

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

高中性脂肪血症に関わる新規遺伝子の探索と機能解析  
高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析

分担研究者 友池仁暢（国立循環器病センター病院長）

研究要旨

高中性脂肪血症は、動脈硬化性疾患のリスクファクターである脂質代謝異常として、重要な位置をしめ、さらに最近ではメタボリックシンドロームの所見の 1 つとして注目されている。しかしながら、動脈硬化の発生や進展への関わりやその遺伝的背景は不明な点が多い。我々は、高中性脂肪血症の病因と病態生理を解明するため、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た。

二次元電気泳動の結果、約 220 のスポットを得た。スポットの大きさで表わされる発現量に極端な差異のある蛋白質を、さらに質量分析計を用いて解析を行った。蛋白質の同定のために、MS-MS にてアミノ酸シーケンスの解析を行った。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 Carboxyl-esterase 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。さらに多くのスポットが認められているので、これらのプロテオーム解析により、病因と病態の解明に大きな手がかりが得られると考えられる。

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  
ス波真理子  
前田律子

国立循環器病センター研究所  
薬理部  
南野直人  
桑原大幹  
山形大学医学部  
附属動物実験施設  
伊藤恒賢

## A. 研究目的

高中性脂肪血症が動脈硬化の発生、進展にどのように関わっているか、古くから関心が集まっているが、現在まで明らかとなっていない。高中性脂肪血症の原因遺伝子についても、リポ蛋白質リパーゼ(LPL)欠損症、アポリポ蛋白質 C-II 欠損症という、非常に稀な遺伝病以外は明らかではない。我々は、高中性脂肪血症の遺伝的背景、病態、および動脈硬化発生、進展への関わりなどを探るため、著明な高中性脂肪血症を呈する新しい動物モデルを作製した。WHHL ウサギでは、空腹時および食後の血清中性脂肪値高値であることは報告されている(空腹時 Control;  $108.0 \pm 43.5$ , WHHL;  $308.7 \pm 128.8$  mg/dl、食後 Control;  $213.3 \pm 27.4$ , WHHL;  $435.0 \pm 94.7$  mg/dl) (Arteriosclerosis 2;467-474)。これは LDL 受容体がレムナントリポ蛋白の処理にも関わっていることを示す。我々は、高中性脂肪血症を呈する WHHL ウサギを選択的に交配することにより、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。

TGL は、通常の日本文色ウサギに比し、血清中性脂肪値は高値であった。一方、TGH は空腹時においても著明な高中性脂肪血症を呈していた。マウスやラットなどは個体のサイズが小さいため、飼育が容易であること、扱いが簡単であること、遺伝情報が豊富であることなどの理由で、実験によく用いられる。しかしながら、これらの動物は cholestery-

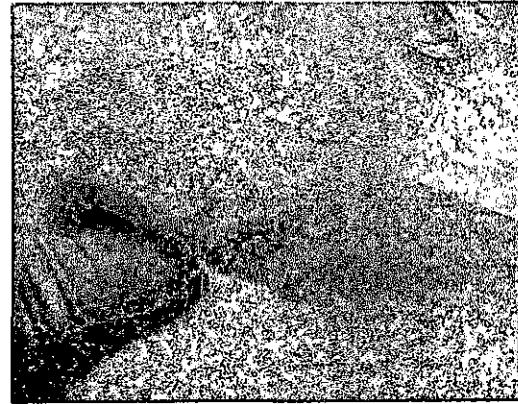


図1 TGH の皮膚症状 (黄色腫)

lester transfer protein (CETP)を欠損しており、血中 LDL 値が低く、コレステロールの担送は、おもに HDL が担っている。マウスやラットで動脈硬化が比較的起こりにくいのもこのためである。一方、ウサギは CETP を有し、コレステロールの輸送を LDL が担うなど、リポ蛋白代謝が基本的にヒトと同じであり、ヒトの疾患モデルとして適当であると言える。TGL と TGH は中性脂肪代謝を除く他の遺伝的バックグラウンドが均一であることから、高中性脂肪血症の影響や原因遺伝子群の探索に適している。また、WHHL ウサギのホモ接合体をバックグラウンドとしているので、著明な高 LDL コレステロール血症を呈し、動脈硬化発症、進展のモデル動物としても適当であると考えられる。

