

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5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部

研究者 最上知子

### 分担研究者

- |                         |      |
|-------------------------|------|
| (1) 帝京大学薬学部             | 東 祐輔 |
| (2) 名古屋市立大学医学部          | 横山信治 |
| (3) 三菱ウェルファーマ(株)創薬第二研究所 | 喜多田好 |
| (4) グレラン製薬(株)開発研究所      | 松倉竹雄 |

### 要旨

肝での VLDL 形成において verapamil が阻害するミクロゾーム内腔への脂質輸送系が必須であり、MTP がアセンブリー中間体へのトリグリセリド積込に機能することを明らかにした。HDL 新生反応について ABCA1 の構造と機能を解析しプロゲステロンによる細胞内コレステロール輸送系阻害を示すとともに、アポ A-I やシステインプロテアーゼ阻害剤による ABCA1 の細胞内分解抑制ならびに ACAT 阻害による新たな HDL 新生促進機構を見出した。

### 1. 研究目的

高脂血症は動脈硬化症の危険因子であり、生活習慣病の主な原因のひとつである。この研究では「肝からの VLDL 分泌」と「末梢細胞からのコレステロール搬出・HDL 新生」を高脂血症・動脈硬化症の予防・治療に決定的な段階ととらえ、細胞内脂質供給・輸送系を介した制御に着目して分子メカニズムを解明し、新たな制御方法を探る。

VLDL は巨大な一本鎖ポリペプチドであるアポリポタンパク B (アポ B) とコレステロールやトリグリセリドなどの脂質成分が会合して形成・分泌される。VLDL 分泌量の決定には脂質の供給が最も大切であり、我々はこれまでホスファチジルコリン (PC) の合成阻害が分泌低下を引き起こすことを明らかにしている。脂質は小胞体の細胞質側で合成され小胞体内腔側に輸送されてアポ B と会合される。この研究では VLDL 粒子形成に至るまでの脂質輸送・転移の役割に焦点をあて、その解明を通じて制御の方法を探ることを目的とする。今年度は①アポ B 分泌を低下させる薬物を見出し小胞体内腔への脂質輸送との関わりについて検討するとともに [東]、②小胞体内腔に存在するミクロゾームトリグリセリド転移タンパク (MTP) に着目して VLDL 形成過程での役割を解析した [最上]。MTP は VLDL 分泌に必須であり、遺伝子異常はアポ B リポタンパク欠損症の原因となるが、その機序については様々な説が提唱され統一的な見解は得られていない。

末梢細胞はコレステロールを異化することができない。動脈硬化巣の細胞に蓄積したコレステロールを減少させる、あるいは蓄積を積極的に防ぐためには、細胞から HDL に積み込んで積極的に搬出する必要がある。HDL はアポリポタンパクと細胞膜トランスポーター ABCA1 の相互作用によって新生される。本研究の目的はこの HDL 新生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。今年度は①HDL 欠損症である Tangier 病の原因遺伝子として同定された ABCA1 の構造と機能との関連について強制発現細胞を調製して検討し、②HDL 新生反応のための細胞内コレステロール輸送系について解明を行った。また、③HDL 新生反応の血漿 HDL 濃度制御への寄与についてモデルマウスを用いて解析した [横山]。さらに、④ACAT 阻害によるコレステロール搬出促進の可能性について [喜多田]、また⑤ABCA1 分解抑制による HDL 新生反応の新たな促進方法について検討した [松倉]。

## 2. 研究方法

### 2-1 VLDL 形成過程での MTP の役割の解明

アポ B48 含有の VLDL を主に分泌するラット肝細胞を用い、 $^{35}\text{S}$ メチオニンを用いたパルス・チェイス実験でアポ B 合成・分泌速度におよぼす MTP 阻害剤(BMS-19763615)の影響を解析した。VLDL 形成・分泌に及ぼす影響は培地ならびにマイクロゾーム内腔のアポ B を密度勾配遠心で分画し解析した。脂質の輸送・分泌への影響は細胞内各画分・培地の脂質量(mass)を測定し解析した。

