

脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬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

HDL形成に必須の役割を担うABCA1の発現を遺伝子転写活性・タンパク分解抑制により促進する薬物、細胞内脂肪滴形成を抑制する薬物、肝での胆汁酸排出促進を担う脂質メディエーターを同定するとともに、胆汁酸吸着樹脂による抗肥満作用を見いだした。

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科 横山信治
- (2) 帝京大学薬学部 藤本康之
- (3) 三菱ウエルファーマ(株)創薬第二研究所
坂井 薫、杉本佳奈美
- (4) グレラン製薬(株)開発研究所 松倉竹雄

A. 研究目的

血管壁マクロファージなどの末梢細胞はコレステロールを分解できないことから、過剰のコレステロールは蓄積し、動脈硬化の原因となる。この防止には、コレステロールをHDLの形で運び出し、肝臓に運び胆汁酸に転換し排泄する必要がある。この研究では、[1]末梢細胞でのHDL産生、[2]肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出を促進する新たな方法の確立をめざし、以下の研究を行う。

HDL形成に必須の役割を果たす膜トランスポーターABCA1について発現増加を図るために、(1)カルシウムアンタゴニストおよびPPAR活性化剤による遺伝子発現の促進機構、(2)タンパク分解の抑制機構を解明する。また、(3)細胞内のコレステロールプールからコレステロールを輸送しHDL形成に至るメカニズムとその制御を明らかにし、(4)細胞内脂質貯留の場である脂肪滴の退縮に関わるタンパクと活性制御薬物を同定する。

肝臓においては、(1)胆汁酸輸送を担うトランスポーターBSEP発現を制御する脂質メディエーターを同定し、その産生促進手法を探るとともに、(2)コレステロールの胆汁酸への転換促進が血清トリグリセリド低下・抗肥満・抗糖尿病作用を引き起こす新たな知見についてメカニズムを解明する。

B. 研究方法

B-1 HDL産生による末梢細胞からのコレステロール

搬出の促進

カルシウムアンタゴニストおよびフィブラート系薬物のHDL産生促進、ABCA1タンパク、ABCA1 mRNA増加作用を検討した。ABCA1転写活性化作用は、マウスABCA1遺伝子プロモーター領域断片(-1247/+57)をエンハンサーとして組み込んだルシフェラーゼベクターを用いて検討した。

ABCA1のカルパインによる分解の調節機構は阻害剤の探索から検討した。細胞内コレステロールコンパートメントのABCA1によるHDL新生反応制御における役割を検討した。細胞外HDLとABCA1の作用機構を検討した。

脂肪滴のプロテオーム解析の結果を活用し、構成タンパクの機能を阻害する薬物を中心に、脂肪滴形成を抑制する薬物を探索した。

B-2 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出促進に機能する脂質メディエーター

コレステロールから胆汁酸への転換を促進する手段として胆汁酸吸着樹脂(三菱ウエルファーマ(株)で合成したコレステチミド(2-methylimidazole-epichlorohydrin copolymer))を用い、ゴールドンシリアンハムスターの体重、内臓脂肪、血清脂質に及ぼす影響を測定した。

胆汁酸輸送を担うトランスポーターBSEPの遺伝子転写は核内受容体FXRにより直接促進されることから、FXRの活性化を指標にBSEP発現物質を探索した。コレステロール/胆汁酸転換の中間体は、広島国際大学宇根瑞穂助教授により提供された。

(倫理面への配慮) 当該研究においては、ヒト組織を研究材料とする実験、ヒト遺伝子の解析は行っていない。動物の取り扱い「動物実験に関する指針」(昭和63年1月三菱化学動物実験委員会策定)を遵守し動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

