

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22590832

研究課題名（和文） 新規可溶性脂質輸送体を標的とした

動脈硬化関連疾患の診断とその治療戦略

研究課題名（英文） Establishment of a novel therapeutic strategy

for atherosclerosis *via* soluble lipid transporter.

研究代表者

上原 吉就（UEHARA YOSHINARI）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70373149

研究成果の概要（和文）：ATP-Binding Cassette Transporter (ABC) G4 が動脈硬化関連疾患のアルツハイマー病(AD)患者脳に強発現することを報告したが、本研究では AD 脳より同定した新規 ABCG4 短縮型アイソフォーム(SI-ABCG4)の機能を検討した。SI-ABCG4 過剰発現細胞では、膜発現のみならず培養上清にも同蛋白が同定され可溶性であった。SI-ABCG4 導入細胞では、HDL 依存性 Cholesterol efflux が有意に抑制された。免疫沈降法では SI-ABCG4 は ABCG1 や G4 だけではなく ABCA1 ともダイマー形成することが明らかとなり、SI-ABCG4 は HDL lipidation を調節し、今後の新たな動脈硬化関連疾患の診断・治療ターゲットとなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our previous report shows the microglial ATP-binding cassette transporter (ABC) G4 has been upregulated in Alzheimer's disease (AD) brain. We had reported the cloning of a novel isoform of human ABCG4 which was short-isoform (SI) of ABCG4. SI-ABCG4 transfected cells expressed SI-ABCG4 proteins with both soluble and membrane bound forms. The SI-ABCG4 is possible to suppress HDL-mediated cholesterol efflux to interact with other lipid transporters such as ABCG1, ABCG4, and ABCA1. SI-ABCG4 could be a therapeutic tool and a novel marker for atherosclerosis related diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

コレステロール高値が心血管疾患のリスクを増加させることは誰もが疑う余地のない事実であるが、高比重リポ蛋白(HDL)コレステロールの低値もまた、LDL コレステロールの高値以上に心血管疾患のリスクを増加させることが多くの大規模疫学研究によっても明らかにされている。HDL コレステロールの虚血性心疾患に対する影響は、HDL が 1.2mg/dl 増加するごとに虚血性心疾患のリスクは少なくとも 3%減少することが認められている。そこで抗動脈硬化治療として、この HDL 増加あるいは HDL の機能増強を標的とした新たなアプローチによる動脈硬化疾患の新規診断マーカーおよび新規治療戦略の構築を本研究の目的とする。1999 年 ATP-Binding Cassette Transporter (ABC) A1 脂質膜輸送体が家族性 HDL 欠損症の原因遺伝子として同定され、これがコレステロールを細胞外へ輸送することにより HDL が新生され、細胞の余剰コレステロールを排出していることが判明した。一方、ABCA1 と同ファミリーに属し、ABCA1 の約半分のサイズのトランスポーターである ABCG1 も同様にコレステロール応答膜蛋白であることが既に知られているが、その存在意義、機能の詳細は依然明らかとなっていない。ABCG1 遺伝子過剰発現細胞では HDL 依存性のコレステロール引抜き能力が上昇することを報告し、ABCG1、ABCG4 膜輸送体もコレステロール逆転送系の一翼を担っていることを明らかとした。この ABCA1、ABCG1、ABCG4 蛋白はいずれもコレステロール引抜き作用に関与しているが、ABCA1 が HDL のコア蛋白であるアポリポ蛋白 (Apo) A-I、ApoE と相互作用してコレステロール引抜きに関連していることに対して、ABCG1、ABCG4 は HDL (幼若 HDL、ディスク状-HDL、pre $\beta$ HDL) と相互作用してコレステロール引抜きに関連すると考えられている。ApoE は動脈硬化だけでなくアルツハイマー病 (AD) と関連が高く動脈硬化疾患と AD との類似点も多く指摘されている。apoE $\epsilon$ 4 は脳・心血管疾患のリスクを高めるだけでなく、AD においてもその発症リスクが高いことが明らかにされており、HDL 代謝調節機構に共通点が存在することに着目している。私たちはこれまでに AD 患者脳組織では活性化されたミクログリア細胞に ABCG4 蛋白発現および mRNA 発現が強く認める事を報告してきた (Uehara et al. *Brain Res* 2008)。ABCG4 膜輸送体は、HDL の新生、成熟に関与していると考えられているが、その生理学的意義の詳細は未だ不明である。AD 患者脳組織から mRNA を抽出し 3'RACE 法を用いて splicing variants を検索した結果、新規の Exon 9 を同定し、それに伴っ

