

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節 因子の検索

所 属 国立健康・栄養研究所 臨床栄養部
研究者 松本 明世

分担研究者

- (1) 古濱 孝文 三共(株) 第一生物研究所
- (2) 成田 寛 田辺製薬(株) 創薬研究所
- (3) 堀内 正公 熊本大学 医学部生化学第二講座

要旨

多価不飽和脂肪酸あるいはエストロゲンの遺伝子発現調節作用について網羅的な解析をおこなうため、DNA チップを用いて脂質代謝関連遺伝子を中心に検討した。血管内皮細胞において LOX-1 は TNF- α など種々刺激によって発現誘導されることが明らかになり、新規抗動脈硬化薬創製の手掛かりを与え得ると考えられた。HMG-CoA 還元酵素阻害剤の新たな作用として、単球・マクロファージの分化過程における ACAT-1 発現を抑制することを見出した。

1. 研究目的

我が国においても、虚血性心疾患や脳卒中など動脈硬化性疾患は死因として高い位置を占め、罹患者においては質の高い生活を送るための大きな障害となるとともに、医療費において大きな社会負担となっている。高コレステロール血症に伴う酸化 LDL の増加はスカベンジャー受容体経路を介して動脈壁でマクロファージの泡沫細胞化を促進し、動脈硬化を発症・進展させる。一方、生体は動脈硬化の防御機構として HDL による抗動脈硬化作用を獲得している。この作用は末梢細胞に蓄積した余剰のコレステロールを HDL が引き抜き肝臓へ戻す、いわゆるコレステロール逆転送系であると考えられている。

本研究では、血中コレステロールレベルの適正化、あるいは抗動脈硬化剤など新たな薬剤開発の基礎となる知見探索を目的として、動脈硬化の発症に関わる酸化 LDL 受容体や acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT), また、血清コレステロールレベルを規定する LDL 受容体ならびにコレステロール合成系酵素群、加えてコレステロール逆転送系に関わる HDL binding protein 2 (HB2), cholesteryl ester transfer protein (CETP) 等の発現調節因子について分子レベルから解析した。

これまでに、IL-6 はマクロファージのスカベンジャー受容体遺伝子の発現を転写レベルで抑制すること、HB2 は胆汁酸、HMG-CoA 還元酵素阻害剤、IL-6 などサイトカイン、レチノール、ビタミン D3 および α -tocopherol によって発現調節を受けること、多価不飽和脂肪酸が CETP 発現を抑制すること、また、ACAT-1 発現に対する種々因子の作用、免疫電子顕微鏡による ACAT-1 のマクロファージ細胞内局在の変化を示した。本年度は、脂質代謝・動脈硬化に調節作用が知られる物質の遺伝子発現調節作用を網羅的に解析するため DNA チップを解析に用いた 1) 遺伝子発現調節に及ぼす多価不飽和脂肪酸の作用の検索 (松本), 2) 遺伝子発現調節に及ぼすエストロゲンの作用の検索 (古濱), 3) 血管内皮細胞における酸化 LDL 受容体 LOX-1 の発現調節 (成田), また 4) ACAT 活性調節因子の探索およびその機能の検討 (堀内) をおこなった。

2. 研究方法

1) 遺伝子発現調節に及ぼす多価不飽和脂肪酸の作用の検索

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 用いてコラーゲンコートディッシュに播種し、37°C, 42 hr 培養後、約 90% confluent の段階で実験に供した。細胞への脂肪酸処理は、FBS 中の脂肪酸の影響を最小限とするために FBS にかえて 10% (v/v) LPDS (fetal bovine serum, lipoprotein-deficient) を添加した DMEM (4 ml) に、最終濃度 0.25mM となるように 40mM 脂肪酸/10% BSA 溶液 25 μ l を加え、24 時間培養した。脂肪酸として、オレイン酸(18:1; OA), アラキドン酸(n-6, 20:4; AA), エイコサペンタエン酸 (n-3, 20:5; EPA) がある

いはドコサヘキサエン酸(n-3, 22:6; DHA)を用いた。また、コントロールとして25 μ lの10%BSAを添加し、同様に培養した細胞を用いた。細胞からPoly(A)⁺RNAをQuickPrep micro mRNA purification kitを用いて精製した。1 μ gのpoly(A)⁺RNAとT7-(dT)₂₄ primerを用いて、逆転写酵素によりcDNAを合成した。これを鋳型としてin vitro transcriptionによりbiotin標識したcRNAを合成した。cRNAを断片化した後、Gene chip (HuGene FL, Affymetrix)を用いて45°Cで16時間ハイブリダイズした。チップを洗浄・染色後、プローブ毎の蛍光強度(average difference, mRNA量)を測定し、コントロール細胞の各mRNA量をベースラインとして脂肪酸処理によるmRNAレベルの変化量(average difference change)と変化率(fold change)をGeneChip Softwareで解析した。

2) 遺伝子発現調節に及ぼすエストロゲンの作用の検索

雄性マウス(C57BL/6, 8週齢, 10匹/群)にエストラジオール(0, 3, 30 mg/kg)を4日間皮下投与後、諸臓器をmRNA調製用に摘出した。肝臓(~200 mg)からRNeasy (Qiagen)を用いてtotal RNAを調製し、さらにOligotex dT-30 (Takara)によってpoly(A)⁺RNAを精製した。1 μ gのpoly(A)⁺RNAをもちいて1)と同様にbiotin標識したcRNAを合成し、Gene chip (Mu 11k, Affymetrix)を用いてmRNAレベルの変動を解析した。

3) 血管内皮細胞における酸化LDL受容体LOX-1の発現調節

ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC, 継代数5-12)は10%FBS含有DMEM培地にて培養した。24時間serum free (0.3% BSA)で培養後、TNF- α , TGF- β , PMAあるいはトロンピンを添加し、さらに0-24時間まで培養した細胞をパラホルムアルデヒドにて固定し、ブロッキングを行った後、抗LOX-1抗体を反応させperoxidase標識抗マウスIgG抗体で検出した。