C. 研究成果

C-1 HDL 産生による末梢細胞からのコレステロール搬出の促進

1) カルシウム拮抗剤および PPAR α 活性化剤による ABCA1 遺伝子発現の増加

カルシウム拮抗剤は降圧剤・抗不整脈薬として临床上用いられるが、抗動脈硬化作用および HDL 上昇効果が認められている。そのひとつ verapamil はマクロファージ系細胞 RAW264 において HDL 産生を促進する。本研究では、verapamil が ABCA1 mRNA レベルを上昇させること(図 1)、ABCA1 mRNA の分解速度は影響されないことから、この上昇は mRNA の安定化によるものではないことを示した。ABCA1 の遺伝子発現は核内受容体 LXR により直接促進されるが、(1)verapamil は LXR 応答性のルシフェラーゼベクターの発現には影響しなかった。(2) ABCA1 mRNA の上昇は LXR アゴニスト 22RHC の作用と相加的であり、LXR 内因性リガンドを枯渇させる compactin により阻害されず、(3)LXR target 遺伝子である ABCG1 の発現には影響しなかった(図 1)。従って、LXR 非依存のメカニズムでの ABCA1 遺伝子発現促進が推定される。また、verapamil はマウス ABCA1 遺伝子プロモーターを直接活性化することを示した (*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 519, 2004)。

フェノフィブリン酸および Wy14643 は 6.25~50 μ M において濃度依存的に RAW264 細胞における apoA1 依存性のコレステロールおよびリン脂質搬出を亢進させ、HDL 新生反応を亢進させることが示された。また、これらの薬物は RAW264、THP-1、Balb/3T3 細胞における ABCA1 蛋白および mRNA 発現量を濃度依存的に増加させた。さらに、細胞にトランスフェクションしたマウス ABCA1 遺伝子プロモーターを濃度依存的に活性化すること、LXR 応答配列に変異を導入したプロモーターでは活性化効果が消失することから、これらの薬物は ABCA1 遺伝子転写を促進すること、またその作用には LXR が関与することが示された (*Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2005 in press)。

2) ABCA1 分解の特異的阻害

ABCA1 タンパクは半減期が短く、速やかに分解されることから、ABCA1 タンパク量の増加には分解の抑制が有力な手段となる。アポ A-I などのヘリックスアポリポ蛋白質とそのモデルペプチドが ABCA1 の磷酸化を誘導し分解を阻害することを見いだした (Arakawa et al., *JBC* 279, 6217-6220)。血清脂質低下剤であるプロブコールが形質膜上の ABCA1 を不

活性化して HDL 新生を阻害する機序とともに、カルパインによる ABCA1 分解を抑制する現象を明らかにし (*J Biol Chem* 279: 30168, 2004)、分解抵抗性のみを示し ABCA1 の活性増加剤となるプロブコール代謝物を発見した(論文準備中)。両親媒性ペプチドによる ABCA1 分解抑制を見いだした (*J Biol Chem* 279: 6217, 2004)。

3) 細胞内コレステロール輸送と HDL 新生の制御

細胞内遊離コレステロールレベルは ACAT によるエステル化と細胞からの放出により制御される。ACAT の基質となるコレステロール分子と ABCA1/HDL 新生に使われる分子は共通の細胞内コンパートメントに存在し、ABCA1 遺伝子の転写発現制御に関わること、このコンパートメントから HDL 新生反応へのコレステロール供給は、PKC 活性化を含む細胞内シグナル伝達機構が制御することを明らかにした (*Biochim Biophys Acta* 1636: 69, 2004; *J Lipid Res* 45:1943, 2004 ; *J Lipid Res* 45:2269, 2004)。細胞コレステロール放出に於ける遊離アポリポ蛋白質の役割については、HDL 粒子へのコレステロール流出は非特異的拡散交換反応と HDL から遊離したアポ A-I による HDL 新生反応の混合作用であること (*J Lipid Res* 45: 645, 2004)、自らアポ A-I を産生する肝細胞ではアポ A-I が分泌後に細胞膜の ABCA1 と作用するオートクリン機構により HDL が新生されることをアポ A-I に対する特異的単クローン抗体を用いて明らかにした (*J Lipid Res* 46:154,2005)。

4) 細胞内脂肪滴の形成抑制・消失促進方法の探索

Huh 細胞の脂肪滴形成に対して抑制的に作用する薬物を探索した。細胞内のエネルギー代謝を促進する caffeine, capsaicin, isoproterenol を、細胞内膜系のマイクロダイナミクスに関与する phospholipase D の阻害剤である 1-butanol は影響が認められなかったが、細胞内の CE 量を特異的に低下させる pregnenolone は、オレイン酸添加による細胞内 CE 増加を 30%程度抑制した。

