

2003/375

厚生科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

生活習慣病予防対策に関わる新規遺伝子の検索と機能解析

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

平成 16 (2004) 年 3 月

主任研究者 シバ  
斯波 真理子  
国立循環器病センター研究所  
バイオサイエンス部・室長

厚生科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

生活習慣病予防対策に関わる新規遺伝子の検索と機能解析

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

## 目次

### I. 総括研究報告

- 生活習慣病に関わる新規遺伝子の検索と機能解析 ----- 1  
斯波真理子（国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 室長）

### II. 分担研究報告

1. 高 LDL 血症に関わる新規遺伝子の探索と機能解析： -----11  
Autosomal Recessive Hypercholesterolemia Knockout Mouse の解析  
斯波真理子（国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 室長）
2. 高中性脂肪血症に関わる新規遺伝子の検索と機能解析： -----19  
高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析  
友池仁暢（国立循環器病センター病院長）
3. 高脂血症モデル動物の開発と病態の解析： -----28  
生活習慣病に関連した食後高脂血症ウサギの遺伝形式  
伊藤恒賢（山形大学医学部 文部科学技官）
4. 低 HDL 血症に関わる新規遺伝子の検索と機能解析： -----33  
ABCA1 およびその近縁関連遺伝子の機能と反応機構  
横山信治（名古屋市立大学大学院医学研究科 教授）

- III.研究成果の刊行に関する一覧表 -----38

- IV.研究成果の刊行物・別刷 -----40

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
総括研究報告書

生活習慣病に関わる新規遺伝子の検索と機能解析

分担研究者 斯波真理子 国立循環器病センター研究所 室長

研究要旨

動脈硬化性疾患の危険因子であるリポ蛋白質異常の主なものは、高 LDL 血症、高中性脂肪血症、低 HDL 血症である。我々は、これらの原因となる新規遺伝子の探索と機能解析を、それぞれのモデル動物や培養細胞を用いて行った。高 LDL 血症については、LDL 受容体の機能を修飾するとされる Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) 遺伝子の機能解析を、ノックアウトマウスを用いて行った。ARH ノックアウトマウスでは *in vivo* では LDL 代謝の遅延を認めたが、初代培養肝細胞では LDL 取り込みに異常を認めなかった。LDL 受容体の細胞内取り込みに際して、ARH 依存性であるかどうかは、細胞の種類によって決まるのではなく、細胞をとりまく環境によって決まり、ARH に変わる物質が補償する可能性が示唆された。高中性脂肪血症については、WHHL ウサギより、高度の高中性脂肪血症を呈するライン (TGH) と軽度の高中性脂肪血症を呈するライン (TGL) の分離に成功した。この TGH と TGL を用い、肝臓における発現蛋白質を、プロテオームの技術を用いて網羅的に解析し、発現量に大きな違いのあるスポットを MS-MS により解析した。TGH にほとんど発現を認めず、TGL に多量の発現を認めるスポットは Carboxylesterase であり、TGL にほとんど発現を認めず、TGH に多量の発現を認めたスポットは Acyl CoA dehydrogenase であると同定された。さらに、TGH より高コレステロール血症の因子 (LDL 受容体欠損) を無くし、高中性脂肪血症のモデルウサギのラインを確立し、その解析を行った。低 HDL 血症については、細胞脂質から HDL が新生する反応の律速遺伝子 ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構を解明した。

分担研究者

友池仁暢

国立循環器病センター病院長

伊藤恒賢

山形大学医学部附属動物実験  
施設 文部技官

横山信治

名古屋市立大学大学院医学研  
究科代謝細胞生化学 教授

## A. 研究目的

高 LDL 血症、低 HDL 血症、高中性脂肪血症は動脈硬化性疾患の主要な危険因子として知られる血漿リポ蛋白質代謝異常である。これらについては、LDL 受容体異常による家族性高コレステロール血症、リポ蛋白質リパーゼ欠損症による高カイロマイクロン血症など、遺伝子の異常が同定されているものはわずかであり、日常臨床で一般的に遭遇し動脈硬化症の危険因子となるリポ蛋白質代謝異常の多くは、原因遺伝子とその異常が未だ明らかとなっていない。本研究では、高 LDL 血症、低 HDL 血症、高中性脂肪血症の原因となる新規遺伝子の探索と機能解析を、それぞれのモデル動物や培養細胞を用いて行い、これらの代謝異常の機序を広く明らかにして、生活習慣病の予防および治療に結びつけることを目的とする。

高 LDL 血症を引き起こす遺伝子として、最近、Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) が同定さ

れた。ARH は、LDL 受容体のアダプター蛋白であり、LDL 受容体の細胞内取り込み機構に関係すると報告されたが、機能の詳細は不明である。この遺伝子に関し、ARH ノックアウトマウスを用いた機能解析を行った。

高中性脂肪血症に関しては、友池らが 10 年の年月をかけて純化した食後高中性脂肪血症モデルウサギを用いて病因遺伝子の探索を行い、新しい血中中性脂肪の調節機構を解明すること、さらに、高中性脂肪血症治療開発を目的とする。

HDL 代謝においては、細胞外への物質の搬出に関わる ATP 結合膜トランスポーターに焦点をあてる。細胞とアポリポ蛋白質による HDL の新生反応には ABCA1 が必須であり、しかもその異常が HDL 欠損症をもたらすことが分かって、HDL 研究の焦点となっている。低 HDL 血症発症要因としての ABCA1 発現の制御と、ABCA1 以外の ABC 蛋白の HDL 新生機能を検索し血中 HDL 濃度制御と動脈硬化症発症に於ける病態生理的意義を研究する。

