

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規標的の創出を目標に、HDL 代謝制御に働くと考えられる新規蛋白質 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。また、HDL 代謝関連遺伝子発現に及ぼす多価不飽和脂肪酸の作用を総括的に解析した。

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搬出し、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、これまで抗動脈硬化作用を持つ HDL の生成・代謝機構等の解明は遅れているが、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1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。

多価不飽和脂肪酸(PUFA)は血中 HDL レベルを増加すること、脂質代謝系酵素・受容体遺伝子などの発現調節に機能することが報告されている。とくに、核受容体 PPAR や脂質代謝系遺伝子の転写因子 SREBP を介した長鎖脂肪酸の作用が注目を集めている。松本らは、これまでに DNA マイクロアレイを用いて PUFA の遺伝子発現調節作用について網羅的解析を行ってきたが、本研究では、HDL 代謝に関わる酵素・蛋白の発現に及ぼす PUFA の作用について定量 RT-PCR を用いて、脂肪酸種間の比較と濃度依存性を検討し、特に n-3 系 PUFA がコレステロール逆転送系を亢進することを示唆した。

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、SR-BI 及び CLAMP の発現が、高脂血症治療薬の一つであるフィブレート系薬剤により著しく低下することを見出した。さらに、CLAMP がリン酸化されていること、フィブレートによる CLAMP の発現低下にこのリン酸化が関与することを明らかにした。

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。さらに、このメカニズムを解明する目的で、HepG2 細胞を用いて mRNA レベル安定化作用について検討した。

2. 研究方法及び成果

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。

(1) HDL 代謝調節因子とその制御機構

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を、10% FBS/DMEM を用いて、type I collagen-coated dish に培養しサブコンフルエント状態で実験に供した。脂肪酸処理は、FBS 中の脂肪酸の影響を排除するため、10% LPDS (lipoprotein-deficient serum, fetal bovine)を含む DMEM (4 ml)に、10% BSA に溶解した脂肪酸(FA)を、終濃度が 0.031~0.25 mM になるように添加し 24 時間培養した。脂肪酸は、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)を用いた。また、コントロールとして脂肪酸を除いた 10% BSA を同量加え培養した細胞を用いた。細胞から調製した 1 μ g total RNA と random primer を用いて Multi Scribe Reverse Transcriptase によって cDNA を合成し、PCR の鋳型とした。HDL 代謝に関わる転写因子 6 種を含む 15 種の目的遺伝子 mRNA 量の測定は real-time RT-PCR 装置を用いて、Cyber Green による検出系でおこなった。各 mRNA 量は GAPDH mRNA 量を対照として補正し、コントロールの mRNA 量を基準に比較検討した。

24 時間の 0.25mM PUFA 処理により、血液循環中の代謝に関わる hepatic triglyceride lipase (HTGL, ~4 倍)および lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT, ~1.7 倍), また、細胞内での代謝に関わる ATP-binding cassette A1 (ABCA1, ~2 倍)および cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a1, ~3 倍)の mRNA レベルに増加が認められた。一方、lysosomal acid lipase/ cholesteryl esterase (LAL/CE, ~0.6 倍)では減少が認められた。

PUFA の濃度依存性を検討した結果、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 処理で濃度に依存した減少が確認された。一方、LXR- α では、FA 処理で増加が認められた。しかし、ARP-1, PPAR α , NF- κ B には変化は見られなかった。HDL 代謝に関わるものでは、SREBP もしくは LXR と同様の挙動を示すものと変化が見られないものに大別された。即ち、SREBP に類似した挙動を示したのものには、LAL/CE 及び ALCAM (HDL binding protein 2)があり、これらは OA では変動しないが、EPA と DHA では濃度に依存した発現の顕著な減少が見られた。CYP7a1 と ABCA1 は LXR と同様の挙動を示し、作用濃度に脂肪酸種による差があるものの、PUFA 濃度に依存して増加する傾向が見られた。しかし、ACAT, Cdc42 および LCAT には、濃度に依存した変化は見られなかった。また、HTGL については、HepG2 細胞での発現レベルが非常に低く、PUFA 濃度による影響を評価することができなかった。