プロテオーム解析で同定された脂肪滴蛋白、acyl-CoA synthetase 3、acyl-CoA synthetase 4 の阻害剤 Triacsin C は脂肪滴の形成を強く抑制した。Lanosterol synthetase の阻害剤である AMO-1618 (2-Isopropyl-4-dimethylamino-5-methylphenyl-1-piperidine-carboxylate methyl chloride)、および LDAO (N,N dimethyldodecyl amine N-oxide、別名 Lauryldimethylamine N-oxide) は明確な阻害効果はみられなかった。

さらに、オレイン酸存在下で脂肪滴の形成が促進

される際には、脂肪滴の ACS3、ADRP、TG、CE の量が増加するが、Triacsin C が共存すると脂肪滴の形成とともにこれらの増加も抑制されたことから、ACS3 の量は脂肪滴の量と対応して変動していると考えられた。また、脂肪滴には ACS 活性が検出され、Triacsin C により大きく低下することを見いだした。

C-2 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出促進に機能する脂質メディエーター

1) 胆汁酸代謝調節を介した脂質・糖代謝制御

本研究では胆汁酸吸着剤が血清 TG 低下作用、抗肥満作用ならびに血糖低下作用を示す新たな知見について検証した。

胆汁酸吸着樹脂(コレスチミド)をハムスターに投与し、摂餌時間制限下で飼育したところ、体重変化は、対照群では食餌制限により平均で $166.6 \pm 3.3\text{g}$ から初期の1週間で徐々に低下したがその後はほぼ一定になり最終体重は $156.6 \pm 4.7\text{g}$ であった。コレスチミド投与群は投与期間中低下を続け、 62.5 mg/kg 群で $166.6 \pm 3.7\text{g}$ から $136.1 \pm 3.7\text{g}$ に、 125 mg/kg 群で $166.7 \pm 3.9\text{g}$ から $130.7 \pm 5.5\text{g}$ (mean \pm SE) に低下した。コレスチミド投与群において最終体重および内臓脂肪重量の有意な低下が見られ(図 2)、血清 TC および血清 TG の低下も観察された。血清のリポプロテインを FPLC により分画したところ、血清 TC の低下は VLDL-C、LDL-C の低下によるもので、HDL-C 画分はむしろ上昇していた。

摂餌量を自由摂餌下の 70%に制限し、同様に検討を加えたところ、対照群は投与開始時より徐々に体重が減少し、24 日後には平均 15.0g 減少した。同様にコレスチミド群では、 62.5mg/kg 投与群で 19.2g 、 125mg/kg 投与群で 22.8g 減少した。最終的に 125mg/kg 投与群ではコントロール群に比べ有意な体重の低下が見られた。内臓脂肪重量についてもコレスチミド投与群において低下する傾向が見られたが有意な差は見られなかった。TC・TG についてもコレスチミド投与群で低下する傾向はあったが(TC; control 247.2 ± 8.8 , 62.5mg/kg 233.3 ± 13.8 , 125mg/kg $221.7 \pm 9.3\text{ mg/dl}$ 、TG; control 53.8 ± 5.0 , 62.5mg/kg 51.9 ± 4.8 , 125mg/kg $43.9 \pm 4.4\text{mg/dl}$)、有意な差ではなかった。

2) 胆汁酸排泄を促進する脂質メディエーターの同定

胆汁酸トランスポーターBSEP は肝から胆管への胆汁酸排出に主要な役割を担っている。コレステロールから胆汁酸への転換過程の中間体から胆汁酸排泄を促進する物質の探索を行った。

BSEP の遺伝子転写は核内受容体 FXR により直接促進されることから、FXR の活性化を指標に検索を行った。肝でのコレステロールからの胆汁酸生合成経路では数多くの中間体を生じる(図 3)。このうち、側鎖が水酸化された胆汁アルコール(26-OH-THC、26-OH-DHC、25-OH-THC)、カルボン酸に転換された C27 胆汁酸(THCA、DHCA)が最終産物の胆汁酸であるケノデオキシコール酸(CDCA)と同程度かあるいはそれを上回る FXR 活性化能を示すことが判明した(図 4)。一方、オキシステロールをリガンドとする LXR は全く影響されなかった。In vitro コアクチベーター会合アッセイにより、中間体が細胞内で最終産物の胆汁酸に代謝され FXR を活性化する可能性は排除され、これらの中間体の直接 FXR へのリガンド結合が示された。

