

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構

所 属 独立行政法人国立健康・栄養研究所
生活習慣病研究部
研究者 松本 明世

分担研究者

- (1) 新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科
- (2) 佐伯 隆生 エーザイ株式会社研究開発本部創薬第三研究所

要旨

動脈硬化の治療薬に対する新たな標的を見いだすこと目標に、新たな角度からの HDL 代謝機構の解明を目的として、エストロゲンの遺伝子発現調節作用を網羅的に解析した。また、新規蛋白質 CLAMP の機能を解析し、HDL 創薬の新たな標的となることを強く示した。

1. 研究目的

わが国を含め欧米の先進国においては、虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患は死因の上位を占め大きな社会問題となっており、動脈硬化に対する効率的な予防手段、ならびに有効な治療薬を開発することの意義は非常に大きい。動脈硬化症は血管壁内皮下にコレステロールが蓄積することにより起こる病気である。血中の低比重リポ蛋白質(LDL)はコレステロールを血管壁に蓄積させる作用があり、逆に高比重リポ蛋白質(HDL)は血管壁に蓄積したコレステロールを取り込み、最終的に肝臓に輸送する、いわゆるコレステロール逆転送作用を有している。したがって、HDL は抗動脈硬化作用を有すると考えられており、疫学的にも HDL レベルと動脈硬化症の発症率には逆相関が示されている。これまで LDL に関する研究に注目が集まり、そのレセプターを含めて合成および代謝機構が詳細に解明されてきた。また、スタチン系の薬物を中心とした LDL コレステロール低下剤が開発され、臨床現場においてもそれらの有効性が明らかにされてきている。一方、抗動脈硬化作用を持つ HDL については、これまでその生成・代謝機構等の解明が遅れてきた。しかし、動脈硬化症をより効率的に防ぐには LDL を低下させるだけでなく、HDL の抗動脈硬化作用を亢進させる薬物の開発の必要性にも関心が高まっている。HDL の代謝機構および HDL コレステロールの肝臓への受け渡し機構を詳細に解明することは、動脈硬化症領域における最重要課題の一つと言える。

本研究では、動脈硬化治療薬の開発に新たな標的を提供することを目指して、我々独自の発見に基づいた新たな角度から HDL の合成・分解の調節機構、および肝臓への末梢コレステロールの転送機構について解明することを目的とする。

人においてエストロゲンには LDL 低下と HDL 上昇作用が知られている。マウスではエストロゲンは HDL レベルを大きく低下させる。しかし、それら機序については不明な部分が多い。また、生体内でエストロゲンに応答する遺伝子については十分に解析されていない。松本らは、HDL 代謝調節因子とその制御機構の解明を目的として、エストロゲンのマウス肝臓における遺伝子発現調節作用についてマイクロアレイ技術を用いて網羅的に検討した。

新井らは、これまでに HDL レセプターSR-BI の細胞質ドメインと結合する新規蛋白質 CLAMP (C-terminal linking and modulating protein)を単離・同定した。血中 HDL レベルの調節機構について、肝臓内 HDL レセプターSR-BI の新規制御機構の解明を目的として、CLAMP による新たな HDL 調節機構について検討した。

血中リポ蛋白組成の種差の問題から、小動物での動脈硬化モデルは数少なく、特に HDL 代謝を評価できるモデルは皆無に等しい。佐伯らは、HDL up regulator の評価モデルの構築を目的に以下の検討をおこなった。血中 apolipoprotein AI (apo AI)はコレステロール逆転送活性を規定する因子として注目されているが、*de novo* 合成の調節機構については不明な点が多い。ヒト apo AI トランスジェニックマウス (hAPOAI TgN) を用いて、Apo AI の合成亢進作用が報告された化合物 Ro11-1416 と LGD1069 の作用を解析した。

2. 研究方法

(1) HDL 代謝調節因子とその制御機構

マウス(C57BL/6, ♂, 8週齢, 5匹/群)に皮下投与により 0, 3, 30 mg/kg/day の 17beta-estradiol (E2) を 4 日間の投与後, 腹部大動脈から採血し, また RNA 調製のため肝臓を摘出し液体窒素により凍結した。血清総コレステロール(TC)および HDL コレステロール(HDL-C)値は酵素法により測定した。

各個体の肝臓(~200 mg)から調製した total RNA の 50. g ずつをプールし, poly(A)+RNA を精製した。1. 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。*in vitro* transcription により biotin 標識した cRNA を合成し, GeneChip (Mu 11k, Affymetrix)を用いて 45. C で 16 時間ハイブリダイズした。streptoavidin/phycoerythrin 染色し, プローブ毎の蛍光強度(average difference, Avg Diff ; mRNA 量)を測定した。コントロール群(0 mg/kg)の各 mRNA 量をベースラインとして estradiol 処理による mRNA の変化量(average difference change)と変化率(fold change)を解析した。

