いられているプロブコールを投与し、血中脂質に対する影響、腹腔マクロファージの HDL 新生に対する影響を検討した。

松本は、ヒト肝癌細胞 (HepG2 細胞) を用い、種々の遊離脂肪酸の CETP 発現に対する効果を検討した。具体的には HepG2 細胞を種々

の脂肪酸と保温した後、細胞に発現する CETP mRNA をノーザンブロットにて、培地中へ放出される CETP 蛋白を ELISA 法で測定した。

新井は、HDL 受容体である SR-BI の細胞質部分に結合する蛋白質として同定された CLAMP の生理的役割を検討した。具体的には、ラット肝臓における SR-BI と CLAMP の生理的結合状態を特異抗体を用いた免疫沈降法にて検討した。また CLAMP を恒常的に発現した CHO 細胞に SR-BI をさらに一過性に発現させ、SR-BI 及び CLAMP の細胞内分布を免疫細胞染色で検討した。両者を共発現させた CHO 細胞を用いて、HDL コレステロールの取り込み、細胞内コレステロール代謝における CLAMP の役割を検討した。ラット肝臓の膜面分からシヌソイド膜とカナリキュラー膜を調製し、CLAMP の局在を検討した。

C. 結果と考察

堀内は、THP-1 細胞を 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃、9-シス-レチノイン酸で処理すると、ACAT-1 蛋白、mRNA 及び ACAT 活性が有意に上昇することを認めた。特に 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ は生理的な濃度で ACAT-1 の発現を誘導するため、単球・マクロファージの ACAT-1 発現誘導因子として注目される。ヒトマクロファージにおける ACAT-1 の細胞内局在を超微形態学的に検討すると、定常状態のマクロファージでは ACAT-1 は小胞体に局限しているが、アセチル LDL でマクロファージを泡沫化すると、50-150 nm の ACAT-1 陽性のベジクルが細胞内に多数形成された。小胞体のマーカーである GRP-78 を用いてもベジクルがみられ、泡沫化に伴う小胞体のベジクル化が生じていることが示唆された。この ACAT-1 陽性ベジクルの形成は、遊離コレステロールの ACAT-1 への近接を促進し ACAT 反応を促進している可能性がある。

横山は、Raw264 からの脂質の放出 (HDL 新生) はアポ A-I の結合量に相関することをみいだした。未分化 THP-1 細胞でもアポ A-I による HDL 新生はおこるが、生じた HDL はリン

脂質を含むもののコレステロールを含まなかった。PMA で分化を誘導すると caveolin-1、ABC1 の発現が増加し、新生 HDL へのコレステロール積み込みも増加した。このときアンチセンス DNA により caveolin-1 の発現を抑制するとコレステロールの積み込みは減少した。以上の結果から caveolin-1 がアポ A-I による HDL 新生に必須の役割を果たしていることが示唆された。マウスにプロブコールを投与すると血中 HDL の急激な減少が生じた。この時採取した腹腔マクロファージはアポ A-I による HDL 新生が低下しており、タンジール病と同様の病態が生起していることが示唆された。

松本は、HepG2 細胞を長鎖不飽和脂肪酸と保温すると細胞の CETP mRNA、培地中に分泌された CETP 蛋白質とも有意に低下することをみいだした。特に不飽和度 4 以上のアラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸でその効果が顕著であった。

新井は、ラット肝臓膜画分を可溶化し抗 CLAMP 抗体による免疫沈降を行うと SR-BI も共沈することをみいだした。CLAMP を CHO 細胞に発現させ免疫細胞染色を行うと、細胞質全体が染色されたが、SR-BI を共発現させると CLAMP は細胞膜周辺に限局して染色された。以上の結果は、SR-BI と CLAMP が生理的状态で結合することを強く示唆する。SR-BI、CLAMP を共発現した CHO 細胞は、SR-BI 単独発現細胞に比し SR-BI 蛋白質の発現が多く、HDL 結合量、HDL 中の放射標識 CE の選択的取り込みも上昇していた。放射標識 CE の細胞内での代謝を検討すると、SR-BI、CLAMP 共発現細胞では SR-BI 単独発現細胞に比し、CE から遊離コレステロールへの変換が抑制されていた。この結果は CLAMP が細胞内の CE の輸送・代謝を規定している可能性を示唆している。シヌソイド膜、カナリキュラー膜における CLAMP の分布を検討してみると、シヌソイド膜に存在することが明らかになった。

D. 結論

- 1) ACAT の活性調節機構について、単球・マクロファージにおける ACAT-1 発現誘導因子として 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ を同定した。マクロファージの泡沫化に伴い、小胞体由来する ACAT-1 陽性のベジクルが多数生じた。
- 2) アポリポ蛋白質による HDL 新生反応について、単球・マクロファージの分化に伴って発現が増加する caveolin-1 の関与が示唆された。プロブコールはアポ A-I による HDL 新生を抑制し、マウスの血中 HDL レベルを減少させた。
- 3) 高度不飽和脂肪酸は HepG2 細胞における CETP の発現を抑制した。
- 4) HDL から肝細胞への CE の選択的輸送系に関して、HDL 受容体結合蛋白質 (CLAMP) のモノクローナル抗体を作製し、SR-BI と CLAMP が肝臓のシヌソイド膜側で生理的に結合していることを明らかにした。CLAMP は SR-BI の安定性を高めると同時に、レセプターを介して取り込まれた CE の細胞内輸送及び代謝経路を決定する役割を果たしている可能性が示唆された。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

新たな血管の老化予防法の開発をめざしたコレステロール逆転送系調節機序の解明
—細胞内遊離コレステロールプール調節機序—

主任研究者 堀内 正公 熊本大学医学部生化学第二講座 教授

細胞内遊離コレステロールのレベルを調節しているアシル CoA:コレステロールアシル基転移酵素(ACAT)の発現調節因子を同定した。ヒト単球白血病細胞 (THP-1 細胞) を生理的濃度の 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ で処理すると、ACAT アイソザイムの一つである ACAT-1 の発現が誘導された。抗 ACAT-1 抗体を用いた免疫電子顕微鏡によりマクロファージ内の ACAT-1 の局在を検討すると、定常状態のマクロファージでは粗面小胞体に局限していたが、アセチル LDL で泡沫化したマクロファージでは、は 50-150 nm の ACAT-1 陽性ベジクルが細胞内多数形成されていた。

A. 研究目的

細胞のコレステロールには遊離コレステロールとコレステロールエステル(CE)が存在する。遊離コレステロールが一定のレベルを越えると Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) の作用によりアシル CoA からアシル基が転移され CE に変換される。生じた CE はコレステロールエステラーゼにより再び遊離コレステロールに変換される。この細胞内のコレステロールと CE の代謝サイクルをコレステロールエステルサイクルといい、遊離コレステロールの調節に重要な役割を持つ。

ACAT は、腸管からのコレステロールの吸収及びキロミクロンの合成、肝臓における VLDL の合成、副腎皮質などのステロイドホルモン産生臓器のホルモン前駆体としてのコレステロール貯蔵が主たる生理的役目と考えられる。病態生理学的には、動脈硬化初期病変のマクロファージ由来泡沫細胞の形成(CE 蓄積)に重要な役割を持つ。現在 ACAT には、副腎、マクロファージに発現する ACAT-1、肝臓、小腸に発現する ACAT-2 の二つのアイソザイムが知られている(ヒトの肝臓 ACAT は例外的に ACAT-1)。

動脈硬化病変、特にマクロファージ由来泡沫細胞は ACAT-1 を高度に発現している。その

メカニズムを説明するものとして、単球・マクロファージの分化に伴う ACAT-1 の発現誘導があげられる。しかし分化に伴う ACAT-1 発現誘導に関与する因子に関しては未だ明らかでない。本研究ではヒト単球のモデルとして単球白血病細胞 (THP-1 細胞) を用いて、種々の(血清)因子の ACAT-1 誘導作用を検討した。従来より ACAT は小胞体(ミクロソーム)に局在する細胞内酵素であると言われてきたが、免疫電子顕微鏡を用いて培養ヒトマクロファージにおける ACAT-1 の細胞内局在を検討した。またヒトマクロファージをアセチル化 LDL と保温して泡沫化し、これに伴う ACAT-1 の細胞内局在の変化を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養: ヒト単核細胞(リンパ球、単球)を健常ヒト血液から Ficoll/Hypaque を用いて分離し、10%の自己血清を含む RPMI-1640 と 7日間培養して成熟マクロファージを得た。成熟マクロファージをさらに 100 mg/ml のアセチル化 LDL と 3日間保温して泡沫化した。ヒト単球白血病細胞、THP-1 細胞を単球・マクロファージの分化を誘導する因子として知られている 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ または 9-シス-レチノイン酸、メジウムとして 10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 と保温し