て 647 アミノ酸からなる 6 回膜貫通モデルの従来型 ABCG4 と比べて約半分の 358 アミノ酸からなる新規の 1 回膜貫通モデルの短縮型 (SI)-ABCG4 を同定することが出来た。RT-PCR 法にて SI-ABCG4 特異的発現を解析すると、脳の他に単球、マクロファージにその発現を認めており、SI-ABCG4 の一過性発現細胞では、細胞膜分画に蛋白発現を認めると同時に、その培養上清にも蛋白を認めていた。

## 2. 研究の目的

抗動脈硬化治療として HDL の増加および機能増強が注目されている。AD 患者脳より同定した新規の SI-ABCG4 脂質膜輸送体を標的として、分子生物学的手法により SI-ABCG4 の発現調節およびその可溶性機構解明により動脈硬化関連疾患における新規の診断・治療マーカーとしての可能性、治療戦略を構築することを目的としている。

## 3. 研究の方法

・これまでに、剖検ヒトAD脳組織よりmRNAを抽出し逆転写 cDNAを用いて、SI-ABCG4 特異的プライマー、PCR 法にて新規 SI-ABCG4 cDNAを作製しさらに pcDNA3.1 発現ベクターへサブクローニングした ABCG4 コンストラクトを作製。このコンストラクトを用いて、N末端、C末端あるいは両端にそれぞれ、GFP, mycタグ, Hisタグ, FLAGタグを付加したコンストラクトを作製。  
・コンストラクト作製後、CHO細胞, COS-7細胞, HEK293細胞, ヒト microglia 細胞へリポフェクション法にて遺伝子導入し、その発現および細胞内局在についてレーザー走査顕微鏡を用いて明らかにする。  
SI-ABCG4-GFP を CHO細胞に一過性発現した後、過剰発現細胞株を確立する。  
作製した Si-ABCG4 遺伝子コンストラクトを基に ATP 結合領域 K108M に変異導入した ATP-mutant (mut)-SI-ABCG4 遺伝子(ドミナントネガティブ; DN)を site-directed mutagenesis 法を用いて作製しヒト SI-ABCG4-DN コンストラクトを作製し、発現・局在解析を行う。  
・放射線ラベル ( $^3$ H) コレステロールを用い、1-20 $\mu$ g/ml ApoE, ApoA-I, 1-50 $\mu$ g/ml HDL 存在下にて、SI-ABCG4 遺伝子の単球系細胞における ApoA-I, ApoE および HDL 依存性の cholesterol efflux への関与を明らかにする。  
更に ABCA1、ABCG1、従来型 ABCG4 過剰発現恒常株に対して ApoA-I, ApoE 存在下にて細胞上清中に efflux される HDL 様の

ApoA-I/ApoE - コレステロール-リン脂質コンプレックスを回収し、cholesterol efflux への関与を明らかとする。

- ・新規に同定 (Exon 9) した蛋白領域を含むペプチドを Japanese white 兎に免疫後、ヒト SI-ABCG4 ポリクローナル抗体を作製する。
- ・免疫沈降法により ABCG1, ABCG4, ABCA1 とそれぞれの dimerization の存在を証明する。
- ApoE, ApoA-I の他、転写因子 LXR  $\alpha/\beta$ , RXR  $\alpha$  との dimerization の存在も確認する。
- ・可溶化のプロセッシングに関して、serine protease、cysteine protease、metalloprotease、acid protease の各種阻害薬を用いて関連酵素を同定し、可溶化促進・阻害因子を明らかとして、可溶性 ABCG4 蛋白の可溶化機構を解明する。