### 2-2 Verapamil によるアポ B 分泌抑制機構の解明

ヒト肝癌由来 HuH-7 細胞を用いて apoB 分泌量を抑制する薬剤をスクリーニングし、見出された薬物のアポ B 合成・分泌速度への影響を $^{35}\text{S}$ メチオニンでパルス・チェイス実験を行い解析した。また、脂質の代謝・輸送・分泌への影響を $^{14}\text{C}$ acetate で標識して解析した。

### 2-3 HDL 新生反応と細胞内コレステロール代謝平衡

①ABCA1 の構造と機能: HDL 新生反応の細胞側の主要因子である ABCA1 タンパクの役割を研究するため、ABCA1 を HEK293 細胞に強制発現させ、その構造と機能の関連を検討した。②HDL 新生反応のための細胞内コレステロール輸送系: HDL 新生反応系による細胞コレステロールの搬出は、まずアポリポタンパクと細胞リン脂質によって HDL 粒子が新生され、続いて細胞コレステロールが積み込まれて起こるのかどうか、コレステロールの積み込みには 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どうかを検討する。③HDL 新生反応の血漿 HDL 濃度制御への寄与: 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。

### 2-4 ACAT 阻害によるコレステロール搬出促進

マウス腹腔内マクロファージを AcLDL で泡沫化したのち、AcylCoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) の阻害薬である EAB-676(N-(5-(1-imidazolyl)-2-methoxyphenyl)methyl-N-1-pentyl-N'-[2-methyl-6{3-(4-phenyl piperazinyl) propoxy} phenyl] urea dihydrochloride,三菱化学(株)で合成)の細胞内コレステリルエステル合成に対する作用を検討した。またウサギ精製 apoA-I、あるいはマイクロエマルジョン(TG/PL)を添加しコレステロールおよびリン脂質の搬出実験を行い、EAB-676 の作用を検討した。

### 2-5 ABCA1 の分解抑制による HDL 新生反応の促進

THP-1 細胞を PMA 処理によりマクロファージへと分化させた後、培地に apoAI を添加し細胞内 ABCA1 の発現量の経時変化を western blotting および RT-PCR にて解析した。また、 $^{35}\text{S}$ メチオニンで ABCA1 を標識し、分解速度に及ぼすアポ A1 ならびに各種 protease inhibitor の影響を解析した。

## 3. 研究成果

### 3-1 VLDL 形成過程での MTP の役割の解明

MTP によるトリグリセリド転移反応の阻害剤 BMS-19763615 (500 nM) は培養ラット肝細胞でのアポ B100 合成を 25%、分泌は 90%低下させたが、主成分であるアポ B48 の合成・分泌には影響しなかった。アポ B48 の脂質との会合状態への影響をパルス・チェイス実験で検討したところ(図 1)、VLDL-アポ B48 の分泌は完全に阻害され、代わりに HDL-アポ B48 の分泌が増加した。チェイス 100 分後にマイクロゾーム内腔のアポ B の密度分布を調べたところ、MTP 阻害により VLDL-アポ B48 が著しく低下し、VLDL アセンブリーの低下が示された。HDL-アポ B48 は逆に増加し、中間体の HDL-アポ B48 から VLDL への転換の阻害が示唆された。マイクロゾーム内腔への HDL-アポ B48 出現、さらに VLDL-アポ B48 出現がピークを過ぎる 90 分後に MTP 阻害を開始した場合でも、それ以降の VLDL-アポ B48 分泌はほぼ完全に阻害された。したがって、MTP は VLDL アセンブリーの極めて遅い過程に必要とされることが明らかになった。MTP 阻害剤はオレイン酸負加によるマイクロゾーム膜および内腔