本研究では、高中性脂肪血症の病因、病態を知ることを目的として、TGL および TGH の肝臓組織に発現している蛋白質を、プロテオームの技術を用いて網羅的に解析した。

表1 JW,TGL,TGHの特性

	JW	TGL	TGH
体重 (kg)	2.53±0.58 (n=19)	2.29±0.07 (n=11)	2.08±0.07 (n=12)
コレステロール (mg/dl)	59±5 (n=10)	1081±59 (n=11)	1465±167 (n=12)
中性脂肪 (mg/dl)	63±8 (n=10)	191±12 (n=11)	2764±413 (n=12)
空腹時血糖 (mg/dl)	160±16 (n=10)	149±4 (n=11)	149±8 (n=12)

## B. 研究方法

### 1. TGL および TGH の特性解析

TGL、TGH、日本白色ウサギ(JW)の体重、血清総コレステロール値、中性脂肪値、空腹時血糖値を表1に示す。日本白色ウサギに比し、TGL および TGH ともに低体重であった。TGL、TGH は、ともに WHHL ホモ接合体をバックグラウンドにしているため、コレステロール値は高値であった。TGL および TGH の皮膚には、図1のような黄色腫の多発を認めた。このような黄色腫は、JW では認めなかった。

### 2. 肝臓サンプルの採取と調製

ペントバルビタールを静注して、

TGL および TGH を麻酔し、肝臓組織を切り出し、細切後、液体窒素中で凍結、-70°C に保存した。サンプル調製時には、ホモゲナイズ用バッファー(40 mM Tris, 4% CHAPS, 8 M urea)に浸し、ポリトロンを用いてホモゲナイズした。

### 3. 二次元電気泳動

一次元電気泳動は、Immobiline® (Amersham) pH 3-10 を使い、12 時間の膨潤の後、50 V 1時間、100 V 1時間、800 V 8時間、等電点電気泳動を行った。ストリップを DTT 10 mg/ml 含有平衡化バッファー中に浸して平衡化し、ヨードアセトアミド 25 mg/

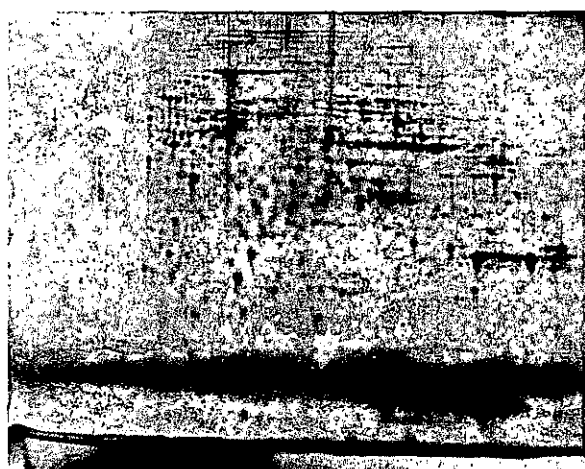


図2 TGL の肝臓サンプルの二次元電気泳動

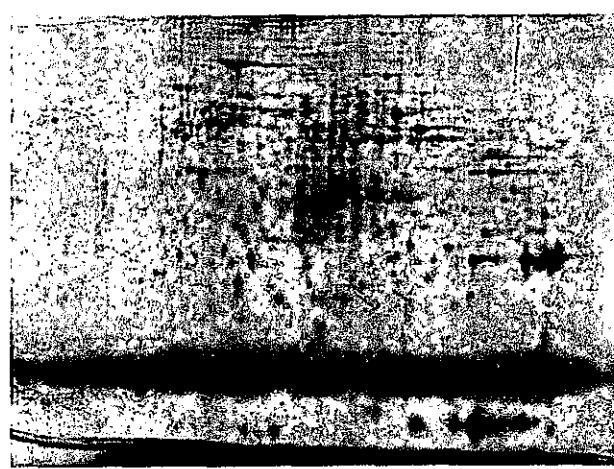


図3 TGH の肝臓サンプルの二次元電気泳動



図4 TGLの二次元電気泳動  
(拡大)