・認知症の患者血清および髄液において、作製した可溶性 ABCG4 抗体を用いて、可溶性 ABCG4 蛋白をウェスタンブロット法にて発現解析も併せて行う。

・in vivo においては、作製した 6X His タグ付可溶性 ABCG4 遺伝子コンストラクトを哺乳細胞へ遺伝子導入することにより可溶性 ABCG4 発現系を確立する。大量培養した培養上清から可溶性 ABCG4 蛋白を採取し、可溶性 ABCG4 タンパク精製を行う。精製した可溶性 ABCG4 タンパクを C57BL6 マウスに経静脈的に急性投与し、4 時間後、24 時間後に血液サンプルを回収し脂質プロファイルを解析する。

#### 4. 研究成果

既知の full-length ヒト ABCG4 特異的抗体のなかでも N 末端を標的とした数種類の commercial available な抗体数種類を用いて SI-ABCG4 蛋白をウェスタンブロット法にて解析したところ、2 種類の抗体において膜分画における蛋白を同定することが可能であった (図 1)。

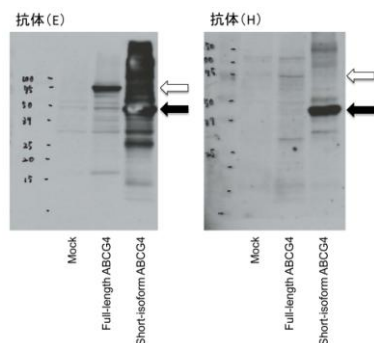


図 1

SI-ABCG4 の一過性発現 CHO 細胞では、細

胞膜分画に蛋白発現を認めると同時に、その培養上清にも蛋白発現を認めていた。この培養上清での蛋白発現は従来型 full-length ABCG4 には認められないことから、この SI-ABCG4 は従来型と異なり可溶性 ABCG4 であると断定した (図 2)。

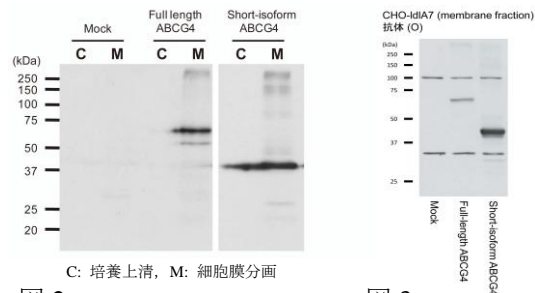


図 2.

図 3.

より特異性の高い SI-ABCG4 特異抗体を作製するために、大腸菌におけるマルトース付加 SI-ABCG4 発現系を確立した。マルトース付加 SI-ABCG4 蛋白精製した後、JW ウサギへ免疫し SI-ABCG4 特異的ポリクローナル抗体を作製した。ウェスタンブロット解析の結果、Full-length ABCG4 蛋白も僅かではあるが detect した。しかしながら SI-ABCG4 への特異度が高いオリジナルポリクローナル抗体 (SI-ABCG4 抗体(O)) を作製することに成功した (図 3)。

#### Localization of short-isoform of ABCG4 in gene transfected CHO cells

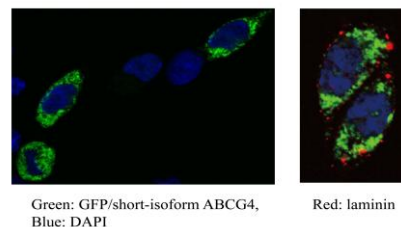


図 4.