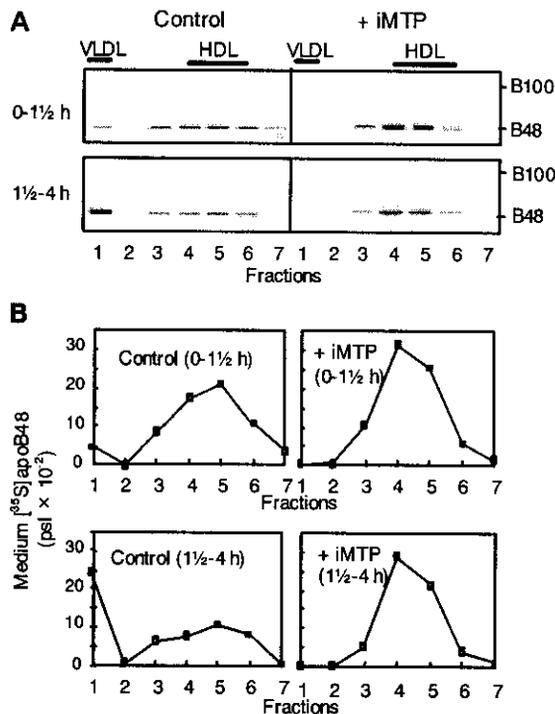


図 1: MTP 阻害剤(BMS-19763615)による VLDL-アポ B48 分泌の低下

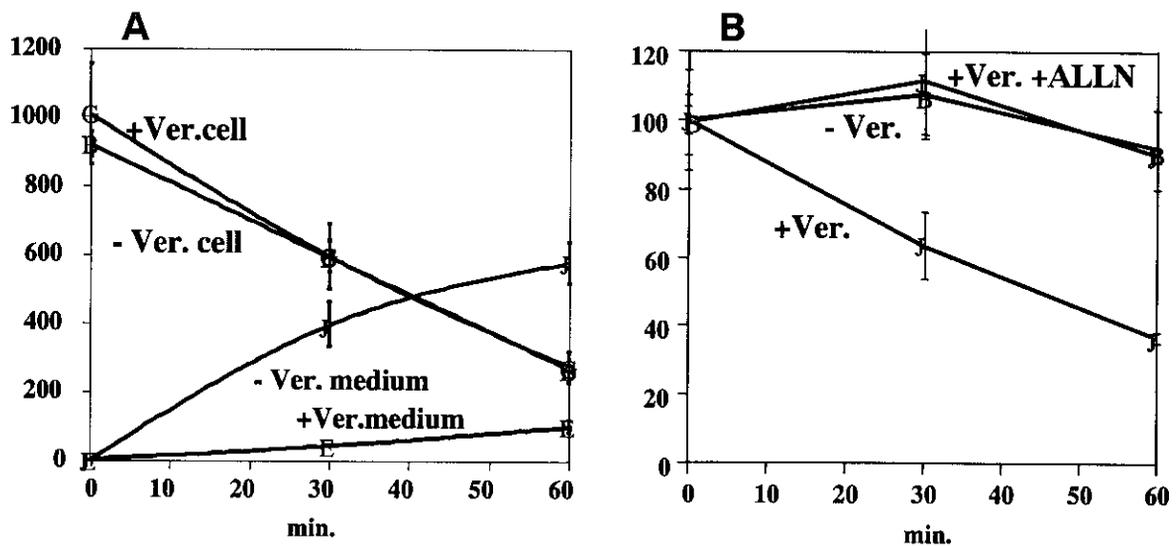


図 2: Verapamil によるアポ B 分泌の低下(A)と細胞内分解増加の ALLN による抑制(B)

50%抑制した。したがって verapamil のアポ B 分泌抑制作用は Ca チャネルの阻害作用に起因しないことが示唆された。分泌されたリポタンパク質顆粒の脂質組成を解析したところ、TG と CE の分泌される割合が減少した。このとき、細胞内の脂質組成には verapamil の影響はなかった。細胞を分画したところ、cytosol 画分においては verapamil 添加による脂質組成の変化は認められなかったが、microsome membrane 及び lumen 画分では、verapamil 添加により、Ch, CE, TG の減少が認められた。このとき Ch, TG の合成速度はむしろ上昇していた。

のトリグリセリド量の増加を防ぎ、細胞質へのトリグリセリド蓄積を引き起こしたことから、細胞質からミクロソーム内腔へのトリグリセリド流入への MTP の関与が推定された。

