

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 | 藤本康之 |
| (2) 名古屋市立大学大学院医学研究科 | 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、杉本佳奈美 |
| (4) グレラン製薬(株)開発研究所 | 松倉竹雄 |

要旨

肝からのVLDL形成・分泌の制御にはVLDLアセンブリーの場合である小胞体内腔への脂質輸送が重要であり、verapamilが阻害する輸送系とマイクロゾームトリグリセリド転移タンパクMTPが機能することを示した。分泌制御における細胞内中性脂質プールの重要性を示すとともに、脂質プールとしての機能が推定される細胞内脂質顆粒を構成するタンパク質を同定し解析した。HDL新生反応に関して、アポリポタンパク質はABCA1と相互作用してシグナル分子となるジアシルグリセロールを産生し、HDLにコレステロールを積み込むための細胞内コレステロール輸送システムを起動させると同時にABCA1の分解抑制による発現増加を引き起こす一連の機構を明らかにした。膜トランスポーターABCA1の構造と機能を解析し、ACAT阻害によるHDL新生促進の新たな機構を明らかにした。

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」について、細胞内脂質供給・輸送系を介した新たな制御メカニズムを解明し、高脂血症・動脈硬化症の予防・治療手段の基盤とすることを目的とする。

肝は脂質代謝の中核として、コレステロールや中性脂質を合成しVLDLのかたちで分泌し末梢に供給している。肝細胞内で脂質は脂質顆粒として貯蔵されるか、あるいは小胞体内腔側に輸送されてVLDLとして形成・分泌される。VLDL分泌抑制の新たな手法を探るために、①小胞体内腔への脂質輸送を阻害しVLDL分泌を低下させる薬物を見出し[棟]、②VLDLへのトリグリセリド積み込み過程でのホスファチジルコリン供給ならびにマイクロゾームトリグリセリド転移タンパク(MTP)の役割[最上]、および③コレステリルエステル合成阻害によるVLDL分泌低下に及ぼす細胞内中性脂質プールの役割[最上]について検討し、④脂質顆粒の形成や退縮への関与が推定されるタンパクの単離同定[藤本]を行う。

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。本研究ではこのHDL新生反応の機序を解明し、反応の賦活化の方法を探る。①強制発現系を用いたABCA1の構造と機能、②細胞内コレステロール輸送系の役割、③細胞膜へのアポリポタンパク結合が引き起こす反応開始のシグナル、④モデルマウスの血漿HDL濃度制御への寄与について解析を行う[横山]。さらに、⑤コレステリルエステル合成阻害によるコレステロール搬出促進の可能性[喜多田]、また⑥ABCA1分解抑制によるHDL新生反応の新たな促進方法[松倉]について検討を行う。

2. 研究方法

VLDL 分泌の制御については、1)ラット肝細胞やヒト由来の肝ガン細胞を用いて標識したアポ B の脂質との会合や分泌を追跡し、特定の脂質合成阻害や脂質転移タンパク MTP 阻害の影響の解析からそれぞれの役割を検討する。また、2)脂質輸送過程に影響を与える薬物の検索を行う。3)細胞内脂質顆粒の形成・退縮の機構の解析、あるいは細胞への強制脂質負荷によって VLDL 分泌制御における細胞内の中性脂質プールの役割を解明する。

HDL 新生は1)この反応の細胞側の主要因子である 膜トランスポーター ABCA1 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)この反応に於けるアポリポタンパク質と ABCA1 の直接の相互作用について検討する。3)この系による細胞コレステロールの搬出は、アポリポタンパク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否かを検討する。

3. 研究成果

3-1 VLDL形成過程でのホスファチジルコリン合成およびMTPの役割の解明

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ことが知られる。VLDL 形成・分泌過程での役割を解明するために、培養ラット肝細胞を用い ^{35}S でアポ B を標識して追跡した。アポ B48 は生合成直後にミクロゾーム内腔で HDL 密度の中間体を形成し、遅れてトリグリセリドを含む VLDL に転換された。MTP 阻害剤 BMS-19763615 (500 nM)はこの転換を阻害し、VLDL に成熟したアポ B48 の分泌を完全に阻害したが、代わりに HDL 密度のアポ B48 の分泌が増加した。ホスファチジルエタノールアミンメチル化経路での PC 合成を阻害した場合にも、同様に HDL 密度のアポ B48 から VLDL への転換が低下した。したがって、中間体にトリグリセリドを積み込み VLDL 形成が完成する過程には MTP の機能ならびに PC の供給が必要とされることが判明した。細胞にオレイン酸を負荷するとミクロゾーム膜および内腔のトリグリセリド量が増加するが、MTP 阻害剤はこ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。したがって、MTP は細胞質から VLDL アセンブリーの間であるミクロゾーム内腔にトリグリセリドを輸送する過程に機能していることが推定された。(J. Lipid. Res.(2002) 43, 1035-1045)