4) ACAT活性調節因子の探索およびその機能の検討

ヒト単球は、健常者末梢血よりFicoll-Paqueを用いて調製した単核球(1 x 10⁷個)を、10%ヒトAB型血清を含むRPMI-1640培地(10 ml)で10 cmディッシュに播種し、1時間37°Cで保温後、リンパ球を洗浄除去して得た。さらに単球を7-9日間培養して成熟マクロファージに分化させた。分化の種々の段階でセラバスタチン(10 nM-10 μ M)を添加して48時間培養した。

ACAT-1蛋白は単球・マクロファージを10% SDSで可溶化後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体としてウサギで作成した抗ヒトACAT-1ポリクローナル抗体、二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いて検出した。

ACAT-1 mRNAは単球・マクロファージから調製した12 μ gのtotal RNAを1.2%アガロースゲルで泳動しナイロン膜に転写後、ジゴキシゲニン標識ヒトACAT-1アンチセンスプローブとハイブリダイゼーションシ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化学発光により検出した。

ACAT-1活性は、細胞を1 mM Tris, 1 mM EDTA (pH7.4)で処理して膜を破碎し、膜成分をタウロコール酸/コレステロール/ホスファチジルコリンで再構成し、ACATの基質として[¹⁴C]oleoyl-CoAを添加し10分間保温後、脂質を抽出し生成したCholesteryl [¹⁴C]oleateを薄層クロマトグラフィーで分離して放射活性を測定した。

3. 研究成果

1) 遺伝子発現調節に及ぼす多価不飽和脂肪酸の作用の検索

多価不飽和脂肪酸の遺伝子発現調節作用について、DNAチップを用いてmRNAレベルでの変動を比較検討することにより、CETP発現に関わる各種転写因子への作用も含め、新たな機能の検索を試みた。Table 1に、脂肪酸処理によりmRNAレベルに大きな変化が認められた遺伝子を示した。mevalonate pyrophosphate decarboxylaseはDHA処理で-9.5倍(10.5%)、prostasinはEPAで-8.3倍(12.0%)と脂肪酸により大きな減少が認められた。一方、metallothionein-1G (MT1G)、四肢分化に働くdeleted in split hand/split foot 1 (DSS1)、glycogen phosphorylase Bは、多価不飽和脂肪酸処理で大きな増加を認めた。また、mRNAレベルの強い抑制作用はおもにn-3系多価不飽和脂肪酸であるEPA, DHAが示すのに対して、強い誘導作用はOAを含め4種総ての脂肪酸で認められた。Table 2に、各脂肪酸処理によるコレステロールおよびリポ蛋白質代謝系遺伝子群のmRNAレベルの変化を示した。これまでに報告されたHMG-CoA reductase, HMG-CoA synthaseにくわえ、mevalonate pyrophosphate decarboxylaseなど、コレステロール合成酵素系遺伝子のmRNAレベルにAA, EPA, DHAで減少が認められた。また、OAでは、これら遺伝子の発現にほとんど抑制効果は認められなかった。一方、hepatic triglyceride lipaseに増加が認められた。これまでに報告されたCETP発現に関わる転写因子の中ではSREBP-1に減少傾

向が認められたが、ARP-1, Ear-3 および LXR-alpha には変化は認められなかった。Table 3 に、コレステロールおよびリポ蛋白質代謝系以外で脂肪酸処理により mRNA レベルに変化が認められたものを示した。Fatty acid synthase など脂肪酸代謝系遺伝子の AA, EPA および DHA により抑制が認められた。一方、糖代謝系遺伝子群では誘導が認められた。接着分子遺伝子群では誘導されるものと抑制されるものとがみられた。細胞増殖および細胞分化因子遺伝子群では主に発現誘導が示唆された。幾つかの転写因子 mRNA レベルに変動が認められた。

2) 遺伝子発現調節に及ぼすエストロゲンの作用の検索

脂質代謝遺伝子群の発現調節に強く影響を及ぼすと考えられるエストロゲンの作用を検索するため、エストラジオールをマウスに投与し、肝臓における遺伝子発現の変動を DNA チップにより解析した。

エストラジオール(0, 3, 30 mg/kg)処理により、解剖時の血中総コレステロール値(mean ± S.E., mg/dl)は各々 111.7 ± 4.2, 88.3 ± 2.7 および 96.8 ± 1.7, HDL コレステロール値(mean ± S.E., mg/dl)は、70.0 ± 2.5, 51.7 ± 1.8 および 18.1 ± 0.9 であり、特に HDL コレステロールレベルの低下に顕著な投与量依存性が認められた。コントロール群では GeneChip 上にある 13,180 遺伝子のプローブ中 5,159 遺伝子 (39%) の発現が示された。Table 4 に示したように、脂質代謝関連遺伝子群の mRNA レベルは、エストラジオール投与で lipid-binding protein 遺伝子群に 2.6-48 倍、ACAT-1 に 2.6 倍の増加、またコントロール群では発現のない squalene epoxydase も 3 mg/kg 投与群から発現が認められ、これらの発現上昇は投与量依存性であった。脂質代謝との関係は不明だが、インターフェロンによって誘導される多くの遺伝子がエストラジオール投与によって誘導された。一方、Table 5 に示したように、SREBP-1 は 30 mg/kg 投与群で 1/8 に減少し、apo AI, AII や肝臓で胆汁酸の取り込みを行う NTCP 遺伝子も約 1/2 に減少したが、胆汁酸をリガンドとする FXR の発現にはほとんど変化が認められなかった。脂質代謝に関わる主要遺伝子である LDL 受容体, HMG-CoA 還元酵素, cholesterol-7 α -hydroxylase, squalene synthase などの発現には特に変化は認められなかった。