### 3-2 Verapamil によるアポ B 分泌抑制機構の解明

HuH-7 細胞を用いて apoB 分泌を抑制するが albumin・apoA-I の分泌に影響を与えない薬物をスクリーニングし、verapamil および diltiazem を見出した。パルス-チェイス実験で 40  $\mu$ M verapamil はアポ B100 の合成速度には影響せず、分泌速度を低下させることが示された(図 2a)。細胞内に残存する apoB100 と分泌された apoB 量の和から、verapamil 処理により細胞内で apoB の分解が増加していると判断した(図 2b)。このアポ B100 分解の増加はプロテアソーム阻害薬である ALLN により完全に抑えられた。Verapamil は Ca チャネルの阻害薬である。しかし calcium ionophore (A23187) 添加による影響は認められなかった。また、Ca チャネルブロック作用が弱い R(+)-verapamil と、Ca チャネルブロック作用が強い S(-)-verapamil の両者ともに 40  $\mu$ M の濃度において apoB 分泌量を約

### 3-3 HDL 新生反応と細胞内コレステロール代謝平衡

①ABCA1 の構造と機能: ヒト ABCA1 タンパクの発現系を用いて、その構造と機能を解析した。HEK293 細胞に於いて、ABCA1 の発現でアポリポタンパクによる HDL 新生反応が発現することを示した。この系に於いては、機能的に発現している ABCA1 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た(Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001) 283: 1019)。

②HDL 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、受容体が存在しないと考えられる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た。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いる(Biochim. Biophys. Acta (2001)1532: 173-184)。またアストログリアにおいて、アポ A-I 刺激により、生合成されるコレステロールと磷脂質及び caveolin が細胞質へ移転することも分かった(J.Biol. Chem. (2002) 277: 7929-7935.)

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)。

### 3-4 ACAT 阻害によるコレステロール搬出促進

ACAT 阻害剤 EAB676 はマウス泡沫化マクロファージにおけるコレステリルエステル合成を濃度 (30~300nM) に依存して阻害し遊離のコレステロールを増加させた。マウス泡沫化マクロファージからウサギアポ A-1 の濃度 (2.5-20 $\mu$ g/ml) に依存したコレステロール搬出作用を観察できることを確認したが、EAB676 は細胞内コレステロールエステル低下作用が十分に見られる 300nM の濃度で、アポ A-1 5~20 $\mu$ g/ml によるコレステロール搬出を有意に(約 1.9 倍)増強させた(図-4a)。また、細胞からのリン脂質の搬出に関しても同様に約 1.8 倍の増強作用が観察された(図-4b)。これに対し、マイクロエマルジョンによる細胞からの物理化学的、非特異的なコレステロール搬出に対して EAB676 は増強作用を示さなかった。