た。

2) ウェスタンブロッティング：細胞を 10% SDS で可溶化し、10% SDS ポリアクリルアミドゲルで展開した。蛋白をブロッティング後、メンブランを 0.25 $\mu\text{g/ml}$ のウサギ抗ヒト ACAT-1 抗体 (DM10) で処理し、二次抗体として horse radish peroxidase で標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体で処理した。ECL 検出キットにより ACAT-1 蛋白のシグナルを検出した。

3) ノーザンブロッティング：ジゴキシゲニン標識 UTP を用いて、ヒト ACAT-1 に対する RNA プローブ (ACAT-1 cDNA, 1551-2278) を作成した。THP-1 細胞から抽出した 12 μg の全 RNA を 1.2% アガロースゲルで分離し、ナイロン膜にブロッティングした。ナイロン膜を熱変性した RNA プローブでハイブリダイゼーションした後、さらにアルカリホスファターゼ標識した抗ジゴキシゲニン抗体で処理した。CDP-Star 基質を加え ACAT-1 mRNA を蛍光にて検出した。

4) ACAT 活性測定：THP-1 細胞を低張液で破碎後、50 mM Tris、1 mM EDTA、1 M KCl、2% CHAPS で可溶化した。タウロコール酸/コレステロール/ホスファチジルコリンのミセルを添加して膜成分を再構成した。基質として [^{14}C] オレオイル CoA を添加し、10 分間保温した後、脂質を抽出した。生じたコレステロール [^{14}C] オレイン酸を薄層クロマトグラフィーで分離し、放射活性を測定した。

5) 免疫電子顕微鏡による ACAT-1 の細胞内局在の検討：培養ヒトマクロファージをパラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで固定した後、0.005% サポニンで処理した。DM10 処理後、イミュノペルオキシダーゼ法にて ACAT-1 を検出した。

C. 研究成果

1) 培養単球・マクロファージ系細胞における ACAT-1 の発現調節

ヒト単球のモデルとして THP-1 細胞を用い、1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 または 9-シスレチノイン酸の ACAT-1 発現誘導効果を検討した。THP-1 細胞を種々の濃度の 1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 または 9-シスレチノイ

ン酸と 48 時間保温し、ACAT-1 蛋白の発現を DM10 を用いたウェスタンブロットで検出すると、濃度依存的に ACAT-1 蛋白の増加を認め (Fig. 1)。デンシトメトリーによる ACAT-1 蛋白の比較では、1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 により最大 4 倍、9-シスレチノイン酸により最大 3 倍の蛋白量の増加を認めた。同じ濃度でその効果を比較すると、1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 が 9-シスレチノイン酸より強力な ACAT-1 発現誘導作用を示した。特に 100 pM という 1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 の生理的濃度で ACAT-1 発現誘導がみられたため、1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 による ACAT-1 の発現誘導は生理的に重要な意義をもっていると思われる。濃度を一定にして時間経過を検討すると、12~24 時間で蛋白発現が増加し、48 時間でほぼピークに達した。ノーザンブロット法にて ACAT-1 mRNA 量に対する効果を検討した。THP-1 細胞はヒト単球・マクロファージと同様に、2.8 kb、3.6 kb、4.2 kb、7.0 kb の 4 種の ACAT-1 mRNA が検出されるが、1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 または 9-シスレチノイン酸により 2.8 kb と 3.6 kb の 2 種の mRNA が選択的に約 2 倍に増加した (Fig. 2)。

1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 と 9-シスレチノイン酸は、単球・マクロファージ系細胞の分化誘導あるいは遺伝子発現に対して協調的に作用するといわれている。そこで、我々はこれらの物質は ACAT-1 の発現誘導に対して協調的に作用するかを検討した。比較的低濃度の 1, 25-ジヒドロキシビタミン D3 (1 nM) と 9-シスレチノイン酸 (10 nM) で ACAT-1 蛋白が 2~3 倍に増加するが、両者を同時に添加すると、ACAT-1 の蛋白は 4.6 倍に増加した。ACAT 活性も両者により協調的に増加した。

2) ヒト培養マクロファージにおける ACAT-1 の細胞内局在

これまでに細胞分画などの生化学手法により ACAT が小胞体の蛋白質であることが提唱されきたが、今回 ACAT-1 特異抗体を用いて形態学的にこれを検討した。定常状態のマクロファージ (非泡沫化) では粗面小胞体及び核膜の辺縁に沿って ACAT-1 のシグナルが検出

された。一方、アセチル化 LDL により泡沫化したマクロファージでは、小胞体以外にも細胞内に 50-150 nm の径を持つベジクルが形成されていることが明らかになった。泡沫細胞においては ACAT-1 の抗原性の 30-40% がこのベジクル上に存在していた。ウェスタンブロッティングによる検討では、非泡沫化マクロファージ、泡沫化マクロファージの間で ACAT-1 の蛋白量の違いは認めなかった。

次にアセチル化 LDL による泡沫化に伴い小胞体自体の構造変化があるかを、小胞体の特異的なマーカーである GRP-78 を用いて検討した。非泡沫化マクロファージでは管状の小胞体が検出されたのに対し、泡沫化マクロファージでは、小胞体の構造以外にも 100 nm 前後のベジクルが形成されていることが認められた。すなわち、アセチル化 LDL によるマクロファージの泡沫化に際し、小胞体に由来するベジクルが多数形成されていることが示唆される。免疫蛍光染色による ACAT-1 の細胞内局在のパターンは GRP-78 の細胞内局在と酷似しており、二重免疫蛍光法では両者の細胞内局在は、非泡沫化、泡沫化マクロファージの両方においてほとんど一致していた。

D. 考察

THP-1 細胞を用いた検討により、1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ 及び 9-シス-レチノイン酸が ACAT-1 の発現を誘導することが明らかとなった。特に 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ は生理的な濃度 (50-150 pM) で ACAT-1 の発現を有意に刺激することから、単球・マクロファージの分化過程においても ACAT-1 の発現に関与している可能性が示唆された。

1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ は細胞膜を通過した後、細胞質で Vitamin D Receptor (VDR) という核内受容体に結合し核内に輸送される。また 9-シス-レチノイン酸は Retinoid X Receptor (RXR) という核内受容体に結合して核内に輸送される。VDR と RXR は複合体を形成し、標的遺伝子のプロモーター領域にある Vitamin D Response Element (VDRE) に結合し、転写を促進する。1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ と 9-シス-レチノイン酸

は協調的に ACAT-1 の発現を誘導していたことから、これらの核内受容体の関与が想定された。しかし現在明らかにされている ACAT-1 プロモーター領域には VDRE の塩基配列をみいだすことはできなかった。未だ明らかにされていないプロモーター領域に VDRE が存在している可能性がある。また、1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ や 9-シス-レチノイン酸は、ACAT-1 以外の遺伝子の発現調節を介して二次的に ACAT-1 の発現を誘導している可能性もある。

これまで一般に、ACAT は小胞体に存在する酵素であると言われてきたが、本研究ではヒトのマクロファージを用いて形態学的にはじめて ACAT-1 が小胞体に存在することを示した。またマクロファージをアセチル化 LDL で泡沫化すると、30-40% の ACAT-1 がベジクルを形成して細胞内によりびまん性に分布することが示された。これらの ACAT-1 陽性ベジクルは小胞体のマーカーとして知られる GRP-78 にも陽性で、泡沫化に際し小胞体から出芽したことが示唆される。泡沫化に伴う小胞体のベジクル化の生理的意義は未だ明らかでないが、リソソームに由来する遊離コレステロールの ACAT-1 に対する近接効果を高め、コレステロールエステル化をより効率的に行っている可能性がある (Fig. 3)。

E. 結論

- (1) ヒト単球白血病細胞、THP-1 細胞において、ACAT-1 の発現は、1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ 並びに 9-シス-レチノイン酸によって誘導された。
- (2) 培養ヒトマクロファージをアセチル化 LDL で泡沫化すると、細胞内に 50-150 nm の径を持つ ACAT-1 陽性のベジクルが多数形成された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Han H, Sasaki J, Matsunaga A, Hakamata H, Huang W, Ageta M, Taguchi T, Koga T, Kugi M, Horiuchi S, and Arakawa K. A novel mutant apoA-I Nichinan (Glu235→0), is

associated with low HDL cholesterol levels and decreased cholesterol efflux from cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1447-1455, 1999.