3) 血管内皮細胞における酸化 LDL 受容体 LOX-1 の発現調節

LOX-1 発現 CHO 細胞を用いて cell surface ELISA を構築した。この系を用いて、BAEC における LOX-1 の発現調節について検討した。Fig. 1, 2 に示したように、BAEC は無刺激の状態でも LOX-1 の発現が検出された。炎症性サイトカインの一種である TNF- α , TGF- β ならびにプロテインキナーゼ C 活性化剤である PMA はいずれも濃度依存的に LOX-1 の発現を誘導し、そのピークは 8-24 時間であった。いずれも動脈硬化病態の進展に重要な役割を果たしているシグナルであると考えられており、LOX-1 発現亢進による酸化 LDL シグナルの増幅とポジティブフィードバックが推察される。また、トロンビンにも LOX-1 発現増強作用が観察され、その作用は濃度依存的で、8-24 時間後も持続していた。

4) ACAT 活性調節因子の探索およびその機能の検討

Fig. 3 に示したように、ヒト単球をマクロファージに分化させた後、day 7 から day 9 にかけてセリバスタチン処理しても ACAT-1 蛋白の発現は影響を受けなかった。しかし、分化の初期段階 (day 1-3) にセリバスタチン処理すると ACAT-1 蛋白の発現は、1 μ M で 82%抑制された。分化の中期 (day 4-6) では 1 μ M のセリバスタチンにより ACAT-1 蛋白の発現は 48%抑制された。ACAT 活性を測定した場合、ACAT-1 蛋白発現と同様に、分化初期、中期では ACAT 活性がセリバスタチンにより有意に抑制され、分化後は全く抑制されなかった。また、ノーザンブロットで単球・マクロファージに発現する ACAT-1 mRNA を検出すると、2.8 kb, 3.6 kb, 4.2 kb の 3 つのバンドが検出され、単球・マクロファージの分化に伴い、2.8 kb, 3.6 kb の 2 つの mRNA が増加し、4.2 kb のバンドには変化がなかった。セリバスタチンを分化の初期(day 1-3)に添加すると、2.8 kb と 3.6 kb のバンドの増加が抑制され、4.2 kb のバンドには変化がなかった。

Fig. 4 に示したように、セリバスタチンと同時にメバロン酸経路の種々の代謝産物を添加して ACAT-1 蛋白の発現を検討した。1 μ M セリバスタチンにより ACAT-1 蛋白発現はコントロールの 28% に抑制された。このとき同時に、HMG-CoA 還元酵素の反応生成物であるメバロン酸を添加すると 75% まで回復した。コレステロールやファルネシルピロリン酸は効果がなかったが、ゲラニルゲラニルピロリン酸はコントロールの 58%まで ACAT-1 発現を回復させた。単球・マクロファージ分化の初期段階(day 1-3)でゲラニルゲラニル基転移酵素阻害剤(GGTI-286)を添加しておくと、ACAT-1 の発現は 50% 抑制されたが、ファルネシル基転移酵素阻害剤(FTI-277)は効果がなかった。他のスタチンのコントロールとしてシンバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチンの ACAT-1 蛋白発現に対する効果を検討した。ACAT-1 発現は、1 μ M のロバスタチンにより 58%、シンバスタチンにより 72%抑制されたが、

プラバスタチンでは有意な抑制がみられなかった。

4. 考 察

Duplus ら(J Biol Chem 275, 2000)は、過去 10 年あまりの研究から、脂肪酸は重要なエネルギー源および細胞膜構成分子としての役割に加え、遺伝子発現調節を含めたシグナル分子として働くことが実証されたこと、そして PPAR のリガンドとなることや SREBP への影響など、最近、興味ある進展はみられるものの、脂肪酸による転写調節メカニズムに関してはまだ多くの問題が残っており、今後これらメカニズムの解明が重要であることを述べている。脂肪酸はそれ自身、Fatty acyl-CoA あるいは脂肪酸代謝産物として、遺伝子発現を調節すると考えられている。脂肪酸応答性の転写因子として PPARs や SREBPs がこれまでに示されており、これらの標的遺伝子としては、脂質代謝関連酵素遺伝子等が良く知られている。PPAR は steroid-thyroid-retinoid receptor superfamily に属する転写因子で、fibrate や thiazolidinedione が合成リガンドとして、また多価不飽和脂肪酸およびエイコサノイドが天然のリガンドとなることが示されている(Curr Opin Chem Biol 1, 1997)。SREBP には、SREBP-1a, -1c および-2 があり、SREBP-1 は主に脂肪酸合成系を、SREBP-2 がコレステロール合成系を調節している。最近、SREBP の発現が多価不飽和脂肪酸により抑制されることが報告された。Yahagi ら(J Biol Chem 274, 1999)は、野生型マウスと成熟型 SREBP-1 トランスジェニックマウスを用いた検討から、野生型マウス肝臓では食事性多価不飽和脂肪酸は核内の成熟型 SREBP-1 蛋白を著しく減少させ、その抑制効果は前駆体蛋白からの成熟化の抑制によることを示した。また、Kim ら(J Biol Chem 274, 1999)は、多価不飽和脂肪酸により SREBP-1 mRNA の減少も認められることを示した。我々も、これまでにコレステロール逆転送系に関わる CETP 発現が、多価不飽和脂肪酸により有意に低下し、n-3 系と n-6 系に分けて CETP 発現に対する抑制作用をみると発現の低下は脂肪酸の不飽和度と相関することを示した。これらの背景から、脂肪酸の遺伝子発現調節作用について網羅的な解析を試みるために、GeneBank などの database に登録されたヒト既知遺伝子 5,700 種のプローブを含む DNA チップを用いて検討した。今回の検討では、これまでに多価不飽和脂肪酸による発現抑制が示されたコレステロール代謝系遺伝子において、その作用が確認されると共に、これまでに報告されていない脂質代謝、糖代謝をはじめとする各種遺伝子発現に対して、多価不飽和脂肪酸が調節作用を持つことが示された。これらの結果から、DNA チップを用いた検討は、多価不飽和脂肪酸をはじめとして各種薬剤や刺激に対する標的遺伝子の検索に有用な方法であると考えられる。また、これまでに報告された CETP 発現制御に関わる転写因子には大きな変化が認められなかったが、今回用いた DNA チップのプローブには含まれない、新たに同定されている転写因子の中に CETP 発現制御に関わるものの存在が予想される。したがって、今後さらにプローブ数を増やし、機能の未知遺伝子に対する脂肪酸の作用についても解析を行いたい。今回の検討により、多価不飽和脂肪酸の作用が新たに示された遺伝子については、現在 RT-PCR 法によって、dose-dependency など詳細な検討をすすめている。

