

200/0/71

厚生科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

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)

平成 13 年度総括・分担研究報告書

平成 14 年 (2002 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 (独立行政法人国立健康・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研究科 教授)

目次

I. 総括研究報告	
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.....	1
堀内正公	
II. 分担研究報告	
1. 細胞内遊離コレステロール調節機構.....	3
堀内正公	
2. 細胞からのコレステロール搬出機序の解明.....	7
横山信治	
3. コレステロールエステル転送蛋白(CETP)発現.....	11
に及ぼす長鎖脂肪酸の影響 松本明世	
4. 肝細胞における HDL からのコレステロールエステル の取り込み機構.....	17
新井洋由	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	30

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

ヒト単球・マクロファージにおける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-1 (ACAT-1) の発現は、Transforming growth factor- β 1 により促進、アディポネクチン、HMG-CoA 還元酵素阻害剤セラスタチンにより抑制された。細胞コレステロール搬出に与る ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1)は、シグナルペプチドが切断され N 末端を細胞外に露出していることが明らかになった。プロゲステロンはコレステロールの細胞内輸送を阻害することが示された。レシチン・コレステロールアシル基転移酵素(LCAT)欠損マウスの解析により肝臓は HDL 新生の主要な臓器であることが示された。アストログリアによる HDL 新生では、コレステロール、リン脂質、カベオリン 1 がともに挙動し、HDL 様粒子を形成した。HepG2 細胞において、多価不飽和脂肪酸により ABCA1、肝トリグリセリドリパーゼ、LCAT の発現が増加した。肝臓に発現する HDL 受容体 SR-BI の結合蛋白として同定された C-terminal linking and modulating protein (CLAMP) は、SR-BI の安定化に関与しており、C末端ドメインがリン酸化を受けていることが示された。HDL を上昇させる薬剤として知られるフィブラートは、SR-BI 及び CLAMP の発現を低下させた。

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 独立行政法人国立健康・栄養研究所
分子栄養健康室長

新井洋由 東京大学大学院薬学系研究科
教授

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。

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

「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。

平成 13 年度の研究経過

堀内は、過剰な細胞内遊離コレステロールをコレステロールエステルに変換する酵素、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)の発現調節を検討した。動脈硬化病変のマクロファージ由来泡沫細胞には ACAT のアイソザイムの一つである ACAT-1 が高度に発現しており、泡沫化に重要な役割を果たしている。

ヒト単球を7日間培養するとマクロファージに分化する。このとき同時に Transforming growth factor- β 1 を添加しておく、ACAT-1 蛋白レベルは3倍に増加した。ACAT 活性、ACAT-1 mRNA も同様に増加した。同様の実験系で HMG-CoA 還元酵素阻害剤、セリバスタチンを添加しておく、ACAT-1 の発現は 50%抑制された。セリバスタチンの ACAT-1 抑制効果はゲラニルゲラニルピロリン酸で解除されたことから、単球・マクロファージの分化に伴う ACAT-1 の発現には未知蛋白質のゲラニルゲラニル化が関与していることが示唆された。分化したマクロファージを脂肪細胞由来のサイトカイン、アディポネクチンと培養すると、ACAT-1 蛋白の発現は 50%減少した。抗ヒト ACAT-2 抗体を用いてヒト動脈硬化病変の免疫組織染色を行うと、動脈硬化病変のマクロファージは ACAT-1 とともに ACAT-2 も発現していることが示された。

横山は HDL による細胞コレステロールの搬出機構を検討した。タンジール病原因遺伝子として同定された ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) の機能的発現系でその構造と機能を解析し、シグナル・ペプチド切断と N 末端の細胞外露出が示された。プロゲステロンが HDL 新生特異的細胞内コレステロールの輸送を阻害し、産生 HDL 中のコレステロール含有量減少を示した。細胞脂質の拡散流出障害である Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) 欠損マウスにプロブコールを与え、臓器特異的なコレステロール蓄積を検討して、肝臓が HDL 新生の主要な臓器であることを示した。アストロサイトにおいて、アポ A-I 刺激によりコレステロールと磷脂質及 caveolin-1 とともに細胞質へ転移することを示し、Acidic fibroblast growth factor (酸性 FGF) による autocrine 効果により apoE-HDL 産生とコレステロール放出が著しく高まると考えられた。

松本は、多価不飽和脂肪酸の脂質代謝系酵素・蛋白の発現調節に及ぼす作用について、HepG2 細胞を用いて定量 RT-PCR により解析した。ABCA1、LCAT および HTGL などコレステロール逆転送系に働く酵素・蛋白の発現に mRNA レベルで増加が

認められた。これらの結果は、多価不飽和脂肪酸がコレステロール逆転送活性を促進させることを示すものであると考えられ、多価不飽和脂肪酸の抗動脈硬化作用の一部は、これらの成果によって理解しうると考えられた。

新井は、肝臓における HDL 受容体である SR-B1 の細胞質に結合する蛋白質(C-terminal linking and modulating protein; CLAMP と命名)を発見し、SR-B1 による HDL 代謝過程における CLAMP の意義を明らかにすることを目的に研究を行ってきた。その結果、CLAMP が SR-B1 の発現量、ひいては血中 HDL レベルを制御する因子であることが強く示唆された。まず、培養細胞および in vivo のレベルにおいて、CLAMP が SR-B1 蛋白質を安定化し、その結果 SR-B1 の発現量が上昇することがわかった。さらにこの作用を発揮するには CLAMP の SR-B1 との結合ドメイン以外に C 末端領域が必要であることが明らかになった。この領域にはリン酸化可能な Ser/Thr 残基が複数あり、実際にリン酸化されていることを確かめた。一方、これまでフィブレート系の薬物は HDL レベルを上昇させることが知られていた。フィブレート系の薬物により肝臓の SR-B1 および CLAMP の発現レベルが著しく低下することを見出した。さらに CLAMP の低下は SR-B1 に依存していないことがわかり、フィブレート> CLAMP の低下> SR-B1 の低下>血中 HDL の上昇、というメカニズムが強く示唆された。フィブレートの標的の一つが CLAMP の発現レベルの低下であることがはじめて明らかにされた。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
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調節機構—

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

ヒト単球・マクロファージにおける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) の発現調節を検討した。ヒト単球を 7 日間培養するとマクロファージに分化する。このとき同時に Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) を添加しておく、ACAT-1 蛋白レベルは 3 倍に増加した。ACAT 活性、ACAT-1 mRNA も同様に増加した。同様の実験系で HMG-CoA 還元酵素阻害剤、セリバスタチンを添加しておく、ACAT-1 の発現は 50% 抑制された。セリバスタチンの ACAT-1 抑制効果はガラニルガラニルピロリン酸で解除されたことから、単球・マクロファージの分化に伴う ACAT-1 の発現には未知蛋白質のガラニルガラニル化が関与していることが示唆された。分化したマクロファージを脂肪細胞由来のサイトカイン、アディポネクチンと培養すると、ACAT-1 蛋白の発現は 50% 減少した。抗ヒト ACAT-2 抗体を用いてヒト動脈硬化病変の免疫組織染色を行うと、動脈硬化病変のマクロファージは ACAT-1 とともに ACAT-2 も発現していることが示された。

A. 研究目的

細胞の遊離コレステロールが一定レベルを越えると 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、コレステロールエステル(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割と考えられる。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、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。