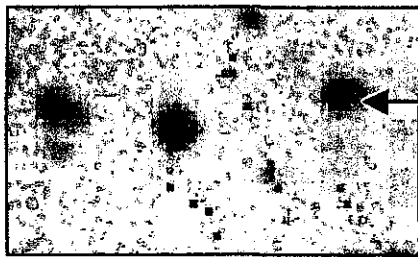


図5 TGHの二次元電気泳動  
(拡大)

ml 含有平衡化バッファーに浸して平衡化した。平衡化したストリップを DAL T 12.5ゲルにセットし、6Wで18時間、二次元目の電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを10%酢酸、40%エタノール中で固定、クマシーブリリアントブルー染色を行い、スキャナーを用いて画像ファイルとした。

#### 4. 質量分析計用サンプルの調製

ゲルから目的のスポットを切り出し、脱色液(50%アセトニトリル、25 mM重炭酸アンモニウム)中で脱色し、アセトニトリルで脱水後、プロテアーゼ溶液(100 µg/mlトリプシン、5%アセトニトリル、0.1% octyl-β-glucoside、100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を加え、37°Cで18時間反応させた。Zip Tipを用いて

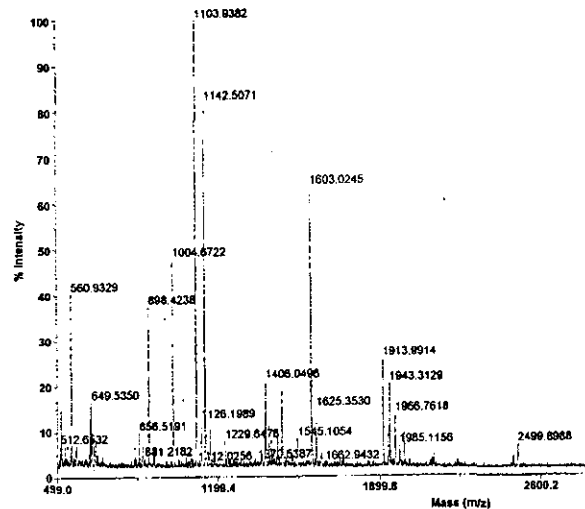


図6 MALDI-TOF-MSのマススペクトル

脱塩後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。

#### 5. 質量分析計による分析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)による分析およびMS-MSによる分析を行った。

##### (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。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理されている。

#### C. 研究結果、考察

それぞれのウサギから肝臓組織を

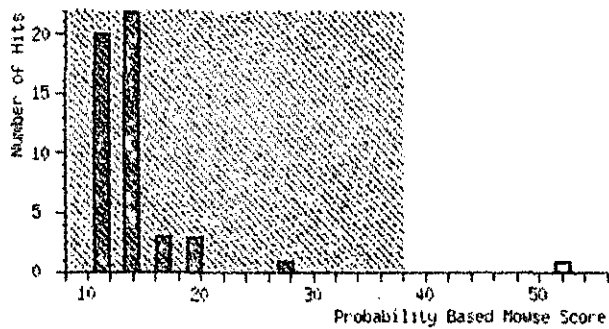


図7 Probability Based Mowse Score

採取し、二次元電気泳動を行ったところ、図2および図3のようにそれぞれ約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た。二次元電気泳動パターンのそれぞれの拡大写真を図4と5に示す。矢印は、TGLではスポットとして認識されないが、TGHでは濃いスポットが認められた。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。図5の矢印のスポットの解析により、図6のようなマススペクトルを得た。データベース検索をしたところ、このペプチドフラグメントのパターンは、既知の蛋白質のものではないことがわかった。ウサギの蛋白質のデータベースが、ヒトやマウスのものと異なり、充実していないためであると考えられた。また、MALDI-TOF-MS法で得られるデータは、トリ

プシン消化により切断されたペプチドフラグメントの長さであるので、切断されるアルギニンおよびリシンの位置が種差によって、異なるため、ヒトのデータに合致しない可能性も考えられた。次に、MS-MSを用いて同じサンプルを解析した。MS-MSは、シーケンスの情報も得られることから、MALDI-TOF-MSより多くの情報が得られると考えられた。MS-MSにより、GITSFLVDR、ASSTCPLTFENVKの2つのペプチドが、ヒトのAcyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain precursorとマッチし、Probability Based Mowse Scoreが52(38以上で同定と判断出来る)であった(図7)。またTGLに多量に発現し、TGHにほとんど発現を認めない蛋白質は、MS-MSにより、7つのペプチドがウサギCarboxylesteraseと一致し、Probability Based Mowse Scoreは102であり、発現量に差異のある蛋白質2つが同定された。