(2) 肝臓内 HDL レセプター SR-BI の新規制御機構

1) SR-BI 細胞質ドメイン結合蛋白質 CLAMP の同定とクローニング

SR-BI の C 末端細胞質ドメインの 45 アミノ酸と GST のフュージョン蛋白質(GST/SRBI-C45)を, アフィニティー担体としたカラムに, ラット肝臓膜画分の 2% Triton X-100 可溶化サンプルを流し, SR-BI の細胞質ドメインと結合する蛋白質を解析した結果, 分子量 70kDa の蛋白質が特異的に結合すること見出し, この蛋白質を MonoQ カラムで部分精製した。70kDa のバンドを SDS 電気泳動で精製し, 部分アミノ酸配列を決定した。部分アミノ酸配列をもとに CLAMP の cDNA クローニングをおこなった。大腸菌に発現させたラット CLAMP を抗原として, 定法に従い CLAMP に対するモノクローナル抗体を作製した。

2) PDZ ドメインを欠損した変異型 CLAMP の SR-BI に対する作用の解析

CHO 細胞に SR-BI を発現させたもの,あるいは SR-BI と CLAMP を同時に発現したものを作製し, SR-BI の機能に対する CLAMP の影響を調べた。さらに, CLAMP の SR-BI に対する機能の発現に, どの PDZ ドメインが必要であるかを調べる目的で, 各種 PDZ ドメイン欠損変異体発現 CHO 細胞を作製した。これらの細胞に, SR-BI を一過性に発現させて, SR-BI 蛋白質の発現量および DiI-HDL の取り込み量を調べた。

3) 細胞レベルでの PDZ-1-2 のドミナントネガティブ効果

CLAMP の 4 つある PDZ ドメインの 1 番目と 2 番目のみを持つ Ad.PDZ-1-2 を作製し, アデノウイルスを用いて CHO 細胞に感染させ, SR-BI と CLAMP の結合が阻害されるかどうかを解析した。また *in vivo* の作用を解析するため, アデノウイルス(Ad.LacZ あるいは Ad.PDZ-1-2)をマウス尾静脈から注入 3 日間後の肝臓ホモジェネートを 100,000xg で遠心分画し, SR-BI 抗体で SR-BI 蛋白質の発現量を調べた。さらに, Ad.LacZ あるいは Ad.PDZ-1-2 感染の直後(0), 3, 7, 14, 21, 28 日後に血漿コレステロール濃度を測定した。併せて Superose 6 ゲルカラムにより, 各種リポ蛋白質中のコレステロール濃度を解析した。Ad.PDZ-1-2 感染マウスの HDL クリアランスについて, 感染 3 日後に ¹²⁵I-HDL を尾静脈から注入し, 経時的に採血して検討した。

4) SR-BI 結合蛋白質 CLAMP のリン酸化

培養細胞および *in vivo* 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と, この作用には CLAMP のもっとも C 末端側の PDZ4 ドメイン以降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アミノ酸が複数存在することが推定された。まず, CLAMP のリン酸化を検討するため, ラット肝細胞株 McARH7777 にトランスフェクションし, 48 時間後に ³²P オルトリン酸を加え, 37°C で 4 時間インキュベートした。CLAMP モノクローナル抗体で免疫沈降後, SDS-PAGE で分離しイメージングアナライザーで検出した。次に, リン酸化部位を調べるために, CLAMP の C 末端側を様々な長さで欠損した CLAMP 変異体を作製し, McARH7777 細胞にトランスフェクションし, 同様にリン酸の取り込みを調べ, さらにホスホアミノ酸分析をおこなった。これらの解析で, 絞り込まれたリン酸化されるアミノ酸が 4 ケ所について, それぞれを Ala に置換した CLAMP 変異体を作製し, 同様にリン酸の取り込みを調べ, リン酸化されるアミノ酸を同定した。

5) 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 レセプターである 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。また、肝臓における SR·BI 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ィング、ウエスタンブロットィング法により調べた。

(3) HDL up regulator の *in vivo* 評価モデルの構築

hAPOAI TgN(10~20 週齢, 4~6 匹/群)に, Ro11-1416 及び LGD10690 を 5%メチルセルロース溶液に懸濁し投与液とし, 1 日 1 回, 強制経口投与した。対照コントロール群は 0.5%メチルセルロース溶液とした。採血は 0, 7, 14 日目にいき, 血清中の TC, HDL-C および apo AI を測定した。apo AI は ELISA 法で定量した。データは 0 日目の値に対する変化率で解析した。

倫理面への配慮として, 各研究施設の倫理規定に従って, 実験動物は恒温・恒湿の動物施設で飼育し, 屠殺にあたっては, ペントバルビタールによる麻酔下でおこなった。

3. 研究成果

(1) HDL 代謝調節因子とその制御機構

Estradiol 処理後のマウス血清 HDL-C 値には, コントロールと比較して, 3 mg/kg で 21%および 30 mg/kg で 74%の減少が認められた。

マウス肝臓においては 30 mg/kg の E2 処理によって, コントロールではほとんど発現の見られない VCAM-1, Fc gamma receptor, NF-kappaB および lipid binding protein など脂質代謝・動脈硬化に関連した mRNA レベルの変化率に E2 による大きな増大が認められた(Table 1)。一方, TFEB, zinc finger protein である KOX1 や XLCOF6, SREBP-1, L-myc などの転写因子, 増殖因子あるいは情報伝達系に関与するものに大きな減少が認められた(Table 2)。

