

厚生労働科学研究費補助金

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 16 年度 総括・分担研究報告書

平成 17 (2005) 年 3 月

主任研究者 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

厚生労働科学研究費補助金

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 16 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  
ARH 蛋白の発現調節機構と LDL 受容体機能の関連  
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： -----18  
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. 生活習慣病モデルとしての食後高脂血症家兎における  
平時の血中脂質並びにインスリン動態： -----25  
伊藤恒賢（山形大学医学部 教務職員）
4. 低 HDL 血症に関わる新規遺伝子の検索と機能解析： -----29  
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 -----32

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----35

厚生労働科学研究費補助金（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

リポ蛋白質代謝異常は、動脈硬化性疾患の重要な危険因子であり、その改善は動脈硬化の予防、治療に直接つながると考えられる。高 LDL 血症、高中性脂肪血症、低 HDL 血症は、その中でも重要な位置をしめる。我々は、これらのリポ蛋白質代謝異常の病因、病態に関連す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) 蛋白の機能解析を培養細胞を用いて行い、発現調節機構、ARH 蛋白過剰発現と LDL 受容体機能との関連も調べた。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 は、高中性脂肪血症のほか、TGL に比べて脂肪組織量が少ない。我々は、脂肪組織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。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 3 個は、MS-MS の解析により、20 alpha-dehydrogenase、annexin A2、Peroxisome oxidoreductin 2 であることが同定された。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 (Postprandial Hyper Triglyceridemia, PHT) を確立し、その解析を行った。PHT では、高コレステロール血症、高中性脂肪血症のほか、著明な高インスリン血症を呈しており、メタボリックシンドロームの病態に酷似していることがわかった。低 HDL 血症については、ABCA1 遺伝子の発現調節機構の解明、ノックアウトマウスの作製、アポ A-I とそれ以外のヘリックスペプチドによる HDL 新生が確認された。

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 教務職員

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

リポ蛋白質代謝異常は、動脈硬化性疾患の重要な危険因子であり、その改善は動脈硬化の予防、治療に直接つながると考えられる。高 LDL 血症、高中性脂肪血症、低 HDL 血症は、その中でも重要な位置をしめる。これらリポ蛋白質代謝異常については、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。昨年度は ARH のノックアウトマウスの機能解析を行った。本年度は、その知見をふまえ、ARH の発現調節機構を調べ、ARH 過剰発現下の LDL 受容体の機能を調べた。

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して、脂肪組織のプロテオーム解析を行った。

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. 細胞

皮膚線維芽細胞、血管平滑筋細胞、Cos-1 細胞、ヒト単球白血病由来細胞株 (THP-1) 細胞、血管内皮細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下に培養し、実験に供した。THP-1 細胞の分化は、50 ng/ml のフォルボールエステル存在下に 2 日間培養した。

## 2. ARH 遺伝子のトランスフェクション

ヒト ARH 遺伝子を発現ベクター (p hCMV-1) に挿入し、ARH 発現ベクター (p hCMV-ARH) とした。Cos-1 細胞、HepG2 細胞に Exgen 500 を用いて ARH をトランスフェクションした。

## 3. ARH stable transfectant の作製

Cos-1 細胞および HepG2 細胞に Exgen 500 を用いて ARH をトランスフェクションし、ジェネティシンを用いて選択培養を行った。

## 4. ARH の Western blotting

前処置した培養細胞を PBS を用いて洗浄後、ポリスマンを用いてかきとり、-70°C 中に保存した。凍結保存された細胞を細胞溶解液 (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, DMSO 2.2%, 10% Triton) に溶解し、蛋白を定量した。10 μg を 10% SDS-PAGE にて分離、メンブレン (Trans-Blot, Bio-Rad) にトランスファーした。抗ヒト ARH 抗体、ECL 法を用いて ARH を検出した。

## 5. LDL 受容体の細胞内取り込み測定

[<sup>3</sup>H]CE-LDL 存在下に細胞を 3 時間培養し、2 mg/ml BSA を含む Tris buffer および Tris buffer による洗浄後、10 mg/ml Heparin 存在下に LDL を release させた。細胞に 1 ml の Hexane/Isopropanol (=3/2) を加えて、脂質

分画を抽出し、窒素ガスにより乾燥後、液体シンチレーター中に溶解してカウントした。

## 6. 脂肪組織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、脂肪組織を切り出し、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に浸し、ポリトロンを用いてホモゲナイズした。

## 7. 高中性脂肪血症ウサギのプロテオーム解析

モデルウサギの脂肪の生検サンプルを二次元電気泳動で解析し、発現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 および MS-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った。