現在、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど、遺伝子を操作して疾患モデル動物を作製できる。しかしながら、マウスはcholesterol ester-transfer protein (CETP)を欠損しているため、ヒトの動脈硬化進展モデルにはなりにくい。ウサギはCETPを有し、そのリポ蛋白代謝がヒトに似通っているため、動脈硬化のモデルとして適当と考えられる。我々は、WHHLウサギから、高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)を得た。TGHは、著明な高コレステロール血症に加え、高中性脂肪血症も呈している。我々は、最近、TGHがTGLおよび日本白色ウサギに比し、アセチルコ

リンに対する内皮依存性弛緩反応が低下していることを報告した (Life Sciences, 74, 1487-1501, 2004)。これは、高コレステロール血症をベースにした高中性脂肪血症の、血管内皮機能への作用が明らかになったもので、このモデル動物の有用性を示すものであると考えられる。

本研究で、TGL に多量に発現し、TGH に発現を認めない蛋白質が Carboxylesterase であると同定された。Carboxylesterase は、種々の組織に存在するセリン依存性エステラーゼであり、Acyl coenzyme A cholesterol acyl transferase (ACAT) 活性を持つことが知られている。ACAT は、細胞内で oleoyl CoA とコレステロールを基質として、コレステリルエステルを生じ、細胞内にコレステロールを貯蔵する働きを持つ。細胞内コレステロールが増加すると、LDL 受容体発現が抑制され、コレステロール合成が低下し、ACAT 活性が誘導され、フリーのコレステロールはエステル化され、細胞内に貯蔵される。細胞内コレステロールが減少すると、LDL 受容体発現が誘導され、コレステロール合成が低下する。TGL と TGH はいずれも LDL 受容体を欠損しているから、LDL 受容体を介して細胞内へのリポ蛋白の取り込みは行われぬ。従って、肝細胞内ではコレステロール合成は常に上昇している。de novo 合成されたコレステロールはエステル化されにくい、受容体を介して取り込まれたコレステロールは、エステル化されやすいことは、すでに報告されている。著明な高中性脂肪血症を呈する TGH では、TGL に

比しはるかに多量のリポ蛋白が LDL 受容体以外の受容体 (アポ E 受容体、レムナント受容体など) を介して取り込まれていると考えられ、ACAT は TGH の方が当然発現を誘導されていると考えられる。ところが、実際は TGH では ACAT の蛋白質としての発現量は非常に少ない。TGH では、一次的あるいは二次的な原因で肝細胞の ACAT 自体の発現が低い可能性が考えられる。二次的な原因としては、LDL 受容体以外のリポ蛋白の受容体発現が抑制されている可能性も考えられる。

一方、TGH に多量に発現し、TGL にほとんど発現を認めない蛋白質として Acyl coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain precursor (SCAD) が同定された。SCAD は脂肪酸オキシダーゼの 1 種でアシル CoA をアセチル CoA まで酸化する反応を触媒する。SCAD は、C の数が 6 および 4 という分子量の小さな脂肪酸のみに働く。SCAD の欠損症は、出生直後から低血糖、嘔吐をくり返し数日で死に至るものから、40~50 才代になって初めて筋力低下などの症状が現われるものまで非常にバリエーションが大きい。TGL に比し、SCAD が TGH に多量に発現しているのは、脂肪酸酸化の量を反映している可能性がある。

我々は、本研究で高中性脂肪血症の病因を知り、動脈硬化発症、進展のメカニズムを探るため、組織抽出液のプロテオーム解析の系を整え、肝臓で発現している蛋白質のプロテオーム解析を行った。TGL と TGH で発現に著明な差のある蛋白質の同定に成功した。肝臓での発現

蛋白質を解析することにより、さらに病態の把握に重要な蛋白質を知ることができる。また、動脈硬化巣での蛋白質の発現を解析することにより、動脈硬化の発症のメカニズムにまでせまることができるのではないかと考えられる。

#### D. 結論

高脂血症ウサギの肝臓のプロテオーム解析を行い、興味ある知見を得た。

#### E. 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. Tsukada S, Iwai M, Nishiu 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Horii 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.