脂質代謝関連遺伝子群を含む多くの遺伝子の発現がエストロゲン投与で変化することが本実験により明らかになった。脂質代謝に関わる主要遺伝子である LDL 受容体、HMG-CoA 還元酵素、cholesterol-7 α -hydroxylase, squalene synthase などによりあまり変化が無く、lipid-binding protein 遺伝子群や、ACAT-1, squalene epoxidase, apo AI, AII, SREBP-1, NTCP 等に変化が現れたことは、これら発現の変化した遺伝子群がエストロゲンによる脂質低下のメカニズムに何らかの関わりを持つ可能性が考えられた。HDL 受容体の変化との相関に興味を持たれる。脂質代謝との関係は不明だが、インターフェロンによって誘導される多くの遺伝子がエストロゲン投与によって誘導された。C 型肝炎のインターフェロン療法において血中エストロゲン濃度が治療成績と良く相関することが知られており(Hayashi J ら, Arch Intern Med 158, 1998)何らかの関係が示唆された。

酸化 LDL はマクロファージ (M ϕ) や血管平滑筋細胞 (VSMC) を泡沫化させるほか、これら細胞の分化、増殖ならびに遊走に密接に関連していることが報告されている。さらに、血管内皮細胞 (EC) においては ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)や VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)といった細胞接着因子や走化性因子(MCP-1, macrophage chemotactic protein-1 や IL-8 など)の発現を誘導し、その結果病巣への白血球浸潤を促進して病態を進展させる。また、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)および組織因子の発現誘導と tPA (tissue plasminogen activator)発現抑制および protein C 活性抑制による血栓形成の促進、NO 産生阻害による内皮依存性血管弛緩反応の減弱など多種多様な作用が報告されている。この酸化 LDL の作用を仲介する分子として、SR-A や CD36 といった、いわゆる

スカベンジャー受容体と呼ばれる一群の分子が同定されていたが、最近、EC に発現する新規な酸化 LDL 受容体 (LOX-1, lectin-like oxidized LDL receptor) が同定された。LOX-1 はヒト動脈硬化病巣での発現増強が確認されているほか、動脈硬化に関連すると考えられている種々刺激や、リガンドである酸化 LDL 自身によって発現が誘導されることが *in vitro* で観察されており、EC の活性化・機能障害に深く関与していると推察されている。今回の酸化 LDL 受容体 LOX-1 発現調節の検討では、酸化 LDL は外因系凝固反応のトリガーである組織因子の発現を誘導することが知られていることから、血液凝固反応においても酸化 LDL を介したポジティブなループの存在が推察される。このことは動脈硬化病態における易血栓性、特にプラーク破裂における血栓形成を精査する上で興味深い知見であると考えられる。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) はすでに一般臨床の場で幅広い使用されている高コレステロール血症治療薬で、コレステロールの合成を抑制することによる血清コレステロール低下作用を有している。最近、スタチンには血清コレステロール低下作用を介しない血管保護作用、抗動脈硬化作用があることが提唱されているが、その実体は未だ明らかでない。ACAT は、動脈硬化病変におけるマクロファージの泡沫化に必須の役割をもっており、ACAT 阻害剤は血管壁に直接作用し、マクロファージの泡沫化を抑制する薬剤として開発が進められている。本研究では ACAT-1 の発現調節機構を明らかにするとともに、ACAT-1 がスタチンの標的分子となり得るかを検討した。

セリバスタチンは、ヒト単球・マクロファージの分化過程における ACAT-1 蛋白の発現を 50-80% 抑制した。一旦単球がマクロファージに分化すると、セリバスタチンによる ACAT-1 発現抑制はみられなかった。従ってセリバスタチンによる ACAT-1 発現抑制は未分化の段階に特異的であるということが示唆される。セリバスタチンによる ACAT-1 発現抑制は mRNA のレベルで生じており、転写レベルでの調節が行われている可能性がある。この点は今後、mRNA の安定性の変化とともに検討すべきである。セリバスタチンによる ACAT-1 発現抑制は、メバロン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸により部分的に解除された。またゲラニルゲラニル基転移酵素阻害剤によっても ACAT-1 蛋白の発現が抑制されたことから、未知蛋白のゲラニルゲラニル化が ACAT-1 の発現に関与している可能性が示された。スタチンによる ACAT-1 発現抑制は、セリバスタチンに特異的ではなく、シンバスタチンやロバスタチンにもみられた。これら 3 種のスタチンはいずれも脂溶性スタチンであるが、水溶性スタチンであるプラバスタチンには ACAT-1 発現抑制作用がほとんどみられなかった。従って単球・マクロファージにおける ACAT-1 発現抑制作用は、脂溶性スタチンに特異的なものであることが示唆される。

5. 結 論

多価不飽和脂肪酸の遺伝子発現調節機能を網羅的に解析するため、HepG2 細胞に対する脂肪酸の作用を DNA チップにより検討した。多価不飽和脂肪酸処理で、これまでに報告された HMG-CoA reductase, LDL receptor, fatty acid synthase などコレステロールおよび脂肪酸代謝系遺伝子の mRNA レベルの減少が確認された。mevalonate pyrophosphate decarboxylase や lysosomal acid lipase などへの作用が今回の解析により新たに示された。さらに、多価不飽和脂肪酸は糖代謝系、細胞分化・増殖因子および他の遺伝子など広範な遺伝子群の mRNA レベルに影響を及ぼすことが示された。

広範かつ詳細に動脈硬化関連遺伝子群の発現調節を解析するために、エストラジオールをマウスに投与し DNA チップを用いて解析を試み、lipid-binding protein 遺伝子群や、ACAT-1, squalene epoxydase, apo AI, AII, SREBP-1 などの発現に変化を見出した。これら遺伝子の HDL 受容体との関連に興味を持たれた。