## 8. 高中性脂肪血症モデルウサギの解析

供試動物は 6~8 ヶ月齢の PHT と JW が雄各 5 匹である。PHT と JW はともに自家繁殖により作出され、制限給餌下で飼育された。採血は耳動脈より採取し、速やかに血漿に分離した後、SPOT CHEM EZ SP-4430 (アークレイ社製) を用いて、総コレステロール (CHO)、トリグリセリド (TG)、血糖 (GLU) を測定した。また、血中インスリンの測定には、ウサギ用インスリン測定キット ((株) 森永生物科学研究所) を用いた。

## 9. ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構の解析

ABCA1 蛋白の活性の制御を、転写・翻訳レベルの面から検討した。さらに ABCA1 ノックアウトマウスと LCAT ノックアウトマウスおよび ARH ノックア

ウトマウスとのダブルノックアウトマウスを作製し、その病態解析を行った。また、ABCA1 と ABCA7 による HDL 新生反応を各種ヘリックス型両親媒性蛋白質を用いて検討した。

(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. 培養細胞における ARH 蛋白質発現

サルの腎臓細胞である Cos-1 細胞では、抗ヒト ARH 抗体で検出できる蛋白質は認めなかった。ARH をトランスフェクションした Cos-1 細胞では、ARH 蛋白質の発現を認めた。血管内皮細胞、平滑筋細胞、THP-1 細胞（未分化な浮遊細胞の状態）で ARH の発現を認めた。健常人皮膚線維芽細胞を 2 日間、10% FCS、10% LPDS、10% LPDS+100  $\mu$ g/dl LDL 存在下に培養し、ウェスタンブロットングを行ったところ、ARH の発現に変化を認めなかった。血管内皮細胞を用い、ヒドロキシ尿素存在下、あるいは 0.2% BSA 存在下という細胞増殖抑制した条件でも、ARH 蛋白質の発現に変動は認めなかった。また、メバスタチン存在下に、コレステロール合成抑制、LDL 受容体活性が上昇している条件でも、ARH 蛋白質発現に変動は認めな

かった。さらに、ヒト単球白血病由来細胞株(THP-1)をフォルボールエステルを用いて分化誘導させ、ARH の発現量を測定した。フォルボールエステルにより分化誘導されると、THP-1 細胞は球形の浮遊細胞からマクロファージ様の付着細胞となった。THP-1 細胞は、分化誘導刺激に対しても、ARH 蛋白質の発現量の変化を認めなかった。

ARH 蛋白質の、発現量による LDL 受容体の細胞内取り込み機能を調べるため、HepG2 細胞に ARH をトランスフェクションした。 $^3\text{H}$ CE-LDL の細胞内取り込みを測定したところ、pGL3-Control をトランスフェクションしたものととの違いを認めなかった。さらに、HepG2 に ARH を transfection し、ジェネティシンを用いて選択培養を行い、ARH stable transfectant を作製した。ARH stable transfectant においても、LDL 受容体の取り込みは、Control との違いを認めなかった。

#### 2. 高中性脂肪ウサギ脂肪組織のプロテオーム解析

それぞれのウサギから脂肪組織を採取し、二次元電気泳動を行ったところ、それぞれ約 110 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、濃さに大きな違いのあるスポットをピックアップし、そのスポットを切り出した。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。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、GIVLVAYSALGSHR のペプチドが、ウサギの 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase とマッチし、Probability Based Mowse Score が 60 (38 以上で同定と判断出来る) であった。また、TGL に多く発現しているスポットより、8 つのペプチドが annexin A2 と一致し、Probability Based Mowse Score は 108 であった。もう 1 つのスポットは、Peroxioredoxin 2 であることが 3 つのペプチドが一致し、Probability Based Mowse Score が 83 であることから、同定された。以上より、TGL と TGH の脂肪組織において、発現量に差異のある蛋白質 3 つが同定された。

#### 4. 高中性脂肪血症モデルウサギの解析

PHT 群と JW 群の体重、摂食のパターンはほぼ同様であった。PHT 群の TG 値は 0 時 (244.4 $\pm$ 37.0 mg/dl) から 6 時まで同様の値で推移し、15 時に頂値 (1134.0 $\pm$ 100.3 mg/dl) を示した後、24 時 (491.6 $\pm$ 282.0 mg/dl) には漸減した。一方、JW 群では 0 時の値 (38.0 $\pm$ 5.1 mg/dl) 以降、ほぼ同様の値で推移し、9 時 (76.0 $\pm$ 4.0 mg/dl) に頂値を認めたが、PHT 群の変動に比較して軽微なものであった。PHT の TG 値は JW に比較して 0 時には 6.4 倍、15 時には 22.4 倍、24 時には 14.7 倍と顕著に高い値を示した。CHO 値は PHT 群の 0 時 (58.6 $\pm$ 13.9 mg/dl) 以降、6 時から値が増加し、18 時に頂