14. 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.

15. Inoue S, Nakamura H, Otake K, Saito H, Terashita K, Saito 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.

16. 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.

## G. 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、  
遺伝性食後高中性脂肪血症家兔、  
特許第3345643号
2. Hitonobu Tomoike, Kazuo Owada, Tsunetaka Ito. Hereditary post prandial hypertriglyceridemic rabbit model. US Patent No. 6,515,196 B2

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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

高脂血症モデル動物の開発と病態の解析  
生活習慣病に関連した食後高脂血症ウサギの遺伝形式

分担研究者 伊藤恒賢（山形大学医学部 文部科学技官）

研究要旨

本プロジェクトで開発する生活習慣病に関わる新規遺伝子を検索する準備研究として、遺伝性高コレステロール兼高トリグリセリド血症家兎から分離した遺伝性食後高トリグリセリド血症家兎 (PHT) を用い、その Wild Type (JW) との雑種第 1 代 (F1) を作出した。PHT の食後高トリグリセリド血症に関連する遺伝様式を推測するために PHT, JW 及び F1 について、絶食及び食後（食餌開始 24 時間後）の血中コレステロール及び血中トリグリセリドを測定し比較検討した。さらに、食後の血液からリポ蛋白コレステロール並びにリポ蛋白トリグリセリドを測定し、その分画パターンから PHT の遺伝様式を推定した。食後のコレステロール値は PHT > JW の関係が示され F1 はその中間値を示した。トリグリセリド値は JW と F1 が同様な値を示したものの、PHT はそれらの 5.5 倍の値を示した。リポ蛋白分画を測定した結果、JW と F1 で同様のパターン（HDL, VLDL, LDL, CM の出現）を示したが、PHT はそれらのパターンとは異なり、VLDL の異常な増加パターンを示した。以上から、PHT の食後高トリグリセリド血症の遺伝様式は劣性であることが示された。しかし、トリグリセリドと密接な関係にあるコレステロールの値が F1 で中間値を示したことから、トリグリセリドを包括する脂質系の遺伝様式が単純な劣性遺伝を示すのではなく、複合遺伝子支配によるものと示唆された。

A. 研究目的

高脂血症は大きく分けると高コレステロール血症と高トリグリセリド（中性脂肪）血症、それらの合併したものがあ

る。動脈硬化の危険因子としては高コレステロール血症の方が臨床的に重大である。しかしながら、生活習慣病を考えた場合、欧米や日本などの先進諸国では食

事内容として年々高栄養価のものが摂取される傾向にあり、高トリグリセリド血症が問題視されるようになってきている。近年、高トリグリセリド血症を中心としたマルチプルリスクファクター症候群(高トリグリセリド(TG)血症, 耐糖能異常, 肥満, 高血圧等を同一人が複数併せ持つ)に虚血性心疾患を発症する頻度が高いことが示され, 特に高トリグリセリド血症と虚血性心疾患との関係が注目されている。さらに, 動脈硬化症を主要所見とする臨床例の中に, 食後高脂血症を示す症例が知られており, 血管病進展の重篤な危険因子と考えられている。

我々は, 遺伝性高コレステロール兼高トリグリセリド血症家兔 (TGH) と JW の交配から通常は血中コレステロール (CHO) 値とトリグリセリド (TG) 値が正常であるが, 食後に TG が異常高値を示す家兔 (食後高トリグリセリド血症家兔 ( PHT: Postprandial Hypertriglyceridemia ) ) を見出した。

本研究では, PHT と日本白色種 (JW) との交配により雑種第 1 代 (F1) 世代を作出し, 絶食と食後における脂質成分値 (CHO, TG) 並びに食後のリポ蛋白分画 (HDL; High density lipoprotein, LDL; Low density lipoprotein, VLDL; Very low density lipoprotein, CM; Chylomicron) の変動について比較検討し, PHT の遺伝様式を推定した。