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の脂質代謝改善面からの予防、治療法の開発に貢献することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. ARH ノックアウトマウスの作製

レトロウイルスベクターを用い、ジーントラップインサクション法によりマウス ES 細胞(129SvEv)の第 4 染色体上に存在する ARH 遺伝子の発現をノックアウトした。LDL 受容体ノックアウトマウス(LDLR<sup>-/-</sup>)は自治医科大学の石橋俊先生より供与された。

## 2. in vivo における LDL 代謝

LDL ターンオーバースタディは、 $^{125}\text{I}$ -LDL を頸静脈より静注後、経時的に採血し、イソプロパノール沈澱画分をカウントした。in vivo の肝臓への LDL の取り込み測定は、形態学的には DiI-LDL 静注後の肝臓切片を蛍光顕微鏡で観察した。マクロファージを同定するため、FITC 標識 anti-panmacrophage antibody を用いた。定量的には  $^3\text{H}$ -cholesteryl oleoyl ether(CE)-LDL 静注後の肝臓より脂質分画を抽出し、カウントした。

## 3. in vitro での LDL 受容体機能測定

それぞれのマウスの初代培養肝細胞を採取し、10% LPDS を含む Waymouth 中で 2 日間培養し、 $^{125}\text{I}$ -LDL の取り込み、分解を測定した。また、DiI-LDL の初代培養肝細胞への取り込みを共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 高中性脂肪血症ウサギのプロテオーム解析

モデルウサギの肝臓の生検サンプルを二次元電気泳動で解析、質量が異なったスポットをピックアップし、酵素処理後、MALDI-TOF-MS を用いて解析、疾患モデルの TGL と TGH で欠損した蛋白質や発現量が著しく異なる蛋白質の同定を行う。

## 5. 高中性脂肪血症モデルウサギの作製

5~8 ヶ月齢の食後高中性脂肪血症 (PHT) 12 匹(雄 5, 雌 7), JW3 匹(雄 3) 及び F1 世代 7 匹(雄 1, 雌 6) の 3 群 (計 22 匹) を実験に使用した。3 群の絶食時と食後 24 時間(食後)の CHO 値と TG 値を酵素法(Vision System; ダイナボット社)により測定し、さらに食後のリ

ポ蛋白コレステロール及びトリグリセリド分画をアガロースゲル電気泳動法(コレトリコンボ; ヘレナ研究所)により比較検討した。

## 6. ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構の解析

ABCA1 の遺伝子発現制御について、解明が進んでいる LXR/RXR 以外の因子を解析する。遺伝子発現誘導が確認されている cAMP のプロモーターの感受性領域を同定し、その誘導機序を解明する。カルモジュリン阻害剤とカルシウムチャネル阻害剤による遺伝子発現誘導の機序を解明し、カルシウムシグナルとの関連を明らかにする。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮した。飼育は動物管理施設にて一括管理されている。

## C, D. 研究結果、考察

### 1. ARH ノックアウトマウスの作製、血清脂質およびリポ蛋白の解析

$ARH^{-/-}$ 、 $ARH^{+/-}$  は、いずれも外観上  $ARH^{+/+}$  と変化はなく、発育、生殖能ともに正常であった。それぞれの遺伝子型の ARH mRNA の発現を調べると、 $ARH^{+/+}$  では ARH mRNA の発現を認めしたが、 $ARH^{+/-}$  で約半分、 $ARH^{-/-}$  では発現を認めなかった。 $ARH^{-/-}$  では、総コレステロール値は  $ARH^{+/+}$  に比し、1.7

倍高値であり、特に LDL 分画では 6 倍上昇していた。ARH<sup>+/-</sup>は、ARH<sup>+/+</sup>と同様の値であった。

## 2. in vivo における LDL 代謝

<sup>125</sup>I-LDL を用いた LDL クリアランスは ARH<sup>+/-</sup>で ARH<sup>+/+</sup>と同様であり、ARH<sup>-/-</sup>で LDLR<sup>-/-</sup>と同様に遅延していた。特に、<sup>125</sup>I-LDL 投与初期の代謝の遅延が著明であった。DiI-LDL を頸静脈から投与し、肝臓組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、ARH<sup>+/+</sup>の肝臓では、肝細胞の細胞質に蛍光活性を認めしたが、ARH<sup>-/-</sup>および LDLR<sup>-/-</sup>では認めなかった。ARH<sup>+/+</sup>、ARH<sup>-/-</sup>および LDLR<sup>-/-</sup>のいずれの組織にも認められる、DiI-LDL を多量に取り込んでいる細胞は、マクロファージであることが、anti-mouse panmacrophage 抗体により染色されたことから、証明された。 [<sup>3</sup>H] CE-LDL を静注したところ、ARH<sup>-/-</sup>は ARH<sup>+/+</sup>の約 40% であり、LDLR<sup>-/-</sup>の 1.8 倍であった。これらのことから、ARH<sup>-/-</sup>は LDLR<sup>-/-</sup>と同様の、in vivo における肝臓での LDL 代謝遅延により、高 LDL 血症をきたしていると考えられた。

## 3. 初代培養肝細胞での <sup>125</sup>I-LDL の取り込み

ARH<sup>-/-</sup>の初代培養肝細胞を採取し、<sup>125</sup>I-LDL 取り込み、分解能を調べたところ、<sup>125</sup>I-LDL の取り込み、分解能ともに、ARH<sup>-/-</sup>と ARH<sup>+/+</sup>では同等であった。一方、LDLR<sup>-/-</sup>では極端に低下を認めた。DiI-LDL は、ARH<sup>-/-</sup>では ARH<sup>+/+</sup>と同等の量の細胞内取り込みを認めた。