3-2 ACAT 阻害による VLDL 分泌低下に及ぼす細胞内中性脂質プールの役割

コレステリルエステル合成が VLDL 分泌に与える影響については、多様な結論が導きだされている。ラット肝由来の McARH7777 細胞を用い、ACAT 阻害剤 MCC-147 によるコレステリルエステル合成阻害の影響を検討したところ、アポ B100 分泌は 50%低下した。ところが、細胞にオレイン酸を負荷し細胞内のトリグリセリドレベルを 3.5 倍に増加させたところ、ACAT 阻害剤の影響は消失した。オレイン酸に加えて 25-hydroxycholesterol を負荷して ACAT 活性を増加させた場合には、阻害によりアポ B100 分泌はむしろ 2.4 倍の増加に転じた。VLDL 中の脂質を分析したところ、コレステリルエステルの減少はトリグリセリドの増加で補われていることが判明した。したがって、VLDL 分泌には特定の中性脂質が要求されるのではなく、細胞内中性脂質の総量が分泌量の決定に重要であることが示された。(第 34 回日本動脈硬化学会総会 他)

3-3 小胞体内腔への脂質輸送を阻害しVLDL分泌を低下させる薬物

ヒト肝由来培養細胞 HuH-7 を用いてアポ B 分泌を抑制する薬物をスクリーニングし、verapamil および diltiazem を見出した。これらは albumin・アポ A-I の分泌、アポ B100 の合成速度には影響を与えず、アポ B100 の細胞内分解を亢進して分泌のみを低下させた。Verapamil は Ca チャネルの阻害薬であるが、calcium ionophore (A23187)による影響は認められず、R(+)-、S(-)- verapamil の両者ともに同程度の作用を示したことから、アポ B 分泌抑制は Ca チャネルの阻害作用に起因しないことが示唆された。Verapamil 添加により、ミクロゾーム膜及び内腔面分に存在するコレステロール、コレステリルエステル、トリグリセリドが減少していた。したがって、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。(第 33 回日本動脈硬化学会総会)

3-4 細胞における細胞内脂質顆粒形成タンパクの単離・同定

細胞内脂質顆粒の形成・退縮機構を解明する手がかりとして、ヒト肝由来培養細胞 HuH7 から細胞内脂質顆粒をシヨ糖密度勾配遠心によって単離し、脂質顆粒に存在するタンパクの解析をおこなった。主要な 75kDa、55kDa、35kDa のタンパク3種について部分アミノ酸配列解析を行い、それぞれ acyl-CoA synthetase 3 (ACS3)、adipose differentiation-related protein (ADRP)、 17β -hydroxysteroid dehydrogenase 11 (17β HSD11)と同定した。このうち 17β HSD11 と ACS3 は脂質代謝酵素であった。この3種のタンパクに対する特異抗体および抗血清を得て、細胞分画・イムノプロットならびに間接蛍光抗体法により細胞内局在を解析し、ADRP と 17β HSD11 の大部分と ACS3 の一部が脂質顆粒に局在することを示す結果を得た。これらの知見は肝細胞の細胞内脂質顆粒上で脂質代謝がおこなわれていることを示唆しており、細胞内中性脂質貯蔵機構との関係が示唆される。(生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2002,11))

3-5 ABCA1 の構造と HDL 新生反応における機能

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。HEK293 細胞に於いて、ABCA1 の発現でアポリポ蛋白質による 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)。

2) HDL 新生反応欠損症である Tangier 病の ABCA1 の変異、R587W、Q597R および W590S、がその機能に及ぼす影響を、HEK293 における発現系において検討した。R587W と Q597R はハイマンノース型から複合型への糖鎖の成熟の障害があつて形質膜に到達できず、W590S にはこうした障害は認められなかった。W590S には ATP 結合の障害も認められなかった。(J. Biol. Chem. in press)

3-6 HDL 新生のための細胞内コレステロールの特異的輸送系

1) 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。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.)