SI-ABCG4-GFP cDNA を COS-7 細胞に一過性に発現させると (図 4, 図 5A), 細胞膜のみならず細胞質においてその発現が強く認められた。また、SI-ABCG4 も full-length ABCG4 と同様に ATP 結合 domain を持つことから、このドメインに変異を導入した K108M DN を作製し、野生型 (WT) と比較したが明らかな局在の変化はみられなかった (図 5B)。

#### 短縮型 ABCG4-GFP

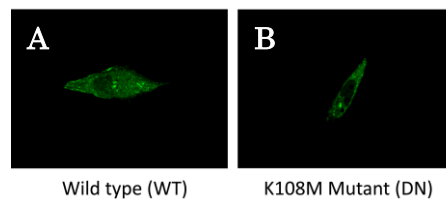


図 5.

SI-ABCG4 の機能として、細胞内コレステロ

ール排出作用への影響を検討した。COS-7 細胞に mock および SI-ABCG4 遺伝子を一過性に過剰発現させ、<sup>3</sup>H 標識コレステロールを細胞に取り込ませた後、4 hour のアポリポ蛋白 (apo) A-I 依存性コレステロール排出能を測定した結果、SI-ABCG4 の過剰発現は apoA-I 依存性コレステロール排出能には影響を及ぼさなかった (図 6A)。一方、興味深いことに COS-7 細胞に mock および SI-ABCG4 遺伝子を一過性に過剰発現させ、4 hour の HDL 依存性のコレステロール排出能を測定した結果、SI-ABCG4 の過剰発現は HDL 依存性コレステロール排出能を有意に抑制する結果が得られた (図 6B)。

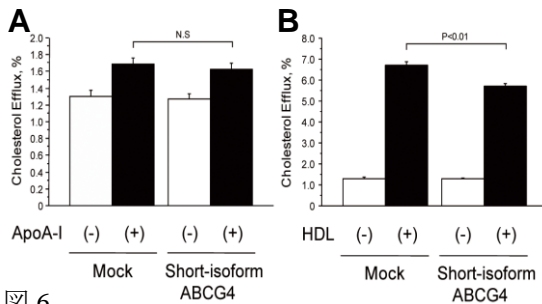


図 6.

この SI-ABCG4 による HDL 依存性コレステロール排出能の抑制作用メカニズムとして、これまでに ABCG1 や ABCG4 といったハーフトランスポーターはダイマライズして、HDL 依存性コレステロール排出などのトランスポーターとしての機能を発揮することが知られている。このことから、ABCG1 および G4 とこの SI-ABCG4 とがそれぞれダイマライズすることにより、非活性型のヘテロダイマーを形成している可能性を推察した。そこで、免疫沈降法を用いて SI-ABCG4 と ABCG1, ABCG4, ABCA1 蛋白とのダイマー形成を検討した。FLAG-tag 付加 SI-ABCG4 を一過性遺伝子導入した COS-7 細胞において、FLAG にて免疫沈降(IP), ABCG1 抗体にて immunoblotting (IB) を施行した (図 7A)。また ABCG1 抗体にて IP を行い FLAG, sbG4 抗体にて IB を行った (図 7B, 7C)。

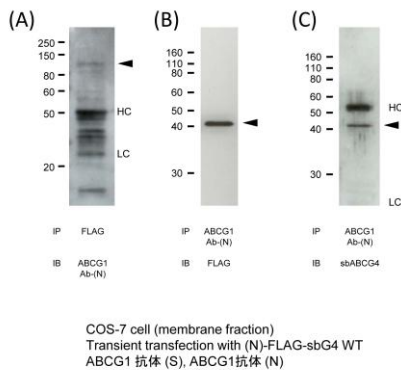


図 7.

いずれの結果からも sbABCG4 と ABCG1 と

はダイマー形成していることが明らかとなった。更に FLAG-tag 付加 SI-ABCG4 および ABCG1 を一過性遺伝子導入した COS-7 細胞においても、同様にダイマライズを確認出来た (図 8)。

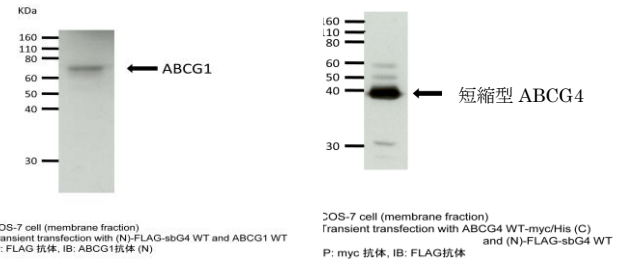


図 8.