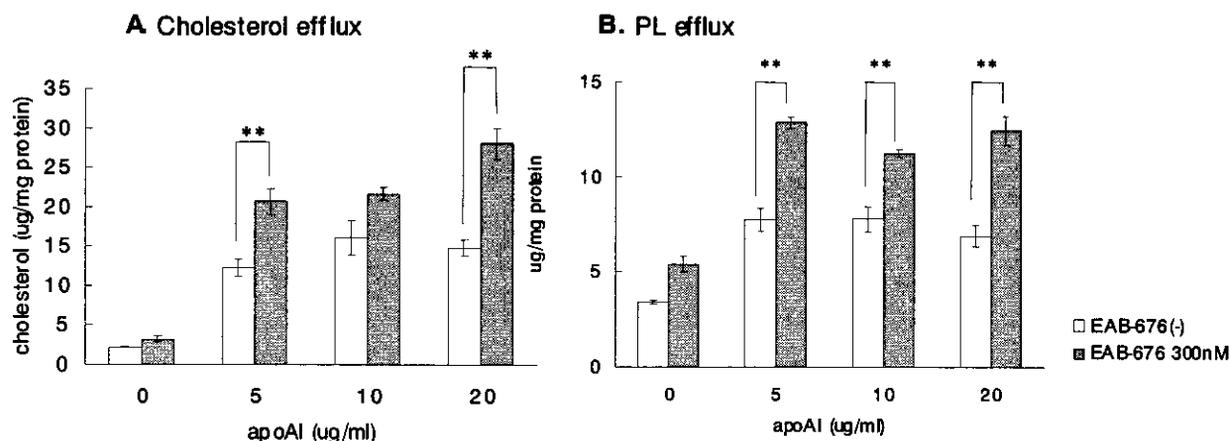


図 3: ACAT 阻害剤(EAB676)による HDL 新生の促進  
A.コレステロール搬出、B.リン脂質搬出

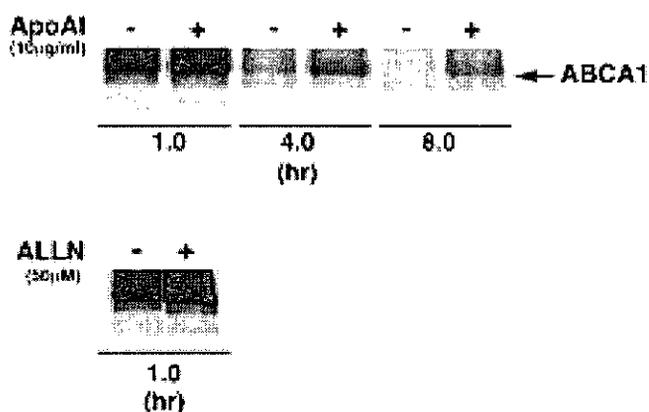


図 4: アポ A-I および ALLN による THP-1 細胞内での <sup>35</sup>S-標識 ABCA1 分解抑制

加させた。その他の protease inhibitor ではこのような作用は認められなかった。

分化後の THP-1 細胞の細胞内 ABCA1 を <sup>35</sup>S で標識し、その代謝に及ぼすアポ A-I、ALLN の作用について検討した結果、アポ A-I および ALLN は添加 1~8 時間後で標識 ABCA1 の細胞内代謝を抑制した(図 4)。ALLN は分化後の THP-1 細胞においてアポ A-I 依存性の HDL 新生反応を亢進させた。

#### 4. 考察

##### 4-1 VLDL 形成過程での MTP の役割の解明

VLDL はトリグリセリドおよびコレステリルエステルからなるコアを巨大な一本鎖ポリペプチドであるアポ B とリン脂質およびコレステロールの一重膜とが取り囲む構造をとる。VLDL のアセンブリー過程は複雑であるが、アポ B が翻訳と同時に小胞体内腔側に転移し、少量の脂質と会合して開始される。続いてコアを構成するトリグリセリドが取り込まれて VLDL 粒子として完成され、分泌される。アポ B100 のみを分泌する HepG2 細胞ではアセンブリーの初期過程に MTP が関与することが示されているが、本研究において培養ラット肝細胞が主に分泌するアポ B48 の場合には MTP 阻害による影響をうけないことを明らかにした。しかし、分泌されたアポ B48 はほとんどが脂質含量の低い HDL 密度の粒子を形成しており、トリグリセリドに富む VLDL としての分泌はほぼ完全に阻害されていた。ミクロゾーム内腔においても VLDL 密度のアポ B48 は全く形成されず、VLDL のアセンブリーが阻害されることが示された。HDL 密度のアポ B48 はむしろ増加し、また HDL-アポ B48 形成が終了した後に MTP 阻害を開始しても VLDL 分泌はほぼ完全に阻害されることから、MTP は HDL-アポ B48 にトリグリセリドを取り込んで VLDL に転換する過程に要求されることが判明した。

MTP 阻害はオレイン酸負加によるミクロゾーム内腔へのトリグリセリド蓄積を防ぎ、代わりに細胞質にトリグリセリドを蓄積させた。したがって MTP はミクロゾーム内腔へのトリグリセリド流入に何らかの機能を果たしていることが推定される。ミクロゾーム内腔には中間の IDL・LDL 密度のアポ B48 は見出されないことから、HDL-アポ B48 から VLDL へのトリグリセリド取り込みは不連続ではなく一段階に起こると推定されている。免疫電顕の結果から、粗面小胞体で合成されるアポ B が滑面小胞体で形成される脂肪粒子と融合する VLDL アセンブリーモデルが提唱されている。実際に肝特異的に MTP をノックアウトしたマウスでは分泌経路にこのような脂肪粒子が認められないことから、MTP は脂肪粒子のミクロゾーム内腔への出現に必須であると推定されている。MTP 阻害はこのために HDL-アポ B48 へのトリグリセリド積込を低下させると考えることができる。