2) Biwa T, Sakai M, Matsumura T, Furukawa N, Kaneko K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, and Shichiri M. Sites of action of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase are distinct in

oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J. Biol. Chem.* 275: 5810- 5816, 2000.

3) Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, Horiuchi S, Chang CCY, Chang TY, and Takahashi K. Localization of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and various tissues. *Am. J. Pathol.* 156: 227-236, 2000.

2. 学会発表

1) 大神信孝, 國安明彦, 袴田秀樹, 宮崎 章, 堀内正公, 中山 仁: スルホニルウレア剤グリベンクラミドは acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害活性をもつ. 第41回日本脂質生化学研究会, 平成11年6月4日, 鎌倉

2) 坂下直実, 宮崎 章, 堀内正公, 高橋潔: ヒト全身臓器ならびにマクロファージにおける acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT-1) 局在. 第31回日本動脈硬化学会総会, 平成11年6月25日, 宮崎

3) 大神信孝, 袴田秀樹, 宮崎 章, 堀内正公, 中山 仁: Sulfonyleurea 剤 glibenclamide (GB) は ACAT 阻害剤でもある. 第31回日本動脈硬化学会 総会, 平成11年6月25日, 宮崎

4) 宮崎 章, 堀内正公: アシルコエンザイム A: コレステロールアシル基転移酵素 (ACAT) と動脈硬化. 第72回日本生化学会大会 (シンポジウム), 平成11年10月9日, 横浜

5) 大神信孝, 國安明彦, 中山 仁, 袴田秀樹, 宮崎 章, 堀内正公: スルホニルウレア剤グ

リベンクラミドは acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害活性を持つ. 第72回日本生化学会大会, 平成11年10月7日, 横浜

6) 宮崎 章, 堀内正公: 酸化 LDL によるマクロファージの増殖. 日本動脈硬化学会平成11年度冬季大会 (シンポジウム), 平成11年11月25日, 大阪

7) 宮崎 章, 堀内正公: コレステロールエステルサイクルと HDL. 日本動脈硬化学会平成11年度冬季大会 (シンポジウム), 平成11年11月26日, 大阪

8) チューチューマウン, 宮崎 章, メヒタツプ・ユクセル, 堀内正公: 活性型ビタミン D3 及び 9-シス-レチノイン酸は THP-1 細胞における ACAT-1 発現を誘導する. 日本動脈硬化学会平成11年度冬季大会, 平成11年11月26日, 大阪

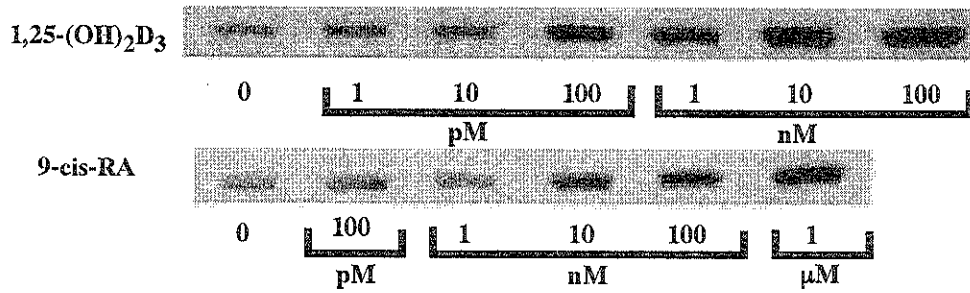


Fig. 1. Dose-dependent effects of 1,25-(OH)₂D₃ and 9-cis-RA on ACAT-1 protein content in THP-1 cells. THP-1 cells (3×10^6) were incubated for 48 h with the indicated concentrations of 1,25-(OH)₂D₃ or 9-cis-RA. The cells were solubilized with 100-150 ml of 10% SDS and 2.5 mg protein from each sample was separated by 10% SDS-PAGE. ACAT-1 protein was detected as a 50 kDa band by immunoblot analysis with anti-human ACAT-1 antibody (DM 10).

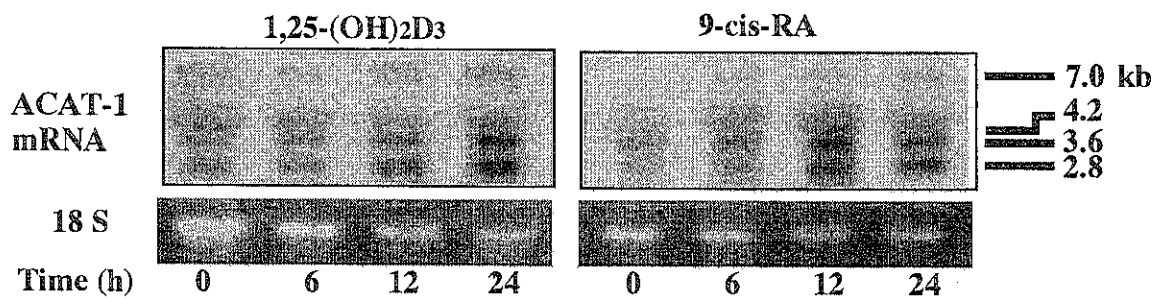


Fig. 2. Northern blot analysis of THP-1 cells treated with 1,25-(OH)₂D₃ with 100 nM 1,25-(OH)₂D₃ or 1 μM 9-cis RA. Twelve μg of extracted total RNA was run on 1.2% agarose gel and transferred to a Hybond N⁺ membrane followed by UV cross-linking. The membrane was hybridized for 4 h at 65°C with heat-denatured digoxigenin-labeled RNA-probe for ACAT-1. After washing, the membrane was incubated for 30 min with anti-digoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase. The membrane was treated with CDP-star chemiluminescent substrate and exposed to an X-ray film to detect ACAT-1 mRNA.

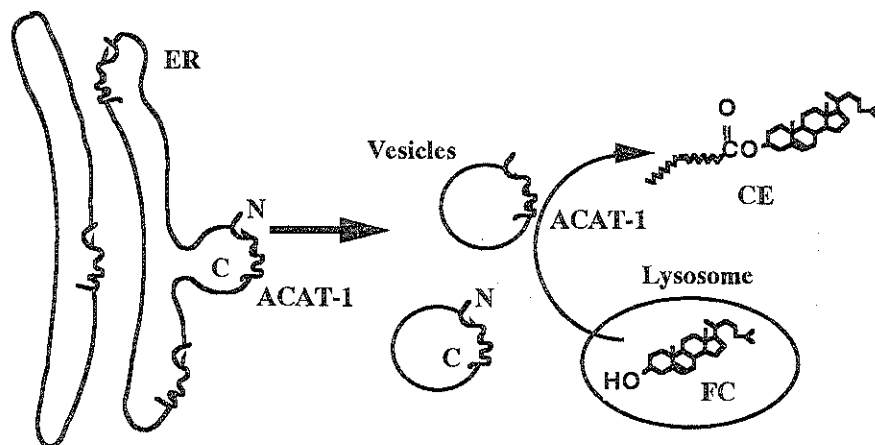


Fig. 3. Possible role of ACAT-1-containing vesicles in foam cell formation. ACAT-1 is located exclusively in endoplasmic reticulum (ER) in normal human macrophages. However, when macrophages are converted to foam cells with acetylated LDL, ER-derived vesicles containing ACAT-1 are formed inside the cells. These vesicles may play a role in enhancing cholesterol esterification by ACAT-1 in macrophages.