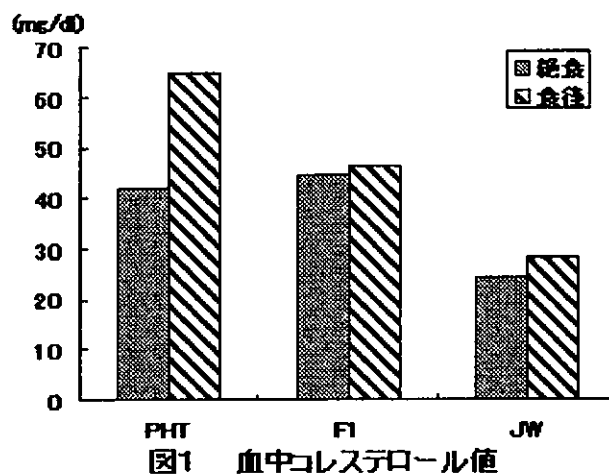
## B. 研究方法

5~8ヶ月齢の PHT 12 匹(雄 5, 雌 7), JW 3 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。

## C. 研究結果

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 (PHT; 65.0 mg/dl, F1; 46.2 mg/dl, JW; 28.5 mg/dl) では PHT > F1 > JW の関係が認められた (図 1)。



一方, TG 値は絶食 (PHT; 83.1 mg/dl, F1; 59.8 mg/dl, JW; 44.5 mg/dl) で PHT > F1 > JW の関係にあり, 食後 (PHT; 459.3 mg/dl, F1; 119.4 mg/dl, JW; 124.6 mg/dl) 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 (図 2)。

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測定した結果, JW 群 (図 3) と F1 群 (図 4) は同様の分画 (CHO 分画; HDL と LDL の 2 峰性, TG 分画; HDL, VLDL, LDL, CM の出現) を示した。

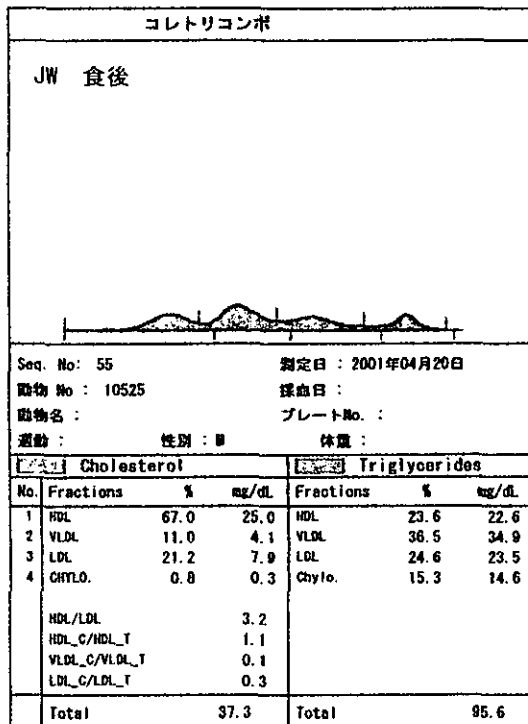
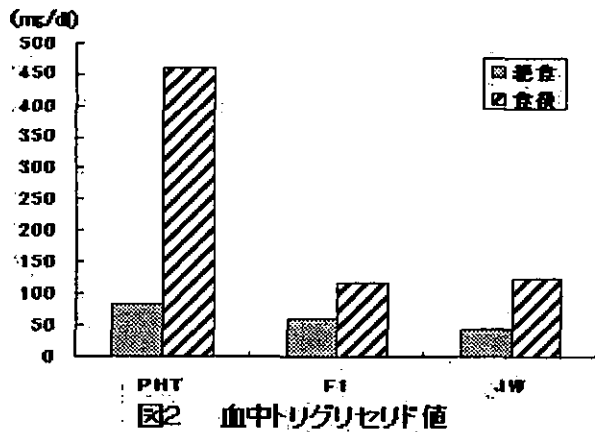