動脈硬化病変の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。単球・マクロファージの分化に伴い ACAT-1 の発現誘導がおこるが、動脈硬化病変には多くのサイトカインが発現しており、ACAT-1 発現に影響を与えているこ

とが想定される。本研究では、培養ヒト単球マクロファージを用いて、ACAT-1 発現に対する種々のサイトカインの影響を検討した。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) は、高コレステロール血症に対する治療薬として頻用されているが、最近、脂質低下作用を介しない血管壁への直接作用が注目されている。本研究では、単球・マクロファージにおける ACAT-1 発現に対するスタチンの抑制効果を検討した。

これまでマクロファージに発現する ACAT アイソザイムは ACAT-1 のみであると考えられてきたが、研究協力者の Dr. Chang よりヒト ACAT-2 抗体の供与を受け、ヒト動脈硬化病変並びに培養ヒト単球・マクロファージにおける ACAT-2 発現を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

健康者新鮮血から Ficoll/Hypaque 並びに単球・血小板凝集法を用いてヒト単球を分離し、10%ヒト血清を含む RPMI-1640 と 7 日間培養して成熟マクロファージを得た。このとき同時に Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン 1 β (IL-1 β)、インター

フェロン γ (IFN γ)、腫瘍壊死因子(TNF- α)、単球遊走因子(MCP-1)等のサイトカインを添加し、ACAT-1 発現に対する効果を検討した。同様の実験系でセラバスタチンの効果を検討した。また分化したヒトマクロファージをレコンビナントアディポネクチンと2日間保温し、ACAT-1 発現に対する効果を検討した。

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 μ g/ml のウサギ抗ヒト ACAT-1 抗体またはウサギ抗ヒト ACAT-2 抗体で処理し、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 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 プロブ(ACAT-1 cDNA, 1551-2278)を作成した。細胞から抽出した 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

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、15 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) 免疫組織化学染色

ヒト剖検例から動脈硬化病変をもつ大動脈を用いて、抗ヒト ACAT-2 抗体による免疫組織染色を行った。

C. 研究成果

1) 単球・マクロファージにおける ACAT-1 発現に対するサイトカインの効果

単球・マクロファージの分化の過程で種々のサイトカインを添加し、7日目に ACAT-1 蛋白の発

現をウェスタンブロットで検討すると、TGF- β 1 により ACAT-1 蛋白発現レベルは3倍に増加した。一方、GM-CSF、IL1 β 、IFN γ 、TNF- α 、MCP-1 には有意な効果がみられなかった。細胞を可溶化し ACAT 酵素活性を測定すると、ACAT 活性は TGF- β 1 処理により 1.8 倍に増加していた。ノーザンブロット解析では、検出された 2.8 kb、3.6 kb、4.3 kb の ACAT-1 mRNA うち、2.8 kb、3.6 kb のバンドが選択的に 1.7 倍増加していた。一方、分化したヒトマクロファージを TGF- β 1 処理しても ACAT-1 蛋白発現に影響を与えなかった。以上よりヒト単球・マクロファージの分化過程において、TGF- β 1 は ACAT-1 の発現を mRNA レベルで増加させることがあきらかとなった。

分化した培養ヒト単球由来マクロファージをアディポネクチンと2日間培養し、ウェスタンブロットで ACAT-1 蛋白の発現を検討すると、50%の減少がみられ、ACAT 活性にも同様の変化がみられた。

2) 単球・マクロファージにおける ACAT-1 発現に対するセラバスタチンの効果

単球・マクロファージの分化の種々の段階でセラバスタチンを添加し、ACAT-1 の発現に対する効果をウェスタンブロットで検討した。成熟マクロファージを 1 μ M のセラバスタチンで2日間(day 7-9) 処理しても ACAT-1 の発現に影響を与えなかった。一方、分化の初期段階(day 1-3) で単球をセラバスタチン処理すると、ACAT-1 蛋白の発現は 80%抑制された。ACAT 活性を測定しても同様の結果が得られた。ノーザンブロットで分化の初期段階 (day 1-3) における ACAT-1 mRNA の発現を検討すると、2.8 kb、3.6 kb の二つの ACAT-1 mRNA が増加したが、4.2 kb の ACAT-1 mRNA は一定の発現レベルを持続した。このときセラバスタチンを同時添加しておくと、2.8 kb、3.6 kb の二つの ACAT-1 mRNA の増加が抑制され、4.2 kb には変化がなかった。

セラバスタチンによる ACAT-1 発現抑制は、HMG-CoA 還元酵素の反応生成物であるメバロン酸、あるいはメバロン酸経路の代謝産物であるガラニルガラニルピロリン酸の添加により解除された。単球をガラニルガラニル基転移酵素阻害剤 (GGTI-286) と 2 日間 (day1-3) 培養すると、ACAT-1 蛋白の発現は 50%抑制された。

3) ヒト動脈硬化病変のマクロファージにおける ACAT-2 の発現

ヒト大動脈の動脈硬化病変を抗ヒト ACAT-2 抗体で免疫組織化学的に検討すると、脂質を蓄積した細胞に一致して有意な ACAT-2 の発現がみられた。細胞型特異抗体との二重染色により、主な ACAT-2 発現細胞は、平滑筋細胞ではなくマクロファージであることが明らかになった。培養ヒト単球マクロファージを抗ヒト ACAT-2 抗体を用いたウェスタンブロットで解析すると、培養7日目以降、ACAT-1 の発現にやや遅れて ACAT-2 の有意な発現がみられた。

D. 考察

単球・マクロファージにおける ACAT-1 の発現に対する種々のサイトカインの効果を包括的に検討した。その結果、単球・マクロファージの分化途上で TGF- β 1 は ACAT-1 の発現をさらに促進することが示された。最近の免疫組織化学的研究によると、動脈硬化病変のマクロファージ由来泡沫細胞は TGF- β 1 を発現していることが明らかになっている。この TGF- β 1 が血管からリクルートされる単球・マクロファージに作用すると、ACAT-1 の発現をさらに促進し、マクロファージの泡沫化を促進する可能性が考えられる。本研究から泡沫細胞形成における TGF- β 1 の促進的役割が示された。

単球・マクロファージの分化に伴う ACAT-1 の発現は、セリバスタチンの添加により有意な抑制を受けた。ACAT-1 の発現はその基質であるコレステロールの影響を受けないということが多くの研究により明らかになっており、本実験系でもセリバスタチンによる ACAT-1 発現抑制に対しコレステロールは何ら拮抗する作用をもたなかった。メバロン酸経路の他の代謝産物の中で、ゲラニルゲラニルピロリン酸がセリバスタチンの効果に拮抗し、ACAT-1 発現を回復することができた。ACAT-1 自身はゲラニルゲラニル化を受けることはなく、未知の蛋白のゲラニルゲラニル化を介して ACAT-1 の発現が誘導されているものと考えられる。セリバスタチンは横紋筋融解症の副作用のため市場から消えたが、スタチンによる ACAT-1 発現抑制作用は、スタチンの血管壁に対する多面的作用として注目をされる。

本研究は、ヒト動脈硬化病変、特にマクロファ

ージ由来泡沫細胞は、ACAT-1 のみならず、ACAT-2 を発現することを明らかにした。ACAT-2 がどのように発現調節されているか興味もたれる。

E. 結論

動脈硬化病変局所に発現する TGF- β 1 は、ACAT-1 の発現促進を介してマクロファージの泡沫化をさらに促進している可能性がある。

単球・マクロファージの分化に伴う ACAT-1 の発現には、未知タンパク質のゲラニルゲラニル化が関与することが示唆される。高コレステロール血症の治療に頻用されているスタチンは、ACAT-1 を標的として直接作用している可能性がある。

マクロファージは ACAT-1、ACAT-2 の両方のアイソザイムを発現しており、動脈硬化病変の泡沫細胞形成機構を明らかにするためには両者の発現調節機構を明らかにすることが重要である。

F. 研究発表

論文発表

1. Ohgami, N., Nagai, R., Ikemoto, M., Arai, H., Kuniyasu, A., Horiuchi, S., and Nakayama, H. CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276:3195-3202, 2001.
2. Ohgami, N., Nagai, R., Miyazaki, A., Ikemoto, M., Arai, H., Horiuchi, S., and Nakayama, H. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation endproducts. *J. Biol. Chem.* 276:13348-13358, 2001.