FXR アゴニスト作用を示すこれらの胆汁酸生合成中間体(C26-あるいは C25-水酸化胆汁アルコールや C27 胆汁酸)は、ヒト肝ガン由来細胞 HepG2 において強力な BSEP mRNA 発現促進作用を示すことを明らかにした(*J Lipid Res* 45:1538,2004)。

D. 考察

D-1 HDL 産生による末梢細胞からのコレステロール搬出の促進

1) カルシウム拮抗剤および PPAR α 活性化剤による ABCA1 遺伝子発現の増加

Verapamil による HDL 産生の増加は ABCA1 タンパクの増加を伴う。本研究では、verapamil が ABCA1 mRNA レベルを上昇させること、これは ABCA1 遺伝子転写の促進によることを、ABCA1 遺伝子プロモーターを用いた解析により示した。RAW264 細胞での verapamil による HDL 産生増強は、カルシウムアンタゴニスト効果と同様に、*d*-より *l*-verapamil が顕著であり、さらに他のカルシウムアンタゴニストである nifedipine および nicardipine でも観察されることから、カルシウムチャネルの阻害が作用発現に関わると推定される。新たな HDL 上昇・抗動脈硬化作用技術の開発につなげるためには、さらなる作用機構の解明が必要である。

本研究において、フェノフィブリン酸および Wy14643 は濃度依存的に apoAI 依存性の HDL 新生反応、ABCA1 遺伝子転写、ABCA1 蛋白発現量を増加させ、この作用は LXR を介することが確認された。臨床的に用いられているフィブラート系薬剤による ABCA1 遺伝子発現亢進作用および apoAI 依存性の HDL 新生反応亢進作用が認められたのは本研究が

初めてである。Wy14643は30 μ M以上ではPPAR α に加えてPPAR γ ・ δ も活性化するが、フェノフィブリン酸は100 μ M以下ではPPAR α 特異的であることから、PPAR α の活性化による作用と考えられた。またフェノフィブリン酸は臨床適応量の投与における血中濃度範囲内でHDL新生反応を示したことから、フェノフィブレートは本研究で認められた作用機序によりヒト血中HDLを上昇させる可能性が示唆された。

4) 細胞内脂肪滴の形成抑制・消失促進方法の探索

本研究では、脂肪滴の形成を抑制する薬物の探索を行い、脂肪滴に多く存在するアシルCoA合成酵素の一種ACS3の阻害剤Triacsin Cの有効性を見いだした。Triacsin Cは顕著な作用から、中性脂質蓄積性疾患に対する治療薬創生のシードとなる可能性があり、プロテオームの情報をもとにした薬物の探索は有意義であると言えた。

Triacsin Cは脂肪滴形成とともに脂肪滴のACS3量の増加・活性も抑制した。これらの知見を総合すると、脂肪滴の形成にはアシルCoA合成酵素が関与している可能性が考えられ、その解明にはTriacsin Cが有効なツールとなる。

脂肪滴形成の際にはTGやCEなどの中性脂質分子の生合成が必須であり、脂肪滴上のACSが必要アシルCoAを供給している可能性がある。また、脂肪滴は中性脂質がリン脂質1重膜で覆われた構造をしており、脂肪滴の発達にはリン脂質分子の生合成も必要と考えられる。アシルCoAはリン脂質合成にも利用されているかもしれない。

D-2. 肝臓でのコレステロール・胆汁酸排出促進に機能する脂質メディエーター

1) 胆汁酸代謝調節を介した脂質・糖代謝制御

胆汁酸吸着樹脂のコレステリドは非吸収性の陰イオン交換樹脂で、その血清コレステロール低下作用は腸管内で胆汁酸を吸着することによる。腸管から肝臓への胆汁酸再吸収が阻害されると、肝臓内でコレステロールから胆汁酸への変換が促進され、血中LDLの肝臓への取り込みが亢進した結果、血中LDLコレステロールが低下する。本研究では胆汁酸吸着剤が血清TG低下作用、抗肥満作用を示す新たな知見について、ハムスターを用いて検討した。

本実験に先立ち、ハムスターを用いて自由摂餌条件下でコレステリドの体重に対する影響を検討した際には、2週間の投与で対照群との差は見られなかった。ハムスターの摂食量の日内変化を調べると、1日中ほぼ定常的な摂食が確認され、ヒトのようにコレステリドを服用してから食事をとるというパターンを動物