血管内皮細胞において LOX-1 は種々刺激によって発現誘導されることが、今回確立した cell surface ELISA 系を用いた検討で明らかになった。LOX-1 は動脈硬化の発症および進展に密接に関連していることが推察されており、この LOX-1 を中心とする病態の解析を行うことにより、新規抗動脈硬化薬を創製する手掛かりが得られる可能性があると考えられる。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤、セリバスタチンは培養ヒト・単球マクロファージの分化過程における ACAT-1 発現を有意に抑制した。その効果は、有効血中濃度である 10 nM でも有意であった。セリバスタチンによる ACAT-1 発現抑制は、mRNA レベルで生じており、蛋白のゲラニルゲラニル化に関与していると推察された。また、セリバスタチン以外にもシンバスタチンやロバスタチンなどの脂溶性スタチンに ACAT-1 発現抑制作用を認めた。

6. 研究発表

- 1) Iizuka A, Iijima OT, Kondo K, Matsumoto A, Itakura H, Yoshie F, Komatsu Y, Takeda H, Matsumiya T: Antioxidative effects of Choi-oki-to and its ability to inhibit the progression of atheroma in KHC rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2000; 6(2):49-54
- 2) Hanaka S, Abe T, Itakura H, Matsumoto A: Gene expression related to cholesterol metabolism in mouse brain during development. *Brain Dev* 2000; 22(5):321-6
- 3) Fujiwara Y, Kondo K, Itakura H, Fujioka T, Tsujita Y, Kurata H, Fidge N, Matsumoto A: Regulation of hepatic high density lipoprotein binding protein, HB₂, expression after administration of simvastatin to rabbits. *J Atheroscler Thromb*, In press
- 4) Hirano R, Igarashi O, Kondo K, Itakura H, Matsumoto A: Regulation by long chain fatty acids of the expression of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in HepG2 cells. *Lipids*, in press
- 5) Kono K, Tanaka M, Ogita T, Kohama T: Characterization of B-5354c, a new sphingosine kinase inhibitor, produced by a marine bacterium. *J Antibiot* 2000; 53(8): 759-64
- 6) Kono K, Tanaka M, Mizuno T, Kodama K, Ogita T, Kohama T: B-535a, b and c, new sphingosine kinase inhibitors, produced by a marine bacterium; taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and structure determination. *J Antibiot* 2000; 53(8): 753-8
- 7) Kono K, Tanaka M, Ogita T, Hosoya T, Kohama T: F-12509A, a new sphingosine kinase inhibitor, produced by a discomycete. *J Antibiot* 2000; 53(5): 459-66
- 8) Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, Horiuchi S, Chang CCY, Chang TY, Takahashi K: Localization of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and various tissues. *Am J Pathol* 2000; 156:227-236
- 9) Biwa T, Sakai M, Matsumura T, Furukawa N, Kaneko K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, 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* 2000; 275:5810-5816
- 10) Ohgami N, Kuniyasu A, Furukawa K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Nakayama H: Glibenclamide acts as an inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:417-422
- 11) Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, Horiuchi S, Chang CCY, Chang TY, Takahashi K: Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in macrophage-derived foam cells and its distribution in human organs. *Acta HistochemCytochem* 2000; 33:189-194
- 12) Miyazaki A, Biwa T, Hakamata H, Sakai M, Sakamoto Y, Maung K K, Yuksel M, Horiuchi S: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor plays a priming role in murine macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902:342-346
- 13) Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S: Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:503-509
- 14) Maung KK, Miyazaki A, Nomiyama H, Chang CCY, Chang TY, Horiuchi S: Induction of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 or 9-cis retinoic acid in undifferentiated THP-1 cells. *J Lipid Res* 2000; 42:181-187
- 15) Zhu W, Sano H, Nagai R, Fukuhara K, Miyazaki A, Horiuchi S: The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:1183-1188
- 16) Ohgami N, Nagai N, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H: Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation endproducts. *J Biol Chem*, in press

Table 1. Major genes showing large fold changes with FA treatments.

FA	Accession	Fold Change	Avg Diff Change	Gene
Repressed				
DHA	U49260	-9.5	-1480	mevalonate pyrophosphate decarboxylase
EPA	L41351	-8.3	-650	prostaticin
EPA	U24704	-4.5	-340	antiseecretory factor-1
EPA	J05633	-4.3	-296	integrin beta-5 subunit
EPA	U18919	-4.0	-292	chromosome 17q12-21 mRNA, clone pOV-2
EPA	D11094	-3.8	-247	MSS1
DHA	D42054	-3.8	-238	KIAA0092
DHA	L41351	-3.8	-550	prostaticin
AA	U49260	-3.4	-1388	mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD)
DHA	X59405	-3.4	-189	Membrane cofactor protein
Induced				
DHA	J03910	5.6	890	metallothionein-IG (MT1G)
EPA	M24248	5.2	497	MLC-1V/Sb isoform
DHA	U41515	4.8	389	deleted in split hand/split foot 1 (DSS1)
OA	U47025	4.5	294	glycogen phosphorylase B
EPA	L31881	4.4	314	nuclear factor I-X
EPA	U41515	4.4	351	deleted in split hand/split foot 1 (DSS1)
DHA	U47025	4.4	292	glycogen phosphorylase B
DHA	D31764	4.3	397	KIAA0064
OA	D86973	4.2	311	KIAA0219
AA	U47025	4.2	269	glycogen phosphorylase B
OA	M24248	3.8	337	MLC-1V/Sb isoform
AA	U41515	3.7	273	deleted in split hand/split foot 1 (DSS1)
AA	J03910	3.6	512	metallothionein-IG (MT1G)
OA	D64158	3.4	535	ATP binding protein associated with cell differentiation

HepG2 cells were treated with 0.25mM fatty acid: OA, oleic acid; AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; or DHA, docosahexaenoic acid, for 24h.