新たな血管の老化予防法の開発をめざしたコレステロール逆転送系調節機構の解明
—細胞からのコレステロール搬出機序の解明—

分担研究者 横山 信治 名古屋市立大学医学部 生化学第一講座 教授

本研究は、動脈硬化初期病変である細胞内蓄積コレステロールの積極的搬出の機序を細胞生物学的・生化学的に明らかにすることを目的とする。1) マウス白血病細胞 RAW264 を用い、細胞表面の作用部位の同定を行った。蛍光標識アポ A-I による直接結合と HDL 新生の関連を cAMP による HDL 新生誘導とその蛋白質合成阻害剤による抑制により観察した。2) ヒト白血病細胞 THP1 を用い、新生 HDL へのコレステロール組み込みの機序を研究した。PMA 長期処理による分化誘導により、アポ A-I により新生する HDL のコレステロール含有量を ABC1 や caveolin-1 の発現との関連で観察した。3) HDL 新生反応の生理的意義を、反応阻害剤 probucol をマウスに投与して検討した。4) 脳に於ける HDL 新生システムの特異性を、ラットアストロサイトをを用いて研究した。

A. 研究目的

本研究は、動脈硬化初期病変である細胞内蓄積コレステロールの積極的搬出の機序を細胞生物学的・生化学的に明らかにすることを目的とする。血漿 HDL が細胞コレステロールの流出を招くことは広く知られているが、その機序についての理解は長い間混乱していた。近年、我々が遊離アポリポ蛋白質による細胞脂質からの HDL 新生反応を見いだして以来その理解が進み、コレステロールの物理化学的拡散による非特異的流出とアポリポ蛋白質と細胞の相互作用による特異的機序の二つが機能していることが分かってきた。我々は後者に重点を置きつつ、細胞のステロール平衡の観点からその動脈硬化発症・退縮における役割を明らかにしたいと考えている。昨年（1999）、HDL 欠損症でありアポリポ蛋白質による細胞からのコレステロール搬出の障害があるとされる Tangier 病の原因が ATP-binding cassette transporter のひとつである ABC1 の遺伝子変異によるものであることが発表され、我々の HDL 新生に関わる仮説が正しいことが証明された。この新しい段階を踏まえ、ABC1 がこの反応系の中でどのような役割を果たすのかを正確に明らかにすることが必要になっている。具体的に言えば、

従来からの我々の研究目標である細胞とアポリポ蛋白質の結合部位や細胞内の特異的コレステロール輸送系やそのためのシグナル伝達系について、この蛋白質との関わりでより具体的に明らかに出来る条件が整ったといえる。

B. 研究方法

1) マウス白血病細胞 RAW264 を用い、細胞表面の作用部位の同定を行った。蛍光標識アポ A-I による直接結合と HDL 新生の関連を cAMP による HDL 新生誘導とその蛋白質合成阻害剤による抑制により観察した。
2) ヒト白血病細胞 THP1 を用い、新生 HDL へのコレステロール組み込みの機序を研究した。PMA 長期処理による分化誘導により、アポ A-I により新生する HDL のコレステロール含有量を ABC1 や caveolin-1 の発現との関連で観察した。3) HDL 新生反応の生理的意義を、反応阻害剤 probucol をマウスに投与して検討した。4) 脳に於ける HDL 新生システムの特異性を、ラットアストロサイトをを用いて研究した。

C. 研究成果

1) RAW264 細胞をモデルとしたアポリポ蛋白質結合部位同定の研究

細胞コレステロールと磷脂質の放出を微量酵素定量法による質量測定で検出する方法を開発、また蛍光標識アポ A-I を用いるアポリポ蛋白質結合の定量法を確立した。これらを用い、cAMP や蛋白合成・輸送阻害剤を用いた HDL 新生反応の誘導と阻害はアポ A-I の細胞への結合の増減に平行する事を示した。従って、この反応は細胞の蛋白質合成能に依存する。RT-PCR に於いても DNA Chip 解析でも、cAMP による ABC1 のメッセージの有意な増加が認められた。アポ A-I による細胞脂質の放出 (HDL の新生) はカルモジュリン阻害剤 W7、W5 により増強するが、これは必ずしもこれらの薬剤によるカルモジュリン阻害効果とは平行せず、独自の薬理効果であることが示された。

2) THP1 細胞に於ける PMA による分化と ABC1 と caveolin-1 の誘導

THP1 細胞は PMA 刺激前にアポ A-I と反応して HDL を産生するがこれにはコレステロールが含まれず、PMA 刺激によるマクロファージ化により caveolin-1 と ABC1 が特異的に増加して HDL へのコレステロール積み込みが特異的に増加した。この時に caveolin-1 のアンチセンス DNA を働かせると、この増加は特異的に減少した。従って、Caveolin-1 がアポ A-I による HDL 新生に連動したコレステロールの特異的細胞内輸送への関与が示された。

3) マウスへの Probuco 投与による HDL の選択的減少の機序

マウスにプロブコールを投与すると HDL の特異的で急激な現象が起こる。この時腹腔マクロファージのアポ A-I 依存 HDL 新生も特異的に低下した。その他の HDL 代謝のパラメータである血漿 HDL の消失率やアポ A-I、アポ E、ABC1、SR-BI、LCAT、PLTP の mRNA などに変化はなかった。従って、プロブコール投与マウスでは Tangier 病同様、HDL 合成抑制が HDL 低下をもたらしていることが示された。

4) アストロサイトによる脳 HDL の新生機構の研究。アストロサイトは内因性のアポ E によりコレステロールに富んだ HDL を産生し、

外因性のアポリポ蛋白質と反応してコレステロールの乏しい HDL を産生する。また他の神経系細胞との共培養によりアポ E 合成が数倍以上に高まり HDL としての分泌が亢進する。これらは、アストロサイトが中枢神経系の細胞間脂質輸送に独特の特異的機能を果たしていることを意味する。

今年度の研究では、1) コレステロールに乏しい HDL 産生は、細胞膜の HDL 産生ドメインにおけるスフィンゴミエリンによるコレステロールの運動制限によるものであることが、2) 神経細胞からのサイトカインが内因性アポ E-HDL の産生を著しくたかめること、また 3) アポ E 産生能はアストロサイトの分化の程度に比例すること、が示された。

D. 考察

この分野での 1 年の大きな動きは、細胞コレステロール放出における ABC トランスポーターの役割の発見である。この先これに触発されたこの分野での研究の大きな展開が起こるものと期待される。しかしながら、反応の機序と生理的意義に関する仮説は未だ混乱しており、この整理が今後の研究競争の鍵を握るものと考えられる。

E. まとめ

アポリポ蛋白質の HDL 新生反応について
1) 細胞結合部位は ABC1 発現と平行しない。
2) 細胞内コレステロール運搬は ABC1 と独立し、caveolin-1 の関与が示唆される。
3) 血漿 HDL を制御する。
4) 中枢神経系ではアストロサイトがステロール平衡を制御する。

F. 研究発表

1. Jin-ichi Ito, Li-Yong Zhang, Michiyo Asai and Shinji Yokoyama. Differential generation of high density lipoprotein by Endogenous and exogenous apolipoproteins in cultured fetal rat astrocytes. *J. Neurochem.* (1999) 72: 2362-2369.
2. LA Leiter, K Hanna and the Canadian Cerivastatin Study Group. Efficacy and

safety of cerivastatin in primary hypercholesterolemia: A long term comparative titration study with simvastatin. Canadian Journal of Cardiology (1999) 15: 545-555

3. Kazunori Saito, Ki-ichiro Kobori, Hideyuki Hashimoto, Sachiko Ito, Mitsuhsa Manabe and Shinji Yokoyama. The epitope mapping for the anti-rabbit cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibody that selectively inhibits triglyceride transfer. J. Lipid Res. (1999) 40: 2013-2021

4. Jin-ichi Ito and Shinji Yokoyama. Sialosylcholesterol induces reorganization of astrocyte filament network. Biochim. Biophys. Acta (2000) in press.

5. Reijirou Arakawa, Sumiko Abe-Dohmae, Michiyo Asai, Jin-ichi Ito & Shinji Yokoyama. Involvement of Caveolin-1 in Cholesterol-Enrichment of HDL Assembled by Interaction of THP-1 Cell With Apolipoprotein. Submitted.

6. Maki Tsujita, Shigehiro Tomimoto, Kuniko Okumura-Noji, Mitsuyo Okazaki, and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol/phospholipid efflux and plasma high density lipoprotein level in mice. Submitted.

7. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu and Shinji Yokoyama. Cholesterol-Sphingomyelin Interaction in Membrane and Apolipoprotein-Mediated Cellular Cholesterol Efflux. J. Lipid Res. (2000) in press.