値 (116.8 $\pm$ 13.9 mg/dl) を示した後、24 時には 0 時とほぼ同様の値 (66.4 $\pm$ 26.7 mg/dl) に戻った。一方、JW 群の CHO 値は 0 時の値 (15.2 $\pm$ 4.2 mg/dl) から 24 時の値 (14.0 $\pm$ 3.9 mg/dl) まで変動を認めなかった。PHT の CHO 変動は TG の変動に酷似していた。血糖値は 2 群とも 0 時から 24 時までほぼ同様な値で推移したのに対し、血中インスリン値は、PHT 群が JW 群に比較して約 2.5 倍から 8 倍の顕著な高値を示した。

#### 6. ABCA1 とその近縁関連遺伝子の機能と反応機構の研究

##### 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転写レベルで発現増加が起こる。この結果コレステロールエステル化酵素 ACAT の阻害による ABCA1 の発現増加を昨年引き続き検証した。ACAT 阻害剤に加え、ACAT 遺伝子の欠損によっても ABCA1 遺伝子の活性化が起こることを明らかにした (Journal of Lipid Research 45; 1943-1951, 2004)。臨床的に抗高脂血症剤として広く用いられているフィブラートによる HDL の上昇は血漿トリグリセリドの低下により CETP 反応を介して起こるが、この薬剤が ABCA1 の発現調節に直接関連するか否かを検討した。複数の株細胞で apo A-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、これはレポーターアッセイにより LXR に依存する反応と認められた (Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (2005) in press)。



## 2) ABCA1 欠損マウスの整備・確立と二重欠損マウスの準備と検討

ABCA1の生理的役割を検討するために、欠損マウスの確立を図った。Jakson Laboratory から DBA マウスを遺伝子背景にもつ ABCA1-KO マウスを得、我々の他の遺伝子改変マウスとの対照実験を容易にするためその遺伝子背景を系交代により C57Bl/6 に変更を完了した。これと非特異的細胞コレステロール搬出系の障害を持つ LCAT-KO マウスを交配し、ABCA1/LCAT 二重欠損マウスを確立して、詳細を検討中である(本年度学会発表予定)。また LDL 受容体の機能発現を制御する ARH との二重欠損マウスの確立の準備に入っている。

## 3) ABCA1 と ABCA7 による HDL 産生機構

昨年度 ABCA7 が ABCA1 と同様 HDL 新生反応を媒介できることを示した。この反応の詳細を検討中である。apoA-I と apoA-II による HDL 新生を検討し、ABCA1 によってはコレステロールに富んだ直径 13 nm の大型の HDL とコレステロールに乏しい直径 10 nm の小型の HDL が産生されるが、ABCA7 によっては後者しか産生されず、ABCA1 が細胞コレステロール搬出においてより効率的な機構を備えていることが分かった(論文投稿中)。また血漿アミロイド蛋白質 A (SAA) による HDL 新生を検討し、他のアポリポ蛋白質と同様の HDL 新生能を有することが明らかになった

## D. 考案

ARH 蛋白は、HepG2、血管内皮

細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージなどに ubiquitous に発現しており、細胞内コレステロール量、増殖、分化の刺激によっても、その発現量に変化を認めなかった。また、ARH 過剰発現下でも、LDL 受容体機能に変化はなかった。これらのことは、in vitro と in vivo での ARH 機能の違いによるものかもしれない。昨年度の成果より、LDL 受容体は、細胞内に取り込まれる時、in vivo では ARH を必要とするが、in vitro では必要としないことがわかった。今後の方向として、さらに、in vivo での ARH 発現調節機構を調べることが必要であると考えられる。

TGL と TGH の脂肪組織における蛋白質発現の網羅的解析により、3つの蛋白質が同定された。20 alpha-dehydrogenase、annexin A2、Peroxisome oxidoreductase である。これらの蛋白質と中性脂肪値、脂肪組織の量との関連をさらに解析することが必要である。

ABCA1 の遺伝子発現調節機構が明らかとなり、血中 HDL 値の調節ができるようになれば、高脂血症の新しい治療法として、非常に有意義であると考えられる。

## E. 結論

高 LDL 血症に関連する ARH 発現調節機構の解明、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ることは、新しい治療法の開発につながると考えられる。

## 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. Nakayama Y, Masuda T, Nagaishi M, Hayashi M, Ohira M, Harada-Shiba M: High performance gene delivery polymeric vector: Nano-structured cationic star polymers (Star Vectors). *Current Drug Delivery*. 2;53-57, 2005

2. Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyu H, Ishibashi S, Asada Y, Yokoyama S: Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. *Circ. Res.* 95:945-952, 2004

3. 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*. 109:526-531, 2004

4. Matsunaga T, Takasaki S, Masakane I, Okazaki M, Tomoike H. Changes in lipoprotein profile after selective LDL apheresis. *Intern Med*. 2004 Aug;43(8):760.