Table 2. PUFA-treatment changes in genes of cholesterol and lipoprotein metabolism.

Gene	Fold change			
	OA	AA	EPA	DHA
Repressed				
HMG-CoA reductase	-1.5	-2.9	-2.2	-3.1
HMG-CoA synthase	-1.5	-2.9	-2.4	-2.0
mevalonate kinase	-1.2	-1.2	-2.7	-1.1
mevalonate pyrophosphate decarboxylase	-1.3	-3.4	-1.9	-9.5
lanosterol synthase	-2.5	-2.8	-3.0	-3.1
squalene epoxidase	-1.0	-2.0	-1.2	-2.2
LDL receptor	-1.1	-2.6	-2.1	-2.3
lysosomal acid lipase	-1.1	-1.6	-2.2	-1.6
CETP	-2.9	-1.2	1.3	-1.9
SREBP1	-1.0	-1.7	-1.2	-1.8
Induced				
hepatic triglyceride lipase	1.7	1.2	1.8	2.6
apolipoprotein(a)	2.2	1.3	2.4	-1.3
ICAM-2	2.0	1.3	3.1	-1.3
No change				
apolipoprotein AI regulatory protein (ARP-1)	1.2	1.1	-1.7	1.1
Ear-3	1.0	1.1	-1.1	-1.5
LXR-alpha	1.4	-1.3	2.1	1.3
lectin-like oxidized LDL receptor	1.1	-2.0	-1.1	1.1
lipoprotein lipase	-1.4	-1.0	-1.3	-1.3
scavenger receptor type I	-1.2	-1.3	1.0	1.2
CLA-1 (SR-BI)	0.0	0.0	0.0	0.0
HDL binding protein	1.2	1.2	1.2	1.4
ACAT	1.3	-1.3	1.1	-1.3
Cdc42 GTPase-activating protein	1.3	1.2	1.2	1.4
LCAT	1.0	1.1	-1.2	1.2
phospholipid transfer protein	1.4	-1.2	1.4	-1.0
MTP	0.0	0.0	0.0	0.0
CD36	1.1	-1.3	1.3	1.5

HepG2 cells were treated with 0.25mM fatty acid: OA, oleic acid; AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; or DHA, docosahexaenoic acid, for 24h.

Table 3. Fold changes of mRNA levels by PUFA-treatment in HepG2 cells.

Gene	Accession	Fold change				Function
		OA	AA	EPA	DHA	
fatty acid synthase	S80437	-1.0	-2.1	-2.1	-2.3	fatty acid synthesis
acetyl-CoA carboxylase		-1.8	-1.3	-2.2	-2.1	fatty acid synthesis
stearoyl-CoA desaturase		1.1	-2.9	-2.9	-3.1	PUFA synthesis
liver fatty acid binding protein (FABP)	M10050	1.1	-2.0	-1.6	-1.5	fatty acid transport
2-oxoglutarate dehydrogenase	D10523	1.4	-1.0	2.0	1.4	TCA cycle
succinate dehydrogenase (SDH)	L21936	1.9	1.4	2.1	2.5	TCA cycle
isocitrate dehydrogenase	Z68129	1.5	1.9	2.5	2.0	TCA cycle
succinyl-CoA synthetase	Z68204	2.1	1.2	2.1	2.1	TCA cycle
glycogen phosphorylase B	U47025	4.5	4.2	3.3	4.4	glycogenesis
galactokinase (GALK1)	L76927	2.5	2.8	1.9	3.1	glycogenesis/glycolysis
mitochondrial NADH dehydrogenase	U65579	1.8	2.0	3.1	2.7	aspiratory chain
FDXR gene (adrenodoxin reductase)	M58509	1.2	1.5	1.6	2.2	electron transport system
deoxyuridine nucleotidohydrolase	U31930	1.6	1.6	1.2	2.1	nucleotide metabolism
glucose transport-like 5 (GLUT5)	M55531	-1.0	2.6	1.2	3.0	glucose transporter
intercellular adhesion molecule 2 (ICAM-2)	M32334	2.0	1.3	3.1	-1.3	cell adhesion
neural cell adhesion molecule (N-CAM)	S71824	1.6	2.9	2.3	2.3	cell adhesion
heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	M85289	-1.5	1.3	5.3	1.3	cell adhesion
integrin beta-5 subunit	J05633	1.1	-1.7	-4.3	-1.1	EM receptor
vitamin D receptor	J03258	2.4	1.2	1.7	1.5	transcription factor
thyroid receptor interactor (TRIP7)	L40357	1.2	2.5	1.1	1.8	transcription factor
PPAR gamma	L40904	2.0	-1.6	-1.1	1.0	transcription factor
NF-kappa-B transcription factor p65 subunit	L19067	2.3	1.7	1.4	1.8	transcription factor
Rad2		2.6	2.1	3.5	2.6	transcription factor
nuclear factor I-X	L31881	1.4	-1.2	4.4	1.4	transcription factor

HepG2 cells were treated with 0.25mM fatty acid: OA, oleic acid; AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; or DHA, docosahexaenoic acid, for 24h.

Table 4. Genes showing increased expression with estradiol treatment in mice.

Accession	Description	Fold change	
		3 mg/kg	30 mg/kg
Lipid binding protein			
	adipocyte lipid binding protein	-1.1	48.2
	mal1 mRNA for keratinocyte lipid-binding protein	1.7	4.2
X70100	mal1 mRNA for keratinocyte lipid-binding protein	1.5	2.6
k02109	3T3-L1 lipid binding protein	2.1 *	44.8 *
	homologous to sp P04117: fatty acid-binding protein	-1.5 *	26.5 *
M72394	calcium-dependent phospholipid binding protein (PLA2)	1.9 *	7.6 *
Lipid metabolism			
L42293	acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT)	1.6	2.6
D42048	squalene epoxidase	14.3 *	24.1 *
Interferon activatable protein			
	mouse 204 interferon-activatable protein	-1.1	9.8
	homologous to sp P09912: interferon induced protein 6-16	1.5	8.3
w11156	similar to gb:J03909 gamma-interferon inducible protein	1.6	6.5
	homologous to sp P15092: interferon-activatable protein	2.1	6.3
m31419	mouse 204 interferon-activatable protein	3.8 *	20.1 *
m63961	mouse interferon-gamma inducible protein (mag-1)	6.5 *	10.9 *

* Values were not accurate, expression levels of base lines (control) were called "Absence".