8. Koon K. Teo, Jeffrey R. Burton, Christopher E. Buller, Sylvain Plante, Diane Catellier, Wayne Tymchak, Vladimir Dzavik, Dylan Taylor, Shinji Yokoyama, and Terrence J. Montague, on behalf of the SCAT Investigators. Long Term Effects of Cholesterol Lowering and

Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Coronary Atherosclerosis: The Simvastatin/Enalapril Coronary Atherosclerosis Trial (SCAT). Submitted.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

新たな血管の老化予防法の開発をめざしたコレステロール逆転送系調節機序の解明
—コレステロールエステル転送蛋白(CETP)発現に及ぼす長鎖脂肪酸の影響—

分担研究者 松本 明世 国立健康栄養研究所 分子栄養研究室長

コレステリルエステル転送蛋白(CETP)はコレステロール逆転送系に深く関わり、血中リポ蛋白レベル、特に高比重リポ蛋白(HDL)レベルを規定する重要な因子である。多価不飽和脂肪酸による脂質代謝関連蛋白や酵素の発現調節や血清脂質レベルの改善が知られている。本研究では、各種脂肪酸による CETP 発現制御作用を解析した。長鎖脂肪酸の不飽和度の増加に伴い、特に不飽和度 4 以上のアラキドン酸(AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)では CETP mRNA および蛋白レベルで有意な低下を、その作用は不飽和度の高いものほど、CETP 発現を低下させることが示唆された。

A. 研究目的
目的

コレステロールエステル転送蛋白(CETP)は、末梢組織から搬出された高比重リポ蛋白(HDL)のコレステロールを apo B 含有リポ蛋白質へ転送し、最終的には低比重リポ蛋白(LDL)受容体を介して肝臓へと戻して処理・排泄する、いわゆるコレステロール逆転送系働き、血中リポ蛋白レベルを規定する主要な因子の一つである。近年、食事因子である脂肪酸について、脂質代謝関連蛋白および酵素の発現制御因子であることが報告され、血中 CETP 活性レベルに関しても脂肪酸の鎖長や不飽和度による影響が報告されている。また魚油摂取による血中 CETP 活性の低下が報告され、CETP 発現に及ぼす n-3 系多価不飽和脂肪酸の作用が注目されている。しかしながら、CETP 発現に及ぼす脂肪酸の作用を分子レベルから検討した研究はわずかで、その作用機序についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、各種脂肪酸が CETP の発現調節にどのような影響を及ぼすか培養細胞系を用いて mRNA および蛋白レベルから検討した。

B. 研究方法

これまで広く *in vitro* における脂質代謝研究に用いられているヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた。Type I collagen-coated culture dish (φ60 mm)に細胞を 2×10^5 /dish で播種し、4 ml の 10% FBS 含有 DMEM にて、37°C で 72 hr 培養し、約 90% confluency の段階で実験に供

した。

脂肪酸として stearic (18:0; SA), oleic (18:1; OA), linoleic (18:2; LA), α -linolenic (18:3; α LA), γ -linolenic (18:3; γ LA), arachidonic (20:4; AA), eicosapentaenoic (20:5; EPA) and docosahexaenoic acids (22:6; DHA)を用い、10% BSA に溶解し 40 mM の添加溶液を調製した。FBS 中の脂肪酸の影響を除くため、10% (v/v) lipoprotein-deficient serum (LPDS) を添加した培養液 (4 ml) に交換し、脂肪酸/BSA 溶液およびコントロールとして 10% BSA を添加し、48 hr のインキュベーション後、細胞を CETP mRNA の測定に、培養液を CETP mass の測定に用いた。

CETP mRNA レベルの解析は細胞から Total RNA を Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法により抽出・精製し、アガロースゲル電気泳動にて RNA を分離後、ナイロン膜にプロットングし、 32 P でラベルした human CETP cDNA fragment (365-624 bp)をプローブとして hybridization させ、イメージングアナライザーにより放射能強度を定量解析した。単位は photostimulated luminescence per area (PSL/A)で表した。また、コントロールとして glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)でリプロービングを行い、GAPDH mRNA の PSL/A 値で CETP mRNA の PSL/A 値を補正した。

CETP mass の測定は CETP (CHUGAI) ELISA kit (Chugai Pharmaceutical) を使用し enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) 法により行った。培養液 1 ml を微量用遠心式濃縮器マイクロコンを用いて約 100 μ l まで濃縮し測定サンプルを調製した。

HepG2 細胞への脂肪酸の取り込みは、細胞中の全脂質を Folch 法により抽出し、塩酸メタノールで脂肪酸をメチルエステル化しガスクロマトグラフィーにて分析した。

各グループ間の有意差統計は ANOVA (one-way analysis of variance) により、また、各グループ相互の有意差は Fisher の PLSD で行った。有意差レベルは $P < 0.05$ とした。

C. 研究結果

各種脂肪酸を培養液に添加し、48 hr のインキュベーションを行い、細胞内脂肪酸濃度を測定した結果、細胞内脂肪酸含有量は添加した脂肪酸に応じて増加した (Table 1)。したがって、添加した脂肪酸は 48 hr のインキュベーションで HepG2 に取り込まれ、代謝を受けることが認められた。

OA を最終濃度 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mM となるように細胞培養液に添加した結果、CETP mRNA の発現レベルは Control に比し 0.75 mM OA で PSL/A が約 8 と最も高く ($p < 0.0005$)、1 mM で発現量の低下を認めた

(Fig.1A)。この時の培養液に分泌された CETP mass は 0.75 mM 処理までは Control と同程度であったが、1 mM では CETP mRNA レベルと同様に低下する傾向が認められた (Fig. 1B)。

EPA を最終濃度 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 mM となるように細胞培養液に添加した結果、CETP mRNA の発現レベルは Control に比し 0.125 mM EPA で PSL/A が約 10 と最も高く、0.25 mM 以降低下し、0.5, 0.75 mM では PSL/A が約 2 まで低下した (Fig. 2A)。この時に分泌された CETP mass も 0.125 mM EPA で 500 ng/ml と最大になり ($p < 0.005$)、0.25 mM 以後、CETP mRNA レベルと同様に低下する傾向が認められた (Fig.2B)。

上記の検討において、OA では 1 mM 添加しても細胞成長および形態学上の観察から正常であることが確認されたが、EPA の場合、0.5 mM 以上の添加により細胞毒性が認められ、0.5 mM および 0.75 mM における細胞生存率はそれぞれ 59% および 25% であった。

CETP 発現量への脂肪酸の不飽和度の影響を検討するために、不飽和度が 0~6 の 7 種類の脂肪酸を最終濃度 0.5 mM となるように細胞培養液に添加した結果、不飽和度が 4 以上の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) である AA, EPA, DHA

において CETP mRNA の発現レベルは Control の 50% 以下であった ($p < 0.0001$; Fig.3A)。この時に分泌された CETP mass も CETP mRNA レベルと同様に、AA, EPA, DHA の添加で、Control に比し有意に低下することが認められた (AA; $p = 0.0005$, EPA; $p < 0.01$, DHA; $p < 0.0001$; Fig.3B)。また、炭素鎖 18 の脂肪酸 SA, OA, LA を比較検討すると、不飽和度の増加に伴い CETP mRNA レベルが低下するにも関わらず、CETP mass レベルは増加することが認められた (OA; $p < 0.05$, LA; $p < 0.005$ to SA)。

脂肪酸の不飽和度の影響を CETP mRNA 発現量と CETP mass レベルで相関性を示すかどうか検討した結果、相関性が認められなかった。しかしながら、n-6 系、n-3 系脂肪酸に分けて関連性を解析すると、いずれの場合でも不飽和度の増加に伴い、CETP mRNA 発現量および CETP mass レベルは低下した (n-6; $r = 0.986$, n-3; $r = 0.998$; Figs.4, 5)。したがって、脂肪酸系列上では、その不飽和度が強く CETP 発現量に影響を与えることが認められた。

D. 考察

HepG2 細胞を用いた培養細胞系において、CETP mRNA の発現および CETP mass の分泌に及ぼす長鎖脂肪酸の影響を検討した。HepG2 細胞はほぼ正常な肝細胞の代謝機能を有し、コレステロール代謝やリポ蛋白質代謝の研究に広く用いられている。CETP はヒトの肝臓で発現が高いことから、今回、培養細胞系モデルとして HepG2 を選択した。放射活性の定量にイメージングアナライザーを使用し、Northern blot analysis を試みた結果、CETP mRNA を定量的に解析することが可能となった。

脂肪酸は脂質代謝に関連する酵素や蛋白発現に影響を与える。例えば、長鎖脂肪酸は lipoprotein lipase (LPL) mRNA の発現を亢進させる一方、その活性を低下させるという LPL の post-translational process への関与や sodium butyrate の LCAT 活性や mRNA 発現への低下作用が報告されている。今回の検討から、CETP 発現に対しても長鎖脂肪酸は影響を与えることが明らかとなった。CETP mRNA 量を表す PSL/A レベルは、0.75 mM OA の添加で約 8, EPA 添加では OA よりも低濃度の 0.125 mM で約 10 と最高に達した。Apo B 発現への脂肪酸の影響に関して、外因性脂肪酸が低濃度 (0.4 mM) の時、脂肪酸は apo B mRNA の分解を抑制 (安定化) することにより apo B 分泌