学会発表

- 1) Miyazaki A, Maung, KK, Sakashita N, Takeya M, Hakamata H, and Horiuchi S: Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 as a new therapeutic target of statins. 2nd Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. May 12, 2001. Arlington, Virginia, USA.
- 2) Miyazaki A, and Horiuchi S: Involvement of AGE in atherogenesis. The 5th International Conference on Preventive Cardiology. May 28, 2001. Osaka.

- 3) 坂本裕一郎, 宮崎 章, 堀内正公: 酸化 LDL によるマクロファージ増殖における TGF- β 1 の役割. 第 33 回日本動脈硬化学会総会, 平成 13 年 6 月 7 日, 東京.
- 4) 宮崎 章, チューチュー・マウン, 袴田秀樹, 堀内正公: 単球・マクロファージにおける ACAT-1 発現に対するセラバスタチンの効果. 第 33 回日本動脈硬化学会総会, 平成 13 年 6 月 7 日, 東京.
- 5) 坂下直実, 宮崎 章, 堀内正公, 竹屋元裕: ヒト肝および小腸における ACAT-1, ACAT-2 の組織発現に関する検討. 第 33 回日本動脈硬化学会総会, 平成 13 年 6 月 7 日, 東京.
- 6) 宮崎 章, 永井竜児, 袴田秀樹, 堀内正公, 大神信孝, 中山 仁, 池本 守, 新井洋由: メイラード反応後期生成物(AGE)による HDL 受容体 SR-BI 機能の阻害. 第 43 回日本脂質生化学研究会・研究集会, 平成 13 年 6 月 22 日, 帯広.
- 7) 宮崎 章, 大神信孝, 永井竜児, 堀内正公: 生体内糖化蛋白質(AGE)による SR-BI を介するコレステロール逆転送系の抑制. 第 9 回日本血管細胞生物学会, 平成 13 年 11 月 6 日, 福岡.
- 8) 坂下直実, 宮崎 章, Chang CCY, Chang TY, 中村治, 佐藤麻紀, 堀内正公, 竹屋元裕: 骨髄単球由来ヒトおよびマウスマクロファージは分化・成熟とともに ACAT-2 を発現し, 過剰の細胞内コレステロール負荷に伴う細胞泡沫化を促進する. 第 9 回日本血管細胞生物学会, 平成 13 年 11 月 6 日, 福岡.

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機序であると同時に血漿 HDL の主要な起源である細胞からの HDL 新生の機序を、細胞生物学的・生化学的に明らかにすることを目的とし、次の四つの主要なアプローチを行った。1) 形質膜に於ける脂質トランスポーター ABCA1 の構造を解明し、その作用機構を明らかにする。2) ABCA1 の関与する HDL 新生反応 へのコレステロール供給とその HDL への組み込みの機構を研究し、これに関与する細胞内シグナルとコレステロール輸送機構を明らかにする。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する。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用いて研究する。

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 新生反応が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。一方、脳では細胞間コレステロール輸送は脳内で産生される HDL により行われ、脳障害修復機序において重要な役割を果たすと考えられることから、アストロサイトによる HDL

産生機構の解明を目指す。1999 年、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。本研究の目的はこれらの反応の機序を解明し、反応の賦活化とそれによる動脈硬化症予防・治療の手段の基盤とすることにある。

B. 研究方法

1) この反応の細胞側の主要因子である ABCA1 蛋白質の役割を研究するため、ABCA1 を強制発現させた細胞を用い、その構造と機能の関連を検討する。2) この系による細胞コレステロールの搬出は、アポリポ蛋白質と細胞磷脂質による HDL 粒子の新生とそれへの細胞コレステロールの積み込みによって行われ、後者が ABCA1 とは相対的に独立したコレステロールの細胞内の特異的輸送機構を必要とするかを検討する。3) 細胞や個体レベルでこの反応を阻害するプロブコールを利用し、この反応が細胞・個体レベルでのコレステロール代謝平衡と HDL 新生にどのように関わるかを検討する。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する。

C. 研究成果

1) ヒト ABCA1 蛋白質の発現系を用いて、その構造と機能を解析した。ABCA1 を発現しない HEK 293 細胞に ABCA1 を強制発現させると、アポリポ蛋白質 (A-I, A-II) による HDL 新生反応が発現することを示された。この系に於いては、機能的に発現している ABCA1 ではシグナル・ペプチドが切断されていて、596 アミノ酸残基からなる N 末端は細胞外に露出していることが示され、ABCA1 の膜に於ける機能的発現の構造が従来のモデルとは異なることが分かった (Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001) 283: 1019)。

2) HDL 新生のための細胞内コレステロールの特異的輸送系

プロゲステロンは抗動脈硬化作用においてエストロゲンに拮抗するとされるが、その機序は不明である。本論文では、プロゲステロン受容体が存在しないと考えられるヒト繊維芽細胞に於

いて、プロゲステロン及びそのアゴニストがコレステロールの細胞内特異的輸送系を阻害し、アポ A-I により産生する HDL 中のコレステロール含有量を減少させることを示し、同じ効果がエストロゲン存在下でも示された (Biochim. Biophys. Acta (2001) 1532: 173-184)。これはプロゲステロンがエストロゲンの抗動脈硬化作用の一つと考えられている HDL 上昇作用を阻害することを示しており、プロゲステロンのエストロゲン拮抗作用の一部を説明していると考えらえる。

3) 細胞コレステロール搬出反応の生体内での役割分担と血漿 HDL 濃度の制御に於ける役割の研究

HDL 新生反応と血漿 HDL 濃度の制御を、この反応の生理的意義を検討する視点から動物モデルを用いて検証した。HDL 欠損症に於ける反応の欠如と HDL 低下剤による反応阻害は、この反応が血漿 HDL の主要な生成源であることを示す。この反応と物理化学的拡散による細胞コレステロールの流出の、細胞コレステロール代謝平衡に対する臓器特異的な相対的寄与を検討するため、拡散流出の障害である LCAT knock-out マウスにプロブコールを与え、臓器特異的なコレステロール蓄積を検討した。LCAT 欠損マウスに於いてもプロブコール投与による著明な全身のコレステロール蓄積は起こらず、非特異的なコレステロール流出は LCAT 欠損状態に於いても HDL 新生反応の欠如を十分に補っていることを示した。プロブコール投与で肝臓に於いてのみコレステロール蓄積がみられ、肝臓が HDL 新生の主要な臓器であることが分かった (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2001) 21: 394-400)。