2) ABCA1 とアポリポタンパク質により産生する HDL の組成を六種類の繊維芽細胞で検討して、HDL 粒子の新生とそれへのコレステロール組み込みの相対的に独立した制御を明らかにした。細胞リン脂質と HDL 粒子の新生は ABCA1 の発現に直接依存し、これが ABCA1 の基本的役割であることが示された。新生した HDL のコレステロール含有量は ABCA1 の発現、細胞コレステロールレベル、caveolin-1 発現などのいずれにも依存せず、独立した制御を受けていることが分かった。物理化学的拡散による細胞コレステロールの流出は細胞コレステロールレベルに直接依存することから、HDL へのコレステロール積み込みが先に生じた HDL へ 2次的に拡散によって起こる機序について否定的結果が得られた(Biochim, Biophys. Acta (2002) 1585: 1-10)。

3-6 アポリポタンパク質と ABCA1 の相互作用が起動する細胞内情報伝達系

アポリポタンパク質-ABCA1 による HDL 新生反応は細胞膜から sphingomyelin をも搬出し、この結果 phosphatidylcholine から phospholipase C により切り出された phosphorylcholine が ceramide に転移されて補充される。その結果、diglyceride が産生し、これがアポリポタンパク質による ABCA1 を介した細胞内情報伝達系の起動の機序である可能性が示唆された。(J. Biol. Chem.(2002) 277:44709-44714)

3-7 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

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)。

3-8 ACAT 阻害による HDL 新生の促進

ACAT 阻害剤 MCC-147 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る効果を示した。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 の濃度で検討を行ったところ、アポ A-I 5~20 μ 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。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が、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する増強作用は認められなかった。この増強作用はタンパク合成に依存しており、シクロヘキシミドと共存すると消失した。さらに、細胞に対する [¹²⁵I]アポ A-I の結合が増加していることが示されたことから、コレステリルエステル合成阻害によってアポ A-I と細胞表面との相互作用を介した HDL 新生反応の促進が予想される。

3-9 ABCA1 の分解抑制による HDL 新生反応の促進

THP-1 細胞をアポ A-I の存在下で培養すると、細胞内 ABCA1 の蛋白量が増加した。この増加はアポ A-I 添加 30 分後より認められたが、ABCA1 mRNA の増加を伴わず、また、9-cis retinoic acid によって ABCA1 の転写を促進した場合にも同様に認められた。細胞内 ABCA1 を ³⁵S で標識し 8 時間までその変化を追跡すると、標識 ABCA1 は速やかに減少し分解を受けることが判明した。アポ A-I あるいはアポ A-II が存在すると標識 ABCA1 の減少は抑制され、このような分解の抑制はチオールプロテアーゼ阻害剤である ALLN が共存した場合にも認められた。したがって、細胞内 ABCA1 のレベルはチオールプロテアーゼによる分解で調節が行われており、アポ A-I は ABCA1 と相互作用することによって分解を抑制することが分かった。さらに、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ることが示され、ABCA1 の分解を抑制して HDL 新生反応を促進する、新しい薬剤開発の可能性を開いた (J. Biol. Chem. (2002) 277: 22426-22429)

4. 考察

肝細胞内で合成される脂質は細胞質の脂質顆粒に蓄えられ、あるいは小胞体内腔に輸送されてアポ B と VLDL にアセンブリーされ分泌される。脂質輸送の方向と量を制御するメカニズムは、VLDL 分泌の制御を通じて脂肪肝・高脂血症の予防・治療に直接つながるものとしてその解明が期待される。この研究では、脂質顆粒に存在するタンパクを解析し、顆粒の形成・退縮のメカニズム解明をめざすとともに、小胞体内腔への脂質輸送、アポ B への脂質転送を司る機構の解明を試みた。脂質顆粒から単離同定した二種の主要タンパクは脂質代謝酵素であったことから、顆粒上での活発な脂質代謝が推定されるが、これらのタンパクが中性脂質貯蔵機構とどのように関連しているのか、さらにリポタンパク産生機構とどのように関係するのか解明が必要とされる。脂質は小胞体の細胞質側で合成されることから、VLDL アセンブリーの場合である内腔側に脂質を輸送するシステムが必要とされる。このような脂質輸送系の実体は明らかではないが、小胞体内腔への脂質輸送を阻害し VLDL 分泌を低下させる薬物 verapamil を見出した。この発見は輸送担体の単離・同定に道を開くものと期待される。アポ B への脂質転移は複数のステップを経るが、MTP はトリグリセリドの大部分を積み込む後期過程に必要とされるこ

