

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年～2009 年
 課題番号：19590874
 研究課題名（和文） 細胞内コレステロール排出膜蛋白の作用機構解明と
 それを標的とした血管病治療戦略
 研究課題名（英文） A novel function of membrane cholesterol transporter and
 a therapeutic strategy for atherosclerosis
 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) G1の転写調節（プロモーター）領域の遺伝子解析により遺伝子多型の存在を明らかとした。このABCG1プロモーターの-257T>G多型は転写活性を有意に低下させていた。虚血性心疾患患者におけるこのABCG1プロモーター-257T>G多型解析において、ABCG1がコレステロール値には影響を及ぼさないがリポ蛋白脂質構成に関与して、動脈硬化防御機構として働くことが示された。

研究成果の概要（英文）：

A novel -257T>G single nucleotide polymorphism (SNP) was found in ATP-Binding Cassette Transporter (ABC) G1 promoter. The -257T>G SNP had a reduced transcriptional activity of ABCG1 *in vitro*. In the clinical analysis of ABCG1 -257T>G SNP, although ABCG1 was not related with plasma cholesterol levels, it was shown that ABCG1 had affected to a lipoprotein composition such as HDL particle in patients with ischemic heart disease. This is a new finding to show that ABCG1 contributes to protect a progression of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 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：脂質、循環器・高血圧、高比重リポ蛋白、発現制御、遺伝子多型、リポ蛋白、アポリポ蛋白

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦においては車中心の社会など生活習慣・食事の欧米化に伴って生活習慣病

は増加の一途をたどっている。高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病はもちろん、動脈硬化性疾患の代表である虚血性

心疾患は依然として増加傾向であり日本人死因の15%以上を占めている。コレステロールの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疫学研究によっても明らかにされている。またフラミンガムスタディーやプロカムスタディーなどの代表的な大規模臨床試験では、総コレステロールの増加よりむしろHDLコレステロール(HDL-C)の低下のほうがより心血管疾患のリスク増加に影響する事実が明らかにされている。

HDL-Cの虚血性心疾患に対する影響は、HDL-C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の機能促進をターゲットとした治療戦略が重要であると考えられる。近年ATP-Binding Cassette Transporter (ABC) A1が家族性HDL欠損症の1つであるTangier病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が形成され、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。2004年になり*in vitro*において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が報告され、ABCG1もコレステロール逆転送系の一翼を担っている可能性が示唆されるようになってきた。このABCA1、ABCG1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可能性があるが、それぞれその関与は相違点があると考えられている。ABCA1がHDLのコア蛋白であるApoA-I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はHDL(幼若HDL, ディスク状-HDL, pre β HDL)と相互作用してコレステロール引抜きに関連する可能性が示唆される。これまでにABCG1に関しては、その発現調節機構はほとんど報告されておらず、またそのヒト生体内での生理的意義も明らかとなっていない。ABCG1プロモーター解析に関しては、LXR/RXR結合領域の存在が以前から推察され、2001年にKennedyらも報告しているが、彼らの報告ではイントロン7の約9kbの領域に2箇所のLXR応答領域を示している。しかしイントロン7のプロモーターはスプライシングに関連した転写調節をしている可能性が極め

て高く、主要プロモーターでは無いとの見解を推察している。そこで私たちのグループで以前報告したエキソン1,5の上流にそれぞれあるプロモーターについて検討した結果、エキソン1上流にLXR/RXR結合領域の存在を認めた。本研究ではABCG1の生理的意義を解明に重要であると考え検討した。

2. 研究の目的

本研究では、ABCG1のプロモーター解析をすることにより、その発現調節機構の解明が可能であり、そのことは今後の抗動脈硬化治療の新たな方向性として重要である。そのため正常者、生活習慣病患者、虚血性心臓病患者を対象として、ABCG1プロモーターの遺伝子多形についてそれが影響を与える因子を検討し、ABCG1のヒト生体内での機能および脂質異常症、低HDL血症をはじめとした動脈硬化症へのABCG1遺伝子の関与を明らかとすることが主目的である。