以上の結果より、より LDL 受容体

が細胞内に取り込まれる際、ARH 依存性であるかどうかを決定するのは、細胞の種類ではなく、細胞を取りまく環境ではないかということが解った。

## 4. 高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析

それぞれのウサギから肝臓組織を採取し、二次元電気泳動を行ったところ、それぞれ約 220 個のスポットを認めた。このスポットを Imagemaster Lab Scan を用いて解析した。濃さに大きな違いのあるスポットをピックアップし、このスポットを含む数個のスポットの部分のゲルを切り出した。その後、脱色し、トリプシンによるゲル内消化を行い、脱塩の操作の後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。MALDI-TOF-MS を用いてトリプシンによる切断されたペプチドフラグメントの解析を行った。さらに、MS-MS を用いて同じサンプルを解析したところ、TGH にほとんど発現を認めず、TGL に多量の発現を認めるスポットは Carboxylesterase であり、TGL にほとんど発現を認めず、TGH に多量の発現を認めたスポットは Acyl CoA dehydrogenase であると同定された。

## 5. 高中性脂肪血症モデルウサギの作製

CHO 値は絶食(PHT; 41.8 mg/dl, F1; 44.7 mg/dl, JW; 28.5 mg/dl)時は PHT と F1 が同様の値を示したのに対し、JW では約 1/2 の値であった。食後では PHT > F1 > JW の関係が認められた。TG 値は絶食で PHT > F1 > JW の関係にあり、食後では F1 と JW は同様の値を示したが、PHT はそれらの 5.5 倍に増加した。

## 6. ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構の研究

コレステロール負荷のないマウス副腔マクロファージでは ACAT 阻害による遊離コレステロールの上昇は起こらず、ABCA1 の転写にも蛋白質レベルにも変化は起きない。これに対し、コレステロール負荷状態では ACAT 阻害により遊離コレステロールが上昇し、ABCA1 の転写と蛋白質レベルの上昇がみられ、apoA-I による HDL 新生の増加も見られた。Verapamil や他のカルシウムチャネル阻害剤で apoA-I による HDL 新生が増大し、ABCA1 の転写と蛋白質の増加が認められたが、同じく LXR/RXR で活性化される ABCG1 では認められなかった。また ABCA1 のプロモータと LXR responsive element にたいするレポーターアッセイの結果から、Verapamil は LXR とは独立に ABCA1 の転写促進を行うことが示された。Apo A-I は細胞脂質から HDL を新生するとき sphingomyelin も引き出し、その補充反応は phosphatidylcholine の phospholipase C による分解で生ずる phosphorylcholine を利用し、この反応は同時に diglyceride を生成する。この diglyceride は PKC $\alpha$  を活性化し、さらに ABCA1 を磷酸化する。

## E. 結論

高 LDL 血症にに関連する ARH ノックアウトマウスの解析、高中性脂肪血症を呈するモデルウサギの作製、そのプロテオーム解析、低 HDL 血症に関連する ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構の研究を行い、リポ蛋白質代謝

異常の機序の理解を深め、新しい治療の開発にさしかかったところである。

## F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. Benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation*. 2004;109:526-531.
2. Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S. Homozygous familial hypercholesterolaemia: development of xanthogranuloma in a boy at puberty under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy. *Br J Dermatol*. 2003;149:1302-1303.
3. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy



for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:889-895.

4. Makino H, Harada-Shiba M. Long-term effect of low-density lipoprotein apheresis in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Therap Apher Dial*. 2003;7:397-401.

5. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A. Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2541-2547.

6. Shishido T, Tasaki K, Takeishi Y, Takasaki S, Miyamoto T, Itoh M, Takahashi H, Kubota I, Ito T, Katano Y, Wakabayashi I, Tomoike H. Chronic hypertriglyceridemia in young watanabe heritable hyperlipidemic rabbits impairs endothelial and medial smooth muscle function. *Life Sci*. 2004;74:1487-1501.

7. Asano Y, Takashima S, Asakura M, Shintani Y, Liao Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogai A, Fukushima T, Oikawa Y, Okazaki Y, Kaneda Y, Sato M, Miyazaki JI, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M, Hori M. Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet*. 2004.

8. Yamaoka-Tojo M, Yamaguchi S, Nitobe J, Abe S, Inoue S, Nozaki N, Okuyama M, Sata M, Kubota I, Nakamura H, Tomoike H. Dual response to Fas ligation in human endothelial cells: apoptosis and induction of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *Coron Artery Dis*. 2003;14:89-94.

9. Yamagishi M, Ito K, Tsutsui H, Miyazaki S, Goto Y, Nagaya N, Sumiyoshi T, Fukami K, Haze K, Kitakaze M, Nonogi H, Tomoike H. Lesion severity and hypercholesterolemia determine long-term prognosis of vasospastic angina treated with calcium channel antagonists. *Circ J*. 2003;67:1029-1035.

10. Tsukada S, Iwai M, Nishiue J, Itoh M, Tomoike H, Horiuchi M, Nakamura Y, Tanaka T. Inhibition of experimental intimal thickening in mice lacking a novel G-protein-coupled receptor. *Circulation*. 2003;107:313-319.

11. Tamada Y, Kubota I, Tomoike H. [Clinical and experimental evidences regarding the relations of coronary vasospasm to progression of organic coronary stenosis and acute myocardial infarction]. *Nippon Rinsho*. 2003;61 Suppl 5:147-152.

12. Sato J, Sata M, Nakamura H, Inoue S, Wada T, Takabatake N, Otake K, Tomoike H, Kubota I.

Role of thymidine phosphorylase on invasiveness and metastasis in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2003;106:863-870.