E2 処理によって Squalene epoxidase に大きな増加が認められた。HDL 代謝に関わる酵素・レセプターでは, hepatic triglyceride lipase (HTGL)および apo AI の mRNA レベルの減少が認められた(Table 3)。しかし, lipoprotein lipase, lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), HDL binding protein, ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1)および Cdc42 の mRNA レベルには変動は認められなかった。脂肪酸代謝に関わるものでは, E2 処理により各種 fatty acid binding protein (FABP) の増加が認められた。また, uncoupling protein (UCP)の増加が認められ, とくに UCP2 に顕著であった。一方, acetyl-CoA synthase には減少が認められた。Table 4 には, E2 処理で変動の認められた転写因子を示した。細胞増殖に関わる heparin-binding EGF-like growth factor, hepatocyte growth factor activator に E2 の 30 mg/kg 処理で大きな減少が認められた。また, 細胞接着分子 VCAM-1 の大きな増加が認められた。

(2) 肝臓内 HDL レセプター SR·BI の新規制御機構

1) SR·BI 細胞質ドメイン結合蛋白質 CLAMP の同定とクローニング

新井らは以前からスカベンジャーレセプター SR·BI について解析を進めていたが, SR·BI の肝臓における機能に注目し解析を進めた結果, SR·BI の細胞質ドメインと特異的に結合する蛋白質 (CLAMP) をアフィニティークロマトグラフィー法により肝臓から見出し, これをクローニングした。CLAMP は PDZ ドメインと呼ばれる蛋白質-蛋白質間の結合に関わるモチーフを 4 つ持ち, SR·BI の細胞質 C 末端部分が CLAMP の最初の PDZ ドメインとのみ結合していることを認めた。SR·BI は肝臓以外にも副腎などのステロイドホルモン産生臓器に発現しているが, CLAMP は肝臓にしか存在せず, 肝臓における SR·BI の機能を特異的に調節していることが示唆された。

2) SR·BI 結合蛋白質 CLAMP の機能

CLAMP を恒常的に発現した CHO 細胞に, SR·BI 遺伝子を一過的に発現させると, CLAMP が存在しない細胞に比べて, SR·BI 蛋白質の量は約 4 倍が増加しており, CLAMP は細胞内において, SR·BI 蛋白質の発現を安定化させる機能があることが示唆された。次に, CLAMP の PDZ ドメインを欠損した各種変異型 CLAMP を恒常的に過剰発現した CHO 細胞に SR·BI 遺伝子を一過的に発現させると, CHO·CLAMP 細胞で見られた SR·BI 蛋白質の発現増加作用は, これらの変異型 CLAMP 発現細胞では全く観察されなかった。さらに, PDZ-1-2 のみを持つ変異体は, CLAMP の SR·BI との結合を阻害する働きを持つことが示唆された。

さらに, CLAMP の生理機能を個体レベルで調べるため, PDZ-1-2 変異体をアデノウィルスベクターによりマウス肝臓に過剰発現させた。PDZ-1-2 を感染したマウスの肝臓では, コントロールマウスに比べて SR·BI 蛋白質の発現レベルが有意に減少していることがわかった。また, 血中コレステロー

ルレベルがコントロールマウスに比べて有意に上昇し、主に HDL 画分が増加していた。さらに、PDZ-1-2-感染マウスでは、HDL コレステロールのクリアランスがコントロールに比べて有意に落ちていた。すなわち、CLAMP は肝臓において HDL レセプター SR-BI の細胞質ドメインに結合することにより SR-BI の発現レベルを制御し、ひいては血中 HDL レベルを規定する新しい因子であることが明らかになった。このように、リポ蛋白質レセプターの中で細胞質ドメインに結合しその発現レベルを調節する蛋白質が同定されたのはこれが初めての例である。

4) SR-BI 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、CLAMP がリン酸化されていた。さらに、リン酸化アミノ酸部位は、Ser 残基であった。次にリン酸化可能な Ser 残基を Ala に置換したコンストラクトを作製してリン酸化の有無を調べた結果、C 末端側の Ser509 および Ser512 がリン酸化されることを同定した。

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

マウスにフィブレート系薬物を与え、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。また、肝臓における SR-BI の蛋白質発現量が、フィブレート系薬物投与で著しく低下していることを見出した。しかし、SR-BI mRNA 量には全く変化なかった。同様の検討をフィブレート系薬物の標的と考えられている PPAR-alpha のノックアウトマウスを用いて行ったところ、SR-BI 蛋白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-alpha を介していることが明らかになった。さらに、CLAMP 蛋白質の発現レベルは、SR-BI 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 レベルには同様に変化は見られなかった。

次に、CLAMP の蛋白質レベルでの低下は SR-BI 蛋白質の減少によるものかを調べるため、SR-BI ノックアウトマウスを用いて同様の検討をおこなった結果、SR-BI 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-BI とは独立した機序によることが明らかになった。

(3) HDL up regulator の *in vivo* 評価モデルの構築

投与 7 日目において、Ro11-1416 は 10~100 mg/kg の範囲で apo AI の用量依存的な上昇作用が認められた。Fig. 1 に Ro11-1416 及び LGD1069 の血中脂質値への作用を示した。Ro11-1416 は 7 日目に、また LGD1069 は 14 日目において、血中 apo AI の上昇が見られた。このとき、LGD1069 投与群では血中 TC, HDL-C の上昇が観察されたが、Ro11-1416 投与群では明確な低下作用が見られた。