5. Sakata T, Mannami T, Baba S, Kokubo Y, Kario K, Okamoto A,

Kumeda K, Ohkura N, Katayama Y, Miyata T, Tomoike H, Kato H. Potential of free-form TFPI and PAI-1 to be useful markers of early atherosclerosis in a Japanese general population (the Suita Study): association with the intimal-medial thickness of carotid arteries. *Atherosclerosis*. 2004 ;176(2):355-60.

6. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*. 2004;110(6):705-12.

7. Takiuchi S, Mannami T, Miyata T, Kamide K, Tanaka C, Kokubo Y, Koyama Y, Inamoto N, Katsuya T, Iwai N, Kawano Y, Ogihara T, Tomoike H. Identification of 21 single nucleotide polymorphisms in human hepatocyte growth factor gene and association with blood pressure and carotid atherosclerosis in the Japanese population. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):301-7.

8. Miyamoto T, Takeishi Y, Tazawa S, Inoue M, Aoyama T, Takahashi H, Arimoto T, Shishido

- T, Tomoike H, Kubota I. Fatty acid metabolism assessed by 125I-iodophenyl 9-methylpentadecanoic acid (9MPA) and expression of fatty acid utilization enzymes in volume-overloaded hearts. *Eur J Clin Invest.* 2004;34(3):176-81.
9. 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 J, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M, Hori M. Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet.* 2004;36(2):123-30.
10. 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(12):1487-501.
11. 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.
11. Shimoda T, Ishihata A, Ito T, Owada K, Aita T, Kaga M, Katano Y. Progression of Atherosclerosis and Femoral Arterial Blood Pressure In Heritable Hypertriglyceridemic Rabbits. *Yamagata Med J,* 23(1), 23-32, 2005
12. 伊藤恒賢, 大和田一雄, 友池仁暢: 実験技術; 食後高トリグリセリド血症 (PHT) 家兎の開発経緯と生活習慣病モデルとしての有用性, 日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*), 125 卷 5 号, ○-○, (2005), (印刷中)
13. Cheng-Ai Wu, Tsujita M, Hayashi M, 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
14. Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I. Promoter polymorphism in FGF1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 321: 320-323
15. Yamauchi Y, Catherine C. Y. Chang, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Patrick C. Reid, Ta-Yuan Chang and Yokoyama S. Intracellular Cholesterol Mobilization Involved in the ABCA1/Apolipoprotein-Mediated Assembly of High Density Lipoprotein in Fibroblasts. *J. Lipid Res.* (2004) 45: 1943-1951.
16. Ito J, Hao Li, Nagayasu Y, Alireza Kheirollah and Yokoyama S.

Apolipoprotein A-I Induces Translocation of Protein Kinase-Ca to a Cytosolic Lipid-Protein Particle in Astrocytes. *J. Lipid Res.* (2004) 45: 2269-2276.

17. Tsujita M, Cheng-Ai Wu, Abe-Dohmae S, Usui S, Okazaki M, and Yokoyama S. On the Hepatic Mechanism of HDL Assembly by the ABCA1/ApoA-I Pathway. *J. Lipid Res.* (2005) 46: 154-162.

18. Ito J, Nagayasu Y, Rui Lu, Alireza Kheirollah, Hayashi M and Yokoyama Y. 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.

19. Yokoyama S. 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. *Atherosclerosis* in press.

20. Arakawa R, Tamehiro N, Nishimaki-Mogami T, Ueda K and Yokoyama S. 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.

## 2. 学会発表

### 国内学会

1. 斯波真理子、横山信治、吉政康直、山本章：Target LDL-cholesterol levels in familial hypercholesterolemia for prevention of cardiovascular events (横浜)、日本循環器学会、一般演題

2. 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、神野桂子、前田律子、丸塚浩助、浅田祐士郎、野牛宏明、石橋俊、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(福岡)、一般演題

3. 前田律子、斯波真理子、伊藤恒賢、大和田一雄、安部映里、大平望都、神野桂子、桑原大幹、南野直人、友池仁暢：高中性脂肪血症モデルウサギのプロテオーム解析、日本動脈硬化学会第36回総会(福岡)、一般演題

4. 大平望都、神野桂子、安部映里、前田律子、宮田完二郎、片岡一則、斯波真理子：架橋ミセルの遺伝子導入ベクターとしての評価、遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム、一般演題

5. 中山泰秀、舛田健、笥千聡、林美智子、斯波真理子、大平望都：合成高分子ベクターのナノ分子骨格の最適設計：スター型高分子の分子設計と持続的遺伝子発現、遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム、

6. 南雲彩子、槇野久士、宮本恵宏、斯波真理子、吉政康直：Obesity and Insulin Resistance Possibly Promotes Ischemic Heart Disease of the Patients with Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL). (横浜)、日本循環器学会、一般演題

7. 南雲彩子、槇野久士、伊藤康樹、平野勉、吉政康直、斯波真理子：LDL-ア

フェレシスによる small dense LDL の除去率について関西アフェレシス学会(広島)、一般演題

8. 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)のインスリン抵抗性, (2004), 日本実験動物科学・技術ながさき 2004 第 38 回日本実験動物技術者協会総会講演要旨集, 長崎市, 329-329, 平成 16 年 5 月 21 日

9. 伊藤恒賢, 秦 正充, 三ツ口陽子, 大和田一雄, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎(PHT)の平時 TG 値, (2004), 日本実験動物技術者協会平成 16 年度奥羽・東北支部合同勉強会講演要旨集, 仙台市, 15-16, 平成 16 年 11 月 27 日

のリスクの診断法

発明者: 小久保 喜弘、岡山 明、  
宮田 敏行、友池 仁暢、神出 計、  
河野 雄平

出願番号:特願 2004-255361

4. 発明の名称: GPR91,99 の遺伝子多型を利用した動脈硬化診断

発明者: 小久保 喜弘、岡山 明、  
宮田 敏行、友池 仁暢、神出 計、  
河野 雄平

出願番号:特願 2005-036011

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. 発明の名称: アポリポプロテイン A5 遺伝子多型のハプロタイプを利用した高脂血症の発症リスクの予測法

発明者: 小久保 喜弘、宮田 敏行、  
友池 仁暢

出願番号:特願 2004-30265

2. 発明の名称: 遺伝子多型と生活習慣との組み合わせを利用した動脈硬化症のリスクの診断法

発明者: 小久保 喜弘、岡山 明、  
宮田 敏行、友池 仁暢、神出 計、  
河野 雄平

出願番号:特願 2004-255405

3. 発明の名称: 遺伝子多型と生活習慣との組み合わせを利用した高血圧症

厚生労働科学研究費補助金（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：  
ARH 蛋白の発現調節機構と LDL 受容体機能の関連

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

Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) 蛋白質は、LDL 受容体のアダプター蛋白であると考えられており、その N 末端に、LDL 受容体の NPXY 部位に結合する PTB ドメインを有する。さらに、ARH はクラスリン結合部位、AP2 結合部位を持ち、LDL 受容体とともに、endocytic machinery を形成して、LDL 受容体の細胞内取り込みに関わっていると考えられている。我々は、現在までに ARH 患者の遺伝子解析、ARH ノックアウトマウスの作製、解析を行ってきた。ARH ノックアウトマウスのホモ接合体 (ARH<sup>-/-</sup>) は高コレステロール血症を呈し、LDL ターンオーバースタディの遅延を認めること、初代培養肝細胞では ARH<sup>-/-</sup> において <sup>125</sup>I-LDL および DiI-LDL は ARH<sup>+/+</sup> の正常な取り込みを認めることを報告した。今回我々は、ARH の機能を知るため、培養細胞における ARH の発現調節機構を調べた。また ARH と LDL 受容体の相互関係を知るため、ARH 過剰発現による細胞内への LDL 受容体取り込みへの影響を調べた。皮膚線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、ヒト単球白血病由来細胞株 (THP-1 細胞) および HepG2 において、ARH は発現しており、その発現は、LDL の存在、マクロファージの分化、細胞増殖などの細胞の状態により、調節を受けないこと、また、ARH 過剰発現によっても LDL 受容体の細胞内取り込み能に影響しないことがわかった。これらのことから、ARH は in vitro では発現は一定であること、また、その発現量の増減によっては、LDL 受容体の機能に影響しないことが明らかとなった。これらのことは、ARH 患者の皮膚線維芽細胞において、LDL 受容体の取り込みが正常であることと符合する。

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

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

ARH 蛋白は、308 個のアミノ酸からなる蛋白質であり、分子内に phosphotyrosine 結合(PTB)ドメイン、クラスリン結合部位、AP2 結合部位を持っている。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、受容体の細胞内取り込みに関わっていると考えられており、ARH の場合、LDL 受容体の NPXY 部位に結合する。ARH は、LDL 受容体、クラスリン、AP2 とともに、endocytic machinery を形成して、LDL 受容体の細胞内取り込みに関わっていると考えられている。LDL 受容体の NPXY 部位

の点変異により、LDL 受容体欠損症である家族性高コレステロール血症(FH)を発症すること、ARH 患者において FH と同様の症状を呈することからも、この endocytic machinery の形成が LDL 受容体の細胞内取り込みにおいて重要であることが示唆される。

我々は、昨年度の本研究の成果で、ARH ノックアウトマウスにおいて、高コレステロール血症、in vivo では LDL のターンオーバーの遅延、肝臓での LDL の取り込みの低下を認めたが、初代培養肝細胞においては、LDL の細胞内取り込み、分解が正常であることを報告した。LDL 受容体は、細胞内に取り込まれる際、in vivo では ARH を必要とするが、in vitro では必要としないということである。これらのことは、ARH 患者は FH と同様の高コレステロール血症を呈するが、培養皮膚線維芽細胞において、LDL 結合、取り込み、分解能が正常である事実とも良く符合する。

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、培養細胞における ARH の発現調節機構を調べた。また、ARH 過剰発現下に、LDL 受容体の細胞内取り込み能を測定し、興味ある結果を得た。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

皮膚線維芽細胞、血管平滑筋細胞、Cos-1 細胞、ヒト単球白血病由来細胞株 (THP-1) 細胞、血管内皮細胞を 37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下に培養し、実験に供し

た。THP-1 細胞の分化は、50 ng/ml のフォルボールエステル存在下に 2 日間培養した。

## 2. LDL および LPDS の調整

プールされた健常人の血清を超遠心分離し、LDL (1.019<d<1.063 g/ml)、LPDS (d>1.240)の分画を採取し、0.15 M NaCl、0.3 mM EDTA 中で透析の後を使用した。

## 3. ARH 抗体

ARH 抗体は、ヒト ARH 蛋白 C 末端 16 アミノ酸残基の合成ペプチドに対する抗体を用いた。

## 4. ARH 遺伝子のトランスフェクション

ヒト ARH 遺伝子を発現ベクター(p hCMV-1)に挿入し、ARH 発現ベクター-(phCMV-ARH)とした。Cos-1 細胞、HepG2 細胞に Exgen 500 を用いて ARH をトランスフェクションした。

## 5. ARH stable transfectant の作製

Cos-1 細胞および HepG2 細胞に Exgen 500 を用いて ARH をトランスフェクションし、ジェネティシンを用いて選択培養を行った。

## 6. ARH の Western blotting

前処置した培養細胞を PBS を用いて洗浄後、ポリスマンを用いてかきとり、-70℃中に保存した。凍結保存された細胞を細胞溶解液 (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, DMSO 2.2%, 10% Triton) に溶解し、蛋白を定量した。10 μg を 10% SDS-PAGE にて分離、メンブレン (Trans-Blot, Bio-Rad) にトランスファーした。抗ヒト ARH 抗体、ECL 法を用いて ARH を検出した。

## 7. LDL の標識

[<sup>3</sup>H]Cholesteryl oleoyl ether を PBS 存在下にソニケーションし、をさらに LPDS を加え 37℃に 1 晩反応した。LDL 分画を Liposorber カラムを用いて精製し、[<sup>3</sup>H]Cholesteryl oleoyl ether (CE)-LDL とした。

## 8. LDL 受容体の細胞内取り込み測定

[<sup>3</sup>H]CE-LDL 存在下に細胞を 3 時間培養し、2 mg/ml BSA を含む Tris buffer および Tris buffer による洗浄後、10mg/ml Heparin 存在下に LDL を release させた。細胞に 1 ml の Hexan/Isopropanol(=3/2)を加えて、脂質分画を抽出し、窒素ガスにより乾燥後、液体シンチレーター中に溶解してカウントした。

(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、動物愛護に配慮する。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. 培養細胞における ARH 蛋白質発現

サル腎臓細胞である Cos-1 細胞では、抗ヒト ARH 抗体で検出できる蛋白質を認めなかった。ARH をトランスフェクションした Cos-1 細胞では、ARH 蛋白質の発現を認めた。血管内皮細胞、平滑筋細胞、THP-1 細胞 (未分化な浮遊細胞の状態) で ARH の発現を認めた (図 1)。



健常人皮膚線維芽細胞を 2 日間、10% FCS、10% LPDS、10% LPDS+100  $\mu$ g/dl LDL 存在下に培養し、ウェスタンブロットティングを行ったところ、発現に変化を認めなかった(図 2)。

血管内皮細胞を用い、ヒドロキシ尿素存在下、あるいは 0.2%BSA 存在下という細胞増殖抑制した条件でも、ARH 蛋白の発現に大きな変動は認めなかった(図 3)。また、メバスタチン存在下に、コレステロール合成抑制、LDL 受容体活性が上昇している条件でも、ARH 蛋白発現に変動は認めなかった (図 3)。

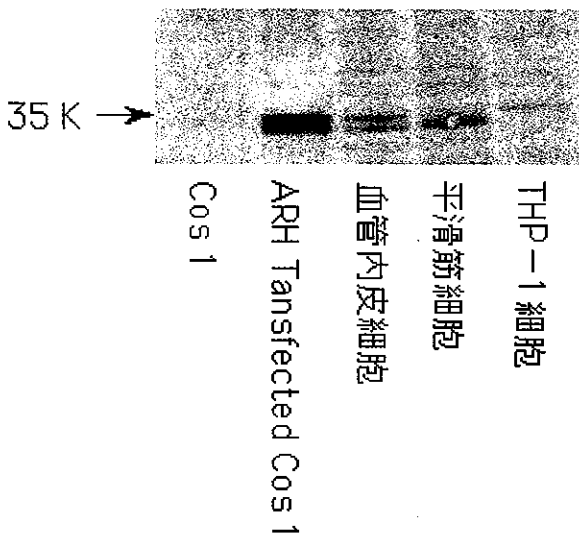


図 1. 血管内皮細胞、平滑筋細胞、ヒト単球白血病由来細胞株(THP-1)における ARH 蛋白質の発現

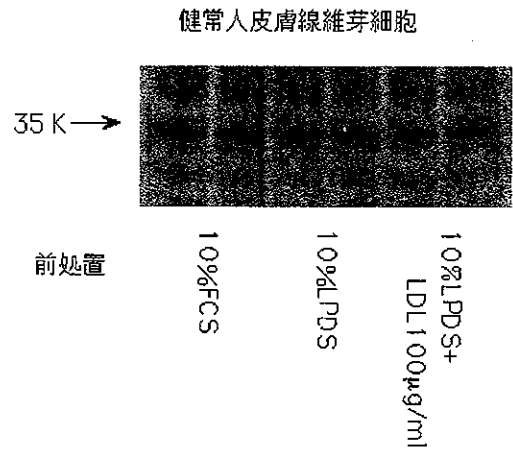


図 2. 健常人皮膚線維芽細胞における、ARH 蛋白質の発現調節機構

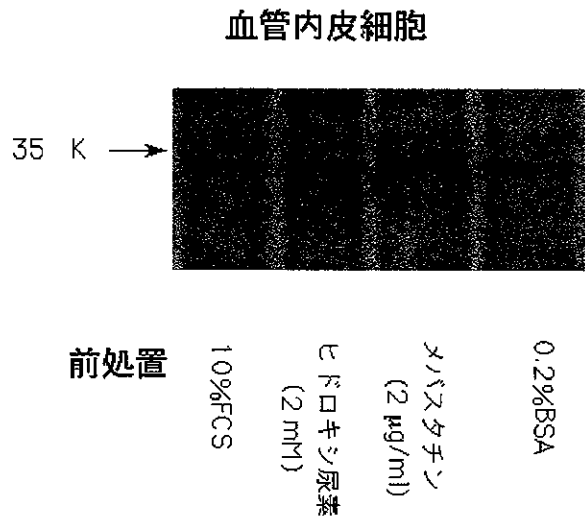


図 3. 血管内皮細胞におけるメバスタチン、ヒドロキシ尿素存在下の ARH 蛋白質の発現

血管平滑筋細胞においても、メバスタチン、ヒドロキシ尿素存在下に、ARH 蛋白質発現に変動を認めなかった (図 4)。

平滑筋細胞

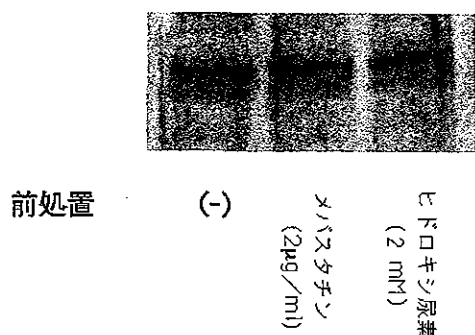


図 4. 平滑筋細胞の ARH 蛋白質発現調節機構

さらに、ヒト単球白血病由来細胞株(THP-1)をフォルボールエステルを用いて分化誘導させ、ARH の発現量を測定した。フォルボールエステルにより分化誘導されると、THP-1 細胞は球形の浮遊細胞からマクロファージ様の付着細胞となった。



図 5. THP-1 細胞の分化誘導に伴う ARH 蛋白質発現調節

THP-1 細胞は、分化誘導刺激に対しても、ARH 蛋白質の発現量の変化を認めなかった (図 5)。

ARH 蛋白質の、発現量による LDL 受容体の細胞内取り込み機能を調べるため、HepG2 細胞に ARH をトランスフェクションし、<sup>3</sup>H]CE-LDL の細胞内

取り込みを測定したところ、pGL3-Control をトランスフェクションしたものとの違いを認めなかった (図 6)。

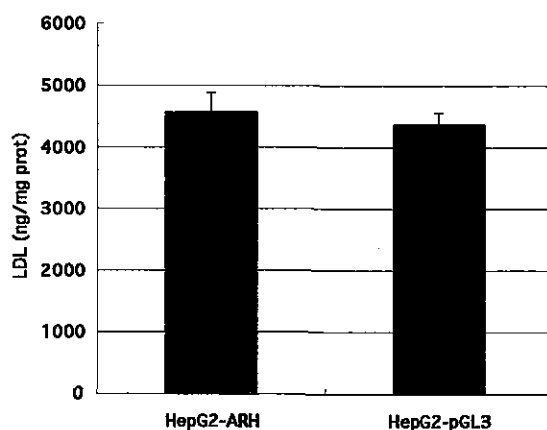


図 6. ARH 強制発現による、LDL 受容体の細胞内取り込みへの影響

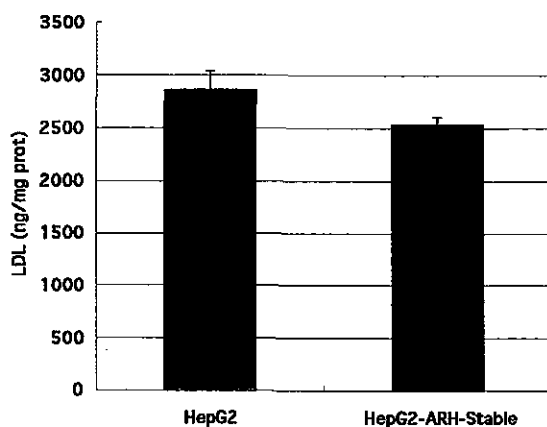


図 7. ARH stable transfectant の LDL 受容体取り込み能

さらに、HepG2 に ARH を transfection し、ジェネティシンを用いて選択培養を行い、ARH stable transfectant を作製した。ARH stable transfectant においても、LDL 受容体の取り込みは、Control との違いを認めなかった。

## D. 考案

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ている。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。LDL 受容体は、プロモーター領域に SRE(sterol regulatory element)を持ち、細胞内コレステロール量による制御を受ける。また、LDL 受容体は、細胞増殖刺激により up regulation され、マクロファージの分化にともない down regulation される。しかしながら、ARH は、細胞増殖刺激、LPD S 存在下、マクロファージ分化により発現調節をうけていないことがわかった。また、ARH の強制発現下においても、LDL 受容体取り込み能は変化を認めなかった。これらのことから、ARH に関し 2 つの可能性が存在する。ARH が細胞内コレステロール量、増殖状態などに影響されずに一定である可能性と in vitro では影響されないが、in vivo では影響される可能性である。ARH ノックアウトマウスのホモ接合体において、in vivo の肝臓では LDL を取り込むことはできないが、初代培養肝細胞においては、LDL を取り込むことができることが、昨年度の本研究の研究結果でわかった。このことは、in vitro では ARH の発現調節をうけていなくても、in vivo ではうける可能性があることを示唆している。

## E. 結論

ARH 蛋白は、in vitro においては、

細胞内コレステロール量、細胞増殖刺激、マクロファージの分化状態によっては、発現調節をうけないことがわかった。

## 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. Nakayama Y, Masuda T, Nagaishi M, Hayashi M, Ohira M, Harada-Shiba M: High performance gene delivery polymeric vector: Nano-structured cationic star polymers (Star Vectors). *Current Drug Delivery*. 2;53-57, 2005
2. Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyū H, Ishibashi S, Asada Y, Yokoyama S: Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. *Circ. Res.* 95:945-952, 2004
3. 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*. 109:526-531, 2004

## 2. 学会発表 国内学会

1. 斯波真理子、横山信治、吉政康直、山本章：Target LDL-cholesterol levels in familial hypercholesterolemia for prevention of cardiovascular events (横浜)、日本循環器学会、一般演題
2. 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、神野桂子、前田律子、丸塚浩助、浅田祐士郎、野牛宏明、石橋俊、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(福岡)、一般演題
3. 前田律子、斯波真理子、伊藤恒賢、大和田一雄、安部映里、大平望都、神野桂子、桑原大幹、南野直人、友池仁暢：高中性脂肪血症モデルウサギのプロテオーム解析、日本動脈硬化学会第36回総会(福岡)、一般演題
4. 大平望都、神野桂子、安部映里、前田律子、宮田完二郎、片岡一則、斯波真理子：架橋ミセルの遺伝子導入ベクターとしての評価、遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム、一般演題
5. 中山泰秀、舛田健、笥千聡、林美智子、斯波真理子、大平望都：合成高分子ベクターのナノ分子骨格の最適設計：スター型高分子の分子設計と持続的遺伝子発現、遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム、
6. 南雲彩子、榎野久士、宮本恵宏、斯波真理子、吉政康直：Obesity and Insulin Resistance Possibly Promotes Ischemic Heart Disease of the Patients with Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL). (横浜)、日本循環器学会、一般演題
7. 南雲彩子、榎野久士、伊藤康樹、平野勉、吉政康直、斯波真理子：LDL-アフェレシスによるsmall dense LDLの

除去率について関西アフェレシス学会(広島)、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