を亢進させることが報告されている。この調節作用と同じようなメカニズムで、CETP mRNA に対しても低濃度の脂肪酸は安定化作用が強いため、mRNA と mass がともに増加したものと考えられた。Faust RA らは HepG 細胞に OA 濃度を変えて添加し、CETP 活性を測定した結果、0.5 mM 添加までは CETP 活性に何ら影響を与えないことを報告した。今回の検討においてもタンパクレベルは 0.5 mM 添加で変化せず、この報告と一致する結果となった。脂肪細胞や Caco-2 細胞において CETP 遺伝子の選択的スプライシングが起こることが明らかにされている。脂肪組織における CETP cDNA をクローニングした際、exon 9 を含まない cDNA の存在が認められ、この variant mRNA から翻訳された蛋白は CE ならびに TG 転送能力の欠損するものであり、また活性型 CETP の分泌量を調節する作用をもつ。Caco-2 細胞において、OA 50 μ M の添加により variant mRNA 発現の低下および full length CETP mRNA の増加が確認されており、この変動に伴い CETP 活性は増加した。本検討で OA 濃度を変化させた際、0.75 mM 添加までは濃度依存的に CETP mRNA は増加したが、CETP mass は変化しなかった。このことから Caco-2 と違い HepG2 では OA を添加しても variant mRNA 発現が低下しないために CETP mass が増加しない、あるいは mRNA レベルが亢進しても転写後制御メカニズムにより mass に影響を与えない可能性が推察された。HepG2 における長鎖脂肪酸の特性と mRNA およびタンパクレベルの関連を更に解明するために、HepG2 においても選択的スプライシングが起こるか、脂肪酸添加により variant mRNA は変動するか、転写後の制御がいかんにかつて起こるかについての検討が必要である。

脂肪酸の不飽和度の増加に伴い CETP mRNA の発現は低下し、特に不飽和度 4 以上の AA, EPA, DHA で低下が顕著であった。同時に CETP mass も有意な低下を認めた。脂肪酸による CETP の発現調節に関する知見はほとんど得られていないが、CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP- α) と CETP gene promoter の関連、C/EBP- α への脂肪酸の影響についての興味深い報告がある。CETP gene promoter の上流には C/EBP- α の結合部位が存在し、C/EBP- α の結合により promoter 活性は亢進する。つまり C/EBP- α レベルは CETP mRNA 発現に影響を与える。動物実験から C/EBP- α mRNA は OA リッチ食 < EPA リッチ食 < DHA リッチ食のオーダーで低下すること

が報告されており、これは本検討で OA, EPA, DHA 添加の際に認められたオーダーと一致するものであった。また、CETP は細胞内コレステロールレベルの上昇に伴い、発現が増す。これは CETP のシスエレメントである sterol regulatory element (SRE) にコレステロール増加に伴い発現した sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) が結合し、CETP promoter 活性を亢進させることにより誘発する。近年、コレステロールに加え脂肪酸も SREBP-1 の発現調節因子であることが報告され、この報告によれば、多価不飽和脂肪酸 0.6 mM の添加により SREBP-1 mRNA の発現は 75% まで低下した。よって C/EBP- α および SREBP-1 などの調節因子間相互作用により長鎖脂肪酸は CETP 発現を制御している可能性が示唆された。

以上、長鎖脂肪酸がこれまでに報告された脂質代謝関連酵素および蛋白に加え、CETP においても効果的な発現調節因子であることを明らかにした。

E. 結論

各種脂肪酸の CETP 発現制御作用を解析した。長鎖脂肪酸の不飽和度の増加に伴い、CETP mRNA の発現は低下し、特に不飽和度 4 以上のアラキドン酸(AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)ではコントロールの 50% 以下の発現量であった。AA, EPA, DHA では蛋白レベルにおいても有意な低下を認めた。CETP mRNA 発現量と蛋白量の関連性を解析すると、不飽和度の増加に伴い CETP 発現量は低下した。長鎖脂肪酸は CETP の遺伝子レベルおよび蛋白レベルにおいて発現調節に関与することが判明し、その作用は不飽和度の高いものほど、CETP 発現を低下させることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Reiko Hirano, Osamu Igarashi, Kazuo Kondo, Hiroshige Itakura, Akiyo Matsumoto: Regulation by long chain fatty acids of the expression of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* (submitted)

2. 学会発表

- 1) 平野玲子, 五十嵐脩, 近藤和雄, 板倉

弘重, 松本明世:長鎖脂肪酸によるコレステリルエステル転送蛋白(CETP)発現の制御 第53回日本栄養・食糧学会大会, 1999.5.30 東京

2) 平野玲子, 近藤和雄, 五十嵐脩, 板倉弘重, 松本明世:CETP 遺伝子発現に及ぼす脂肪酸不飽和度の影響 第31回日本動脈硬化学会総会, 1999.6.25 宮崎市

Table 1 The composition of fatty acids in HepG2 cells

Added FAs	18:0	18:1n9	18:2n6	18:3n3	20:4n6	20:5n3	22:6n3
Control	128.9±15.5	639.7±86.7	14.2±1.9	nd	38.0±4.9	nd	nd
18:0	540.4±34.1 ^e	1424.9±73.6 ^d	9.6±4.9	nd	46.7±2.5	nd	nd
18:1n9	131.9±23.0	1738.4±281.6 ^e	9.85±.5	nd	34.9±5.5	nd	nd
18:2n6	216.4±29.4 ^a	502.0±68.4	1275.4±154.2 ^e	nd	65.2±9.4 ^b	nd	nd
18:3n3	179.0±7.6	446.7±18.8	14.3±0.8	1115.3±50.5	34.7±1.3	nd	nd
20:4n6	153.1±2.3	228.9±5.9 ^a	7.1±1.2	nd	633.1±12.2 ^e	nd	nd
20:5n3	234.9±9.6 ^e	422.9±19.0	15.0±3.2	nd	42.8±1.7	619.7±42.7	513.7±37.5
22:6n3	148.4±26.9	352.9±63.6	11.5±1.7	nd	28.9±4.9	9.4±5.9	911.0±146.4

Note. Data are expressed as nmol/mg cell protein and are means ± SE from 3dishes. nd, not detectable. a ; p<0.05, b ; p<0.01, c ; p<0.005, d ; p<0.0005, e ; p<0.0001 ; significantly different from control by ANOVA and Fisher's PLSD test.