実験で再現することが必要であると考えられた。そこで、摂食の時間および量を制限する条件下にて、コレステリドの抗肥満作用を検討した。

実験1では摂食時間を9:00から17:00に制限して、摂食直前にコレステリドの投与を行ったところ、明確な体重と内臓脂肪重量の低下が観察された。コレステリドの臨床試験で腹部膨満感の副作用が散見されたとの報告があるため、実験2では対照群とコレステリド投与群で同量の食餌を与え、抗肥満作用を検討した。この条件下においてもコレステリドは有意な体重減少を示し、内臓脂肪量も低下する傾向が見られた。よって、コレステリドによる体重・脂肪減少作用は摂食量低下以外のメカニズムによるものと考えられた。

抗肥満作用のメカニズムとして、腸管内で胆汁酸を吸着することにより脂質/胆汁酸のミセル形成を阻害し、コレステロールやTGの吸収を抑制することが考えられる。in vitroにおいては胆汁酸以外に脂肪酸・コレステロールも結合するため、脂肪吸収阻害作用、あるいは遅延作用も示唆されている。また、同じ陰イオン交換樹脂であるコレステラミンが食後の胃腸管ホルモンに影響することも示されていることから、抗肥満作用のメカニズムとして、食事成分の吸収抑制や胃腸管ホルモンの変化による可能性も考えられる。

近年、胆汁酸の核内受容体であるFarnesoid X receptor (FXR)が発見され、胆汁酸代謝、脂質代謝への関与について広く研究されている。胆汁酸吸着樹脂は腸管から肝臓への胆汁酸再吸収抑制により、肝臓でのFXRリガンドを減少させることからFXR活性のモジュレーション効果を持つと考えられる。今後は胆汁酸吸着樹脂による抗肥満作用とFXR活性制御についての検討を進めていきたい。

2) 胆汁酸排泄を促進する脂質メディエーターの同定

胆汁酸CDCAはFXRの最強の生理リガンドであるが、CDCA生合成の中間体C26-、C25-水酸化胆汁アルコール、ならびにC27胆汁酸THCA、DHCAがCDCAに匹敵するFXR活性化能を持つことを、細胞およびin vitroで明らかにした。

正常肝においてTHCA、DHCAのレベルは胆汁酸の1/5~1/10であるが、培養ヒト肝細胞を用いた報告では、26-OH-THCの細胞内レベルは最終産物であるコール酸の2倍量、CDCAのほぼ1/2量と高い。この違いは、腸管に排出された胆汁酸が再吸収されて肝に戻る、いわゆる腸肝循環により、in vivoの肝には胆汁酸が供給されるためと推定される。胆汁酸吸

着樹脂投与によって腸肝循環が阻害されると、肝内の胆汁酸レベルは低下する。このため negative feedback regulation が解除され胆汁酸の生合成は促進される。このような場合には、中間体のレベルが胆汁酸と匹敵するものとなり、FXR 活性化を通じて遺伝子発現を制御する脂質メディエーターとして機能する可能性は十分高いものと推察される。

C27 胆汁酸である THCA、DHCA は胆汁酸生合成を欠損した先天性胆汁酸代謝異常症 Zellweger syndrome において、胆汁アルコール 25-OH-THC は脳髄黄色腫症 (CTX) において正常肝の 20~100 倍に増加することが知られている。本研究により、これらが最終産物である胆汁酸に代わって FXR を活性化し、SHP 発現誘導 CYP7A1 発現抑制によって自身の生合成を制御する能力、また BSEP 発現促進によって肝から胆管への自身の排出を促進する能力を持つことが明らかになった。26-水酸化胆汁アルコールや C27 胆汁酸は、胆汁酸の進化論的前駆体であり、魚類や両生類ではコレステロール分解経路の最終産物として胆汁酸に代わって産生される。ヒト FXR は進化の過程において、前駆体に対する親和性を保持したのかもしれない。