4. 考 察

動脈硬化はコレステロールの動脈壁への蓄積によって引き起こされるが、末梢細胞自身では余剰に蓄積したコレステロールを分解することはできない。HDL はこの余剰のコレステロールを引き抜き肝臓に戻す、いわゆるコレステロール逆転送作用をもっている。動脈硬化をより効率的に防ぐため、HDL のコレステロール逆転送系を活性化させる方法の開発が注目されている。

エストロゲンは、主に更年期障害の治療薬として使用されてきた過程で、冠動脈疾患、骨粗鬆症およびアルツハイマー病などの予防効果が認められてきた。この冠動脈疾患に対する抗動脈効果は、血中の LDL コレステロールの低下、HDL の上昇、脂質の酸化抑制など脂質代謝改善作用と血管壁への直接的な作用によるものと考えられている。最近、Jones ら (J Lipid Res, 2002) は、HepG2 細胞を用いた *in vitro* での検討から、エストロゲンのヒトにおける血中の HDL コレステロールレベルの上昇は、エストロゲンレセプター (ER) alpha を介した HTGL の転写レベルでの抑制による機序であることを示した。一方、マウスでは、高用量のエストロゲンは HDL レベルを大きく低下させることが知られており、このマウスにおけるエストロゲンの HDL 低下に関わる因子を解析ことは、HDL 代謝調節機構の解明につながるものと考えられる。今回、マウス肝臓における遺伝子発現に対するエストロゲンの作用についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

エストロゲン処理によって、VCAM-1, Fc gamma receptor および lipid binding protein など脂質代謝・動脈硬化に関連した遺伝子の mRNA レベルに大きな増大が認められた。これまでも報告されているように、LDL レセプターや HMG CoA reductase などコレステロール合成に関わるものでは変動は認められなかったが、Squalene epoxidase に増加が認められた。HDL 代謝に関わる遺伝子では、HTGL および apo AI の減少が認められた。しかし、lipoprotein lipase, LCAT, HDL binding

protein, ABC1 などの mRNA レベルは変わらなかった。Srivastava ら (Mol Cell Biochem, 2001) は、マウスにおける血中 HDL レベルの低下機序として、エストロゲンによる肝臓の HTGL mRNA レベルの増加 (1.4-2.5 倍) による可能性を述べている。今回の解析では、E2 処理により HTGL mRNA レベルには、コントロールと比較して 3 mg/kg で -1.4 倍 (70%), 30 mg/kg では -4.2 倍 (24%) と減少が認められ、Srivastava らの報告とは異なる結果であった。先にも述べたように、Jones らの HepG2 細胞を用いた検討から HDL の上昇は、HTGL の転写レベルの抑制によることが示されている。また、ヒトの HTGL 欠損症では、高 HDL 血症を呈することが知られており、HTGL 活性が血中 HDL レベルを規定する因子の 1 つであることは明らかである。しかしながら、エストロゲンによるマウスの HDL 低下機序として、HTGL 遺伝子の転写レベルの亢進をあげるためにはデータが不十分であると考えられる。

エストロゲンは転写因子である ER-alpha もしくは ER-beta を介して、標的遺伝子の発現を制御することが知られているが、その応答遺伝子についてさほど多くは報告されていない。今回の検討では、NF-kappaB, transcription factor IIF, jun dimerization protein 1, C/EBP delta などの増加、あるいは TFEB, KOX1, XLCOF6, SREBP-1 などの減少とエストロゲンが多くの転写因子の mRNA レベルに影響を与えることが示され、これら転写因子の標的となる多数の蛋白の発現調節に関わることが示唆された。したがって、マウスにおけるエストロゲンによる HDL 低下機序を明らかにするために、今回の解析から見出されたまだ機能が解明されていない因子も含めた詳細な検討が必要であると考えられ、今後それらの解析を進める予定である。

HDL レセプターである SR-BI の細胞質 C 末端ドメインに結合する新規蛋白質 CLAMP を発見し、クローニングした。この蛋白質は、蛋白質-蛋白質相互作用に関わる PDZ ドメインを 4 つ持つことから、SR-BI と肝臓内の何らかの蛋白質と相互作用を担っているものと考えられた。しかし、その相手が何であるかはまだ明らかになっていない。細胞レベルおよびマウス個体レベルにおいて、CLAMP の発現を変動させると、SR-BI 蛋白質の膜上での発現が制御されることが明らかになったことから、CLAMP の機能として、SR-BI 蛋白質の膜上での安定化に寄与していることが強く示唆された。おそらくは、CLAMP と作用する肝臓内の因子を介して SR-BI の安定化を保っているものと考えられる。次に CLAMP 自体の発現制御が大きな問題になってくるものと考えられるが、その点に関して 2 つの大きなヒントが得られた。すなわち CLAMP はリン酸化蛋白質であることと、CLAMP 蛋白質の発現がフィブレート系の薬物により制御されているという発見である。リン酸化が CLAMP の機能にどのように関与しているかはまだ全く不明であるが、今後リン酸化の有無による CLAMP の機能的違いを明らかにすることにより、リン酸化の意義が分かってくるものと思われる。さらに、リン酸化-脱リン酸化に関わる酵素の同定も重要かと思われる。さらに、フィブレート系薬物による CLAMP 蛋白質の発現制御も現在ほとんど解明されていないが、フィブレートが HDL レベルを上げるというこれまでの報告を考えると、今回の発見は非常に重要な課題になってくるものと考えられる。