13. Ono K, Iwanaga Y, Mannami T, Kokubo Y, Tomoike H, Komamura K, Shioji K, Yasui N, Tago N, Iwai N. Epidemiological evidence of an association between SLC6A2 gene polymorphism and hypertension. *Hypertens Res*. 2003;26:685-689.

14. Okamoto A, Sakata T, Mannami T, Baba S, Katayama Y, Matsuo H, Yasaka M, Minematsu K, Tomoike H, Miyata T. Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in Japanese: the Suita Study. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2397-2403.

15. Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M, Nozaki N, Sata M, Miyamoto T, Takeishi Y, Kubota I, Tomoike H. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2003;57:119-128.

16. Miyamoto T, Takeishi Y, Shishido T, Takahashi H, Itoh M, Kubota I, Tomoike H. Role of nitric oxide in the progression of cardiovascular remodeling induced by carotid arterio-venous shunt in

rabbits. *Jpn Heart J*. 2003;44:127-137.

17. Minamihaba O, Yamaki M, Tomoike H, Kubota I. Severity in myocardial dysfunction contributed to long-term fluctuation of heart rate, rather than short-term fluctuations. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2003;8:132-138.

18. Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res*. 2003;93:759-766.

19. Iwai N, Mannami T, Tomoike H, Ono K, Iwanaga Y. An acyl-CoA synthetase gene family in chromosome 16p12 may contribute to multiple risk factors. *Hypertension*. 2003;41:1041-1046.

20. Inoue S, Nakamura H, Otake K, Saito H, Terashita K, Sato J, Takeda H, Tomoike H. Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:764-770.

21. Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, Mannami T, Asai T, Baba S, Ogata J, Tomoike H,

- Ogihara T. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke*. 2003;34:1628-1633.
22. 伊藤恒賢, 大和田一雄, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎 (PHT)の特徴 - ヒト虚血性心疾患の新しいモデル動物 -, *アニテックス Laboratory Animal Technology and Science*, Vol.15, No.4, 178-184, 2003
23. 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* (2003) 329: 69-76.
24. 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) 278: 815-8819.
25. Yoshio Yamauchi, Michi Hayashi, Sumiko Abe-Dohmae, and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein A-I activates protein kinase Ca signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 47890-47897.
26. Yuiko Ikeda, Sumiko Dohmae, Youichi Munehira, Ryo Aoki, Shinobu Kawamoto, Akiko Furuya, Kenya Shitara, Teruo Amachi, Noriyuki Kioka, Michinori Matsuo, Shinji Yokoyama, Kazumitsu Ueda. Post-translational regulation of human ABCA7 and its function for the apoA-I mediated lipid release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 311: 313-318.
27. Sumiko Abe-Dohmae, Yuika Ikeda, Michinori Matsuo, Michi Hayashi, Kei-ichiro Okuhira, Kazumitsu Ueda, and Shinji Yokoyama. Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate HDL. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 604-611.
28. Shogo Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Norimasa Tamehiro, Kazuhide Inoue, Reijiro Arakawa, Sumiko Abe-Dohmae, Arowu R. Tanaka, Kazumitsu Ueda,

and Shinji Yokoyama. Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via an LXR-independent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (2004) 24: 519-525

29. Kanami Sugimoto, Maki Tsujita, Cheng-Ai Wu, Kazuo Suzuki, Shinji Yokoyama. Inhibitor of acylCoA: cholesterol acyltransferase increases expression of ATP-binding cassette transporter A1 and thereby enhances the apoA-I-mediated release of cholesterol from macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* (2004) 1636: 69-76

30. Reijiro Arakawa, Michi Hayashi, Alan T. Remaley, Bryan H. Brewer, Yoshio Yamauchi and Shinji Yokoyama. Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 6217-6220.

31. Kei-ichiro Okuhira, Maki Tsujita, Yoshio Yamauchi, Sumiko Abe-Dohmae, Koichi Kato, Tetsuro Handa, Shinji Yokoyama. Potential involvement of dissociated apolipoprotein A-I in the ABCA1-dependent cellular lipid release by high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* (2004) in press.

32. Toyohiro Tada, Jin-ichi Ito, Michiyo Asai, and Shinji Yokoyama.

Fibroblast growth factor 1 is produced prior to apolipoprotein E in the astrocytes after cryo-injury of mouse brain. *Neurochemistry International* (2004) in press.

## 2. 学会発表 国際学会

1. Harada-Shiba M, Makino H, Takamisawa I, Hiuge A, Yoshimasa Y, Yamamoto A: Long term effect of LDL-apheresis on Homozygous FH. The 4th World Congress of International Symposium for Apheresis (Nashville), ワークショップ

2. Harada-Shiba M, Takagi A, Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Asada Y, Yokoyama S: Analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題

3. Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Asada Y, Harada-Shiba M: Regulatory mechanism of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein expression. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題

4. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A: Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題  
国内学会

1. 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、宮本恵宏、池田康行、浅田祐

士郎、横山信治：Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)ノックアウトマウスの解析、日本動脈硬化学会第36回総会（京都）、一般演題

2. 安部映里、大平望都、宮本恵宏、浅田祐士郎、斯波真理子：Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)蛋白質合成制御機構の検討、日本動脈硬化学会第36回総会（京都）、一般演題

3. 高見澤格、大平望都、安部映里、浅田祐士郎、斯波真理子：高脂血症に対する気管内投与による遺伝子治療の試み、日本動脈硬化学会第36回総会（京都）、一般演題

4. 伊藤恒賢，大和田一雄，遠藤順子，神村栄吉，友池仁暢，脂質代謝異常の新しいモデル動物としての食後高トリグリセリド血症家兎，フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」講演要旨，12-13，佐賀市，2003年3月8日