4) アストログリアにおいて、アポ A-I 刺激により HDL が新生するとき、HDL 粒子の新生に

先立ち、生合成されるコレステロールと磷脂質及び caveolin-1 とともに細胞質へ移転し、密度 1.1 前後の HDL 様野脂質蛋白質複合粒子を形成することが分かった (J. Biol. Chem. (2002) 277: 7929-7935)。この粒子は cyclophilin A を含むように見え、その阻害剤 cyclosporine A で細胞コレステロールの放出を含むこれらの apoA-I 刺激に基づく全ての反応が停止する。これらの結果は、HDL 形成に向けて細胞内から生合成されたコレステロールを特異的に運搬するシステムが存在することをしめし、HDL 粒子の産生の重要な機序の一つと考えられる。この細胞内 HDL 様粒子へのコレステロールの転移は、マクロファージや繊維芽細胞など他の体細胞にも認められた。一方、脳細胞を長期培養した後分離したアストロサイトからは apoE 産生・分泌の増加がおり、これによる HDL 産生とコレステロール放出が著しく高まる。これはアストロサイト自らが分泌するようになった酸性 FGF による autocrine 効果によるものと考えられた (Biochim. Biophys. Acta (2002) in press)。凍結損傷後の脳組織ではアストロサイトでの酸性 FGF と apoE の産生が著しく高まっており、脳損傷回復機転に於ける反応のモデルであることが示された。

D. 考察

本年度の研究結果から、ABCA1 の膜に於ける基本的構造が分かり、今後の機能的発現の実験の基礎が得られた。また、アポリポ蛋白質—ABCA1 経路による HDL 新生系には特異的細胞内コレステロール輸送システムがリンクしており、アポリポ蛋白質による刺激でこれが起動することが示されて、研究が大きく前進した。さらに、血漿 HDL の主要な産生臓器が肝臓であることが明らかになり、ここでの内因性アポ

リポ蛋白質による HDL 産生の機序を解明する足掛かりがえられた。また、脳内 HDL 産生の機序とその役割についての研究が前進した。

E. 結論

ABCA1 は HDL 新生反応における粒子形成の律速因子となりえて、その細胞外構造が反応に重要である。しかし、HDL へのコレステロール積み込みは粒子形成と相対的に独立しており、そのための特異的機構と因子を必要とする。この反応は血漿 HDL 生成の主要反応であり、その中心臓器は肝臓である。脳内 HDL は脳損傷修復に重要な役割を担うことが分かった。

F. 研究発表

1. Shigehiro Tomimoto, Maki Tsujita, Mitsuyo Okazaki, Shin-ichi Usui, Toyohiro Tada, T. Fukutomi, Shigenori Ito, Makoto Itoh and Shinji Yokoyama. Effect of probucol in lecithin-cholesterol acyltransferase deficient mice: Inhibition of two independent cellular cholesterol releasing pathways in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2001) 21: 394-400.
2. Akitomo Goto, Kanna Sasai, Shogo Suzuki, Tatsuya Fukutomi, Shigenori Ito, Toyooki Matsushita, Mitsuhiro Okamoto, Takahiko Suzuki, Makoto Itoh, Kuniko Okuyama-Noji, and Shinji Yokoyama. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: A study based on coronary angiography. *Atherosclerosis* (2001) 159: 153-163.
3. Kazuhisa Kojima, Sumiko Abe-Dohmae, Reijiro Arakawa, Isamu Murakami, Kaoru Suzumori and Shinji Yokoyama.

- Progesterone Inhibits Apolipoprotein-mediated cellular lipid release: A putative mechanism for the decrease of HDL. *Biochim. Biophys. Acta* (2001) 1532: 173-184.
4. Arowu R. Tanaka, Yuika Ikeda, Sumiko Abe-Dohmae, Reiji Arakawa, Keishi Sadanami, Akinori Kidera, Satoshi Nakagawa, Takahiro Nagase, Ryo Aoki, Noriyuki Kioka, Teruo Amachi, Shinji Yokoyama and Kazumitsu Ueda. Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) 283: 1019-1025
5. Kuniko Okumura-Noji, Kanna Sasai, Renli Zhan, Hitoshi Kawaguchi, Haruhiko Maruyama, Toyohiro Tada, Hikaru Takahashi, Mitsuyo Okazaki, Takashi Miida, Nagahiko Sakuma, Genjiro Kimura, Nobuo Ohta, and Shinji Yokoyama. Cholesteryl Ester Transfer Protein-Deficiency Causes Slow Egg Embryonation of *Schistosoma japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) 286: 305-310.
6. Qianqian Li, Shinji Yokoyama, Luis B. Agellon. Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* (2002) 1580: 22-30.
7. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Koichi Kato, Ryuichiro Sato and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid and caveolin-1 to cytosol in rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 7929-7935.
8. Sachiko Ueno, Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Toshiaki Furukawa, Shinji Yokoyama. An Acidic Fibroblast Growth Factor-Like Factor Secreted into the Brain Cell Culture Medium Upregulates ApoE Synthesis, HDL Secretion and Cholesterol Metabolism in Rat Astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* (2002) in press.

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 独立行政法人国立健康・栄養研究所 分子栄養学研究室長

多価不飽和脂肪酸の脂質代謝系酵素・蛋白の発現調節に及ぼす作用について、HepG2 細胞を用いて定量 RT-PCR により解析した。ABCA1, LCAT および HTGL に発現の増加が認められ、多価不飽和脂肪酸によるコレステロール逆転送活性の亢進が示唆された。

A. 研究目的

生活習慣病の発症には特に食習慣が大きく関わっているが、その予防は高齢者を含め人々の QOL を維持・増進させるために重要である。多価不飽和脂肪酸(PUFA)は脂質代謝系酵素や受容体遺伝子などの発現調節に機能すること、その作用は n-3 と n-6 系、不飽和度、鎖長の違いにより差があることも報告されている。

とくに、脂肪酸およびそれらの代謝物が核受容体 PPAR のリガンドとなること、脂質代謝系遺伝子の転写因子 SREBP の発現あるいは成熟型への転換を PUFA が抑制することが報告され、注目を集めている。昨年度、我々はマイクロアレイ (DNA チップ) を用いて、多価不飽和脂肪酸の遺伝子発現調節作用について、網羅的解析をおこなった。

本年度は、DNA チップから得られた情報を精査することと、発現レベルが低く DNA チップでは解析できなかった高比重リポタンパク質 (HDL) 代謝に関わる酵素・蛋白の発現に及ぼす PUFA の作用を検討するために、定量 RT-PCR の測定系を確立し、mRNA レベルからの解析をおこなった。

B. 研究方法

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、type I collagen-coated dish (. 60 mm) に 1×10^5 cells/dish で播種し、5% CO₂ 下、37°C、42 hr 培養後、約 90% confluent の段階で実験に供した。FBS 中の脂肪酸の影響を最小限とするために、脂肪酸処理は、FBS にかえて 10% (v/v) serum: fetal bovine, lipoprotein-deficient (LPDS, Sigma) を添加した DMEM (4 ml) に、

25 μ l の脂肪酸(FA)ストック溶液(40 mM, 最終濃度 0.25mM) を加え、24 時間培養した。脂肪酸ストック溶液は、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)あるいはドコサヘキサエン酸 (n-3, 22:6; DHA) (Sigma) を 10% BSA 溶液で 40mM となるように溶解し調製した。また、コントロールとして脂肪酸を添加していない 10% BSA (0 mM FA) 25 μ l を加え、同様に培養した細胞を用いた。