E. 結論

- カルシウムアンタゴニストのひとつ verapamil が核内受容体 LXR 非依存のメカニズムで ABCA1 遺伝子プロモーターを活性化し、ABCA1 mRNA 発現の増加により HDL 産生を促進する機序を明らかにした。
- フェノフィブラートの活性代謝物フェノフィブリン酸が LXR 依存的に ABCA1 の遺伝子転写および蛋白発現量を上昇させ、apoAI 依存性の HDL 新生反応を亢進し、血漿 HDL 上昇をもたらす機序を明らかにした。
- ABCA1 の活性制御について研究した。1) プロブコールが ABCA1 を形質膜上で不活性化する。2) ACAT と ABCA1 に供される共通コレステロールをコンパートメントし ABCA1 の転写発現制御に関わる。3) HDL への細胞コレステロール流出は非特異的拡散交換反応と遊離したアポ A-I による HDL 新生反応の混合作用である。
- 脂肪滴にはアシル CoA 合成酵素 (ACS) の一種である ACS3 が多く存在し、ACS 活性も検出された。細胞を ACS 阻害剤 Triacsin C で処理すると、脂肪滴の形成と脂肪滴の ACS 活性が強く阻害され、脂肪滴形成への ACS の関与が考えられ

た。

- 胆汁酸吸着樹脂はハムスターにおいて、コレステロール低下だけでなく TG 低下、内臓脂肪量低下、体重低下作用作用をしめした。摂餌量には影響を与えておらず、新規メカニズムによる抗肥満作用が示唆された。
- コレステロールから胆汁酸への転換過程の中間体から胆汁酸排泄を促進する物質を探索し、26-あるいは 25-水酸化胆汁アルコールおよび C27 胆汁酸が核内受容体 FXR を活性化し、胆汁酸トランスポーター BSEP 発現の強力な促進作用を示すことを明らかにした。

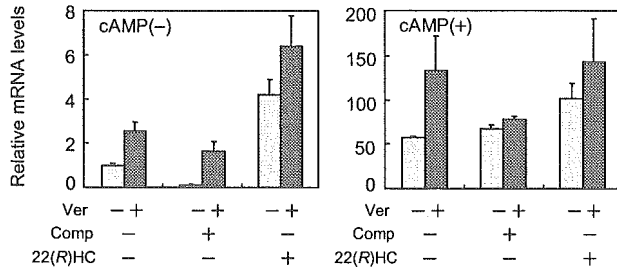
F. 研究発表

1. Nishimaki-Mogami, T., Une, M., Fujino, T., Sato, Y., Tamehiro, N., Kawahara, Y., Shudo, K., Inoue, K. Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *J. Lipid Res.*, (2004) 45, 1538-1545
2. Fujino, T., Une, M., Imanaka, T., Inoue, K., Nishimaki-Mogami, T. Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J. Lipid Res.*, (2004) 45, 132-138
3. Suzuki, S., Nishimaki-Mogami, T., Tamehiro, N., Inoue, K., Arakawa, R., Abe-Dohmae, S., Tanaka, R.T., Ueda, K., Yokoyama, S. Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via an LXR-independent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2004) 24, 519-525
4. 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
5. 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

6. 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) 45: 645-652
7. 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) 45: 23-30
8. Cheng-Ai Wu, Maki Tsujita, Michi Hayashi, and Shinji Yokoyama. Probucol Inactivates ABCA1 in Plasma Membrane for its Function to Mediate Apolipoprotein Binding and HDL Assembly and for its Proteolytic Degradation. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 30168-30174
9. Hidehisa Yamagata, Yusen Chen, Hiroyasu Akatsu, Kouzin Kamino, Jin-ichi Ito, Shinji Yokoyama, Takayuki Yamamoto, Kenji Kosaka, Tetsuro Miki, Ikuko Kondo. Promoter polymorphism in FGF1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 321: 320-323
10. Yoshio Yamauchi, Catherine C. Y. Chang, Michi Hayashi, Sumiko Abe-Dohmae, Patrick C. Reid, Ta-Yuan Chang and Shinji Yokoyama. Intracellular Cholesterol Mobilization Involved in the ABCA1/Apolipoprotein-Mediated Assembly of High Density Lipoprotein in Fibroblasts. *J. Lipid Res.* (2004) 45: 1943-1951.
11. Jin-ichi Ito, Hao Li, Yuko Nagayasu, Alireza Kheirollah and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein A-I Induces Translocation of Protein Kinase-C α to a Cytosolic Lipid-Protein Particle in Astrocytes. *J. Lipid Res.* (2004) 45: 2269-2276
12. Mariko Harada-Shiba, Atsuko Takagi, Kousuke Marutsuka, Sayaka Moriguchi, Hiroaki Yagy, Shun Ishibashi, Yujiro Asada, and Shinji Yokoyama. Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. *Circulation Res.* (2004) 95: 945-952
13. Maki Tsujita, Cheng-Ai Wu, Sumiko Abe-Dohmae, Shinichi Usui, Mitsuyo Okazaki, and Shinji Yokoyama. On the Hepatic Mechanism of HDL Assembly by the ABCA1/ApoA-I Pathway. *J. Lipid Res.* (2005) 46: 154-162
14. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Rui Lu, Alireza Kheirollah Michi Hayashi and Shinji Yokoyama Astrocytes produce and secrete fibroblast growth factor-1 that promotes production of apoE-high density lipoprotein in a manner of autocrine action. *J. Lipid Res.* in press.
15. Shinji Yokoyama. HDL can be a more effective target than LDL for primary prevention of coronary heart disease in Japan: An attempt for estimation of treatment-effectiveness. *Atheroscler.* in press.
16. Reijiro Arakawa, Norimasa Tamehiro, Tomoko Nishimaki-Mogami, Kazumitsu Ueda and Shinji Yokoyama. Fenofibric acid, an active form of fenofibrate, increases apoAI-mediated HDL biogenesis by enhancing transcription of ABCA1 gene in an LXR-dependent manner. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* in press.