Ro11-1416 は、1997 年に Hoffman-La-Roche 社より発表された化合物で、HepG2 細胞において apo AI の合成を促進し、高コレステロール食飼育ハムスターにおいて HDL-C の上昇が報告されている。一方、LGD1069 は Ligand Pharmaceuticals 社の化合物であり、核内レセプターの 1 つである RXR-alpha のリガンド活性を有する。また、all-trans-レチノイン酸、9-cis-レチノイン酸などのレチノイン酸誘導体にも HepG2 細胞で apo AI 合成促進作用のあることが、多数報告されている。hAPOAI TgN はヒト apo AI 遺伝子を、そのプロモーター領域とともに導入されたマウスで、投与された化合物による転写の亢進が apo AI 合成の促進ならびに血中 apo AI 量の増加として反映されることが期待される動物である。さらに、apo AI 合成が促進された際の血中 HDL-C 動態についての解析も期待される。今回、apo AI 合成促進作用のある二つの化合物 Ro11-1416 並びに LGD1069 の apo AI と HDL-C 代謝への作用を検討した結果、両化合物ともに、hAPOAI TgN において血中 apo AI 量を増加させたことから、apo AI の合成促進作用が本動物において反映されたと考えられる。このとき、血中 HDL-C は Ro11-1416 では低下作用が、一方 LGD1069 では上昇作用が認められた。これらの結果から血中 apo AI 上昇作用は HDL 上昇作用と平行ではないことが示唆された。Apo AI から HDL-C への成熟には LCAT, CETP の関与が知られており、これら蛋白質への影響に Ro11-1416 と LGD1069 において相違があるのかもしれない。また、近年、RXR-alpha の作用点のひとつに phospholipid transfer protein (PLTP) が報告されている。この蛋白質は、フィブレート系薬剤でも活性化されることが知られており、血中での HDL-C の成熟に深く関与している可能性がある。以上より、今後の apo AI お

よび HDL 代謝の研究では、血液循環中の HDL 成熟に関与する蛋白質群にも着目する必要があると考えられ、ヒト CETP トランスジェニックマウスを研究題材として基礎検討をおこなうこととする。

5. 結 論

動脈硬化の治療薬に対する新たな標的を見いだすこと目標に、新たな角度からの HDL 代謝機構の解明を目的として検討をおこなった。

マウス肝臓における遺伝子発現に対するエストロゲンの作用を網羅的に解析した。HDL 代謝関連遺伝子では、HTGL および apo AI の減少を認めたが、lipoprotein lipase, LCAT, HDL binding protein, ABC1 などの mRNA レベルには変動を認めなかった。マウスにおけるエストロゲンによる血中 HDL の低下は、肝臓の HTGL 遺伝子の転写亢進よることが報告されたが、我々の解析結果とは異なるものであった。また、エストロゲンは NF- κ B, transcription factor IIF, jun dimerization protein 1, C/EBP delta などの増加、あるいは TFEB, KOX1, XLCOF6, SREBP-1 などの減少と、エストロゲンが多く転写因子の mRNA レベルに影響を与えることが示され、これら転写因子の標的となる多数の蛋白質の発現調節に関わることが示唆された。

肝臓における HDL レセプターである SR-BI の細胞質結合蛋白質 (CLAMP) を発見し、SR-BI 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おこなった。CLAMP が SR-BI 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。すなわち、CLAMP は SR-BI 蛋白質を安定化し、SR-BI の発現量を上昇することが示された。この作用の発現には、CLAMP の SR-BI との結合ドメイン以外に C 末端領域を必要とした。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、フィブレート系薬物の HDL 上昇作用が知られていたが、フィブレート系薬物により肝臓の SR-BI および CLAMP の蛋白質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-BI に依存せず、フィブレート > CLAMP の低下 > SR-BI 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 1 つが CLAMP の発現レベルの低下であることをはじめ明らかにした。この成果は、フィブレート系薬物の作用機構のひとつを解明しただけでなく、血中 HDL レベルを制御する医薬品開発において、SR-BI 結合蛋白質である CLAMP が新たな標的となることを強く示唆するものである。

apo AI 分泌促進作用が知られている Ro11-1416 ならびに LGD1069 は、hAPOAI TgN において血中 apo AI 量を増加させたが、血中 HDL-C と TC レベルに対する作用はそれぞれ異なるものであった。

6. 研究発表

Hirano R, Igarashi O, Kondo K, Itakura H and Matsumoto A. Regulation by long-chain fatty acids of the expression of cholesteryl ester transfer protein in HepG2 cells. *Lipids*, 36, 401-406 (2001)

Yoshie F, Iizuka A, Kubo M, Komatsu Y, Matsumoto A, Itakura H, Takeda H, Matsumiya T and 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*, 43, 481-488 (2001)