細胞から RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて total RNA を調製した。1 μ g の total RNA と primer として random hexamer を用いて Multi Scribe Reverse Transcriptase によって single strand cDNA を合成し、PCR の鋳型とした。目的遺伝子の mRNA 量の測定は、real-time RT-PCR 装置(Gene Amp 5700, Perkin Elmer)を用いて、Cyber Green による検出系でおこなった。各 mRNA 量は GAPDH の mRNA 量を対照として補正し、コントロール (LPDS) の mRNA 量を基準とした相対レベルで示した。

PUFA の遺伝子発現調節作用について検討した HDL 代謝を中心とした脂質代謝・動脈硬化関連遺伝子と RT-PCR に用いたそれらの遺伝子に対する primer の塩基配列を table 1 に示した。

C. 研究結果

0.25 mM 脂肪酸処理後のコントロール細胞 (LPDS) に対する各 mRNA レベルを Table 2 に示した。24 時間の 0.25mM PUFA 処理で、血液循環中の HDL 代謝に関わる hepatic triglyceride lipase (HTGL) および lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), また、細胞内での代謝に関わる ATP-binding cassette A1 (ABCA1) および cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a1) の mRNA レベルに増加が認

められた(Fig. 1)。一方, lysosomal acid lipase/cholesterol esterase (LAL/CE)の減少が認められた(Fig. 1)。しかし, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT), ALCAM (HB2), Cdc42 および CLA-1 (SR-B1)に変動は認められなかった(Table 2)。

コレステロール代謝および脂肪酸代謝に関わる酵素・蛋白遺伝子の発現制御に働く転写因子では, これまでにも報告されているように, SREBP-1および-2のmRNAレベルにAA, EPA および DHA 処理で減少が確認された(Fig. 2)。また, NF-kappa B mRNA レベルにも PUFA 処理で減少が認められた。一方, LXR-alpha では, FA 処理で増加が認められた(Fig. 2)。しかし, ARP-1 および PPAR-alpha には変化は見られなかった(Table 2)。

さらに, DNA チップによる解析から serine protease である prostasin mRNA レベルに EPA で-8.3倍(12.0%)と大きな減少が認められ, PUFA の新たなターゲットであると考えられたが, 今回の検討からも EPA 濃度に依存した mRNA 量の減少が認められた(Fig. 3)。

D. 考察

脂肪酸処理した HepG2 細胞におこる各種遺伝子の mRNA レベルの変動について, DNA チップを用いた解析から得られた情報を精査するために, また, この細胞系では発現レベルが低く DNA チップでは解析ができなかった ABCA1, ACAT や CLA-1, あるいは ARP-1 や LXR-alpha 等の転写因子に対する脂肪酸の作用を精査するために定量 RT-PCR 測定系を確立し, 検討をおこなった。

DNA チップによる解析から FA の作用が新たに見出された HTGL と LAL/CE とについては, 今回の検討からも HTGL mRNA レベルの増加と LAL/CE の EPA および DHA による減少とが確認された。

Wang と Oram (J Biol Chem, 2002)は, 培養マクロファージにおいて, 細胞からのコレステロールの搬出の制御に関わると考えられる細胞の因子である ABCA1 活性を, 飽和脂肪酸では認められないが, 不飽和脂肪酸(C16:1, C18:1, C18:2 および AA)が阻害することを報告した。この阻害は, 不飽和脂肪酸が ABCA1 の mRNA レベルは変化させずに, 蛋白レベルでの分解を促進し, 細胞表面の ABCA1 量を減少させるためであると述べている。しかし, 今回の HepG2 を用いた検討からは, ABCA1 mRNA レベルの EPA と DHA による増加が認められた。これら

結果の差異は, 検討に用いた細胞系ならびに脂肪酸に違いがあることから, 今後の検討課題である。しかしながら今回の検討では, 血液循環中で HDL 粒子内の遊離コレステロールをエステル化することによって HDL のコレステロール受容能の維持に働く LCAT の増加が認められた。さらに, HTGL にも FA による発現の増加が認められた。これらの結果は, PUFA がコレステロール逆転送活性を促進させることを示すものであると考えられる。

Spady ら (J Lipid Res, 1999) は, PUFA に富む食事が, 血清 HDL コレステロールレベルを低下させるのは, ハムスターを用いた検討から, 肝臓の SR-B1 の発現を増加させ, HDL からのコレステロールエステルの選択的取り込みを促進させるためであることを報告した。しかし, 今回の検討では, PUFA による CLA-1 (SR-B1) mRNA レベルの増加は認められなかった。

コレステロール代謝系および脂肪酸合成系の酵素・蛋白遺伝子の脂肪酸による発現制御は, SREBP と LXR とが密接に関わり合った機構によりおこなわれていることが明らかにされてきた。Ou ら (Proc Natl Acad Sci U S A, 2001)は, PUFA が LXR のリガンドに依存した活性化を拮抗的に阻害することにより, SREBP-1c の転写を抑制することを報告している。一方, Tobin ら (Mol Endocrinol, 2000) は, ラット肝細胞系において PUFA が LXR-alpha を mRNA レベルで増加させることを報告した。これ結果は, 今回の結果と一致するものである。LXR-alpha は胆汁酸合成系の律速酵素である CYP7a1 の転写であることから, PUFA による CYP7a1 mRNA レベルの増加は, LXR-alpha の増加と連動した変動であると考えられる。

一方, DNA チップによる解析から PUFA 応答性の遺伝子として見出された prostasin 遺伝子のプロモータ領域には, sterol regulatory element (SRE)の存在が Yu ら (Genomics, 1996) によって示されており, 今回の検討からこの protease は, 脂肪酸およびコレステロールに応答した活性の発現調節をもった酵素で, 血液循環中にもその存在が認められていることから, 脂質代謝酵素系の蛋白レベルでの調節に機能している可能性が考えられる。

E. 結論

多価不飽和脂肪酸の脂質代謝系酵素・蛋白の発現調節に及ぼす作用について, HepG2 細胞を用いて定量 RT-PCR により解析した。ABCA1,

LCAT および HTGL など、コレステロール逆転送系に働く酵素・蛋白の発現に mRNA レベルで増加が認められた。これらの結果は、PUFA がコレステロール逆転送活性を促進させることを示すものであると考えられ、PUFA の抗動脈硬化作用の一部は、これらの成果によって理解しうると考えられた。

これらの成果を人の健康の維持・増進への応用のために、今後、さらに PUFA の濃度依存性、さらに実験動物などを用いた個体レベルでの検討を進めたいと考えている。

F. 健康危険情報

Wang と Oram (J Biol Chem, 2002) は、マクロファージにおいて、コレステロール逆転送系に働く ABCA1 活性を、不飽和脂肪酸が阻害することから、不飽和脂肪酸の過剰摂取による動脈硬化の促進の危険性を指摘している。不飽和脂肪酸の過剰摂取（摂取上限値）については、現在検討が進められている課題であるが、2001 年に発表された米国の National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III Report の Therapeutic Lifestyle Change (TLC) に示された推奨摂取量では、多価不飽和脂肪酸は総摂取カロリーの 10% 未満、一価不飽和脂肪酸は総摂取カロリーの 20% 未満、ただし総脂肪摂取量は総摂取カロリーの 25~35% とされている。また、第六次日本人の栄養所要量では、一般成人の総脂質摂取量は総摂取エネルギーの 20~25% とされており、飽和脂肪酸：一価不飽和脂肪酸：多価不飽和脂肪酸の摂取比率を 3:4:3 とすることを目安としている。従って、これらに示される範囲での不飽和脂肪酸の摂取であれば、脂質代謝の正常化と動脈硬化の抑制効果とが期待され、過剰摂取とはならないと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirano R, Igarashi O, Kondo K, Itakura H, Matsumoto A: Regulation by long-chain fatty acids of the expression of cholesteryl ester transfer protein in HepG2 cells. *Lipids* (2001) 36: 401-406
- 2) Yoshie F, Iizuka A, Kubo M, Komatsu Y, Matsumoto A, Itakura H, Takeda H,