図 9.

ABCG4 においても ABCG1 と同様に FLAG-tag 付加 SI-ABCG4 および full-length ABCG4-myc/His を一過性遺伝子導入した COS-7 細胞においても、ABCG1 と同様に SI-ABCG4 は ABCG4 と同様にダイマー形成していることが明らかとなった (図 9)。

ABCG1 や G4 などのハーフトランスポーターと異なり、フルトランスポーターである ABCA1 はダイマー形成をせず単独でコレステロール排出機能を持つと考えられているが、SI-ABCG4 が ABCA1 とダイマー形成を行うかどうかを確認した。FLAG-tag SI-ABCG4 を一過性遺伝子導入した COS-7 細胞で ABCA1 抗体にて IP, ABCG4 (図 10A) および FLAG 抗体 (図 10B) にて IB を行った。その結果、sbABCG4 は、ABCG1 や G4 と同様に ABCA1 と同様にダイマー形成していることが明らかとなった。フルトランスポーターとハーフトランスポーターとがダイマー形成をするこの結果はこれまで予想していない結果であることから、これを検証するために、myc-tag 付加 SI-ABCG4 および FLAG-tag 付加 ABCA1 を一過性遺伝子導入した細胞において FLAG および myc 抗体にて IP, ABCA1 抗体にて IB を施行した (図 10C)。

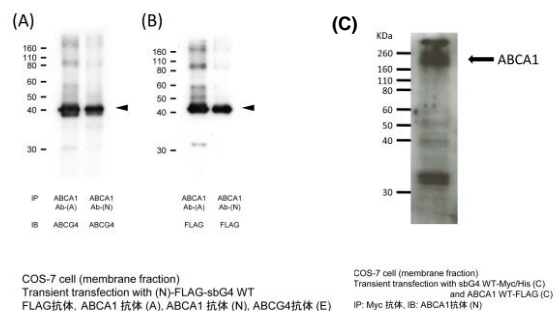


図 10

これらの結果から、sbABCG4 と ABCA1 とはダイマー形成していることが確認されたが、SI-ABCG4 が ABCG1 や G4 とのダイマー形成により HDL 依存性コレステロール引き抜き能を制御している事に対して、ABCA1



とのダイマー形成により ApoA-I 依存性コレステロール引き抜き能は制御していない。本来、ABCA1 はモノマーにて ApoA-I 依存性コレステロール引き抜き能を持つことから、ダイマー形成することは ABCA1 の機能制御するのではなく SI-ABCG4 の作用制御に関連していると推察される。ところで、SI-ABCG4 は condition medium 中に確認出来ていることから、可溶性となることが明らかとなったが（前述）、その可溶化機構を検討した。FLAG-tag 付加 SI-ABCG4 を一過性遺伝子導入した COS-7 細胞において、24 時間培養中の condition medium を抗 FLAG 抗体にてウェスタンブロットを行った（図 11; control）。また、リガンドである ApoE, ApoA-I の他、関連の転写因子である LXR  $\alpha/\beta$  や RXR  $\alpha$  とのダイマー形成の存在は確認できなかった。同時に各種プロテアーゼ阻害薬（E64, PMSF, Aprotinin, Pepstatin, Leupeptin, Chymostatin, Pefabloc）を添加して可溶化の抑制が可能かどうかを検討した。その結果、E-64, Aprotinin 以外では可溶化の抑制を認めていたが、特に Chymostatin にて SI-ABCG4 の可溶化が顕著に良くされていたことから、キモトリプシン様のセリンプロテアーゼが SI-ABCG4 の可溶化を進めていることが判明した（図 11）。様々な病態において、ABCG4 蛋白の可溶化が生体内で行われる可能性が示唆される。

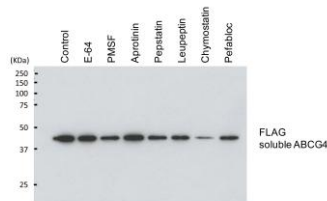


図 11.