5. 伊藤恒賢，大和田一雄，遠藤順子，神村栄吉，友池仁暢，食後高脂血症家兎の脂質代謝能，実験動物科学週間2003合同大会第37回日本実験動物技術者協会総会講演要旨集，250-250，さいたま市，2003年5月31日

6 登録

2. Hitonobu Tomoike, Kazuo Owada, Tsunekata Ito, Hereditary postprandial hypertriglyceridemic rabbit model, United States Patent, Patent No.: US6515196B2, Date of Patent: Feb. 4,2003

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 友池仁暢，大和田一雄，伊藤恒賢，遺伝性食後高トリグリセリド血症家兎，日本国特許，特許第 3345643 号，2002.9.6 登録

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

高 LDL 血症に関わる新規遺伝子の探索と機能解析：  
Autosomal Recessive Hypercholesterolemia Knockout Mouse の解析

分担研究者 斯波真理子（国立循環器病センター研究所・室長）

研究要旨

1992年に我々は、著明な高コレステロール血症、巨大な黄色腫を呈するが、皮膚線維芽細胞において LDL 受容体活性が正常である姉弟例を報告した。これが Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)の最初の報告例であった。2001年に Garcia らにより、ARH 遺伝子の異常が同定され、我々は、この姉弟例において ARH 遺伝子第 6 エキソンに異常があること、皮膚線維芽細胞において ARH 蛋白質が合成されていないことを報告した。ARH 蛋白質は、PTB ドメインを有することから、LDL 受容体の NPXY 部位に結合すると考えられていたが、その機能は明らかではなかった。今回、我々は、ARH 蛋白の機能を調べるため、ノックアウトマウスを作製し、解析した。ARH ノックアウトマウスのホモ接合体( $ARH^{-/-}$ )は高コレステロール血症を呈するが、ヘテロ接合体( $ARH^{+/-}$ )は Wild type( $ARH^{+/+}$ )と同様であり、高コレステロール血症の遺伝形式はヒトの ARH と一致していた。 $^{125}\text{I}$ -LDL ターンオーバースタディは、 $ARH^{-/-}$ において  $LDLR^{-/-}$ と同様の遅延パターンを示していた。DiI-LDL 静注後、 $ARH^{+/+}$ の肝細胞に蛍光を認めたが  $ARH^{-/-}$ 肝細胞は  $LDLR^{-/-}$ と同様に蛍光を認めなかった。 $^3\text{H}$ コレステリルエーテル標識 LDL の肝臓への取り込みは  $ARH^{-/-}$ および  $LDLR^{-/-}$ で低下していた。In vivo の状態を in vitro で解析するため、初代培養肝細胞を用いて実験したところ、 $^{125}\text{I}$ -LDL および DiI-LDL は  $ARH^{-/-}$ において  $ARH^{+/+}$ と同様に取り込みを認めた。以上より、 $ARH^{-/-}$ においては、肝臓での LDL 受容体機能は in vivo で障害されているが、in vitro では障害されていないことが示された。今まで LDL 受容体機能の ARH 依存性は、細胞の種類によると考えられていたが、今回のデータから、むしろ細胞の周囲の環境によることがわかった。

研究協力者

国立循環器病センター研究所

バイオサイエンス部

大平望都

安部映里

前田律子

神野桂子

薬理部

高木敦子

名古屋市立大学大学院医学系

研究科

代謝細胞生化学

横山信治

宮崎大学医学部

第一病理

丸塚浩助

浅田祐士郎

## A. 研究目的

高コレステロール血症は、虚血性心疾患の重要な危険因子の一つである。家族性高コレステロール血症(FH)の研究から、低比重リポ蛋白(LDL)受容体が発見され、そのコレステロール代謝における役割が明らかにされた。これら一連の研究がスタチンの臨床研究につながり、現在、世界中の虚血性心疾患の予防に役立っている。

我々は1991年に、家族性高コレステロール血症(FH)ホモ接合体と同様の症状(著明な高コレステロール血症、巨大な黄色腫、若年性動脈硬化症)を呈するが、皮膚線維芽細胞においてLDL受容体が完全に正常である姉弟例を報告した

(斯波(原田)真理子ら、動脈硬化 19:227-242, 1991, Harada-Shiba M, et al., Arterioscler Thromb 12:1071-1078, 1992)。この論文がAutosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)の、世界で初めての報告であった。2001年、Hobbs HらのグループがARH家系の連鎖解析により、第1染色体にあるこの病気の原因遺伝子(ARH)を同定した。我々は我々の家系についてARH遺伝子の第6エキソンに1塩基挿入の新しい異常があることを見出し、報告した(Harada-Shiba M, et al., J. Clin. Endocrinol. Met. 88:2541-2547, 2003)。患者皮膚線維芽細胞においても、ARH遺伝子およびARH蛋白質の発現は認められなかった。また、変異部位にSNPが存在することも報告した。

ARH蛋白質は、N末端にphosphotyrosine結合(PTB)ドメインを持ち、308個のアミノ酸からなる。PTBドメインは、細胞内情報伝達や輸送に関わるアダプター蛋白に認められるもので、受容体の細胞質部分のNPXY部位に結合し、受容体の細胞内取込みに関わっていると考えられている。しかしながら、ARH患者の皮膚線維芽細胞では、LDL受容体活性は、ほぼ正常であり、正常にLDLを取り込み、分解する。一方、リンパ球ではLDL取り込みが低下しているという報告もある。患者のLDLクリアランスが遅延していることから、in vivoにおいて、肝臓のLDL受容体取り込みが低下しており、ARH蛋白質は、細胞特異的にLDL受容体の取り込みに関