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*, 47, 357-362 (2001)

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*, 7, 203-208 (2000)

D. Feng, M. Ikemoto, N. Isoo, K. Tsukamoto, M. Tsujimoto, K. Inoue and H. Arai. Regulation of hepatic SR-B1 expression level by CLAMP, SR-B1 C-terminal binding protein. *J Biol Chem*, in press

J. Ishii, H. Adachi, J. Aoki, K. Inoue, S. Tomita, H. Suzuki, M. Tsujimoto and H. Arai. Identification of second isoform of scavenger receptor expressed by endothelial cells (SREC-II) and heterophilic binding between the extracellular domains of SREC-I and -II. *J Biol Chem*, in press

N. Ohgami, R. Nagai, M. Ikemoto, H. Arai, A. Miyazaki, H. Hakamata, S. Horiuchi and H. Nakayama. CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications*, 16, 56-59 (2002)

N. Ohgami, R. Nagai, M. Ikemoto, H. Arai, A. Kuniyasu, S. Horiuchi and H. Nakayama. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 350-355 (2001)

Z. Zhang, S. Yamashita, K. Hirano, Y. Nakagawa-Toyama, M. Matsuyama, M. Nishida, N. Sakai, M. Fukasawa, H. Arai, M. Miyagawa and Y. Matsuzawa. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 159, 67-75 (2001)

T. Yokota, K. Igarashi, T. Uchihara, K. Jishage, H. Tomita, A. Inaba, Y. Li, M. Arita, H. Suzuki, H. Mizusawa and H. Arai. Delayed-onset ataxia in mice lacking α -tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration due to chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 15185-15190 (2001)

K. Hayashi, M. Takahashi, W. Nishida, K. Yoshida, Y. Ohkawa, A. Kitabatake, J. Aoki, H. Arai and K. Sobue. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res*, 89, 251-258 (2001)

K. Tsuneyama, K. Harada, N. Kono, K. Hiramatsu, Y. Sudo, M. E. Gershwin, M. Ikemoto, H. Arai and Y. Nakamura. Scavenger cells with Gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrates around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*, 35, 156-163 (2001)

N. Ohgami, R. Nagai, A. Miyazaki, M. Ikemoto, H. Arai, S. Horiuchi and H. Nakayama. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 276, 13348-13355 (2001)

K. Jishage, M. Arita, K. Igarashi, T. Iwata, M. Watanabe, M. Ogawa, O. Ueda, K. Inoue, H. Arai and H. Suzuki. α -Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice. *J Biol Chem*, 276, 1669-1672 (2001)

N. Shibata, M. Arita, Y. Misaki, N. Dohmae, K. Takio, T. Ono, K. Inoue and H. Arai. Supernatant protein factor (SPF), which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a novel cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2244-2249 (2001)

N. Ohgami, R. Nagai, M. Ikemoto, H. Arai, A. Kuniyasu, S. Horiuchi and H. Nakayama. CD36, a member of class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products (AGE). *J Biol Chem*, 276, 3195-3202 (2001)

M. Ikemoto, H. Arai, D. Fen, K. Tanaka, J. Aoki, N. Dohmae, K. Takio, H. Adachi, M. Tsujimoto and K. Inoue. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 6538-6543 (2000)

H. Hiyoshi, M. Yanagimachi, M. Ito, T. Saeki, I. Yoshida, T. Okada, H. Ikuta, D. Shinmyo, K. Tanaka, N. Kurusu and Tanaka H. Squalene synthase inhibitors reduce plasma triglyceride through a low-density lipoprotein receptor-independent mechanism. *Eur J Pharmacol*, 431: 345-352 (2001)

7. 知的所有権の取得状況
特になし

Table 1. Genes showing large induction in mRNA levels with the estrogen treatment.

	Gene	Avg diff (control)	Fold change (30mg/kg)	Function	Accession Number
1	keratin, type II 57 kd	-26	167.5 *	cell intermediate filament	X03491
2	prostaglandin D synthetase	-89	151.3 *	syntase	AB006361
3	pre-pro-protease 3	-14	128.1 *	protease	U43525
4	VCAM-1	3	111.6 *	adhesion	X67783
5	creatin kinase, B chain (EC 2.7.3.2)	-37	101.3 *	creatine pathway	P07335
6	Fc gamma receptor (IgG 2.4G2 receptor)	-52	83.8 *	receptor	M14215
7	GDP-dissociation inhibitor	-54	75.3 *	RHO	L07918
8	UCP2	-22	67.2 *	uncoupling protein	U69135
9	stathmin (phosphoprotein P19)	-5	63.2 *	second messenger	P13668
10	SHPS-1	-47	60.8 *	cell signaling	d87967
11	macrophage-specific integral membrane protein (Nramp)	-18	57.5 *	natural resistance to infection	I13732
12	vv02b01.r1 Stratagene mouse skin (#937313) Mus musculus cDNA clone 1210441	-58	56.4 *	unknown	AA727619
13	NF-kappa-B (p105)	-68	53.9 *	transcription factor	L28117
14	vj76g02.r1 Knowles Solter mouse blastocyst B1 Mus musculus cDNA clone 934994 5	-3	53.1 *	unknown	AA617493
15	serum amyloid A (SAA) 3 protein	-20	51.6 *	SAA	
16	lipid binding protein, adipocyte	25	48.2	lipid binding protein	
17	vn57g08.r1 Barstead mouse proximal colon MPLRB6 Mus musculus cDNA clone 1025342	10	46.3 *	unknown	AA590086
18	leukocyte adhesion protein (LFA-1)	-132	45.3 *	adhesion	X14951
19	lipid binding protein	15	44.8	lipid binding protein	k02109
20	viral envelope like protein (G7e)	3	42.2 *	unknown	U69488

Avg Diff showed mRNA levels in the liver of control mice. * Values are not accurate that expression levels in the control or the treated group (30mg/kg) were called absence by Affymetrix program.