(2) 肝臓内 HDL レセプター SR-BI の新規制御機構

1) 各種核内受容体アゴニストによる SR-BI, CLAMP の発現制御

近年、核内受容体である PPAR, LXR, FXR が肝臓において脂質代謝に関わる様々な遺伝子の発現制御を担うことが注目されている。そこで、これらの受容体に対する特異的なアゴニストとなる薬物を C57BL/6J マウスに投与し、肝臓における SR-BI/CLAMP の発現を調べた。その結果、PPAR α アゴニストのフィブレート投与時のみ、SR-BI, CLAMP の蛋白質発現量が全く検出できないほどに低下することを見出した。しかし、興味深いことにフィブレートを投与しても、SR-BI, CLAMP ともに mRNA レベルではほとんど変化しないことがわかった。従って SR-BI と CLAMP はフィブレートによって直接転写レベルで制御されているのではなく、蛋白質レベルで制御されていることが示唆された。但し、PPAR α ノックアウトマウスでは、SR-BI, CLAMP ともに全く発現低下は見られなかったことから、この発現低下作用は PPAR α を介していることが確認された。

2) CLAMP リン酸化

翻訳後の蛋白質発現制御をリン酸化が担うことがある。CLAMP には一次構造上リン酸化されうるモチーフが多いことに着目し、CLAMP が実際にリン酸化されるのか検討した。まず、ラット肝癌由来細胞株 McARH7777 に CLAMP を発現させ、培地に ^{32}P リン酸を加えたところ、確かに CLAMP に ^{32}P が取り込まれていることを見い出した。次に CLAMP のどのアミノ酸がリン酸化されているか調べた。CLAMP の様々な欠損変異体を作製し、 ^{32}P が取り込まれるか同様に調べたところ、C 末端 23 アミノ酸を欠損するだけで ^{32}P の取り込みが見られなくなったことから、このドメインにリン酸化部位が存在することがわかった。ホスホアミノ酸分析により、Ser がリン酸化されることがわかったので、リン酸化されうる可能性のある 4 箇所の Ser をそれぞれ Ala に置換した変異型 CLAMP を作製した。その結果、Ser509 と Ser512 がリン酸化されていることが明らかになった。次に、これらの Ser をリン酸化させたペプチドより抗体を作製し、実際に肝臓内の CLAMP もこれらのアミノ酸がリン酸化されているか調べた。その結果、これらの抗体は、大腸菌で作製したリコンビナント CLAMP を全く認識しなかったのに対して、ラット肝臓中の CLAMP でははっきりと検出された。従って、生体内でも確かに CLAMP がリン酸化されていることが示された。

次に CLAMP のリン酸化の意義を調べた。CLAMP は SR-BI の蛋白質レベルでの発現を上昇させる効果があることがこれまでに明らかになっていたので、まずこの作用に対するリン酸化の効果調べた。ラット肝癌由来細胞株 Fao に CLAMP、または Ser509 と Ser512 を Ala に置換した変異型 CLAMP を強制発現させ、内在的に持つ SR-BI の蛋白質発現量を調べた。その結果、正常型 CLAMP を発現させると SR-BI の発現量は有意に増加したが、その効果は変異型 CLAMP を発現させたときにも見られた。よって、CLAMP による SR-BI 発現制御にリン酸化は関与しないことが示唆された。

3) CLAMP のフィブレートによる発現制御とリン酸化の関与

Fao 細胞は PPAR α を内在的に持つ細胞株である。また SR-BI も内在的に発現するが CLAMP は発現していない。Fao 細胞にフィブレート処理すると、SR-BI 蛋白質の減少が観察された。そこで次に、CLAMP またはリン酸化部位変異型 CLAMP を細胞に強制発現させ、フィブレート処理した後、それらの蛋白質発現量を調べた。その結果、フィブレート処理により正常型 CLAMP が約半分程度に低下したのに対して、リン酸化部位変異型 CLAMP は 10%程度まで低下した。但し、フィブレート処理しない状態では、正常及び変異型 CLAMP の発現レベルはほぼ同様であった。即ち、リン酸化を受けない CLAMP は、フィブレートによる蛋白発現量低下がより顕著であ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