Table 5. Genes showing decreased expression with estradiol treatment in mice.

Accession no.	Description	Fold change	
		3 mg/kg	30 mg/kg
Lipid binding protein			
	homologous to sp P36956: (SREBP-1)	1.1	-8.8
	homologous to sp P26435: sodium/bile acid cotransporter (Msa.34372.0)	-1.1	-2.4
	homologous to sp P26435: sodium/bile acid cotransporter (Msa.27445.0)	1.0	-2.0
	homologous to sp P09813: apo A-II	-1.1	-2.2
	apo A-I	-2.0 *	-2.1 *
u06670	very low density lipoprotein receptor	-1.6 *	-5.0 *
Other protein			
	homologous to sp P27550: acyl-coenzyme A synthase	-2.0	-14.1
	homologous to sp P98063: bone morphogetic protein 1	-8.8	-12.6
I05439	insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2)	-1.4	-9.7
	homologous to sp P33194: possible DNA-repair protein XP-E	1.1	-8.0
AF031170	3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform VI	-1.1	-7.7
	homologous to sp P29692: elongation factor 1-delta	1.0	-6.3

* Values were not accurate, expression levels of treated groups were called "Absence".

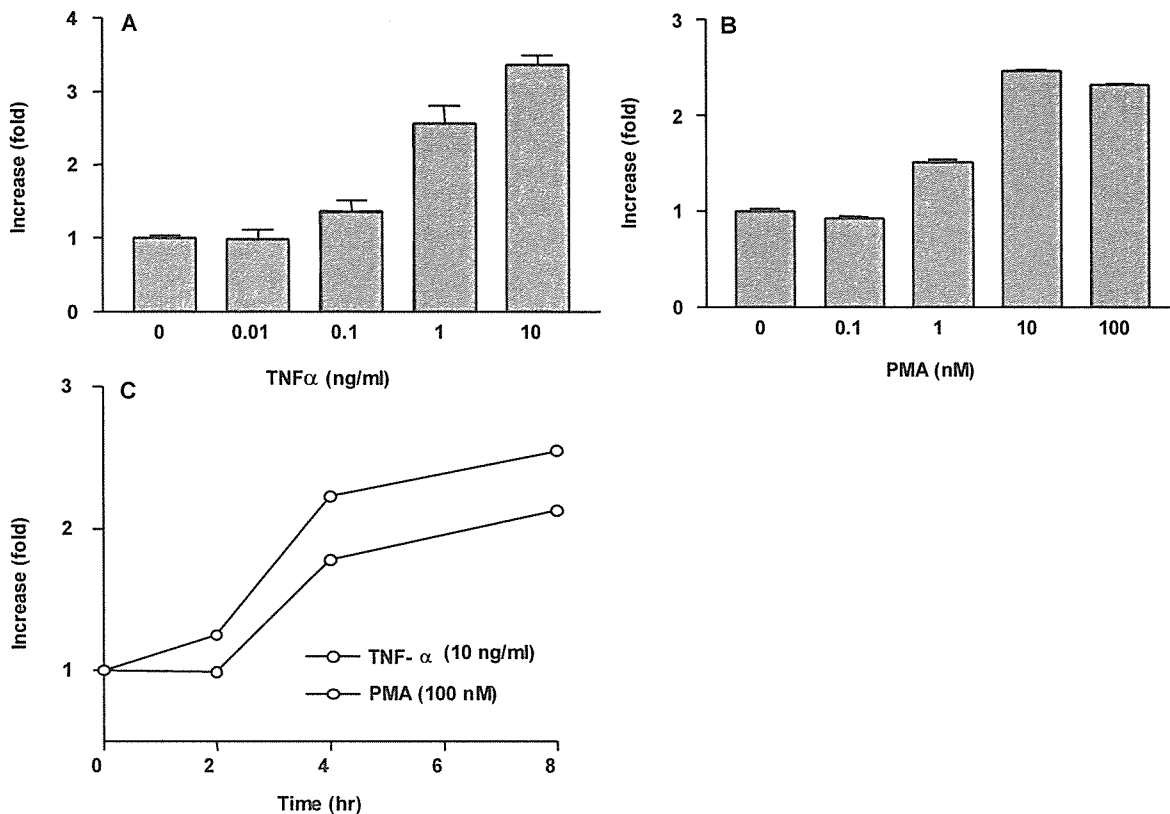


Fig. 1 Induction of LOX-1 expression by treatments with TNF- α or PMA in bovine aortic endothelial cells. Panels show dose dependencies for TNF- α (A), PMA (B) after 8h treatment, and time-responsive curves.