Matsumiya T, Kondo K: Protective effects of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to (Chai-Hu-Jia-Long-Gu-Mu-Li-Tang) against atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Pharmacol Res* (2001) 43: 481-488

- 3) Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K: Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol* (2001) 47: 357-362
- 4) 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* (2000) 7: 203-208

2. 学会発表

- 1) Fujiwara Y, Yokoyama M, Hanaka S, Itakura H, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Matsumoto A: Exploring new functions of polyunsaturated fatty acids on the gene expression using DNA chip. 17th International Congress of Nutrition: 2001.8.29: Vienna, Austria
- 2) Sawada R, Tamura K, Cui Y, Yaguchi T, Akimoto K, Kiso Y, Matsumoto A, Fujiwara Y, Igarashi O: Dietary effect of docosapentaenoic acid (n-6) and docosahexaenoic acid (n-3) on delta 6 desaturase mRNA level in liver and testis of infant rats. 17th International Congress of Nutrition: 2001.8.29: Vienna, Austria
- 3) 藤原葉子, 横山雅代, 貴堂としみ, 石井雅巳, 堤 修一, 油谷浩幸, 古濱孝文, 稲葉寿守, 板倉弘重, 松本明世: DNA チップを用いたエストロジオールの遺伝子発現に及ぼす影響. 第 33 回日本動脈硬化学会総会: 2001.6.8: 東京

Table 1. Primer sequences of real-time RT-PCR.

genes	accession	forward primer sequences		backward primer sequences	
HMG-CoA reductase	M11058	5'- CAGTTGTGCGTCTCCACGT	-3'	5'- CACTGCGAACCCCTCAGATGT	-3'
LDL receptor	L00352	5'- GACTGTGTGCAACGCTTTTGTG	-3'	5'- AAGTGACACCCATCTCCGAGA	-3'
hepatic triglyceride lipase (HTGL)	M29194	5'- TTCAGAAAACACAGATGACCTACTACTTC	-3'	5'- CTGATCTTTGGCTTTGATGTTTTAGAC	-3'
lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)	M12625	5'- TTTCCACACCCAGCTTCAACTA	-3'	5'- CATGTACCAGCCTTCTCAAAGT	-3'
acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)	L21934	5'- CGTCGGCACTGTCTCTGA	-3'	5'- CTAACACCGTAACGACAAGTCCAG	-3'
ALCAM (HB2)	L38808	5'- CCTACCCGTGTCATGCACAATA	-3'	5'- GGCTAGATCGAAGCCTGATGTT	-3'
ATP-binding cassette, A1 (ABCA1)	XM_054857	5'- CAGTTGGATGGCTTAGATTGGAC	-3'	5'- ACAGAACCATTACTGGACTGGACA	-3'
Cdc42	U02570	5'- GCTGTTGTTTTCGGCCCTAAC	-3'	5'- TGATCCAGAAGGAACCTGGTGA	-3'
cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7a1)	XM_044651	5'- TGAGACCTCCAGTCTCCTAACTC	-3'	5'- TCCCGCCTTGTAAGATCTCTG	-3'
CLA-1 (SR-B1)	Z22555	5'- CACACATTCTACACTCAGCTGGTG	-3'	5'- AATAGCATTCTCTTGGCTCCG	-3'
lysosomal acid lipase/cholesteryl esterase (LAL/CE)	M74775	5'- CCAGAGTTATCCTCCACATACAA	-3'	5'- AGACATCTGCAAGCCAGTCGT	-3'
ARP-1	M64497	5'- TCCTGTTACCTCAGATGCCT	-3'	5'- GCTCCTAACGTATTCTTCCAAAGC	-3'
LXR-alpha	U22682	5'- GCCTAGCTCTCCATCCACCA	-3'	5'- AGGCTCACCAGTTTCATTAGCATC	-3'
NF-kappaB (NF-kB)	L19067	5'- CATCCCATCTTTGACAATCGTG	-3'	5'- GAAGATCTCATCCCCACCGA	-3'
PPAR-alpha	XM_027084	5'- GCAGCTGCAAGATCCAGAAAA	-3'	5'- CCAAAACGAATCGCGTTGT	-3'
SREBP-1	U00968	5'- GCAAGGCCATCGACTACATTC	-3'	5'- TTGCTTTTGTGGAGAGCAGTG	-3'
SREBP-2	U02031	5'- AGGGCGACAACCATAATATCA	-3'	5'- GACTTGTGCATCTTGGCGTCT	-3'

Table 2. Relative mRNA levels of genes related to HDL metabolism after fatty acid treatments (n=3).

	control (LPDS)		OA		AA		EPA		DHA	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
HMG-CoA R	1	± 0.23	1.20	± 0.35	0.67	± 0.07	0.69	± 0.03	0.79	± 0.11
LDL-R	1	± 0.02	1.16	± 0.38	0.44	± 0.15	0.65	± 0.05	0.59	± 0.04
HTGL	1	± 0.39	1.98	± 0.67	3.78	± 0.83	4.19	± 2.36	3.73	± 1.34
LCAT	1	± 0.28	1.47	± 0.57	1.60	± 0.11	1.65	± 0.32	1.75	± 0.40
ABCA1	1	± 0.25	1.30	± 0.54	1.23	± 0.77	1.64	± 0.10	2.05	± 0.26
ACAT	1	± 0.11	1.32	± 0.27	1.47	± 0.14	1.39	± 0.47	1.39	± 0.22
ALCAM	1	± 0.21	1.33	± 0.16	1.01	± 0.55	1.25	± 0.20	1.54	± 0.24
Cdc42	1	± 0.16	1.28	± 0.22	1.03	± 0.51	1.34	± 0.17	1.32	± 0.40
CLA-1	1	± 0.14	1.11	± 0.25	1.10	± 0.28	1.02	± 0.16	1.26	± 0.16
CYP7a1	1	± 0.39	1.39	± 0.85	3.27	± 0.66	3.50	± 1.46	2.33	± 1.45
LAL/CE	1	± 0.15	1.34	± 0.19	0.84	± 0.05	0.71	± 0.14	0.57	± 0.07
ARP-1	1	± 0.24	1.32	± 0.28	1.00	± 0.41	1.06	± 0.19	0.82	± 0.14
LXR-alpha	1	± 0.29	1.96	± 0.80	2.60	± 1.11	2.16	± 1.32	2.34	± 0.90
NF-kB	1	± 0.13	0.79	± 0.19	0.61	± 0.32	0.55	± 0.23	0.35	± 0.02
PPAR-alpha	1	± 0.24	1.20	± 0.20	1.21	± 0.19	1.07	± 0.14	0.85	± 0.05
SREBP-1	1	± 0.11	0.93	± 0.39	0.44	± 0.06	0.32	± 0.05	0.24	± 0.06
SREBP-2	1	± 0.10	0.78	± 0.16	0.59	± 0.12	0.47	± 0.07	0.44	± 0.03
GAPDH	1	± 0.23	0.92	± 0.22	0.98	± 0.32	0.91	± 0.18	0.87	± 0.15

HepG2 cells were treated with 0.25 mM FA for 24 h. Levels of mRNA were determined by real-time RT-PCR.