図 3

一方、PHT は CHO 分画及び TG 分画の両方に VLDL の異常な増加を認め、明らかに JW 及び F1 と異なる分画像を認めた (図 5)。

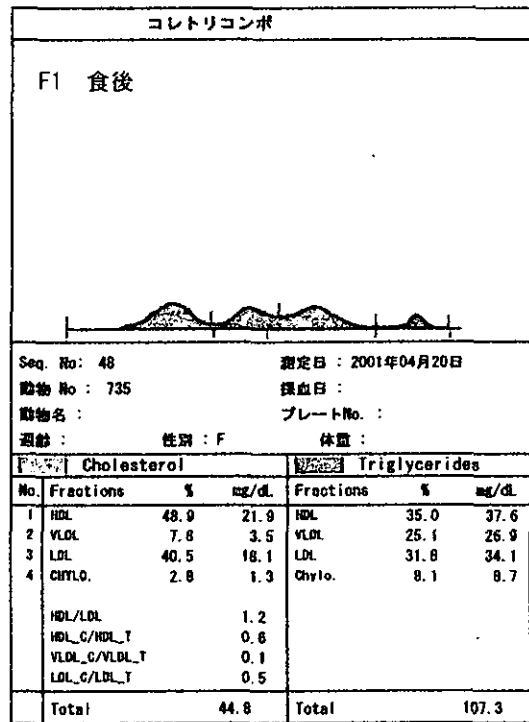


図 4

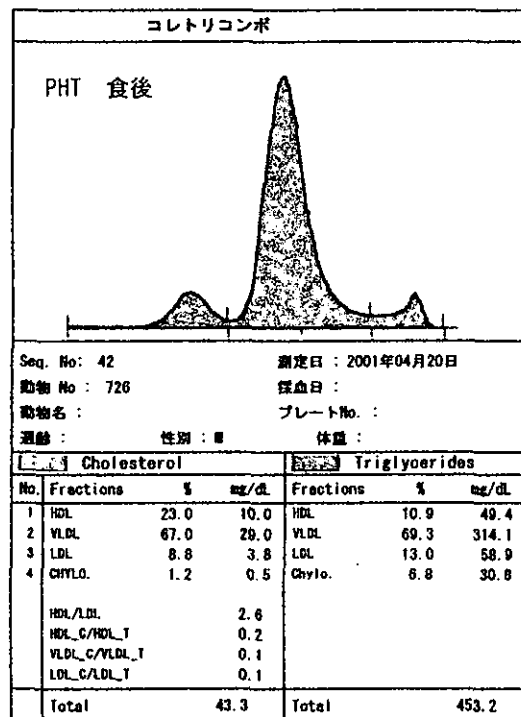


図 5

## D. 考察

PHT 家兎においては食後に TG が増加したが、JW と F1 ではこの現象が認められないこと、さらに食後のリポ蛋白分析から特にリポ蛋白トリグリセリド分画において PHT の VLDL が顕著に増加しており、それが JW と F1 に認められないことから、PHT の食後高トリグリセリド血症の遺伝様式は劣性であることが示された。しかし、TG 値と密接な関係にある CHO 値が F1 で中間値を示したことから、これら脂質系の遺伝様式が単純な劣性遺伝を示すのではなく複合遺伝子（ポリジーン）支配等の関与を受けている事が推測された。

## E. 結論

PHT の食後高トリグリセリド血症の遺伝様式は、劣性遺伝子支配によるものと示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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
2. Shishido T, Tasaki K, Takeishi Y, Takasaki S, Miyamoto T, Itoh M, Takahashi H, Kubota I, Ito T, Katanano Y, Wakabayashi I, Tomoike

H: Chronic hypertriglyceridemia In young watanabe heritable hyperlipidemic rabbits impairs endothelial and medial smooth muscle function. Life Sciences, 74, 1487-1501, 2004

## 2. 学会発表

1. 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
2. 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

## 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
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

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

低 HDL 血症に関わる新規遺伝子の検索と機能解析  
ABCA1 およびその近縁関連遺伝子の機能と反応機構

分担研究者 横山信治（名古屋市立大学大学院医学研究科教授）

研究要旨

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研究した。その結果、1) ABCA1 遺伝子は細胞内遊離コレステロールの増加により転写促進を受けるが、カルシウムチャネル阻害剤でもこれとは独立に転写促進を受ける、2) ABCA1 は、HDL 新生反応による細胞スフィンゴ脂質の取り出しが引き金を引く PKC の活性化を介した ABCA1 のリン酸化により、カルパインによる分解を阻害され安定化する、3) 低 HDL 血症を起こす ABCA1 の遺伝子変異にはその細胞内輸送に異常をもたらすものがあり、また近縁遺伝子による ABCA7 の発現により HDL 新生が行われる。