わっているのではないかと考えられている。

我々は、ARH 蛋白質の機能を調べ、未だ明らかではないリポ蛋白代謝への関わりを知り、高 LDL 血症の新しい治療へのアプローチを探るため、ARH ノックアウトマウスを作製し、解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. ARH ノックアウトマウスの作製

レトロウィルスベクターを用い、ジーントラップインサクション法によりマウス ES 細胞(129SvEv)の第4染色体上に存在する ARH 遺伝子の発現をノックアウトした。得られたヘテロ接合体( $ARH^{+/-}$ )を交配し、ホモ接合体( $ARH^{-/-}$ )、Wild type( $ARH^{+/+}$ )を得た。C57Bl/6 と戻し交配を行い、実験は F2 および F3 の動物を用いた。LDL 受容体ノックアウトマウス( $LDLR^{-/-}$ )は自治医科大学の石橋俊先生より供与された。

### 2. ARH mRNA の発現

マウスの肝臓より RNA を精製し、逆転写を行った。得られた ARH cDNA を PCR にて増幅した。

### 3. リポ蛋白質分析

リポ蛋白分析は HPLC を用いて分画し(Skylight Biotec Inc.)、酵素法でコレステロール値を測定した。

### 4. LDL の標識

LDL は超遠心分画法で分離し(1.01  $9 < d < 1.063$  g/ml)、0.15 M NaCl、0.3 mM EDTA 中で透析の後に使用した。 $^{125}\text{I}$ -LDL は LDL を iodine monochloride 法で標識し、ゲル濾過により精製した。

### 5. $^{125}\text{I}$ -LDL ターンオーバースタディ

$^{125}\text{I}$ -LDL を頸静脈より静注後、経時的に採血し、イソプロパノール沈澱画分をカウントした。

### 5. in vivo の肝臓への LDL の取り込み測定

形態学的には DiI-LDL 静注後の肝臓切片を蛍光顕微鏡で観察した。マクロファージを同定するため、FITC 標識 anti-panmacrophage antibody を用いた。定量的には [ $^3\text{H}$ ]-cholesteryl oleoyl ether(CE)- LDL 静注後の肝臓より脂質分画を抽出し、カウントした。

### 6. in vitro での LDL 受容体機能測定

それぞれのマウスの初代培養肝細胞を採取し、10% LPDS を含む Waymouth 中で 2 日間培養し、 $^{125}\text{I}$ -LDL の取り込み、分解を測定した。また、DiI-LDL の初代培養肝細胞への取り込みを共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮した。飼育は動物管理施設にて一括管理されている。

## C. 研究結果

### 1. ARH ノックアウトマウスの作製

$ARH^{-/-}$ 、 $ARH^{+/-}$  は、いずれも外観上  $ARH^{+/+}$  と変化はなく、発育、生殖能ともに正常であった。図 1 に  $ARH^{-/-}$  の写真を示す。それぞれの遺伝子型の



ARH mRNA の発現を調べると、

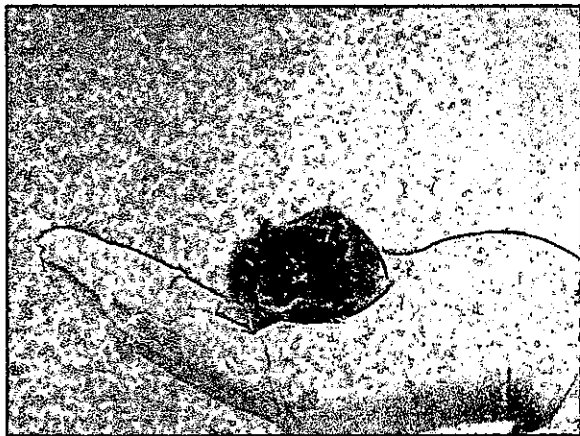


図 1. ARH ノックアウトマウス (ARH<sup>-/-</sup>) の写真

ARH<sup>+/+</sup>では ARH mRNA の発現を認めしたが、ARH<sup>+/-</sup>で約半分、ARH<sup>-/-</sup>では発現を認めなかった (図 2)。

## 2. 血清脂質およびリポ蛋白の解析

血清総コレステロール値、LDL コレステロール値、HDL コレステロール値を Table 1 に示す。ARH<sup>-/-</sup>では、総コレステロール値は ARH<sup>+/+</sup>に比し、1.7 倍高値であり、特に LDL 分画では 6 倍上昇していた。ARH<sup>+/-</sup>は、ARH<sup>+/+</sup>と同様の値であった。

## 3. LDL クリアランス

<sup>125</sup>I-LDL のクリアランスを図 3 に示す。LDL クリアランスは ARH<sup>+/-</sup>で ARH<sup>+/+</sup>と同様であり ARH<sup>-/-</sup>で LDLR<sup>-/-</sup>

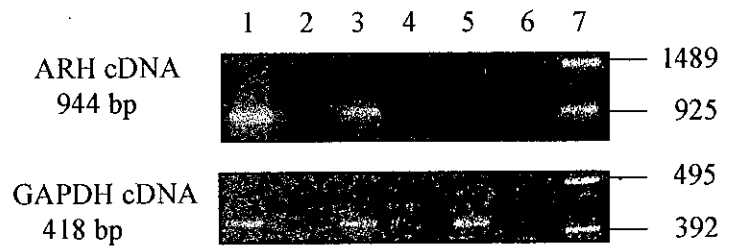


図 2. ARH ノックアウトマウスの ARH mRNA 発現、1, 2) ARH<sup>+/+</sup>, 3, 4) ARH<sup>+/-</sup>, 5, 6) ARH<sup>-/-</sup>, 1, 3, 5) 逆転写酵素(+), 2, 4, 6) 逆転写酵素(-), 7) マーカー