A ABCA1



B ABCG1

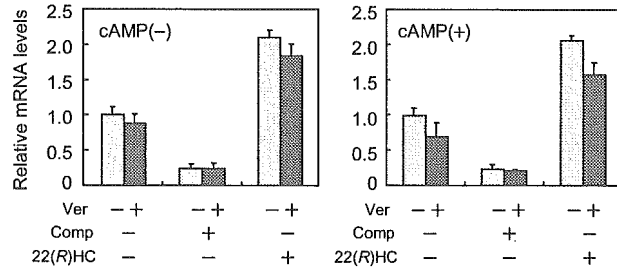


図1 Verapamil の ABCA1 および ABCG1 mRNA レベルへの影響

RAW264 細胞は dibu-cAMP 存在下・非存在下で 18 時間培養し、さらに 6 時間の verapamil、22RHC、compactin 処理を行って mRNA レベルへの影響を調べた。

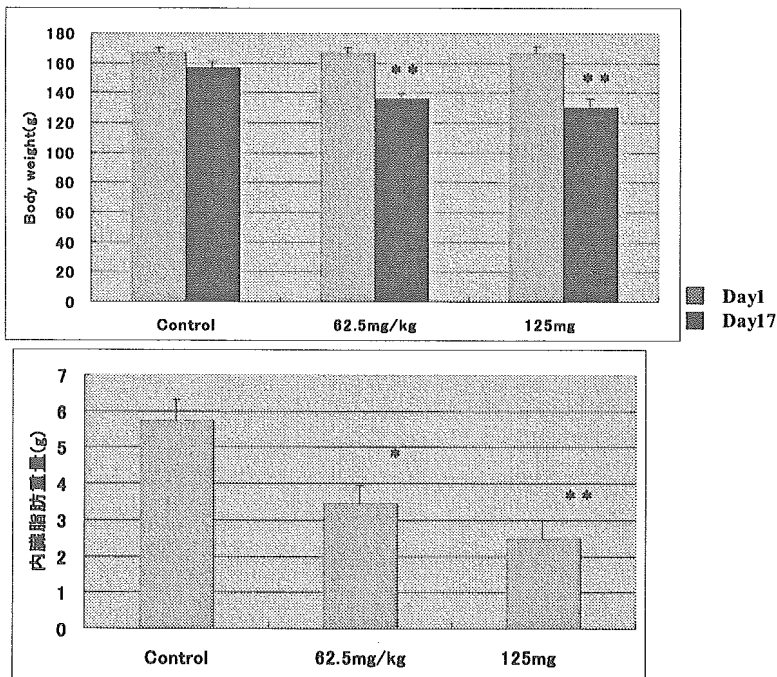


図2 (実験1) 摂餌時間制限下におけるコレステミドの効果—体重・内臓脂肪重量 (Mean±SEM、

* :p<0.05、** :p<0.01 vs. control
* by Dunnett's test)