とを明らかにした。さらに MTP は細胞質から小胞体内腔へのトリグリセリド流入に関わる知見を得た。MTP は小胞体内腔に存在しており、verapamil が阻害する輸送担体と機能的にリンクしている可能性が推定される。ACAT 阻害剤によるコレステリルエステル合成低下の効果は細胞内の中性脂質プール増大により消失した。この ACAT 阻害剤 MCC-147 の in vivo での VLDL-トリグリセリド低下効果はラットおよびウサギで認められていることから、ACAT 阻害は VLDL 分泌低下に有効であるが、過剰な脂質摂取がその効果を減ずる可能性を示す結果と解釈される。

HDL は遊離のアポリポタンパクが細胞膜表面と相互作用し、細胞内のコレステロールを引き抜いて新生される。この反応には ABCA1 が必須であるが、本研究の結果から、ABCA1 の膜に於ける基本的構造が分かり、さらに HDL 欠損症である Tangier 病での変異が ABCA1 の機能にどのように影響を及ぼしているのか解析が可能になった。さらに ABCA1 糖鎖の成熟過程に障害を及ぼし細胞膜への到達が阻害される仕組みを明らかにした。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、アポリポタンパク質による刺激でこれが起動することがわかり、研究が大きく前進した。さらに、アポリポタンパク質と ABCA1 の相互作用はホスファチジルコリン-phospholipase C を活性化して diacylglycerol を産生する、また同時にチオールプロテアーゼによる ABCA1 分解を防ぐことが示され、これらの情報伝達の解明が期待される。プロテアーゼ阻害剤による ABCA1 分解抑制の発見は ACAT 阻害剤の効果の発見とともに HDL 新生を促進する新たな薬剤開発の可能性を開いた。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タンパク質による HDL 産生の機序を解明する足掛かりがえられた。

5. まとめ

肝からの VLDL 分泌の制御には細胞内中性脂質プールと VLDL アセンブリーの間である小胞体内腔への脂質輸送の重要性が示された。脂質プールと考えられる脂質顆粒の構成タンパクを同定し、さらに脂質輸送を阻害する薬物を見いだすと同時に脂質輸送における MTP の機能を解明した。

ABCA1 は HDL 新生反応における粒子形成の律速因子であり、細胞膜への発現と機能発現に重要な構造を解明した。アポリポタンパク質と ABCA1 の相互作用は脂質代謝回転によるシグナル分子を産生し、HDL にコレステロールを積み込むための細胞内コレステロール輸送システムを起動すると同時に、ABCA1 の分解抑制を介して発現を増加させる。HDL 新生反応は血漿 HDL 生成の主要反応であり、その中心臓器は肝臓である。

6. 研究発表

1. Nishimaki-Mogami, T., Yao, Z., and Fujimori, K. Inhibition of Phosphatidylcholine Synthesis via Phosphatidylethanolamine Methylation Is Associated with Impaired Incorporation of Bulk Lipids into Very Low Density Lipoproteins in Cultured Rat Hepatocytes. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1035-10454.
2. Vukmirica, J., Nishimaki-Mogami, T., Tran, K., Shan, J., McLeod, R. S., Yuan, J., and Yao, Z. The N-linked Oligosaccharides of Human Apolipoprotein B Are Important for the Assembly and Secretion of Apolipoprotein B-containing Very Low Density Lipoproteins. (2002). *J. Lipid Res.* 43, 1496-1507
3. Higashi, Y., Itabe, H., Fukase, H., Mori, M., Fujimoto, Y., Sato, R., Imanaka, T. and Takano, T. Distribution of microsomal triglyceride transfer protein within sub-endoplasmic reticulum regions in human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* (2002) 1581(3):127-136
4. Jin-ichi Ito and Shinji Yokoyama. Roles of glia cells in cholesterol homeostasis in the brain. In: Non-neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction, Edited by Leif Hertz. Elsevier, Amsterdam (2003) in press
5. Arowu R. Tanaka, Sumiko Abe-Dohmae, Tomohiro Ohnishi, Ryo Aoki, Gaku Morinaga, Kei-ichiro Okuhira, Yuika Ikeda, Fumi Kano, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Teruo Amachi, Masayuki Murata, Shinji Yokoyama, and Kazumitsu Ueda. Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J. Biol. Chem.* (2003) in press.
6. Shinji Yokoyama. Brief history of LDL apheresis. (2002) *Therapeutic Apheresis*. Invited review. In

press.