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 日目に行い、血清中の総コレステロール、HDL コレステロールおよび 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。

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。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 投与群では血中総コレステロール、HDL コレステロール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。

さらに、このメカニズムを解明する目的で、サブコンフルエント状態の HepG2 細胞に Ro11-1416 を添加し 36 時間培養し、培養液中の apo AI レベルを測定した。対照コントロール群として、0.1% DMSO 群を設定した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後新しい培地に交換し、アクチノマイシン D 存在下で 0~24 時間培養した。培養終了後、細胞から RNA を回収し、apo AI mRNA レベルを定量した。

10 μM の Ro11-1416 処理により apo AI mRNA レベルがコントロール比 148%に亢進した ($p<0.05$)。このとき、培養液中の apo AI レベルは 130%であった ($p<0.05$)。3 μM 処理では、mRNA に上昇傾向 (124%) は認められたものの、有意ではなかった。apo AI 蛋白質にも変化は無かった (110%)。

アクチノマイシン D (100nM) 添加後の mRNA レベルについて time course study を行った。コントロール群、Ro11-1416 群ともに、ほぼ同じ半減期を示した。なお、GAPDH mRNA レベルについては、全ての条件において変動は見られなかった。

3. 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細胞から搬出し肝臓に戻す、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に、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。

多価不飽和脂肪酸のHDL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、CYP7a1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。

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PUFA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と考えられる。

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PPAR α をmRNAレベルで増加させることを報告した。この結果は、今回の結果と一致するものである。LXR α は胆汁酸合成系の律速酵素であるCYP7a1の転写因子であることから、PUFAによるCYP7a1 mRNAレベルの増加は、PPAR α の増加と連動した変動であると考えられる。LDLレセプターやHMG-CoA還元酵素がSREBPで発現制御されることは良く知られているが、LAL/CE、ALCAMとSREBP1との関係はこれまでには認められておらず、今回の検討から、これらが新たにSREBP1ターゲットの遺伝子であることが示唆される。HepG2細胞におけるPPAR α の発現レベルは低いことが報告されているが、PPAR α アゴニストであるフィブレート処理によりHepG2細胞においても、そのターゲット遺伝子の発現を活性化することが認められることから、PUFAはPPAR α の発現自身に影響を与えるのではないと考えられる。ACATはOAへの基質特異性が高いことも知られているが、OAは直接ACAT発現に影響を持たないようであった。これらの遺伝子はPUFA自身というよりは、コレステロールなどの他の因子を介して影響を受けるものと考えられる。

本研究において、PPAR α アゴニストであるフィブレート系薬剤が、肝臓においてSR-BIとCLAMPを転写レベルではなく蛋白質レベルで低下させることを見出した。PPAR α は、様々な脂質代謝関連遺伝子を転写レベルで制御することが知られているが、SR-BIやCLAMPのように蛋白質レベルで制御する例は初めてのものと考えられる。但し、この作用もPPAR α 依存的事であることから、フィブレートによりSR-BIやCLAMPの蛋白質分解を促進する何らかの因子が転写されていると考えられる。その機構は現時点では全く不明であるが、リン酸化部位を変異させたCLAMPはフィブレートにより顕著な発現低下を引き起こすことから、次のような仮説を考えている。肝臓内で発現しているCLAMPの多くは恒常的にリン酸化されている。このCLAMPが何らかの機構で脱リン酸化され、脱リン酸化されたCLAMPのみがPPAR α を介して転写された因子により速やかに分解されるという経路である。今後は、この仮説を検証していくことと、SR-BI/CLAMPがなぜPPAR α により転写レベルでなく蛋白質レベルで制御されているのかを明らかにしていくことが課題である。

Ro11-1416は、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コレステロールの上昇が報告されている。一方、LGD1069はPPAR α 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コレステロール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 コレステロールは 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 上昇作用とパラレルではないことが示唆された。apo AI から HDL 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。