3. 研究の方法

(1) ①脳内発現の高いABCG4 mRNAをヒトneuroblastomaより抽出しランダムプライマーにて逆転写したcDNAを用いて、ABCG4特異的プライマー、PCR法にて完全長ABCG4 cDNAを作製する。さらにPCDNA3.1発現ベクターへサブクローニングしてABCG4-PCDNA3.1コンストラクトを作成する。ABCG1、ABCA1に関してはヒトcDNAライブラリーよりPCR法にて完全長ABCG4 cDNAを作製し、ABCG4と同様にABCG4-PCDNA3.1コンストラクトをそれぞれ作成する。②それぞれのコンストラクトはヒトHEK293、COS-7あるいはCHO-A7細胞へリポフェクション法にて遺伝子導入し、一過性に遺伝子導入する。

(2) (1)で作製したABCG1、ABCG4遺伝子を遺伝子導入した細胞を用いて、トリチウム(^3H)ラベルコレステロールを24時間インキュベートしそれぞれの細胞に取り込ませる。その後、HDLの主要なアポリポ蛋白である20 $\mu\text{g/ml}$ ApoAI, 20 $\mu\text{g/ml}$ HDL存在下にて4時間インキュベートして細胞上清中に排出されるコレステロール量を測定し、ABCG1、ABCG4遺伝子のcholesterol effluxへの関与を明らかとする。

(3) ABCG1遺伝子 exon1 上流域約0.6kbのプロモーター中の-257T>G遺伝子多型(SNP)について、それと同様の人工単変異導入ヒトABCG1プロモーターの作製—既作製済みヒトABCG1プロモーター(1.1kb)を鋳型にQuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)にて以下プライマー ABCG1 -257T>G sense, 5'-CGC CCA GTG ACT TGG GAG GGA ACA GAA CTG-3', ABCG1 -257T>G antisense, 5'-CAG TTC TGT TCC CTC CCA AGT CAC TGG GCG-3' を用いて、-257T>G変異導入ヒ

ト ABCG1 プロモーターの作製した。 Wild type, 変異導入 ABCG1 プロモーター (-1104/+37) は pGL3-Basic vectors にサブクローニングした。 遺伝子変異プロモーターを用いて, 培養 HEK293T 細胞を用いて, wild type および遺伝子変異ヒト ABCG1 プロモーターをリポフェクション法にて遺伝子導入後, プロモーター活性を Dual reporter assay system[®] を用いて測定し, 遺伝子多形の ABCG1 転写活性への影響を検討する。

(4) DNA シークエンス解析。

ヒト末梢血漿から QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。 ヒト ABCG1 exon 1 上流域プロモーターの DNA シークエンスは, 下記センス, アンチセンスプライマーを用いて (センス: 5'- ATG AAT GAA AGA AGC CAG ACA CAAA-3', アンチセンス: 5'-CAC AAA CAT AGG TAG TCC AGC TGC -3') ABI prism 3100 Genetic Analyzer にてシークエンスを行った。

(5) ABCG1 プロモーター (-257T>G) 変異特異的 (MS) PCR

MS-PCR リアクションは 2.5 μ l DNA, 2 μ l dNTP mix, 0.2 μ M 共通上流プライマー 5'-CCA CTA TGT TCA CGA ATG TAC- 3', 0.4 μ M 下流ショートプライマー 5'- CTA AAG GGC AGT TCT GTT CCG TCA -3', 0.08 μ M 下流ロングプライマー 5'- CAG GAA GTG AGC AGG GTT AGA AAA GGG CAG TTC TGT TCC CAC C -3', (野生型および変異部特異的プライマー) と 0.125 μ l HotstarTaq DNA polymerase (Qiagen) にて 25 μ l のリアクション量とした。 15 min 95°C の denaturing 後, 94°C 1分, 60°C, 1.5 min, 72°C 1分の 30 サイクルにて行った。 PCR 産物は 3% アガロースゲルにて確認した。