7. Mariko Harada-Shiba, Atsuko Takagi Yoshihiro Miyamoto, Motoo Tsushima, Yasuyuki Ikeda, Shinji Yokoyama, and Akira Yamamoto. Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrin. and Met.* (2002) in press.
8. Akitomo Goto, Kanna Sasai, Shogo Suzuki, Tatsuya Fukutomi, Shigenori Ito, Toyoaki Matsushita, Mitsuhiro Okamoto, Takahiko Suzuki, Makoto Itoh, Kuniko Okumura-Noji, and Shinji Yokoyama. Plasma Concentrations of LPL and LCAT are in Putative Association with Female Sex and Alcohol That are Independent Negative Risk Factors For Coronary Atherosclerosis in Japanese. *Clin. Chim. Acta* (2002) in press.
9. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Sachiko Ueno and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein-Mediated Cellular Lipid Release Requires Replenishment of Sphingomyelin in a Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C-Dependent Manner. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 44709-44714.
10. Reijiro Arakawa and Shinji Yokoyama. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 22426-22429.
11. 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.
12. Youichiro Wada, Akira Sugiyama, Takashi Yamamoto, Makoto Naito, Noriko Noguchi, Shinji Yokoyama, Maki Tsujita, Yoshiki Kawabe, Mika Kobayashi, Akashi Izumi, Takahide Khoro, Toshiya Tanaka, Hirokazu Taniguchi, Hidenori Koyama, Ken-ichi Hirano, Shizuya Yamashita, Yuji Matsuzawa, Etsuo Niki, Takao Hamakubo and Tatsuhiko Kodama. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of the LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2002) 22: 1712-1719.
13. Heng-ai Wu, Maki Tsujita, Kuniko Okumura-Noji, Shinichi Usui, Hajime Kakuuchi, Mitsuyo Okazaki, Shinji Yokoyama. Cholesteryl Ester Transfer Protein Expressed in Lecithin: Cholesterol Acyltransferase-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2002) 22: 1347-1353
14. 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) 1589: 261-272.
15. Yoshio Yamauchi, Sumiko Abe-Dohmae and Shinji Yokoyama. Differential Regulation of Apolipoprotein A-I/ATP binding Cassette Transporter A1-mediated Cholesterol and Phospholipid release. *Biochim. Biophys. Acta* (2002) 1585: 1-10.
16. 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.
17. Okumura-Noji, K., Sasai, K., Zhan, R., Kawaguchi, H., Maruyama, H., Tada, T., Takahashi, H., Okazaki, M., Miida, T., Sakuma, N., Kimura, G., Ohta, N., and Yokoyama, S. Cholesteryl Ester Transfer Protein-Deficiency Causes Slow Egg Embryonation of *Schistosoma japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) 286: 305-310.
18. Tanaka, A. R., Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Arakawa, R., Sadanami, K., Kidera, A., Nakagawa, S., Nagase, T. Aoki, R., Kioka, N., Amachi, T., Yokoyama, S., and Ueda, K. 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
19. Kojima, K., Abe-Dohmae, S., Arakawa, R., Murakami, I., Suzumori, K., and Yokoyama, S. Progesterone

Inhibits Apolipoprotein-mediated cellular lipid release: A putative mechanism for the decrease of HDL. *Biochim. Biophys. Acta* (2001) 1532: 173–184.

20. Goto, A. Sasai, K., Suzuki, S., Fukutomi, T., Ito, S., Matsushita, T., Okamoto, M., Suzuki, T., Itoh, M., Okuyama-Noji, K., and Yokoyama. S. Cholesteryl ester transferprotein and atherosclerosis in Japanese subjects: A study based on coronary angiography. *Atherosclerosis* (2001) 159: 153–163
21. Tomimoto S., Tsujita M, Okazaki M, Usui S, Tada T, Ito S, Itoh M and Yokoyama S. 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

7. 知的所有権の取得状況

1) 特許出願中

発明者; 横山信治、荒川礼次郎

出願人; グレラン製薬株式会社