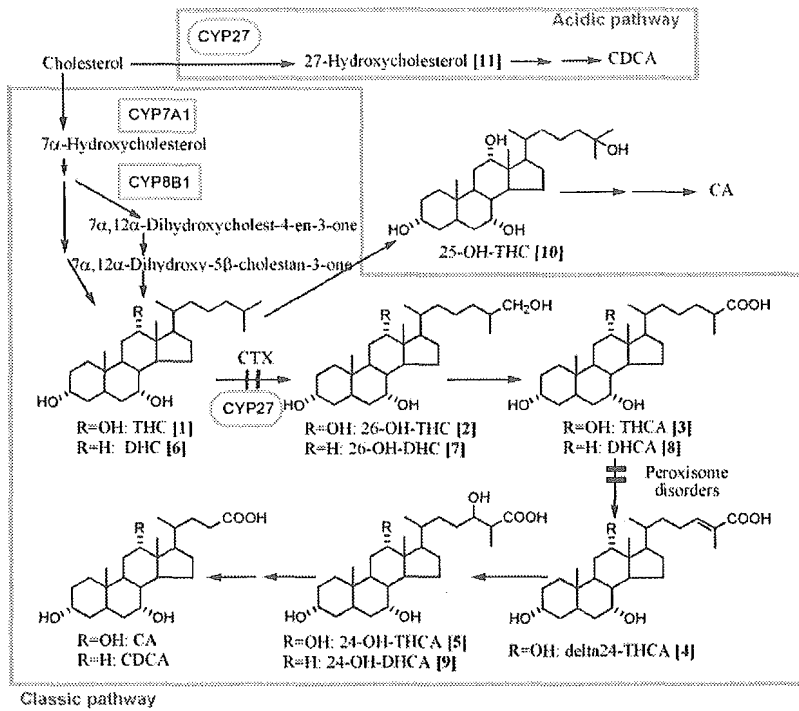


図3. 胆汁酸合成中間体 1, 5β-Cholestane-3α, 7α, 12α-triol; 2, 5β-cholestane-3α, 7α, 12α, 26-tetrol; 3, 3α, 7α, 12α-trihydroxy-5β-cholestanoic acid; 4, 3α, 7α, 12α-trihydroxy-5β-cholest-24-enoic acid; 5, 3α, 7α, 12α, 24-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid; 6, 5β-cholestane-3α, 7α-diol; 7, 5β-cholestane-3α, 7α, 26-triol; 8, 3α, 7α-dihydroxy-5β-cholestanoic acid; 9, 3α, 7α, 24-trihydroxy-5β-cholestanoic acid; 10, 5β-cholestane-3α, 7α, 12α, 25-tetrol; 11, 5-cholestene-3β, 26-diol.. CA, Cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid.

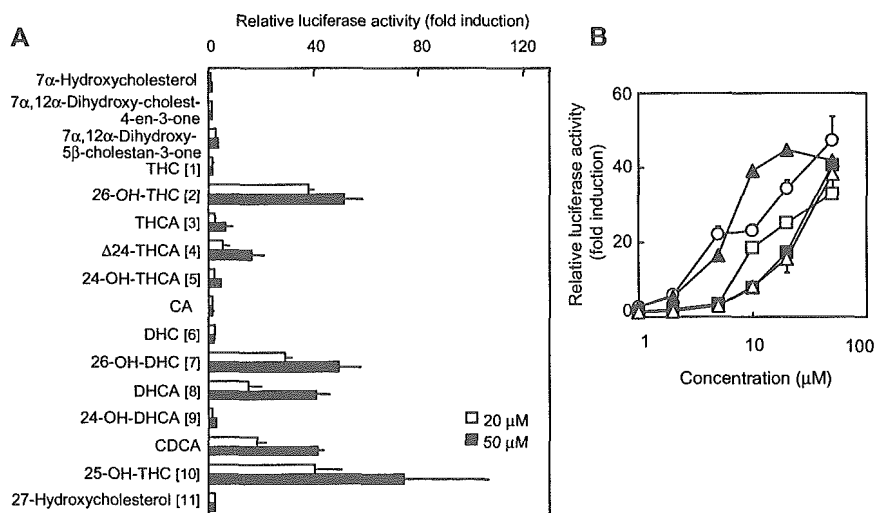


図4. 胆汁酸合成中間体による FXR の活性化: CV-1 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