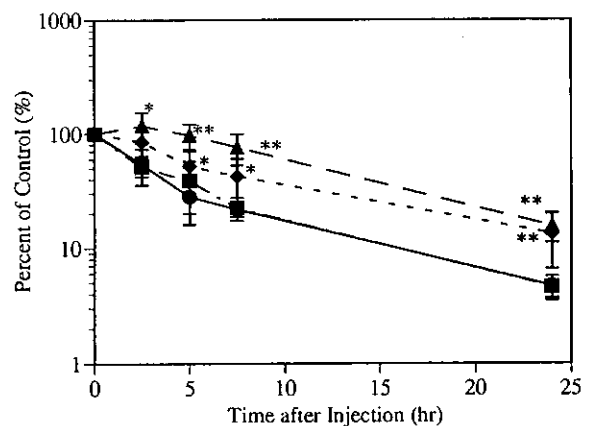


図 3. ARH ノックアウトマウスの LDL クリアランス、●; ARH<sup>+/+</sup>, ■; ARH<sup>+/-</sup>, ▲; ARH<sup>-/-</sup>, ◆; LDLR<sup>-/-</sup>

	Total Cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	HDL-Cholesterol (mg/dl)	LDL-Cholesterol (mg/dl)
Wild				
Male (5)	103.8+11.2	91.2+46.2	96.4+9.2	6.6+3.8
Female (8)	99.2+22.8	69.0+17.4	84.9+19.4	11.5+3.6
Heterozygote				
Male (8)	112.9+14.1	88.1+29.2	107.4+11.7	5.1+3.4
Female (10)	108.9+21.8	67.0+15.6	92.8+16.1	13.6+9.4
Homozygote				
Male (5)	175.2+26.7	105.8+18.4	119.7+40.2	39.1+15.9
Female (8)	179.4+69.6	96.2+44.1	114.5+30.4	56.5+44.6

Table 1 ARH ノックアウトマウスの脂質およびリポ蛋白組成

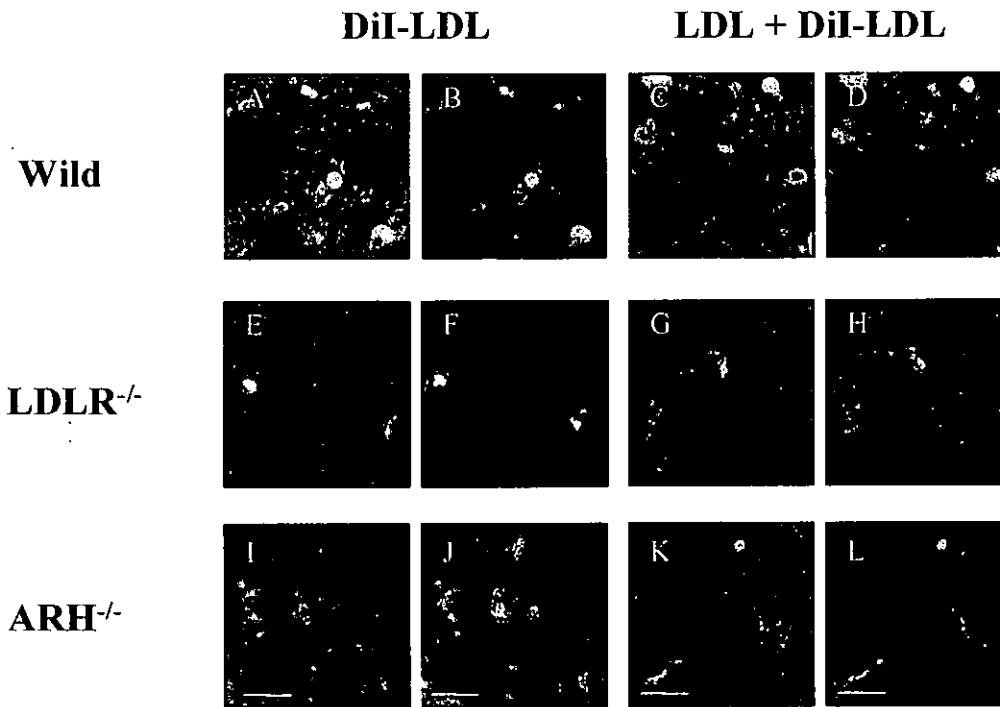


図4. DiI-LDL静注後の肝臓組織写真。A, E, I) DiI-LDL静注後の肝臓、C, G, K) 2.5 mg LDL静注後、50 µg DiI-LDL静注の肝臓、B, F, J) anti-mouse pan-macrophage antibodyによる染色、D, H, L) anti-mouse pan-macrophage antibodyによる染色、スケールバーは 20 µm。

と同様に遅延していた。特に <sup>125</sup>I-LDL 投与初期の代謝の遅延が著明であった。

#### 4. DiI-LDL の肝臓組織への取り込み

LDL クリアランスの低下が肝臓での LDL 取り込みの低下によるものかどうかを形態学的に調べるため、DiI-LDL を頸静脈から投与し、肝臓組織を蛍光顕微鏡で観察した (図 4)。ARH<sup>+/+</sup> の肝臓では、肝細胞の細胞質に蛍光活性を認めたが、ARH<sup>-/-</sup> および LDLR<sup>-/-</sup> では認めなかった。ARH<sup>+/+</sup>、ARH<sup>-/-</sup> および LDLR<sup>-/-</sup> のいずれの組織にも認められる、DiI-LDL を多量に取り込んでいる細胞は、マクロファージであることが、anti-mousepan-macrophage 抗体により染色されたことから、証明された。