AD 脳にて full length および SI-ABCG4 の発現が亢進していることを既に報告したが、AD にて可溶性(sb)-ABCG4 が測定可能であれば診断、進行と等のツールとしての意義を検討した。

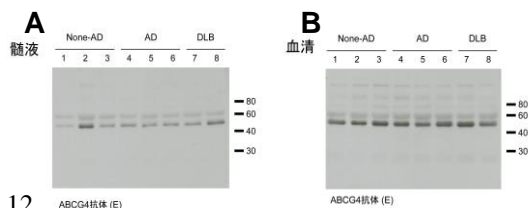


図 12.

非アルツハイマー (none-AD), AD, レビー小体型認知症 (DLB) の患者髄液および血清を用いて、ウェスタンブロット法にて可溶性 ABCG4 を解析した。髄液（図 12A）のみならず血清（図 12B）において目的の可溶性 ABCG4 蛋白を同定することに成功した。しかしながら、数例のサンプルでは none-AD, AD, DLB 間で明らかな差は認めなかった。

今後、age-matched サンプル、AD の stage 別のサンプルでの臨床試験にて sb-ABCG4 と認知症との関連を明らかとさせる必要があると考えられた。さらに健常者 2 人の血清を用いて、今回作製したオリジナルのモノクローナル抗体 (sb-ABCG4 (O)) にて IP を行い、ABCG4 抗体(E)にて IB を行うと sb-ABCG4 蛋白を同定可能であり、sb-ABCG4 蛋白は健常者においても存在することが初めて確認、検証出来た（図 13）。現在、この 2 種類の抗体を用いて血清 sb-ABCG4 蛋白の ELISA 法の確立を行っている。可溶化した ABCG4 蛋白のマーカとしての可能性を考えているが、可溶化した ABCG4 蛋白が機能を持っているのかを検証している。哺乳細胞 (FreeStyle F293 細胞) に一過性に(N)-His-SI-ABCG4 を過剰発現させ、培養上清中に分泌される sb-ABCG4 を回収、濃縮、精製を行うことに成功した（図 14、培養 3-6 日）。

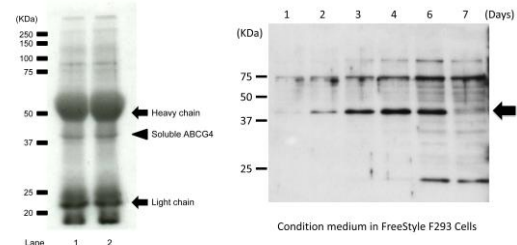


図 13.

図 14.

現在、この精製 sb-ABCG4 蛋白をマウスへ経静脈投与を行っているが、単回投与では明らかな脂質組成への変化は認められていない。今後、さらに中・長期間の投与を進めて可溶化した ABCG4 蛋白の機能を明らかとする。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

① FAMP, A Novel ApoA-I Mimetic Peptide, Suppresses Aortic Plaque Formation Through Promotion of Biological HDL Function in ApoE-Deficient Mice / Y Uehara, S Ando, E Yahiro, K Oniki, M Ayaori, S Abe, E Kawachi, B Zhang, S Shioi, H Tanigawa, S Imaizumi, S Miura, K Saku / J Am Heart Assoc. 2013 (in press). (査読あり)

② Novel Molecular Imaging of Atherosclerosis with <sup>68</sup>Ga-Labeled Apo A-I Mimetic Peptide and PET / Kawachi E; Uehara Y; Hasegawa K; Yahiro E; Ando S; Wada Y; Yano T; Nishikawa H; Shiomi M; Miura S; Watanabe Y; Saku K / Circ J 2013 (in press) (査読あり)

③ Possibility of increasing cholesterol efflux by adiponectin and its receptors through the ATP binding cassette transporter A1 in HEK293T cells.