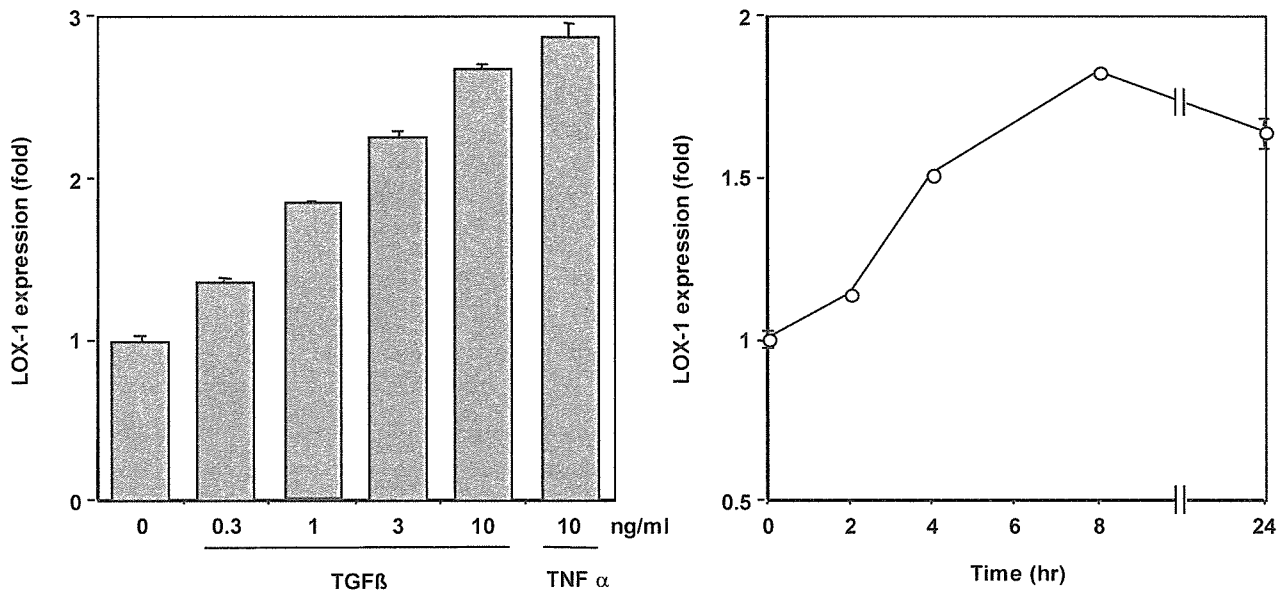


Fig. 2 Induction of LOX-1 expression by treatments with TGF- β in bovine aortic endothelial cells. Panels show a dose dependency after 8hs treatment (left), and a time-responsive curve by the treatment with 1 ng/ml TGF- β (right).

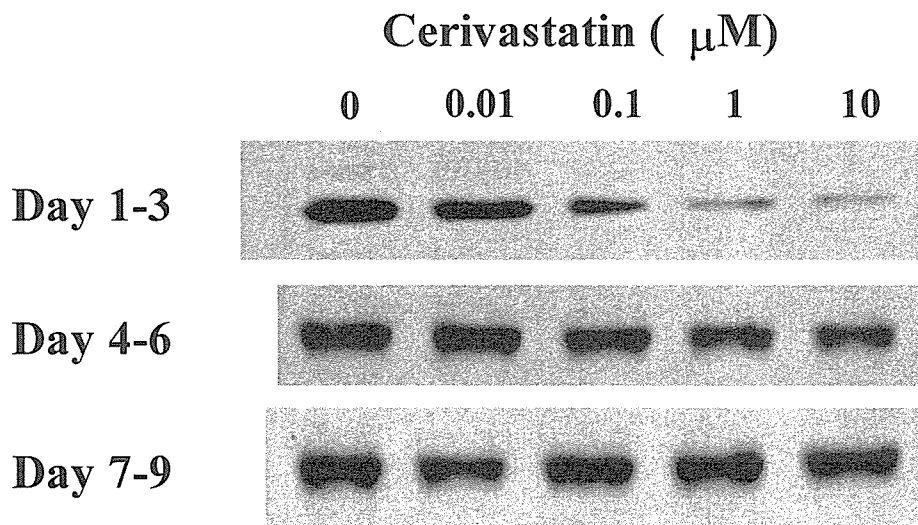


Fig. 3 Effects of cerivastatin on ACAT-1 protein contents in human monocyte-macrophages. Human monocytes were prepared from human blood from healthy volunteers and cultured for 9 days to induce differentiation into macrophages. Cells were treated for 48 hrs with the indicated concentrations of cerivastatin during various stages of differentiation as indicated. The cells were solubilized with 150 μ l 10% SDS and 50 μ g protein from each sample was separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Immunoblotting of ACAT-1 protein was performed with anti-human ACAT-1 antibody.

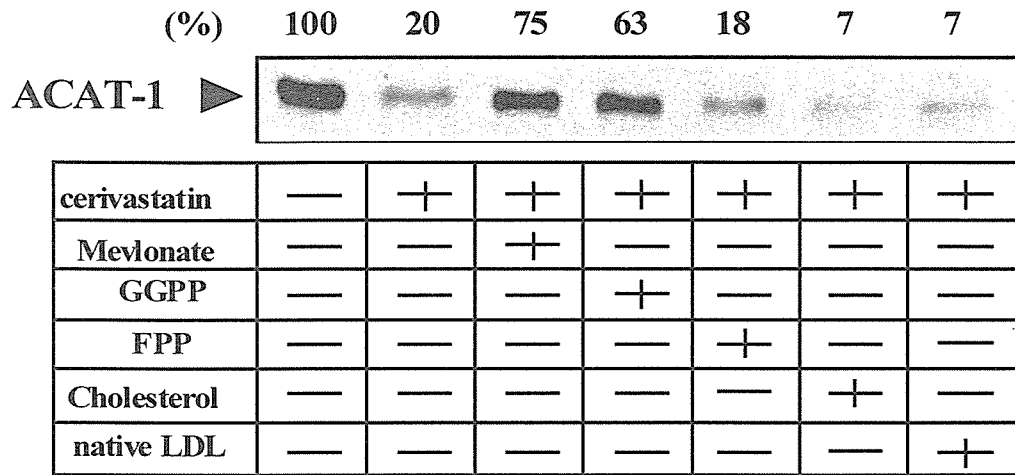


Fig. 4 Role of geranylgeranylpyrophosphate in ACAT-1 protein expression in the early stage of human monocyte-macrophage differentiation. Human monocytes were incubated with medium alone for 24 hrs followed by treatment for 48 hrs with 1 $\mu\text{mol/L}$ cerivastatin in the absence or presence of mevalonate, geranylgeranylpyrophosphate (GGPP), farnesylpyrophosphate (FPP), cholesterol or LDL. The cells were solubilized with 150 μl 10% SDS and 50 μg protein from each sample was separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Immunoblotting of ACAT-1 protein was performed with anti-human ACAT-1 antibody.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社