本研究において Ro11-1416 の濃度依存的な apo AI mRNA の上昇が認められたことから、Ro11-1416 の作用点の一つとして転写調節機構の存在が示唆される。mRNA の de novo 合成をアクチノマイシン D 添加により遮断した条件下で、apo AI mRNA レベルを比較検討したところ、コントロール群と Ro11-1416 群間に消失速度の差は認められなかった。したがって、mRNA の半減期に対しては Ro11-1416 の安定化作用は寄与していないことが推測される。また、近年、RXR- α 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 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。

4. まとめ

動脈硬化の治療薬に対する新たな標的を見いだすことを目標に、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。

PUFA の HDL 代謝系酵素・蛋白質の発現調節に及ぼす作用について解析した結果、ABCA1, CYP7a1 などの発現に mRNA レベルで増加が認められ、これらは LXR などの転写因子を介して、コレステロール逆転送系に影響を与えることが示唆された。

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て明らかにした。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-コレステロールと総コレステロールレベルに対する作用はそれぞれ異なるものであった。

5. 研究発表

Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A. Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on the mRNA expression using a gene chip. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) (2003) in press

Fujiwara Y, Yokoyama M, Umeda-Sawada R, Seyama Y, shii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A. Influence of polyunsaturated fatty acid on gene expression in HepG2 cells. J Atheroscler Thromb 9, 157-162 (2002)

Mardones, P., Pilon, A., Bouly, M., Duran, D., Nishimoto, T., Arai, H., Kozarsky, F., Altayo, M, Miquel, J.F., Luc, G., Clavey, V., Staels, B. and Rigotti, A. Fibrates downregulate hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) protein expression in mice. J.Biol.Chem. (2003) in press

J. Ishii, H. Adachi, J. Aoki, H. Koizumi, S. Tomita, T. Suzuki, M. Tsujimoto, K. Inoue, and H. Arai. SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. J.Biol.Chem. 277, 39696-39702 (2002)

T. M. McIntyre, A. V. Pontsler, A. R. Silva, A. Hilaire, Y. Xu, J. C. Hinshaw, G. A. Zimmerman, K. Hama, J. Aoki, H. Arai, and G. D. Prestwich. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA):LPA is a transcellular PPAR γ agonist. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 100, 131-136 (2003)

D.E. Kaempff-Rotzoll, K. Igarashi, J. Aoki, K. Jishage, H. Suzuki, H. Tamai, O. Linderkamp and H. Arai. Alpha-tocopherol transfer protein is expressed specifically at the implantation site of pregnant mouse uterus. Biol.Reprod. 67, 599-604 (2002)

J. Aoki, A. Taira, Y. Takanezawa, Y. Kishi, K. Hama, T. Kishimoto, K. Mizuno, K. Saku, R. Taguchi and H. Arai. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J.Biol.Chem.* 277, 48737-48744 (2002)

H. Sonoda, J. Aoki, T. Hiramatsu, M. Ishida, K. Bando, Y. Nagai, R. Taguchi, K. Inoue and H. Arai. A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid. *J.Biol.Chem.* 277, 34254-34263 (2002)

K. Kawamoto, J. Aoki, H. Hosono, A. Tanaka, A. Itakura, H. Arai, Y. Kiso and H. Matsuda. Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J.Immunol.* 168, 6412-6419 (2002)

M. Umezu, Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, T. Yamori, G. B. Mills, K. Inoue, J. Aoki and H. Arai. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J.Cell Biol.* 158, 227-233 (2002)

K. Tsuneyama, K. Harada, N. Kono, M. Sasaki, T. Saito, M. E. Gershwin, M. Ikemoto, H. Arai and Y. Nakanuma. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J.Hepatol.* 37, 176-183 (2002)

K. Nakajima, H. Sonoda, T. Mizoguchi, J. Aoki, H. Arai, M. Nagahama, M. Tagaya and K. Tani. A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125. *J.Biol.Chem.* 277, 11329-11335 (2002)

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)

Hiyoshi H, Yanagimachi M, Ito M, Yasuda N, Okada T, Ikuta H, Shinmyo D, Tanaka K, Kurusu N, Yoshida I, Abe S, Saeki T, Tanaka H. Squalene synthase inhibitors suppress triglyceride biosynthesis through the farnesol pathway in rat hepatocytes. *J Lipid Res.* 44(1) 128-35 (2003)

5. 知的所有権の取得状況
特になし