／ Kitajima K, Miura SI, Yamauchi T, Uehara Y, Kiya Y, Rye KA, Kadowaki T, Saku K. / *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 411: 305-311 (査読あり)

④ A Randomized, Double-blind, Controlled, Comparative Trial of Formula Food Containing Soy Protein Versus Milk Protein in Visceral Fat Obesity: FLAVO study / M-Takahira, K-Noda, M-Fukushima, B-Zhang, R-Mitsutake, Y-Uehara, M-Ogawa, T-Kakuma, K-Saku / *Circ J* 2011; 75: 2235-2243. (査読あり)

⑤ Antiatherogenic effects of newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide/phospholipid complexes against aortic plaque burden in Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. / Iwata A, Miura SI, Zhang B, Imaizumi S, Uehara Y, Shiomi M, Saku K. / *Atherosclerosis* 2011; 218: 300-307. (査読あり)

⑥ Effect of chronic kidney disease on excessive daytime sleepiness in Parkinson disease. / Baba Y, Higuchi MA, Fukuyama K, Abe H, Uehara Y et al. / *Eur J Neurol* 2011; 18: 1299-1303 (査読あり)

⑦ Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR $\gamma$ /LXR $\alpha$  pathway: Findings from in vitro and ex vivo studies. / Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Nakaya K, Hisada T, Uehara Y, et al. / *Atherosclerosis* 2011; 219: 141-150. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① A Small Peptide of ApoA-I Mimetic Works Anti-Atherosclerotic Effects by the Strength of HDL Function / Y Uehara, K Oniki, T Shimizu, H Tanigawa, S Abe, S Ando, E Yahiro, S Imaizumi, S Miura, K Saku / The 16th ISA meeting 2012/03 (Sydney, Australia)

② A Novel ApoA-I mimetics, FAMP Constructs Pre-Beta HDL in vitro and in vivo / Y. Uehara, K. Oniki, H. Tanigawa, S. Abe, S. Ando, E. Yahiro, SI. Miura, K. Saku / The 79th European Atherosclerosis Society Congress. 2011/06 (Gothenburg, Sweden).

③ FAMP, A Promising Anti-atherosclerotic Agent Construct Pre-Beta HDL in vitro and in vivo / Y. Uehara, K. Oniki, H. Tanigawa, S. Abe, S. Ando, E. Yahiro, SI. Miura, K. Saku / 第43回日本動脈硬化学会総会 / 2011/7 (札幌)

④ IDENTIFICATION AND CLONING OF NOVEL SOLUBLE AND MEMBRANE BOUND FORMS OF HUMAN ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER G4 / Y.Uehara, S.Abe, E.Yahiro, A.Kawamura, T.Iwamoto, SI.Miura, K.Saku / 78<sup>th</sup> EAS Meeting 2010.6 (Hamburg, Germany)

⑤ 新規可溶性トランスポーター (ABCG4) の同定とアルツハイマー病との関連性 / 上原吉就, 阿部智美, 馬場康彦, 朔 啓二郎, 山田達夫 / 第 21 回日本老年医学会九州地方会 / 2011.3 (福岡)

[図書] (計 2 件)

① Tangier Disease / Y. Uehara, B. Zhang, K. Saku / *Advances in the Study of Genetic Disorders* 2011 (8) 239-254

② THE HDL HANDBOOK; Biological Functions and Clinical Implications; ApoA-I Mutations / A.Matsunaga, Y.Uehara, B.Zhang, K.Saku / *Academic Press (ELSEVIER)* 2010; 133-151.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上原 吉就 (UEHARA YOSHINARI)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号 : 70373149

### (2)研究分担者

朔 啓二郎 (SAKU KEIJIRO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号 : 40183371

松永 洋一 (MATSUNAGA YOUICHI)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 80239053

### (3)連携研究者

なし