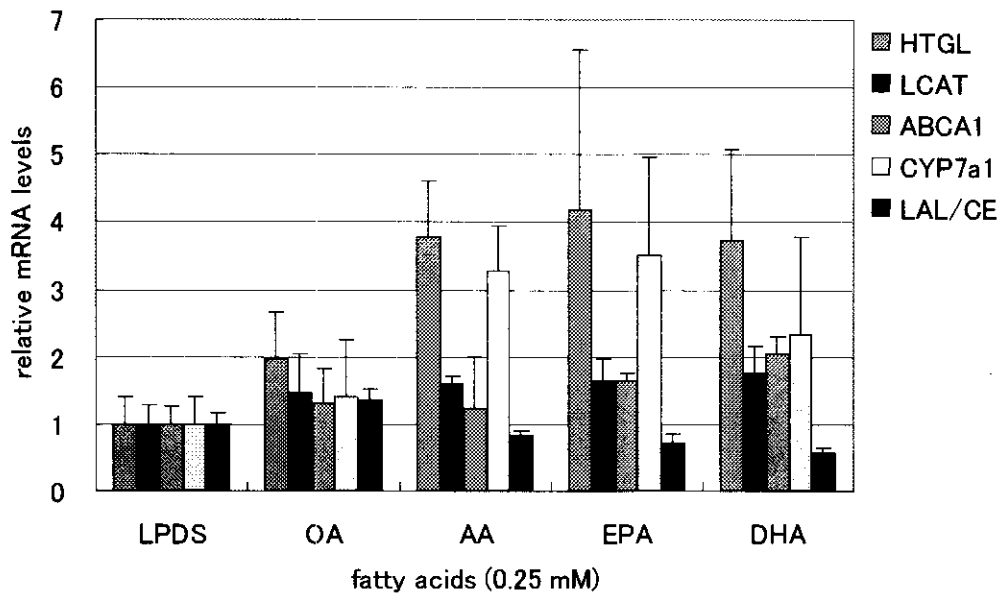


Fig. 1 Relative mRNA levels of genes related to HDL metabolism after 0.25 mM fatty acid treatments. Data were shown mean \pm SD, n=3.

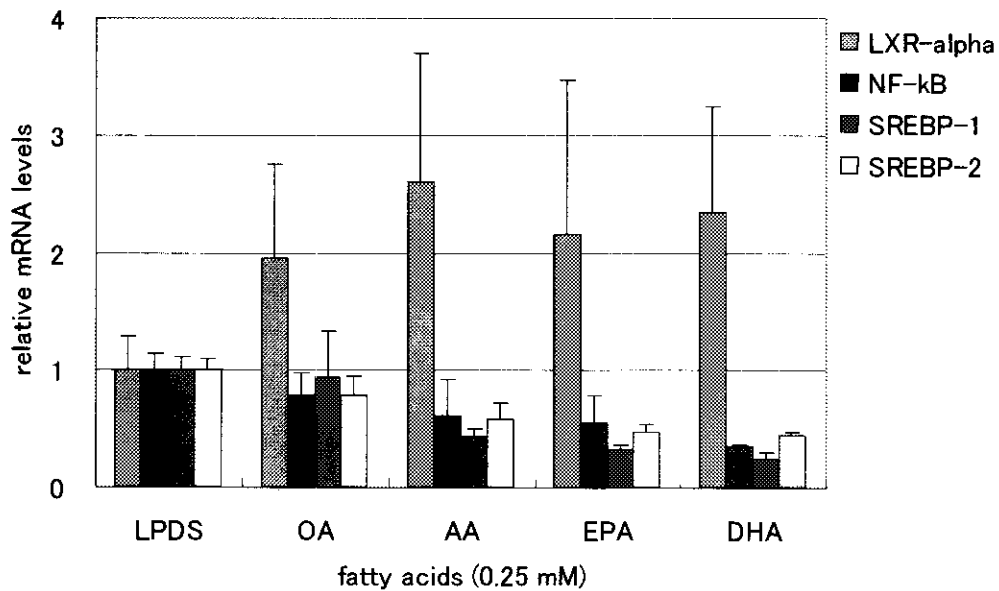


Fig. 2 Relative mRNA levels of transcription factors related to lipid metabolism after 0.25 mM fatty acid treatments. Data were shown mean \pm SD, n=3.

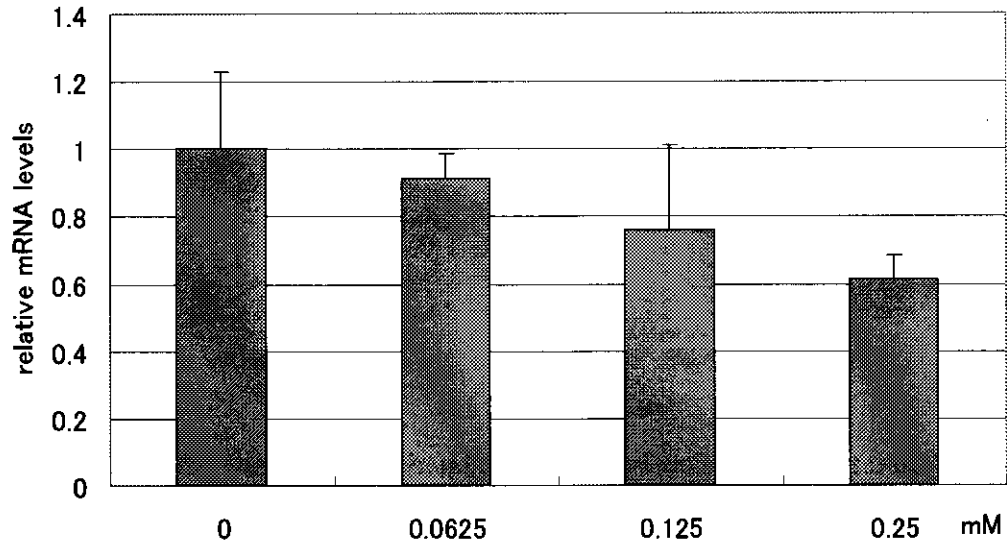


Fig. 3 Effects of EPA on prostasin mRNA levels.
Data were shown mean \pm SD, n=3.