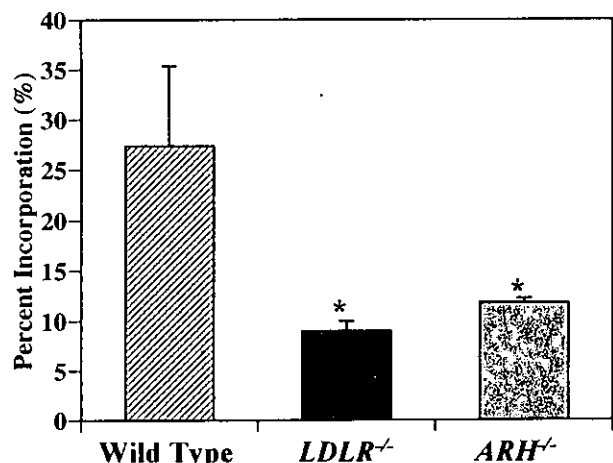


図 5. [<sup>3</sup>H]CE-LDL の肝臓への取り込み

## 5. 肝臓での LDL の取り込みの定量

肝臓での LDL 取り込みを定量するため $^3\text{H}$ CE-LDL を静注した。 $ARH^{-/-}$  は  $ARH^{+/+}$  の約 40% であり、 $LDLR^{-/-}$  の 1.8 倍であった (図 5)。これらのことから、 $ARH^{-/-}$  は  $LDLR^{-/-}$  と同様の、in vivo における肝臓での LDL 代謝遅延により、高 LDL 血症をきたしていると考えられた。

## 6. 初代培養肝細胞での $^{125}\text{I}$ -LDL の取り込み

これらの結果をさらに in vitro で解析するため、 $ARH^{-/-}$  の初代培養肝細胞を採取し、 $^{125}\text{I}$ -LDL の取り込み、分解能を調べた。 $^{125}\text{I}$ -LDL の取り込み、分解能ともに、 $ARH^{-/-}$  と  $ARH^{+/+}$  では同等であった。一方、 $LDLR^{-/-}$  では極端に低下を認めた。DiI-LDL は、 $ARH^{-/-}$  では  $ARH^{+/+}$  と同等の量の細胞内取り込みを認めた。

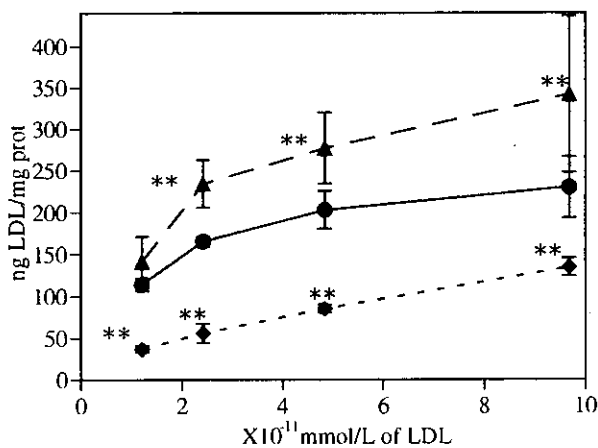


図 6.  $^{125}\text{I}$ -LDL のそれぞれの遺伝型マウス初代培養肝細胞への取り込み、◆;  $ARH^{+/+}$ , ▲;  $ARH^{-/-}$ , ●;  $LDLR^{-/-}$

## D. 考案

ARH ノックアウトマウスの作製により、ARH 非存在下に in vivo では LDL のクリアランスの低下を認め、LDL-コレステロールの上昇をきたすこと、またこのクリアランスの低下は、肝臓での LDL の取り込み低下によることがわかった。in vivo の肝臓では、ARH 非存在下に LDL 取り込みは低下していたが、一方、初代培養肝細胞では ARH 非存在下に LDL を取り込むことが可能であった。ARH は PTB ドメインを持ち、LDL 受容体の NPXY 部位に結合すると考えられる。また、ARH はクラスリン、AP2 との結合部位も持っているため、LDL 受容体が endocytic machinery と結合するアダプター蛋白であると考えられている。今回の我々の結果より、LDL 受容体が細胞内に取り込まれる際、ARH 依存性であるかどうかを決定するのは、細胞の種類ではなく、細胞を取りまく環境ではないかということが解った。

## E. 結論

LDL 受容体が細胞内に取り込まれる機構において、ARH 蛋白質は重要な役割を果たすことがわかった。LDL 受容体の ARH 蛋白質依存性は、細胞の種類によるものではなく、細胞の周囲の環境によるものであることが示唆された。

## F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. Benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation*. 2004;109:526-531.
2. Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S. Homozygous familial hypercholesterolaemia: development of xanthogranuloma in a boy at puberty under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy. *Br J Dermatol*. 2003;149:1302-1303.
3. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:889-895.
4. Makino H, Harada-Shiba M. Long-term effect of low-density lipoprotein apheresis in patients

with homozygous familial hypercholesterolemia. *Therap Apher Dial*. 2003;7:397-401.

5. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A. Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2541-2547.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

1. Harada-Shiba M, Makino H, Takamisawa I, Hiuge A, Yoshimasa Y, Yamamoto A: Long term effect of LDL-apheresis on Homozygous FH. The 4th World Congress of International Symposium for Apheresis (Nashville), ワークショップ
2. Harada-Shiba M, Takagi A, Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Asada Y, Yokoyama S: Analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題
3. Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Asada Y, Harada-Shiba M: Regulatory mechanism of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein expression. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題
4. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A: Clinical Features and Genetic Analysis of