**A. 研究目的**

末梢細胞はコレステロールを異化することが出来ず、細胞内ステロール代謝平衡を維持するためには、細胞外に搬出されねばならない。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ためには、或いは蓄積を積極的に防ぐには、この細胞内コレステロールの搬出システムに頼ることになる。このためのコレステロールの自由拡散と並ぶ主要な機構が、アポリポ蛋白質と細胞の ABCA1 蛋白質の相互作用による HDL の新生反応である。そして、ABCA1 の機能不全は

低 HDL 血症の主要な原因の一つであることが明らかにされつつある。本研究の目的はこの反応の機序を解明し、反応の賦活化とそれによる低 HDL 血症の改善により動脈硬化症予防の手段とすることである。

**B. 研究方法**

- 1) この反応の細胞側の主要因子である ABCA1 蛋白質の活性の制御を、転写・翻訳レベルの面から検討した。
- 2) 翻訳後代謝制御としての ABCA1 の安定化における細胞内情報伝達機構の



役割を検討した。

3) 低 HDL 血症を起こす ABCA1 の変異体や ABCA1 以外の膜蛋白質による HDL 新生を検討した。

## C. 研究成果と考察

### 1) ABCA1 転写の促進

ABCA1 は細胞内コレステロール量を検知して、その搬出のために転写レベルで発現増加が起こると考えられている。細胞内コレステロールエステル化酵素である ACAT の阻害により細胞内で遊離コレステロールが相対的に上昇することから、ABCA1 の発現増加が期待される。この仮説を新規 ACAT 阻害剤 MCC-147 を用いて検証した。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 (Biochim. Biophys. Acta (2004) 1636: 69-76)。臨床的に降圧剤として広く用いられているカルシウムチャンネル阻害剤による HDL の上昇が少なからず報告されている。この現象が ABCA1 の発現調節に関連するか否かを、マウスマクロファージ株細胞 RAW264 において cAMP により ABCA1 を誘導した系で検証した。Verapamil や他のカルシウムチャンネル阻害剤で 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 (Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (2004) 24: 519-525)。

### 2) ABCA1 の安定化における細胞内情報伝達機構の役割

我々は ABCA1 が HDL を新生するヘリックス型アポリポ蛋白質に反応してカルパインによる分解に抵抗性となることを見いだした。この現象の機序を、細胞内情報伝達と ABCA1 の磷酸化の面から検討した。ApoA-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 (J. Biol. Chem. (2003) 278: 47890-47897)。これらの反応は、apoA-I のみならず他のヘリックス型アポリポ蛋白質やこの両親媒性の立体構造をまねて合成したペプチドでも起こり、ABCA1 の安定化は細胞からの磷脂質の引き出しと相関する (J. Biol. Chem. (2004) 279: 6217-6220.)。

3) ABCA1 変異体や ABCA1 以外の膜蛋白質による HDL 新生  
低 HDL 血症の原因となる ABCA1 の変異体 R567W、Q597R 及び W590S

による HDL 新生反応を検討した。前二者は翻訳後のマンノース付加に異常があり形質膜に到達できないが、W590S には細胞内輸送の異常も ATP 結合にも異常がなく、それ以外の機能不全が示唆された (J. Biol. Chem. (2003) 278: 8815-8819)。ABCA1 と高い相同性を持つ ABCA7 は網内系細胞を中心に分布するが、その機能は不明である。この遺伝子を HEK293 細胞に発現させ、その HDL 新生機能を検証した。ABCA7 は ABCA1 と殆ど相似形の反応で apoA-I によるコレステロールに富んだ HDL の新生を媒介し、ABCA1 同様 apoA-I による安定化も起こる。しかし、cAMP や PMA による活性化などには ABCA1 との間で差がみられ、発現調節の機序は同じでないことが示唆された。(Biochem. Biophys. Res. Commun. (2003) 311: 313-318 ; J. Biol. Chem. (2004) 279: 604-611)。

## E. 結論

ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構を研究し、ABCA1 転写機構を解明し、その安定化における細胞内情報伝達機構の役割を明らかにした。

## 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. 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. (2003) 88: 2541-2547.

2. 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.

3. 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: 8815-8819.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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

8. 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

9. 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.

10. 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.

11. 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし