

200501175A

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17年度 総括・分担研究報告書

平成18(2006)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17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： ----- 8

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： -----14

高中性脂肪血症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. 食後高トリグリセリド血症（PHT）家兎における

TG分解に関する基礎的検討： -----19

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： -----23

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 -----27

IV.研究成果の刊行物・別刷 -----29

生活習慣病に関わる新規遺伝子の検索と機能解析

主任研究者 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、動脈硬化性疾患の危険因子であり、中でも高 LDL 血症、高中性脂肪血症、低 HDL 血症は、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、ARH の遺伝子の発現調節機構について、マウスに対し、高脂肪食負荷、およびアトルバスタチン負荷を行い、肝臓でのコレステロールに関わる遺伝子および ARH の遺伝子発現を検討した。ARH 遺伝子は、高脂肪食負荷により発現が促進され、アトルバスタチンにより、発現に変化を認めなかった。これらのことから、ARH は、その発現調節機構が、LDL 受容体や HMGCoA reductase とは異なることが明らかになった。高中性脂肪血症については、高中性脂肪血症ウサギラインの病態解析と、臓器の発現蛋白質のプロテオーム解析を行い、高中性脂肪血症の病態に関与すると考えられる蛋白質の同定に成功した。さらに、食後高中性脂肪血症のラインも確立して、その病態がヒトのメタボリックシンドロームの病態に酷似しており、メタボリックシンドロームのモデル動物として有用であることが示された。低 HDL 血症については、HDL 産生の key molecule である ABCA1 遺伝子の発現調節機構の解明し、ノックアウトマウスの作製を行った。本年度の研究成果より、ARH の新しい遺伝子発現制御機構が明らかになり、高中性脂肪に関わる新しい分子が検出され、ABCA1 の発現調節機構が明らかになった。

【研究組織】

○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）  
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 教務職員）  
横山信治（名古屋市立大学大学院  
医学研究科 教授）

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。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。

A. 研究目的

リポ蛋白質代謝異常は、動脈硬化性疾患の危

高 LDL 血症については LDL 受容体のアダプ

ター蛋白である Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) 遺伝子の発現調節機構、高中性脂肪血症に関しては、食後高中性脂肪血症モデルウサギの病態解析と病因、病態にかかわる遺伝子の探索、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て解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. ARH の遺伝子発現調節機構の解析

高脂肪食およびアトルバスタチン負荷マウス肝臓での、ARH 遺伝子発現制御機構の解析を、RT-PCR を用いて行った。

### 2. 高中性脂肪血症モデルウサギの解析

高中性脂肪血症モデルウサギをライン化して、その病態解析を行った。さらに、肝臓、内臓脂肪、血液を採取して、プロテオーム解析を行った。

### 3. 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-KO マウスと LCAT-KO および ARH-KO とのダブル KO 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 新生反応を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に際しては、動物愛護上の配慮を充分に行い、各研究施設の実験動物委員会の指針に基づいて行った。

## C and D. 研究結果および考察

### 1. ARH 遺伝子の発現調節機構

マウスに高脂肪食負荷を 4 週間行ったところ、総コレステロール値は 133% の増加を認め、LDL-コレステロール値は 285% の増加を認めた。高脂肪食負荷 4 週間後およびコントロールマウスの肝臓での遺伝子発現を、RT-PCR を用いて検

討した。HMGCoA reductase および LDL 受容体の遺伝子発現を定量した。高脂肪食負荷により LDL 受容体および HMGCoA reductase の遺伝子発現は、31% および 42% の減少を認めた。このような、外因性コレステロール負荷の条件下での ARH 遺伝子発現を調べたところ、ARH 遺伝子の発現は、有意な増加を認めた。以上のことから、外因性の脂肪負荷により、ARH 遺伝子発現が促進されること、この制御機構は、HMGCoA reductase や LDL 受容体遺伝子とは異なることが示された。高脂肪食負荷時に、どのような機構で ARH 遺伝子発現が促進されるかは、明らかではなく、今後の課題である。

コレステロール合成阻害薬であるアトルバスタチン投与下における ARH 発現の変化を検討した。アトルバスタチンを 2 週間、経口投与前後の総コレステロール値、LDL コレステロール値はともに 29% の低下を認めた。アトルバスタチン投与により、LDL 受容体遺伝子の発現が 30% 増加し、HMGCoA reductase 遺伝子の発現は 3.8 倍に増加した。この条件下に、ARH 遺伝子の発現を調べたところ、変化を認めなかった。これらのことから、ARH 遺伝子の発現調節機構は、LDL 受容体や HMGCoA reductase とは異なっていることがわかった。また、昨年研究成果により、in vitro では細胞外コレステロール量、細胞の増殖、分化にかかわらず、ARH 遺伝子の発現は一定であったことから、遺伝子発現調節機構もまた、in vitro と in vivo で異なる可能性もあることが示された。ARH 遺伝子の発現調節機構は、今後、詳しく調べる予定であり、ARH 発現を調節することによる、高コレステロール血症の治療も視野にいて、研究を継続する予定である。

### 2. 高中性脂肪血症モデルウサギの解析

PHT の食後 TG 値 (459.3mg/dl) は、JW (124.6mg/dl) 及び F1 (119.4mg/dl) と比較して顕著な高値を認めた。PHT の平時 TG 値に食事

開始 15 時を頂値 (1134.0±100.3 mg/dl) とする一峰性の反応を認めた。PHT の血糖値は対照と同様な値であったが、血中インスリン値は、対照に比較して顕著に高い値を推移した。PHT の LPL 量は対照に比較して有意に低値であった。

### 3. 高中性脂肪ウサギ脂肪組織のプロテオーム解析

遺伝的バックグラウンドが同じである高度高中性脂肪血症ウサギ(TGH)と軽度高中性脂肪血症ウサギ(TGL)の肝臓、内臓脂肪、血液を採取して二次元電気泳動を行い、それぞれ 150~220 前後のスポットが得られた。TGH、TGL のスポットの濃度差が著明であるスポットのプロテオーム解析を行った。肝臓サンプルでは Acyl-Coenzyme A dehydrogenas, short/branched chain precursor, Carboxylesterase、また内臓脂肪サンプルでは、20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, annexin A2、Peroxioredoxin が同定された。

同様に血清サンプルからはハプトグロビン、アポリポプロテイン AIV と、データベースに存在しない蛋白質が検出された。

### 4. ABCA1 転写の促進

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、フィブラートによる HDL の上昇が LXR に依存する反応であること、カルシウムチャネル拮抗剤について、ABCA1 の転写促進が認められ、これが LXR/RXR 系に依存しないことを確かめた。ApoA-I による HDL 新生反応に於けるスフィンゴミエリン搬出の補充反応から生じるジグリセリドが、PKCa 活性化を介して ABCA1 の燐酸化を行うことを示した。さらに、ABCA1 の阻害剤であるプロブコールが、ABCA1 を形質膜状で不活性化し、カルパイン分解に対しても抵抗性を与えることを明らかにした。ABCA1 の欠損マウスの確立して、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。

ABCA7 は強制発現細胞に於いて ABCA1 と同様 HDL 新生反応を媒介できること、また血漿アミロイド蛋白質 A (SAA) が HDL 新生能を有することが明らかになった。

### E. 結論

高 LDL 血症、高中性脂肪血症、低 HDL 血症に関わる遺伝子の発現調節機構、病態が明らかとなった。これらの知見に基づいて、新しい治療法を生み出す基盤となる研究成果が得られた。

### 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. 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. Umeda M, Harada-Shiba M, Uchida K, Nakayama Y. Photo-Control of the polyplexen formation between DNA and photo-cation generatable water-soluble polymers. *Current Drug Delivery*. 2005;2:207-214
3. Yamamoto A, Harada-Shiba M, Endo M, Kusakabe N, Tanioka T, Kato H, Shoji T. The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy. *Atherosclerosis. in Press*
4. Yamagishi M, Higashi-Ueda H, Sasaki H, Ogi-no H, Iihata K, Miyamoto S, Nagaya N, Tomoiike H, Sakamoto A. Sustained upregulation of inflammatory chemokine and its receptor in aneurismal and occlusive atherosclerotic disease: results from tissue

analysis with cDNA macroarray and real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction methods.

*Circ J.* 2005; 698(12):1490-1495

5. Ito T, Ohwada K, Tomoike H. A hereditary postprandial hypertriglyceridemic(PHT) rabbit model.

*Nippon Yakurigaku Zasshi.*

2005; 125(5): 301-306

6. Tasaki K, Wakabayashi I, Shishido T, Takasaka S, Takeishi Y, Kubota I, Ito T, Katano Y, Tomoike H. Diminution of angiotensin II-induced contraction of the abdominal aorta isolated from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

*J Smooth Muscle Res.*

2005; 41(2):87-97

7. Tanaka C, Mannami T, Kamide K, Takiuchi S, Kokubo Y, Katsuya T, Kawano Y, Miyata T, Ogi-hata T, Tomoike H. Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene associated with blood pressure and atherosclerosis in Japanese general population.

*Hypertens Res.*2005; 28(1):35-41

8. Kokubo Y, Iwai N, Tago N, Inamoto N, Okayama A, Yamawaki H, Naraba H, Tomoike H. Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population—the Suita Study.

*Circ J.* 2005; 69(2):879-888

9. Shimoda T, Ishihata A, Aita T, Kaga M, Ito T, Ohwada K, Tomoike H, Katano Y. Progression of severe atherosclerosis and increased arterial pulse pressure in the newly developed heritable mixed hyperlipidaemic rabbits.

*Clin Exp Pharmacol Physiol.*

2006; 33(3):221-226

10. 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.* 2005; 23(1):23-32

11. Tsujita M, Cheng-Ai Wu, Abe-Dohmae S, Usui S, Okazaki M, Yokoyama S. On the Hepatic Mechanism of HDL Assembly by the ABCA1/ApoA-I Pathway.

*J. Lipid Res.* 2005; 46: 154-162

12. Ito J, Nagayasu Y, Rui Lu, Alireza Kheirollah, Hayashi M, Yokoyama S. Astrocytes produce and secrete fibroblast growth factor-1 which promotes production of apoE-high density lipoprotein in a manner of autocrine action.

*J. Lipid Res.* 2005; 46: 679-989

13. Arakawa R, Tamehiro N, Nishimaki-Mogami T, Ueda K, Yokoyama S. Fenofibrate, an active form of fenofibrate, increases apoA1-mediated HDL biogenesis by enhancing transcription of ABCA1 gene in an LXR-dependent manner.

*Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*

2005; 25: 1193-1197

14. Yokoyama S. Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway,

*Current Opinion in Lipidology.*

2005; 16: 269-279

15. Hayashi M, Abe-Dohmae S, Okazaki M, Ueda K, Yokoyama S. Heterogeneity of high density lipoprotein generated by ABCA1 and ABCA7

*J. Lipid Res.* 2005; 46: 1703-1711

16. Yokoyama S. Assembly of high density lipoprotein.

*Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*

2006; 26: 20-27

17. Dohmae S, Ueda K, Yokoyama S. ABCA7, a molecule with unknown function.

*FEBS Letters. in press*

18. Ito J, Alireza Kheirollah, Nagayasu Y, Rui Lu, Kato K, Yokoyama S. Apolipoprotein A-I increases association of cytosolic cholesterol and

caveolin-1 with microtubule-cytoskeletons in rat astrocytes.

*J. Neurochem. in press*

## 2. 学会発表

1. 南雲彩子、榎野久士、宮本恵宏、岡田定規、吉政康直、斯波真理子：LDL-アフェレシスを行いながら、妊娠、出産を行ったFHホモ接合体2例について、日本アフェレシス学会関西地方会(2005年12月)
2. 斯波真理子、横山信治、都島基夫、山崎卓、山本章、高木敦子、吉政康直、友池仁暢：家族性高コレステロール血症(FH)とAutosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) の臨床像、第37回日本動脈硬化学会シンポジウム(2005年7月東京)
3. 安部映里、高木敦子、大平望都、神野桂子、前田律子、斯波真理子：in vitroにおけるLDL受容体の細胞内取り込み機構のARH依存性について-in vivoとの差異-、第37回日本動脈硬化学会、一般演題(2005年7月東京)
4. 大平望都、斯波真理子、安部映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則：PEG-DETによるin vitroおよびin vivoの遺伝子導入の試み、第37回日本動脈硬化学会、一般演題(2005年7月東京)
5. 斯波真理子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、片岡一則：Enhanced in vivo gene expression using PEG-DET、The 6th International Conference on Intelligent Materials and Systems(2005年7月東京)
6. 斯波真理子：循環器病に対する遺伝子治療への試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム(2005年5月東京)
7. 大平望都、斯波真理子、安部映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則：PEG-DETによるin vitroおよび in vivoの遺伝子導入の試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム、一般演題(2005年5月東京)
8. 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、一般演題(2004年7月福岡)
9. 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：高中性脂肪血症ウサギの内臓脂肪組織および血清のプロテオーム解析、日本動脈硬化学会第38回総会、一般演題(2006年7月東京)
10. Harada-Shiba M, Minamino N, Kuwahara H, Ito T, Maeda R, Ohira M, Abe E, Jinno K, Tomoike H: Proteome analysis of hypertriglyceridemic rabbits. XIV International symposium on Atherosclerosis (Rome, Italy, June 18-22, 2006 - Roma)
11. 下田智子、會田智美、利 美賀子、友池仁暢、伊藤恒賢、大和田一雄、石幡 明、片野由美：遺伝性高中性脂肪血症家兎における循環動態および加齢変化 (Effects of aging and elevated level of plasma triglyceride on blood), (2005), 第78回日本薬理学会年会講演要旨集、182-182(2005年3月22日横浜)
12. 伊藤恒賢：食後高トリグリセリド血症家兎の開発と有用性、(2005), 日本実験動物技術者協会東北支部、特別講演(2005年4月9日福島市)
13. 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(PHT)家兎におけるTG産生と分解に関する基礎的検討、(2005), 第52回日本実験動物学会総会、122-122(2005年5月20日東京)
14. 三ツ口陽子、伊藤恒賢、大和田一雄：当施設で開発した遺伝性高TG血症家兎(TGH)の病理組織学的基本特性の検索、(2005), 第52回日本実験動物学会総会、188-188(2005年5月20日東京)



15. Tsunekata Ito, Kazuo Ohwada, Hitonobu Tomoike: A hereditary postprandial hypertriglyceridemic (PHT) rabbit model. The 1st International Conference on Transgenic Rabbits, Tsukuba, Japan, June 18, 8-8, 2005
16. 伊藤恒賢, 秦 正充, 三ツ口陽子, 大和田一雄, 斯波真理子, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎 (PHT) の平時における血中脂質とインスリン動態, (2005), 第39回日本実験動物技術者協会総会, 113-113 (2005年6月25日金沢市)
17. 秦 正充, 伊藤恒賢, 大和田一雄, 斯波真理子, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎(PHT)の食後におけるアポ蛋白プロファイル, (2005), 第39回日本実験動物技術者協会総会, 114-114 (2005年6月25日金沢市)
18. 三ツ口陽子, 伊藤恒賢, 大和田一雄, 斯波真理子, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎(PHT)の基本的病理組織像の特性検索, (2005), 第39回日本実験動物技術者協会総会, 110-110 (2005年6月25日金沢市)
19. 辻田麻紀, 奥平桂一郎, 呉成愛, 堂前純子, 横山信治: 血管壁内細胞からのアポリポ蛋白質による特異的脂質搬出機構, 第37回日本動脈硬化学会, シンポジウム (2005年7月14-15日東京)
20. 岩本紀之, 堂前純子, 胡魏, 林弥智, 植田和光, 横山信治: ABCA1-KO及び野生型マウスにおけるABCA7発現分布の解析, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
21. Anwar Hossain, 辻田麻紀, 横山信治: LCAT/ABCA1欠損マウスにおける細胞コレステロールの恒常性の検討, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
22. 為広紀正, 佐藤陽治, 浅川義範, 橋本敏弘, 大野泰雄, 井上和秀, 横山信治, 最上知子: HDL新生を促進するLXR $\alpha$ 選択的アゴニストRiccardin Cの発見, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
23. 辻田麻紀, 鶴川眞也, Anwar HOssain, 島田昌一, 横山信治: 低HDL血症マウス舌におけるコレステロール受容体の検討, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
24. 堂前純子, 胡魏, 石神秀昭, 岩本紀之, 公文義雄, 岡崎三代, 呉成愛, 辻田麻紀, 植田和光, 横山信治: SAAによるHDL新生反応, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
25. 胡魏, 堂前純子, 辻田麻紀, 公文義雄, 横山信治: SAA含有HDL産生メカニズムとABCA1, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
26. 林弥智, 堂前純子, 岡崎三代, 植田和光, 横山信治: Heterogeneity of HDL Generated by ABCA1 and ABCA7, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
27. 荒川礼二郎, 為広紀正, 最上知子, 植田和光, 横山信治: Fenofibrate のHDL上昇作用に関する検討—細胞内ABCA1発現に及ぼす作用, 第37回日本動脈硬化学会, 一般演題 (2005年7月14-15日東京)
28. 伊藤仁一, 長安祐子, Alireza Kheirollah, 横山信治: Apolipoprotein A-I Increased Association of Cytosolic Cholesterol with Microtubules in Rat Astrocytes, 第48回日本神経化学会, ミニシンポジウム (2005年9月28-30日, 福岡)
29. 辻田麻紀, 鶴川眞也, Anwar Hossain, 島田昌一, 横山信治: 低コレステロール血症マウス味蕾細胞でのコレステロール受容体の検討, 第78回日本生化学会, 一般演題 (2005年10月13-16日, 神戸)
30. 伊藤仁一, 長安祐子, Alireza Kheirollah, 呂銳, 横山信治: アポリポ蛋白質A-I誘導性細胞内コレステロール輸送促進に於ける微小管の役割, 第78回日本生化学会, 一般演題 (2005年10月13-16日, 神戸)

31. Alireza Kheirollah, 伊藤仁一、長安祐子、横山信治 : ApoA-I-Induced Intracellular Cholesterol Trafficking is suppressed by CsA Through Interaction with PP2B、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
32. 呂鋭、伊藤仁一、横山信治 : Apolipoprotein A-I Stimulates Tubulin Phosphorylation by Cytosolic Caveolin-1 and Microtubule-Associated Protein Kinase C、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
33. 堂前純子、胡魏、石神秀昭、岩本紀之、公文義雄、岡崎三代、呉成愛、辻田麻紀、植田和光、横山信治 : Serum Amyloid A による ABCA1/ABCA7依存性HDL新生、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
34. 為広紀正、河原陽介、吉田武美、植田和光、横山信治、最上知子 : Verapamilによる ABCA1遺伝子の活性化機構、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
35. Anwar Hossain、辻田麻紀、横山信治 : ABCA1/LCAT両蛋白欠損マウスのコレステロール平衡の検討、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
36. 岩本紀之、胡魏、林弥智、植田和光、横山信治 : 野生型およびABCA1-KOマウスにおけるABCA7の組織発現分布とコレステロール負荷による変化、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
37. 胡魏、堂前純子、公文義雄、辻田麻紀、横山信治 : ABCA1によるSAA含有HDLの産生、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
38. 西田智、伊藤仁一、長安祐子、横山信治 : 参加ストレスに対するFGF-1/apoEを介した脳保護機構、第78回日本生化学会、一般演題 (2005年10月13-16日、神戸)
39. Maki Tsujita、Kei-ichiro Okuhira、Shinji

- Yokoyama : Apolipoprotein A-I Dissociates From HDL and Reacts with ABCA1 Protein to Generate HDL Particles、FEBS Special Meeting "ABC2006-ATP Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multi Drug Resistance to Genetic Disease"、Oral Session (2006年3月4-10日、Innsbruck)
40. Noriyuki Iwamoto、Sumiko Abe-Dohmae、Ryuichiro Sato、Shinji Yokoyama : ATP-Binding Cassette Transporter A7 is Negatively Regulated by Cholesterol and Needed to Promote Phagocytosis through the Sterol Responsive/Regulatory Element Pathway、FEBS Special Meeting "ABC2006-ATP Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multi Drug Resistance to Genetic Disease"、Poster Session (2006年3月4-10日、Innsbruck)

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

1. 発明の名称 : 染色体性劣性高コレステロール血症遺伝子における新規変異、発明者 : 斯波真理子、特許第3709438号/出願番号 : 特願2002-130779/出願人 : 国立循環器病センター総長/出願日 : 平成14年5月2日/公開番号 : 特開2003-319783/公開日 : 平成15年11月11日
2. 発明の名称 : 高コレステロール血症の疾患モデルマウス、発明者 : 斯波真理子、出願番号 : 特願2005-243938/出願人 : 国立循環器病センター総長

### 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（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

主任研究者 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。昨年度までの研究成果により、ARH ノックアウトマウスが高コレステロール血症をきたすこと、その高コレステロール血症が肝臓での LDL の取り込みの低下によるものであること、LDL 取り込み機能は、*in vivo* では ARH 依存性であるが、*in vitro* では非依存性であること、さらに、培養細胞では、ARH 蛋白の発現は細胞増殖、分化、細胞外コレステロール量には影響されずに一定であることがわかった。本年度の研究で我々は、*in vivo* での ARH の発現調節機構を調べるため、高脂肪食負荷およびアトルバスタチン投与下マウスの遺伝子発現を RT-PCR を用いて定量した。高脂肪食負荷にて血清総コレステロール値は 2 倍以上に上昇した。LDL 受容体遺伝子発現は 42% 低下、HMGCoA reductase 遺伝子は 41% 低下を認め、ARH 遺伝子発現は 30% の増加を認めた。一方、アトルバスタチン投与下では、血清総コレステロール値は 29% 低下を認めた。この条件下で、HMGCoA reductase 遺伝子の発現は 3.8 倍の上昇、LDL 受容体遺伝子の発現は 30% の上昇を認めたが、ARH の遺伝子発現は変化を認めなかった。これらのことから、ARH 遺伝子発現は、*in vitro* でほとんど調節を受けないが、*in vivo* では LDL 受容体や HMGCoA reductase とは異なった発現制御機構を持つことがわかった。本年度の研究成果より、今まで知られていなかった *in vivo* での ARH の遺伝子発現調節機構を明らかにすることができた。

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

ARH は、Autosomal Recessive Hypercholesterolemia の患者家系の positional cloning によりクローニングされた遺伝子であり、その蛋白質は 308 個のアミノ酸からなる。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 FDNPVY 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おり、ARH の場合、LDL 受容体の FDNPVY 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 受容体の細胞内取込みに関わっていると考えられている。LDL 受容体の FDNPVY 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、昨年度までの本研究事業の成果で、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 の取込みの低下を認めしたが、初代培養肝細胞においては、LDL の細胞内取込み、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。さらに、培養細胞を用いて、ARH 蛋白の発現は、細胞外のコレステロール濃度、細胞増殖、分化などに影響せず、一定であることがわかった。

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、本年度は in vivo での ARH 遺伝子発現調節機構を調べ、興味ある知見を得た。

## B. 研究方法

### 1. マウス

C57Bl/6 を繁殖し、明/暗=12 時間/12 時間のライトサイクル下、SPF 条件で飼育した。血清脂質値測定のための採血は、オーバーナイトの空腹の後、朝に行った。

### 2. RT-PCR

オーバーナイトの空腹の後、マウスにネブタールを腹腔内投与して麻酔をかけ、開腹し、上腸管膜静脈より PBS を注射して肝臓を還流したあと、肝臓組織を細切し、液体窒素中で凍結、-70°C で保存した。

肝臓組織を Trizol 中でポリトロンを用いてホモゲナイズし、1/5 量のクロロホルムを添加し、遠心した。上清をイソプロパノールを加えて遠心し、沈殿を RNA 分画とした。RNA を High capacity cDNA 逆転写して cDNA を合成した後、

TaqMan Probe と反応させ、TaqMan を用いて RNA の定量を行った。

### 3. リポ蛋白分画

リポ蛋白分画は、HPLC を用いて分画し、酵素法を用いて脂質値を定量した。

### 4. 高脂肪食負荷

マウスに高脂肪食 (F2HFD1、蛋白質 15%、脂肪 82%、炭水化物 3%、オリエンタル酵母) を 4 週間投与して採血し、さらに肝臓サンプルを得た。

### 5. アトルバスタチン投与

アトルバスタチンは、0.5%メチルセルロース懸濁液に溶解して 1.25 mg/day、ゾンデを用いて 14 日間経口投与した後、採血し、さらに肝臓サンプルを得た。

(倫理面への配慮)

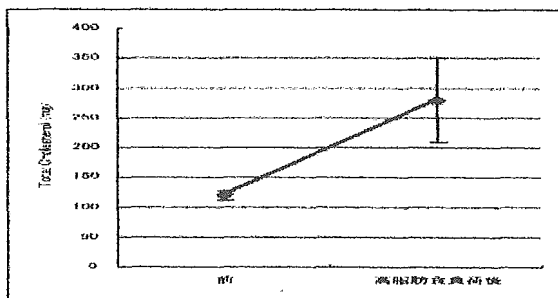
全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は動物管理施設にて一括管理されている。

## C and D. 研究結果および考察

### 1. 高脂肪食負荷

マウスに高脂肪食負荷を 4 週間行ったところ、総コレステロール値は 133% の増加を認め、LDL-コレステロール値は 285% の増加を認めた (図 1a、b)

a)



b)

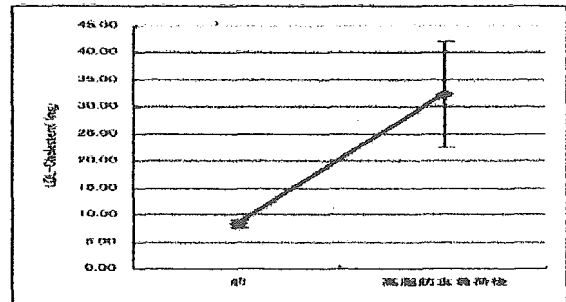
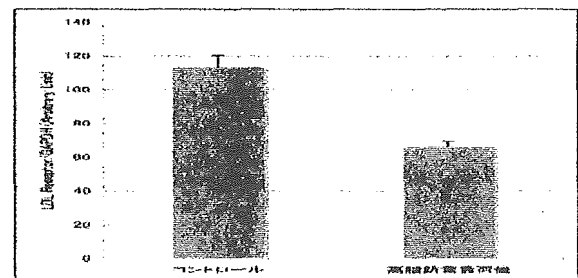


図 1. 高脂肪食負荷前後の血清総コレステロール値(a)と LDL-コレステロール値(b)

高脂肪食負荷 4 週間後およびコントロールマウスの肝臓での遺伝子発現を、RT-PCR を用いて検討した。コレステロール合成にかかわる遺伝子として、HMGCoA reductase および LDL 受容体の遺伝子発現を定量した (図 2a、b)。高脂肪食負荷により LDL 受容体および HMGCoA reductase の遺伝子発現は、31% および 42% の減少を認め、それぞれ有意差を持っていた。高脂肪食負荷により、肝臓へのコレステロールの供給が高度に行われ、細胞内の遊離コレステロールが増加して、SREBP が HMGCoA reductase および LDL 受容体遺伝子の上流域に存在する SRE 部位に結合して、遺伝子発現が低下したと考えられる。

a)



b)

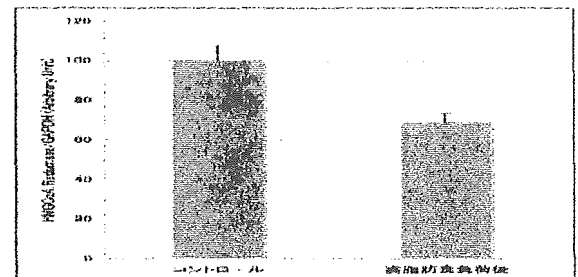


図 2. 高脂肪食負荷後の LDL 受容体(a)および HMGCoA reductase(b)の遺伝子発現

このような、外因性コレステロール負荷の条件下での ARH 遺伝子発現を調べたところ、ARH 遺伝子の発現は、有意な増加を認めた(図 3)。

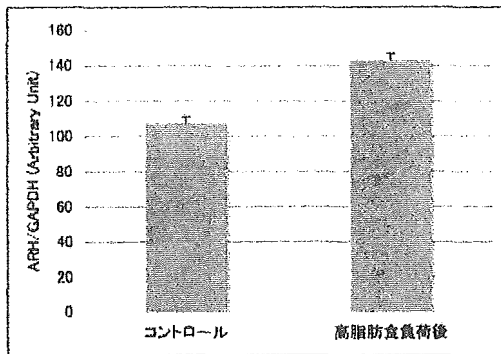


図 3. 高脂肪食負荷後の ARH 遺伝子発現

以上のことから、外因性の脂肪負荷により、ARH 遺伝子発現が促進されること、この制御機構は、HMGCoA reductase や LDL 受容体遺伝子とは異なることが示された。高脂肪食負荷時に、どのような機構で ARH 遺伝子発現が促進されるかは、明らかではなく、今後の課題である。

## 2. アトルバスタチン負荷

コレステロール合成阻害薬であるアトルバスタチン投与下における ARH 発現の変化を検討した。アトルバスタチンを 2 週間、経口投与前後の総コレステロール値、LDL コレステロール値を

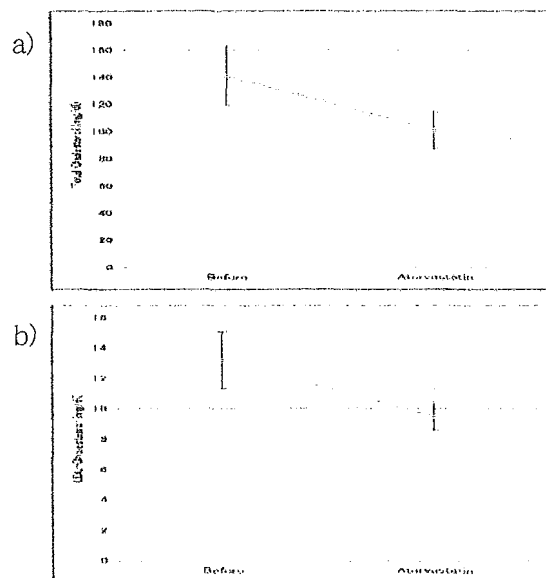


図 4. アトルバスタチン投与前後の総コレステロール値(a)、および LDL-コレステロール値(b)

アトルバスタチン投与により、血清総コレステロール値、LDL-コレステロール値はともに 29% の低下を認めた。アトルバスタチン投与下の LDL 受容体および HMGCoA reductase 遺伝子の発現を図 5a、b に示す。

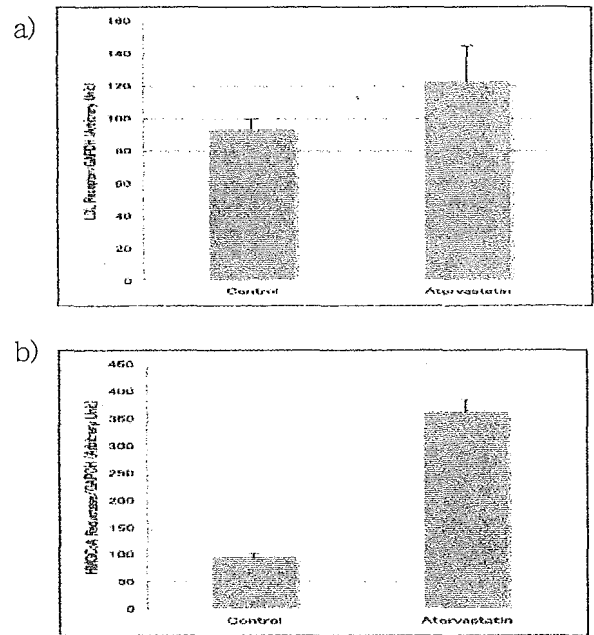


図 5. アトルバスタチン投与による LDL 受容体 (a)および HMGCoA reductase(b)遺伝子発現

アトルバスタチン投与により、LDL 受容体遺伝子の発現が 30% 増加し、HMGCoA reductase 遺伝子の発現は 3.8 倍に増加した。内因性コレステロール合成の低下により、肝細胞内コレステロール需要が増大し、LDL 受容体および HMGCoA reductase 遺伝子の発現が促進されたのである。この条件下に、ARH 遺伝子の発現を調べたところ、変化を認めなかった (図 6)。

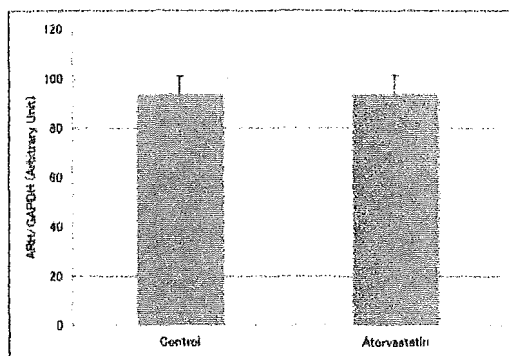


図6. アトルバスタチン投与下のARH遺伝子発現

これらのことから、ARH遺伝子の発現調節機構は、LDL受容体やHMGCoA reductaseとは異なっていることがわかった。また、昨年の研究成果により、in vitroでは細胞外コレステロール量、細胞の増殖、分化にかかわらず、ARH遺伝子の発現は一定であったことから、遺伝子発現調節機構もまた、in vitroとin vivoで異なる可能性もあることが示された。ARH遺伝子の発現調節機構は、今後、詳しく調べる予定であり、ARH発現を調節することによる、高コレステロール血症の治療も視野にいて、研究を継続する予定である。

## E. 結論

ARH遺伝子の発現調節機構は、LDL受容体やHMGCoA reductaseとは異なっており、独自の調節機構を有することが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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
- Umeda M, Harada-Shiba M, Uchida K, Nakayama Y. Photo-Control of the polyplexen forma-

tion between DNA and photo-cation generatable water-soluble polymers.

*Current Drug Delivery*. 2005;2:207-214

- Yamamoto A, Harada-Shiba M, Endo M, Kusakabe N, Tanioka T, Kato H, Shoji T. The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy.

*Atherosclerosis. in Press.*

### 2. 学会発表

- 南雲彩子、榎野久士、宮本恵宏、岡田定規、吉政康直、斯波真理子：LDL-アフェレシスを行いながら、妊娠、出産を行ったFHホモ接合体2例について、日本アフェレシス学会関西地方会(2005年12月)
- 斯波真理子、横山信治、都島基夫、山崎卓、山本章、高木敦子、吉政康直、友池仁暢：家族性高コレステロール血症(FH)とAutosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)の臨床像、第37回日本動脈硬化学会シンポジウム(2005年7月東京)
- 安部映里、高木敦子、大平望都、神野桂子、前田律子、斯波真理子：in vitroにおけるLDL受容体の細胞内取り込み機構のARH依存性について-in vivoとの差異-、第37回日本動脈硬化学会、一般演題(2005年7月東京)
- 大平望都、斯波真理子、安部映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則：PEG-DETによるin vitroおよびin vivoの遺伝子導入の試み、第37回日本動脈硬化学会、一般演題(2005年7月東京)
- 斯波真理子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、片岡一則：Enhanced in vivo gene expression using PEG-DET、The 6th International Conference on Intelligent Materials and Systems(2005年7月東京)
- 斯波真理子：循環器病に対する遺伝子治療へ

の試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム（2005年5月東京）

7. 大平望都、斯波真理子、安部映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則：PEG-DET による in vitro および in vivo の遺伝子導入の試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム、一般演題（2005年5月東京）

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

斯波真理子

1. 発明の名称：染色体性劣性高コレステロール血症遺伝子における新規変異、発明者：斯波真理子、特許第3709438号/出願番号：特願2002-130779/出願人：国立循環器病センター総長/出願日：平成14年5月2日/公開番号：特開2003-319783/公開日：平成15年11月11日

2. 発明の名称：高コレステロール血症の疾患モデルマウス、発明者：斯波真理子、出願番号：特願2005-243938/出願人：国立循環器病センター総長

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



高中性脂肪血症に関わる新規遺伝子の探索と機能解析

高中性脂肪血症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、メタボリックシンドロームの重要な症候の 1 つであり、低 HDL 血症とともに動脈硬化発症のリスクとして注目を集めつつある。しかしながら高中性脂肪血症は、動脈硬化の発生や進展への関わりメカニズムや遺伝的背景には不明な点が多い。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。昨年までの本研究の成果として、肝臓および脂肪組織のプロテオーム解析を行うことにより、肝臓および脂肪組織において蛋白質の発現に大きな違いのあるものを同定した。肝臓組織において発現量に大きな違いのあるスポットとして Acyl-Coenzyme A dehydrogenas、short/branched chain precursor、Carboxylesterase が同定された。また、脂肪組織においては、20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase、annexin A2、Peroxioredoxin が同定された。本年度の研究成果により、TGH および TGL の血清から、発現蛋白質量の発現に大きな違いのあるスポットの同定を行い、ハプトグロビン、アポリポ蛋白 AIV、さらに、データベースに存在しない蛋白質が検出された。

以上の成果より、中性脂肪の代謝に関連がないと考えられていた蛋白質が、TGH と TGL の違いとして同定され、さらに、新しい蛋白質が中性脂肪代謝に関わっていると考えられた。同定された蛋白質の、中性脂肪代謝における機能の研究を進める予定である。

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

斯波真理子

前田律子

大平望都

神野桂子

安部映里

薬理部

南野直人

佐々木一樹

桑原大幹

山形大学医学部

附属動物実験施設

大和田一雄

伊藤恒賢

## A. 研究目的

高中性脂肪血症は、メタボリックシンドロームの症候のひとつであり、動脈硬化の危険因子のひとつとして認識されてきている。しかしながら、高中性脂肪血症の病因について、多くはわかっていない。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の作製に成功した。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)を分離したのである。

TGL は、通常の日本白色ウサギに比し、血清中性脂肪値はやや高値であり、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。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。昨年度までの本研究成果により、肝臓組織のプロテオーム解析によって TGH と TGL の肝臓での蛋白発現の違いを検討し、TGH に発現を認めず、TGL に発現しているスポットが Carboxylesterase であり、TGL に発現を認めず TGH に発現しているスポットが Acyl CoA dehydrogenase であることがわかった。さらに、TGL の脂肪組織に多量に発現し、TGH の脂肪組織に発現を少ない蛋白質が 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase、annexin A2、Peroxioredoxin であると同定された。

本年度の研究では、TGH および TGL の血清を用いてプロテオーム解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 脂肪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、下行大静脈より血液を採取し、遠心分離して血清を得た。

### 2. 二次元電気泳動

一次元電気泳動は、Immobiline® (Amersham) pH 3-10 を用い、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/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 DALT 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。

### 3. 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 を用いて脱塩後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。

### 4. 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 and D. 研究結果および考察

それぞれのウサギから血液を採取し、血清を分離して二次元電気泳動を行ったところ、図1および図2のようにそれぞれ約150個のスポットを認めた。



図1. TGLの血清の二次元電気泳動

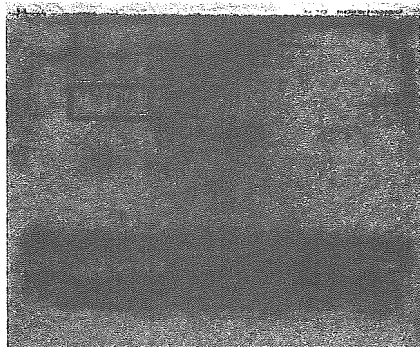


図2. TGHの血清の二次元電気泳動

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た。二次元電気泳動パターンのそれぞれの拡大写真を図3と4に示す。

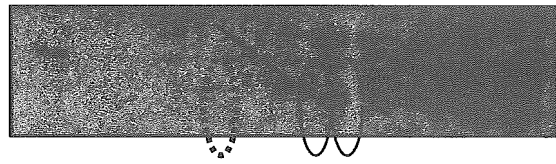


図3. TGLの血清の二次元電気泳動拡大図

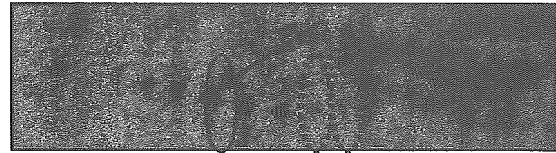


図4. TGHの血清の二次元電気泳動拡大図

図3の矢印で示す2つのスポットは、TGLではスポットが認められたが、図4のTGHでは同位置にスポットとして認められなかった。また図4の矢印で示すスポットは、TGHには認められるが、図3のTGLでは同位置にスポットとして認められなかった。この3つのスポットを含む数個のスポットのプロテオーム解析を行った。

スポット部分のゲル切り出し後、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。矢印のスポットをそれぞれ解析してデータベース検索をしたところ、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、ヒトやマウスのもとは異なり、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ジ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、図3の右の矢印のスポットはアポリポプロテイン AIV、図4の矢印はハプトグロビンであると同定された。一方、図3の左の矢印は、シーケンス情報は得られたが、MS-MSにても同定はされなかった。

MS-MSにても同定されなかった蛋白は、ウサギのデータベースが充実していないため、同定できなかった、という理由の他に、中性脂肪代謝に関わる新しい蛋白質をピックアップした可能性も考えられる。この蛋白質の機能を調べるためには、MS-MS解析のシーケンス情報を用いて、ペプチドを合成し、抗体を作製して培養細胞を用いて実験をすることにより、解析できると考えられる。現在、ペプチド合成を行っているところである。

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、血清蛋白のプロテオーム解析の系を整え、血清中で発現している蛋白質のプロテオーム解析を行い、いくつかの蛋白質についてその同定に成功した。

## E. 結論

高脂血症ウサギの血清のプロテオーム解析を行い、興味ある知見を得た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamagishi M, Higashi-Ueda H, Sasaki H, Ogi-no H, Iihata K, Miyamoto S, Nagaya N, Tomoike H, Sakamoto A. Sustained upregulation of inflammatory chemokine and its receptor in aneurismal and occlusive atherosclerotic disease: results from tissue analysis with cDNA macroarray and real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction methods.

*Circ J.* 2005; 69(12):1490-1495

2. Ito T, Ohwada K, Tomoike H. A hereditary postprandial hypertriglyceridemic(PHT) rabbit model.

*Nippon Yakurigaku Zasshi.*

2005; 125(5): 301-306

3. Tasaki K, Wakabayashi I, Shishido T, Takasa-ki S, Takeishi Y, Kubota I, Ito T, Katano Y, Tomoike H. Diminution of angiotensin II-induced contraction of the abdominal aorta isolated from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

*J Smooth Muscle Res.*

2005; 41(2):87-97

4. Tanaka C, Mannami T, Kamide K, Takiuchi S, Kokubo Y, Katsuya T, Kawano Y, Miyata T, Ogi-hata T, Tomoike H. Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene associated with blood pressure and atherosclerosis in Japanese general population.

*Hypertens Res.* 2005; 28(1):35-41

5. Kokubo Y, Iwai N, Tago N, Inamoto N, Okayama A, Yamawaki H, Naraba H, Tokoike H. Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population—the Suita Study.

*Circ J.* 2005; 69(2):879-888

6. Shimoda T, Ishihata A, Aita T, Kaga M, Ito T, Ohwada K, Tomoike H, Katano Y. Progression of severe atherosclerosis and increased arterial pulse pressure in the newly developed heritable mixed hyperlipidaemic rabbits.

*Clin Exp Pharmacol Physiol.*

2006; 33(3):221-226

### 2. 学会発表

1. 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：高中性脂肪血症ウサギの内臓脂肪組織および血清のプロテオーム解析、日本動脈硬化学会第38回総会、一般演題（2006年7月東京）

2. 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、