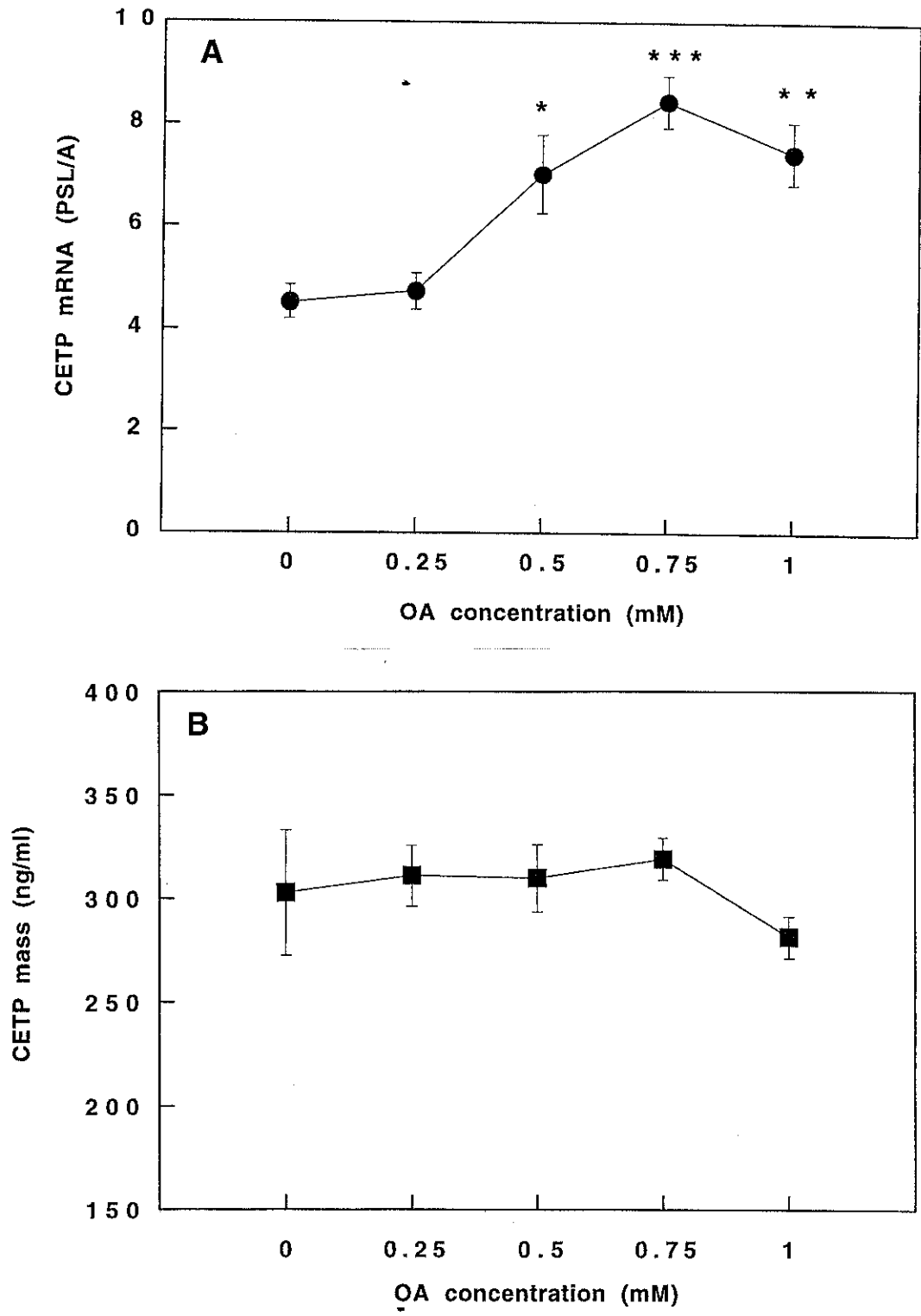


Fig. 1 Dose-response curves for the effect of oleic acid (OA) on the expression of the CETP mRNA (A) and mass (B). HepG2 cells were incubated with 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mM of OA and 1.25% BSA for 48 hr in DMEM with 10% LPDS. CETP mRNA and mass were measured as described in the text. Each data point represents the mean \pm SE from three dishes. Statistical differences are shown as * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ relative to control (0 mM OA).

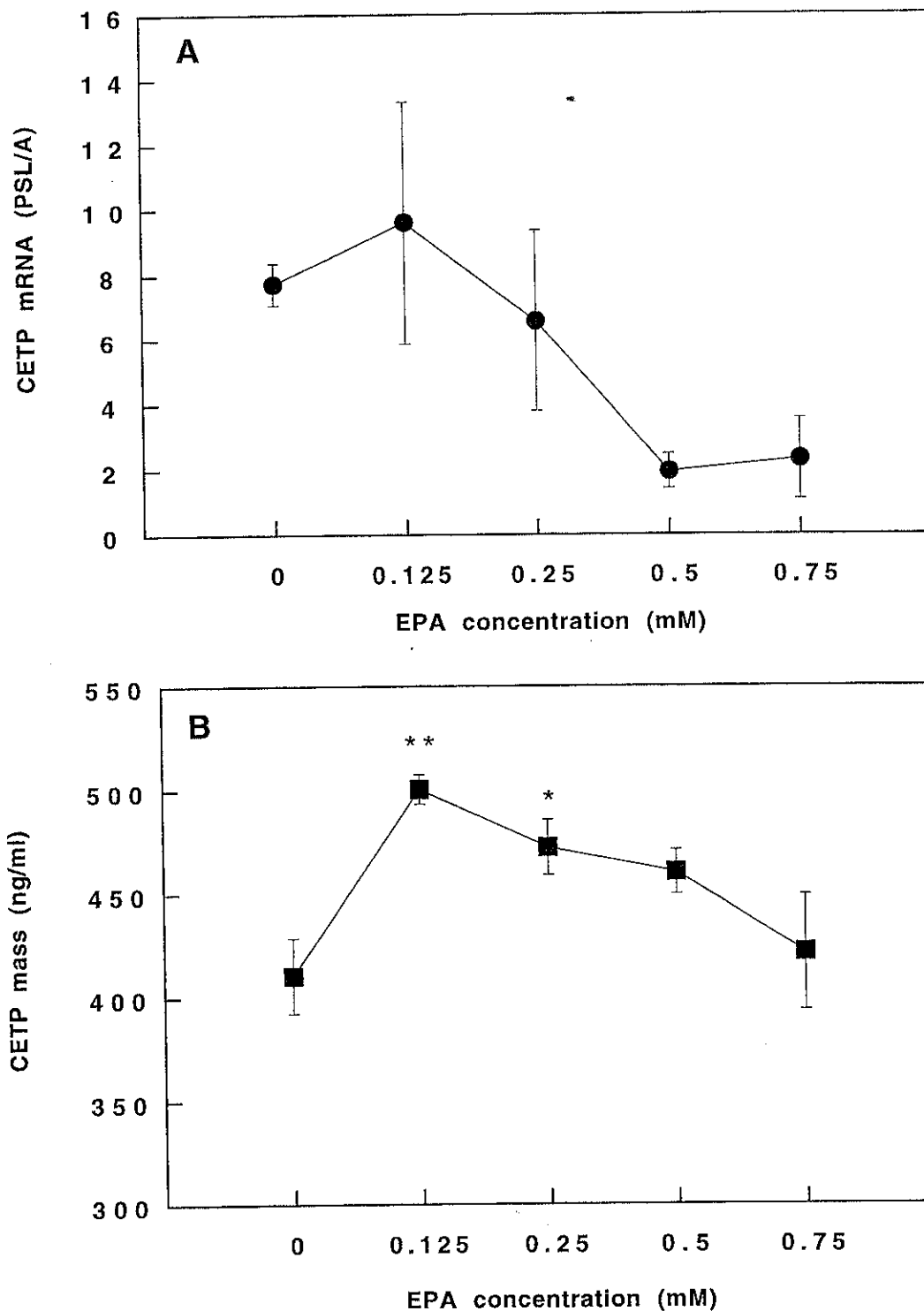


Fig. 2 Dose-response curves for the effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on the expression of the CETP mRNA (A) and mass (B). HepG2 cells were incubated with 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 mM of EPA and 1.25% BSA for 48 hr in DMEM with 10% LPDS. CETP mRNA and mass were measured as described in the text. Each data point represents the mean \pm SE from three dishes. Statistical differences are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ relative to control (0 mM EPA).