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構の解明
-肝細胞における HDL からのコレステロールエステルの取り込み機構-

分担研究者 新井洋由 東京大学大学院 薬学系研究科 教授

血漿リポ蛋白質の一つである HDL は、心筋梗塞等の発症率と負の相関があり、抗動脈硬化作用を有することが知られている。最近、SR-BI と呼ばれる細胞表面受容体が HDL に対する受容体として初めて同定された。我々は肝臓内において SR-BI の細胞質ドメインに結合する新規蛋白質(CLAMP)を発見した。昨年度までの研究において、CLAMP が SR-BI の蛋白質レベルでの発現を規定している可能性を示してきた。今年度は、SR-BI の安定化に CLAMP の C 末端ドメインが必要であること、このドメインが細胞内ではリン酸化されていることを明らかにした。さらに HDL レベルを上昇させることが知られているフィブレート系の薬物により、肝臓における SR-BI および CLAMP が蛋白質レベルで著しく減少することを見だし、HDL 低下の分子レベルでの解明の糸口が見いだされた。

A. 研究目的

動脈硬化症は、動脈壁にコレステロールエステルに富むマクロファージが蓄積し、血管の閉塞を引き起こす病気である。善玉リポ蛋白質として知られる HDL の抗動脈硬化作用は、HDL が末梢組織の細胞に蓄積した過剰のコレステロールを引き抜き、これを肝臓へ輸送して処理・排泄する経路 (reverse cholesterol transport) に重要な役割を果たしていることで説明される。最近、肝臓において、HDL からコレステロールを引き抜き胆汁中に排泄する機能をもつ受容体蛋白質として SR-BI が同定された。申請者らは、この蛋白質の細胞質ドメインと結合する新規蛋白質を同定・クローニングすることに成功し、CLAMP (C-terminal linking and modulating protein) と命名した。CLAMP は PDZ ドメインと呼ばれる蛋白質-蛋白質間相互作用に関わるドメインを 4 個もっている蛋白質である。本研究の目的は、血中の HDL レベルを調節する機構について、肝臓に存在する HDL 受容体 SR-BI による制御機構を解明することである。特に、SR-BI 結合蛋白質として見いだした CLAMP の生理機能を明らかにし、HDL 調節の新たな機構を解明することを目的としている。

B. 研究方法

(1) SR-BI 結合蛋白質 CLAMP のリン酸化

これまでの研究の結果、培養細胞および in vivo

のレベルにおいて、CLAMP が SR-BI 蛋白質の発現を安定化すること、この作用を発揮するには CLAMP の SR-BI との結合ドメイン以外に C 末端領域が必要であることが明らかになっていた。本年度は、この領域がリン酸化可能な Ser/Thr 残基を複数有していることから、CLAMP が生きた細胞の中で実際にリン酸化されているか、されているとすればどの残基がリン酸化されているかを調べた。

培養肝癌細胞である McRH7777 細胞に CLAMP を発現させ、そこに放射標識リン酸を加え、約 6 時間培養した後に、細胞を破壊し、CLAMP に対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、沈降物を SDS-PAGE、オートラジオグラフィにより解析した。

次にどの残基がリン酸化されているかを調べるために、リン酸化可能な Ser 残基を一つずつ Ala に置換した cDNA コンストラクトを作製し、同様に McRH7777 細胞にトランスフェクションし、リン酸化の有無を調べた。

(2) フィブレート系薬物による SR-BI、CLAMP の in vivo での発現制御

フィブレート系の薬物の HDL 代謝に関する報告はこれまでもいくつかあるが、HDL 受容体である SR-BI に関する報告はほとんど無かった。そこで、マウスに ciprofibrate および fenofibrate を投与し、マウス肝臓における SR-BI、CLAMP の蛋白質量および mRNA 量を測定した。

投与後2-3日後にマウス血清を採取し、コレステロールレベル、血中リポ蛋白質プロファイルを測定した。

次に、肝臓における SR-B1 の mRNA および蛋白質の発現レベルについてノーザンブロットング、ウエスタンブロットング法により調べた。

C. 研究成果

(1) SR-B1 結合蛋白質 CLAMP のリン酸化

肝臓系培養細胞に CLAMP を発現させ、免疫沈降した結果、確かに CLAMP がリン酸化されていることが明らかになった(図1)。さらに、リン酸化アミノ酸解析の結果、Ser 残基がリン酸化されていることがわかった(図2)。

次にどの残基がリン酸化されているかを調べるために、リン酸化可能な Ser 残基を一つずつ Ala に置換した cDNA コンストラクトを作製し、同様に McRH7777 細胞にトランスフェクションし、リン酸化の有無を調べた。その結果、CLAMP の C 末端側の二つの Ser 残基、すなわち Ser509 および Ser512 がリン酸化されることを同定した(図3)。現在、実際の肝臓内でのリン酸化およびその変化を追求すべくリン酸化特異的抗体を作製中である。またリン酸化のドミナントネガティブ体を用いて *in vivo* でのリン酸化の意義を解明すべく、リン酸化部位を Ala に置換したコンストラクトを組み込んだアデノウイルスベクターを作製中である。

(2) フィブレート系薬物による SR-B1、CLAMP の *in vivo* での発現制御

マウスにフィブレート系薬物を混ぜた餌を与え、その後血中リポ蛋白質プロファイルを調べた結果、血中コレステロールレベルの緩やかな減少とともに、粒子サイズの大きな HDL の出現を認めた。

次に肝臓における SR-B1 蛋白質の発現をウエスタンブロットングにより調べたところ、SR-B1 の蛋白質発現量が、フィブレート系薬物を投与することにより著しく低下していることを見出した。しかし、SR-B1 の mRNA 量をノーザンブロットングにより調べたところ、全く変化していないことがわかった。さらに、同様の実験をフィブレート系薬物の標的と考えられている PPAR- α のノックアウトマウスを用いて行ったところ、SR-B1 タンパク質の変化は全く見られなかったことから、フィブレートの作用は PPAR- α を介してい

ることが明らかになった。

さらに SR-B1 結合蛋白質である CLAMP の発現レベルをまずウエスタンブロットングにより調べたところ、やはり SR-B1 と同様に著しく低下していることが明らかになった。しかし、mRNA レベルではこちらも変化無いたことがわかった。次に、CLAMP の蛋白質レベルでの低下がその結合蛋白質である SR-B1 が減少したためであるかを調べるために、SR-B1 ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行った。その結果、SR-B1 の発現の有無に関わらず、CLAMP の蛋白質の著しい減少が見られた。すなわち、フィブレートによる CLAMP の蛋白質レベルでの減少は SR-B1 と全く無関係の現象であることが明らかになった。

D. 考察

現在、CLAMP の翻訳後における蛋白質発現の制御機構についてはまだほとんど明らかになっていないが、一つの可能性として CLAMP のリン酸化関係しているのではないかと考え、解析を続けている。また、SR-B1 蛋白質の減少が CLAMP が低下したために起こった現象なのか、あるいは CLAMP とは独立にフィブレートにより制御されているのかという可能性について、CLAMP をアデノウイルスを用いて肝臓に過剰発現させた状態でフィブレートを投与すると、SR-B1 蛋白質レベルが低下するのか或いはしないのかという実験を計画、実行中である。

E. 結論

我々は、肝臓における HDL 受容体である SR-B1 の細胞質に結合する蛋白質 (CLAMP と命名) を発見し、SR-B1 による HDL 代謝過程における CLAMP の意義を明らかにすることを目的に研究を行ってきた。その結果、本年度までの研究により CLAMP が SR-B1 の発現量、ひいては血中 HDL レベルを制御する因子であることが強く示唆された。まず、培養細胞および *in vivo* のレベルにおいて、CLAMP が SR-B1 蛋白質を安定化し、その結果 SR-B1 の発現量が上昇することがわかった。さらにこの作用を発揮するには CLAMP の SR-B1 との結合ドメイン以外に C 末端領域が必要であることが明らかになった。この領域にはリン酸化可能な Ser/Thr 残基が複数あり、実際にリン酸化されていること