Table 2. Genes showing large reduction in mRNA levels with the estrogen treatment.

	Gene	Avg Diff (control)	Fold change (30mg/kg)	Function	Accession Number
1	hepatocyte growth factor activator	140	-45.5 *	cell growth	Q04756
2	transcription factor, TFEB	94	-19.2 *	transcription	U36393
3	ACE-T (EC 3.4.15.1)	91	-18.5 *	ACE	P22967
4	myosin	43	-17.8 *	structural protein	97242182
5	heat shock 27 KD protein (HSP 27)	70	-16.7 *	heat shock protein	P42930
6	G protein-coupled receptor	99	-15.8 *	receptor	94085630
7	zinc finger protein 10 (KOX1)	34	-12.3 *	transcription	P21506
8	S100 calcium-binding protein A13	58	-11.7 *	calcium-binding protein	X99921
9	myosin heavy chain	12	-11.0 *	structural protein	M74752
10	zinc finger protein, XLCOF6	199	-10.9	transcription	P18749
11	insulin-like growth factor II (IGF-II)	77	-10.0	cell growth	
12	GTP-binding protein in PTH 3region (ORF-3)	30	-9.8 *	GTP-binding protein	P31216
13	inositol-1,4,5-triphosphate 5-phosphatase (EC 3.1.3.56)	55	-9.0	phosphatase	P32019
14	erythropoietin	42	-8.5 *	hormone	
15	apolipoprotein E	31	-8.4 *	lipoprotein metabolism	P08226
16	sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1)	62	-8.1	transcription	P36956
17	3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform VI	112	-7.7	dehydrogenase	97230115
18	insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP-4)	208	-7.7	binding protein	P47879
19	aquaporin-CD (water channel protein for renal collectina duct)	63	-6.7	channel	P34080
20	L-myc	58	-5.5	transcription	X13945

Avg Diff showed mRNA levels in the liver of control mice. * Values are not accurate that expression levels in the control or the treated group (30mg/kg) were called absence by Affymetrix program.

Table 3. Fold changes in mRNA levels of genes related to cholesterol and lipoprotein metabolism with estrogen treatments.

Gene	Avg Diff (control)	Fold Change (3mg/kg)	Fold Change (30mg/kg)	Accession Number
Induced gene				
squalene epoxidase	-9	14.3 *	24.1 *	D42048
phospholipase C type IV	12	2.3	4.3	C76245
apolipoprotein AIV	26	2.8	3.7	M13966
phospholipid transfer protein, plasma	44	1.6	3.2	U37226
acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT)	25	1.6	2.6	L42293
Reduced gene				
apolipoprotein E (APO-E)	31	2.7	-8.4 *	P08226
SREBP-1	62	1.1	-8.1	P36956
VLDL receptor	18	-1.6	-5.0 *	U06670
hepatic triglyceride lipase (HTGL)	965	-1.4	-4.2	X58426
apolipoprotein AI	35	-2.0	-2.1	
No change				
lipoprotein lipase	-51	-3.1 *	1.5 *	J03302
monoglyceride lipase	647	-1.0	1.0	AJ001118
phospholipase C-alpha (PLC-alpha)	880	1.0	1.0	M73329
hormone-sensitive lipase	71	-1.1	-1.4	U08188
squalene synthase	455	1.4	-1.3	D29016
HMG-CoA synthase	1681	1.2	-1.3	
HMG-CoA reductase	54	-1.3	-1.2	M62766
LDL receptor	1036	-1.0	-1.3	X64414
MTP	286	1.0	1.2	L47970
cholesterol alpha-7-hydroxylase	128	1.4	-1.2	
lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)	555	-1.1	-1.6	J05154
HDL-binding protein	-95	-5.7 *	-2.5 *	W98758
HDL binding protein 2 (HB2)	8	1.5	1.0	
SR-BI	106	1.1	1.0	U37799
ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1)	16	1.4	-1.2	P41233
Cdc42	397	1.1	1.5	U37720
apolipoprotein AII	896	1.7	1.1	X62772
Apobec1	73	1.4	1.8	U22264
apolipoprotein CII	1475	1.3	-1.1	Z15090
apolipoprotein D	42	-3.3 *	-1.1	X82648