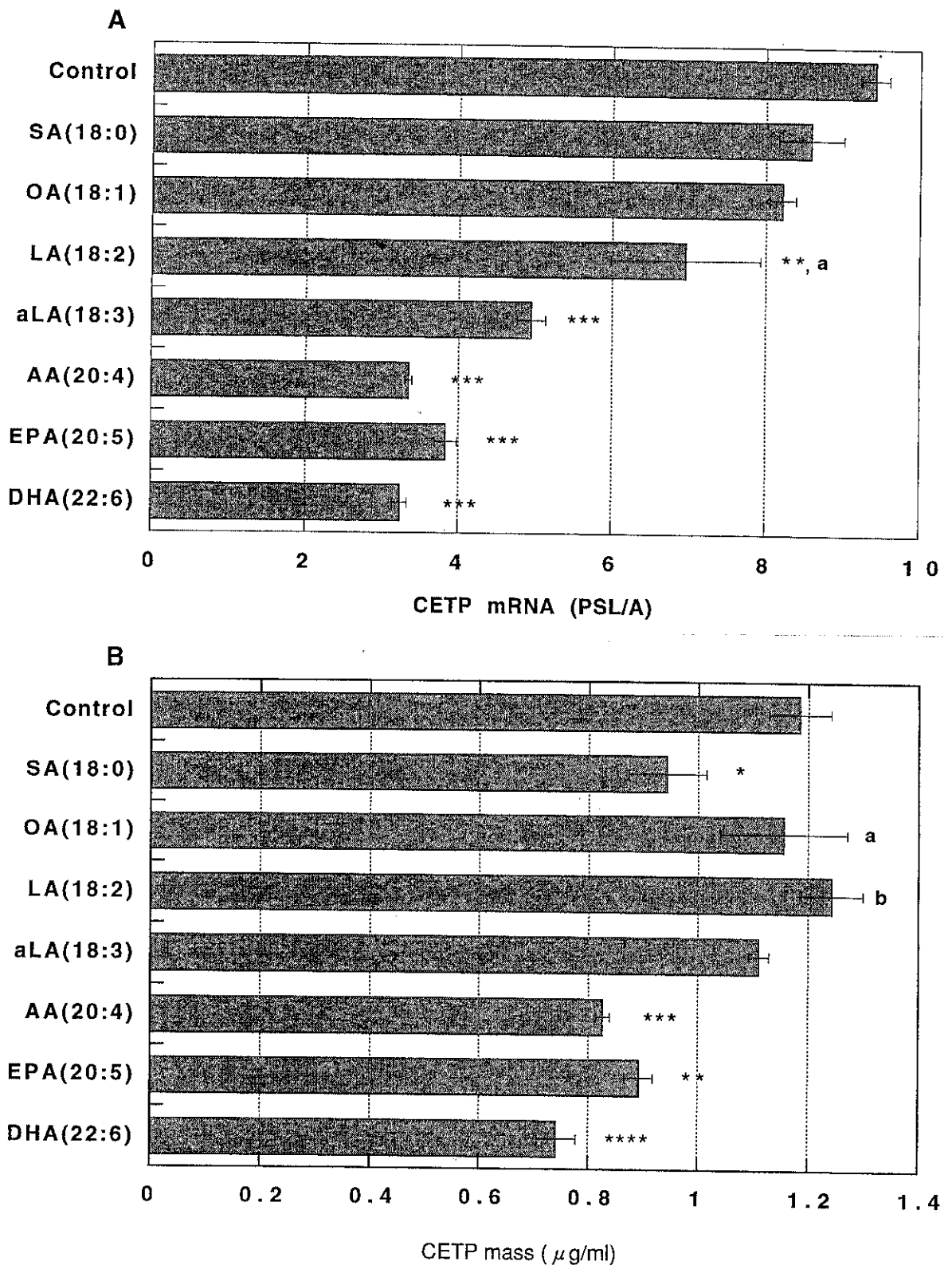


Fig. 3 Comparative effects of various saturated and unsaturated FAs on the expression of the CETP mRNA (A) and mass (B). HepG2 cells were incubated with 0.5 mM of various FAs or 1.25% BSA (as a control) for 48 hr in DMEM with 10% LPDS. CETP mRNA and mass were measured as described in the text. Each data point represents the mean \pm SE from three dishes. In A, statistical differences are shown as ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$ relative to control and in B * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p = 0.0005$, **** $p < 0.0001$ and in both ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.005$ relative to SA.

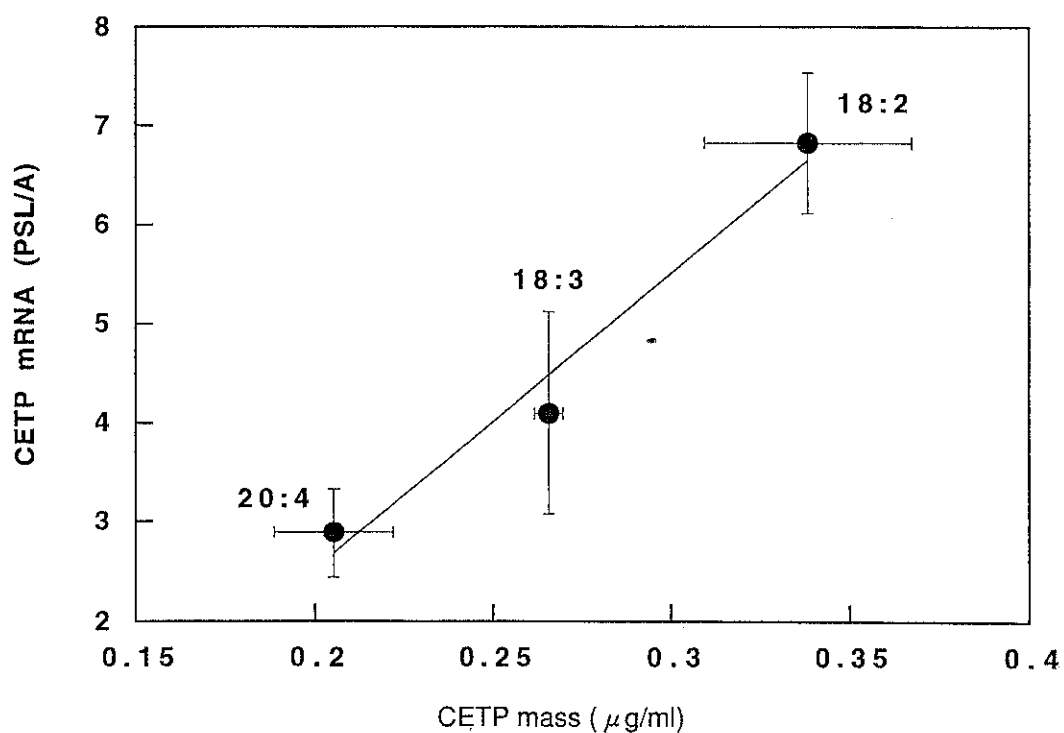


Fig. 4 Relationship between the CETP mRNA and mass secreted into the medium with the treatment of n-6 FAs. Linear regression analysis demonstrates a positive correlation between CETP mRNA and mass ($r = 0.986$). Each data point represents the mean \pm SE from three dishes.

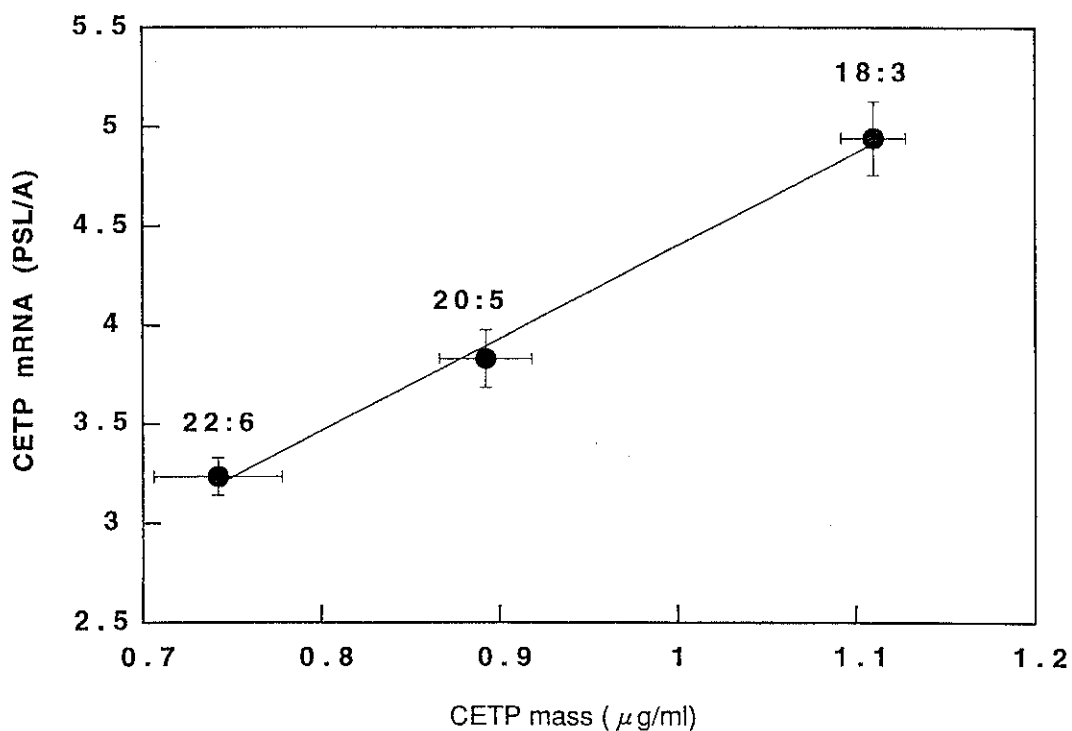


Fig. 5 Relationship between the CETP mRNA and mass secreted into the medium with the treatment of n-3 FAs. Linear regression analysis demonstrates a positive correlation between CETP mRNA and mass ($r = 0.998$). Each data point represents the mean \pm SE from three dishes.