##### 4-2 Verapamil によるアポ B 分泌抑制機構の解明

肝細胞からのアポ B 分泌を抑制する薬剤を検討したところ、verapamil は 40 μM でアポ B100 分泌量を約 50% 抑制することを見出した。この条件下で albumin・アポ A-I の分泌量に影響はない。pulse label-chase 実験からも verapamil 添加によってアポ B 分泌速度の減少が認められた。さらに、アポ B の合成速度には影響がなかった知

##### 3-5 ABCA1 の分解抑制による HDL 新生反応の促進

未分化および分化後の THP-1 細胞をアポ A-I の存在下で培養することにより細胞内 ABCA1 量の増加が認められた。アポ A-I の ABCA1 発現増加作用はアポ A-I 添加 30 分後より認められ、ABCA1 mRNA の増加を伴わないことが確認された。アポ A-I の作用は培地中に 9-cis retinoic acid を添加した条件においても同様に認められた。一方、cystein protease inhibitor である ALLN および leupeptin は共に ABCA1 の発現量を増

見を考慮すると、verapamil により細胞内でアポ B の分解が亢進されたと考えた。Verapamil によるアポ B 分解亢進作用は、細胞内 Ca イオン濃度の変動を介したのではない。その理由は、A23187 は verapamil の作用に影響を与えず、R(+)-verapamil・S(-)-verapamil を用いた場合でも、両者でアポ B 分泌抑制の程度に差が見出されなかったことから判断される。Verapamil 添加により、細胞外へ分泌される脂質の組成は CE, TG が減少し、また microsome membrane, microsome lumen では、Ch, CE, TG の減少が確認された。以上の結果より、verapamil は細胞内 Ca イオン濃度の変動を介することなく、小胞体内腔への Ch, CE, TG の輸送を抑制するために、アポ B の分解が亢進してアポ B の分泌を阻害していると考えられた。

#### 4-3 HDL 新生反応と細胞内コレステロール代謝平衡

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。

#### 4-4 ACAT 阻害によるコレステロール搬出促進

マウス泡沫化マクロファージを用いた検討により、コレステロールエステル化阻害薬による細胞内コレステロールエステルの減少、フリーコレステロールの増加作用を確認し、それに伴いアポ A-I による細胞からの特異的コレステロール搬出作用が促進されることが明らかになった。マイクロエマルジョンによる非特異的なコレステロール搬出経路に対してはコレステロールエステル化阻害は影響を与えなかったことから、細胞内のコレステロールエステル化の阻害はアポ A-I による特異的な引き抜き経路のみを増強することが初めて明らかになった。

この知見は、コレステロール搬出メカニズムの全体像を解明していく上でも非常に興味深い。またコレステロールだけでなく同時にリン脂質の引き抜き作用も増強されることから、アポ A-I と細胞表面との相互作用を介した HDL 新生反応が促進されていると予想される。この点に関しては、今後アポ A-I と細胞との結合実験を行うことにより詳細にそのメカニズムを検討していきたいと考えている。近年、ABCA1 自体がアポ A-I の細胞表面上の結合部位として機能していることを示唆するデータも出てきていること、また、ABCA1 は核内受容体である LXR により発現制御されることから、細胞内のコレステロールエステル化阻害により増加するフリーコレステロールにより LXR が活性化され、その結果 ABCA1 の発現が増加し、細胞からのコレステロール搬出が増強されている可能性も十分に考えられることなどから ABCA1 の発現に対してコレステロールのエステル化阻害が及ぼす影響も検討していきたい。細胞からのコレステロール搬出における ABCA1 の役割は近年急速に研究が進んでいるが未だに解明されていない点も多く、本研究においては特に細胞内のコレステロール代謝と ABCA1 の制御機構の関わりに注目し、より詳細に検討していきたい。