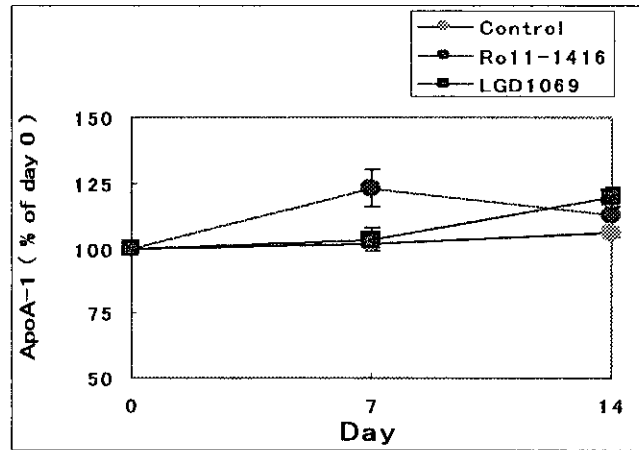
Avg Diff showed mRNA levels in the liver of control mice. * Values are not accurate that expression levels in the control or treated groups were called absence by Affymetrix program.

Table 4. Fold changes in mRNA levels of transcription factors with estrogen treatments.

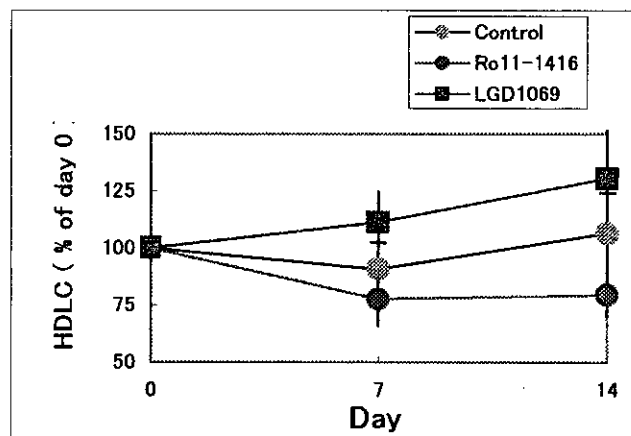
Gene	Avg Diff (control)	Fold Change (3mg/kg)	Fold Change (30mg/kg)	Accession Number
Induced gene				
NF-kappa-B (p105)	-68	38.6 *	53.9 *	94240138
transcription factor IIF (alph subunit)	-38	32.7 *	32.1 *	AA154593
jun dimerization protein 1 (JDP-1)	-40	10.8 *	26.6 *	AA711915
C/EBP delta	-4	6.8 *	15.9 *	X61800
homeotic gene regulator (BRAHMA protein)	5	3.0	13.8 *	P25439
TFIID (subunit p80)	-18	15.2 *	8.6 *	95394377
PU.1	27	2.1	8.5	M32370
basic helix-loop-helix factor (Cor1)	3	5.8 *	7.4 *	98213629
Myc basic motif homologue-1 (mbh1)	19	-1.1	4.7	X54511
mesenchyme fork head-1 protein	5	2.3	4.3	X74040
zinc-finger protein, ring (ZNF127-Xp)	10	-1.0	3.7	C76286
down regulatory protein of IL-2 receptor	12	1.1	3.5	P15533
proto-oncogene (C-CBL)	6	2.4	3.2	P22682
Reduced gene				
transcription factor (TFEB)	94	-1.1	-19.2 *	U36393
zinc finger protein 10 (KOX1)	34	-2.4	-12.3 *	P21506
zinc finger protein (XLCOF6)	199	-1.7	-10.9	P18749
sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1)	62	1.1	-8.1	P36956
zinc finger protein, ZFP-37	25	1.0	-5.9 *	P17141
L-myc	58	-2.4	-5.5	X13945
AEBP1	52	-1.8	-5.3	X80478
nuclear protein (mdm-1)	12	-2.0	-5.0 *	M20823
GASTRULA zinc finger protein (XLCGF20.1)	26	-1.3	-3.7	P18714

Avg Diff showed mRNA levels in the liver of control mice. * Values are not accurate that expression levels in the control or treated groups were called absence by Affymetrix program.

a)



b)



c)

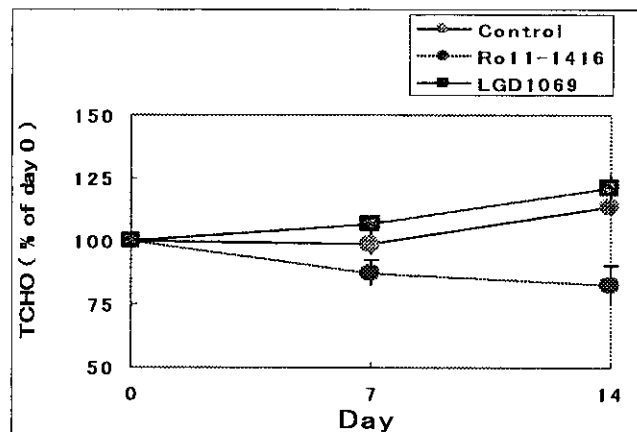


Fig. 1 Effects of Ro11-1416 and LGD1069 on plasma levels of apolipoprotein AI (a), HDL cholesterol (b) and total cholesterol in hAPOAI TgN mice.

Control mice were administrated 0.5% MC solution, and treated mice were administrated with 30mg/kg of Ro11-1416 or LGD1069. Data were showed mean \pm S.E. (n=5).

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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