#### 4-5 ABCA1 の分解抑制による HDL 新生反応の促進

アポ A-I は THP-1 細胞において細胞内 ABCA1 発現増加作用を示した。また cystein protease inhibitor である ALLN および leupeptin がともに ABCA1 発現増加作用を示したことから、ABCA1 の細胞内発現量に cystein protease が関与していることが示唆された。アポ A-I および ALLN による ABCA1 発現増加作用が mRNA の増加を伴わない反応であることから、これらの反応が ABCA1 の細胞内代謝の抑制に起因したものである可能性が考えられた。アポ A-I および ALLN の細胞内 ABCA1 代謝に及ぼす作用について検討する為、<sup>35</sup>S を用いて細胞内 ABCA1 を標識し、その代謝におよぼすアポ A-I および ALLN の作用について検討した。アポ A-I および ALLN が control と比較して細胞内 <sup>35</sup>S 標識 ABCA1 の経時的減少を抑制したことから、アポ A-I および ALLN の ABCA1 発現増加作用は ABCA1 の細胞内分解の抑制に起因することが確認された。また、分化後の THP-1 細胞において ALLN はアポ A-I 依存性の HDL 新生を亢進させた。アポ A-I 依存性の HDL 新生機構には ABCA1 が関与していると報告されており、今回の実験から ALLN により ABCA1 の蛋白量の増加が認められたことから、ALLN の HDL 新生反応亢進作用は細胞内 ABCA1 の分解抑制に起因する作用であると推察された。ま

たアポ A-I 依存性の HDL 新生反応は ABCA1 の分解機構に依存することが示唆された。

## 5. まとめ

- ① MTP は VLDL アセンブリー中間体である HDL-アポ B48 にトリグリセリドを積込み VLDL に転換する段階に要求され、MTP が阻害されるとラット肝細胞での VLDL アセンブリー・分泌が低下することを示した。脂質分析の結果から、MTP はミクロゾーム内腔へのトリグリセリド流入を阻害し、VLDL 粒子への取り込みを低下させる機序が示唆された。
- ② Verapamil がアポ B 含有リポタンパク質の分泌を抑制することを見出した。その作用点の解析より、verapamil はアポ B と脂質の複合体形成が行われる小胞体内腔への脂質輸送を阻害したものと考えられた。すなわち、肝細胞には小胞体内腔への脂質輸送機構が存在し、その活性がリポタンパク質の形成に必須であることが強く示唆された。
- ③ 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。
- ④ 末梢細胞での HDL 新生におけるコレステロールエステルの役割を ACAT 阻害剤 EAB-676 を用いて解析した。EAB-676 によりマウス泡沫化マクロファージ内のコレステロールエステル量が減少し、それに伴って培地中へのコレステロール・リン脂質の搬出が増強されることが明らかとなった。コレステロールエステル化阻害により特異的な引き抜き経路のみが増強されるという知見は非常に新しく、またマクロファージでのコレステロールのエステル化阻害薬は新規の脂質代謝改善薬開発のターゲットとして有望であると考えられた。
- ⑤ THP-1 細胞において ABCA1 は cystein protease を介した細胞内分解機構によりその発現が制御されていることが示唆された。アポ A-I は cystein protease を介した ABCA1 の細胞内分解を抑制することにより、その蛋白量を増加させることが確認された。アポ A-I 依存性の HDL 新生反応は ABCA1 蛋白の合成のみならず代謝分解機構にも依存することが確認された。

## 6. 研究発表

1. Nishimaki-Mogami, T., Yao, Z., and Fujimori, K. Inhibition of Phosphatidylcholine Synthesis via the Phosphatidylethanolamine Methylation Pathway Impairs Incorporation of Bulk Lipids into Very Low Density Lipoproteins in Cultured Rat Hepatocytes. *J. Lipid Res.* (2002) in press
2. Y. Higashi, H. Itabe, H. Fukase, M. Mori, Y. Fujimoto, R. Sato, T. Imanaka and T. Takano, Distribution of microsomal triglyceride transfer protein within sub-endoplasmic reticulum regions in human hepatoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, (2002) in press
3. 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
4. Akitomo Goto, Kanna Sasai, Shogo Suzuki, Tatsuya Fukutomi, Shigenori Ito, Toyoaki 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
5. 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
6. Arowu R. Tanaka, Yuika Ikeda, Sumiko Abe-Dohmae, Reijiro 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

7. 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) in press
8. 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
9. 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) in press
10. 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

#### 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願中「特願2001-314756」

---

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5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

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