(6) 統計解析は SAS ソフトウェア (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc, Cary, NC) を用いて行った。 ジェノタイプの群間比較は *t* 検定, ANOVA を用い, 冠動脈 1 枝, 多枝の解析は chi-square χ^2 検定で行い, 冠動脈疾患における ABCG1 G アレルの頻度はロジスティック解析で行った。 ANOVA と χ^2 検定は, 年齢, 喫煙, BMI, 血中脂質, 高血圧, 糖尿病, 心筋梗塞歴で補正解析した。

4. 研究成果

(1) ABCA1, ABCG1, ABCG4 脂質輸送体とコレステロール排出能

① ヒト ABCG4 cDNA の一過性遺伝子導入では, CHO-IId1A7 細胞 (図 1A) および A172 glioblastoma 細胞 (図 1B) のいずれにおいても, apoA-I 依存性, apoE 依存性, HDL 依存性の cholesterol efflux が有意に上昇していた。

② ヒト ABCA1 cDNA の COS-7 細胞への一過性遺伝子導入では, apoA-I 依存性, HDL 依存性の cholesterol efflux が有意に上昇して

いた。一方, ヒト ABCG1 cDNA の COS-7 細胞への一過性遺伝子導入では, apoA-I 依存性 cholesterol efflux は増加が認められなかったが, HDL 依存性の cholesterol efflux が有意にかつ顕著に上昇していた (図 2)。

これらの結果から, ABCG1 は HDL 新生にはあまり関与せず, HDL のコレステロール引抜きあるいは HDL の脂質修飾に大きく作用していることが示唆された。 ABCG4 に関しては, 従来言われてきた HDL 依存性のコレステロール引抜き作用の他に ApoA-I, ApoE 依存性のコレステロール引抜き作用に関与していることが新たに判明した。

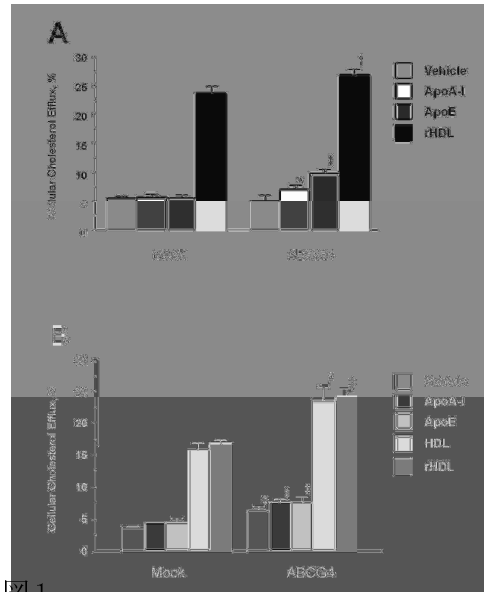


図 1

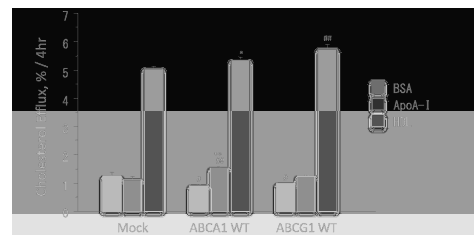


図 2

COS7 cells were transiently transfected with empty-vector, and ABCA1 and ABCG1 gene. ApoA-I, HDL: 20 μ g/ml, #, P<0.05; ##, P<0.01 v.s. Mock; *, P<0.05; **, P<0.01 v.s. ABCG1

(2) ABCG1 プロモーターシークエンスと遺伝子多型の存在

ABCG1 プロモーターの遺伝子多型の存在をこれまでの前実験にて把握していたため, 本研究ではその存在, 転写への関与, 臨床的重要性, 動脈硬化疾患への影響を検討した。

健康者 20 名を対照としてヒト ABCG1 exon 1 上流域プロモーターの DNA シークエンスを行った。 20 名のうち 12 名に ABCG1 遺伝子のシークエンス解析において, Exon 1 上流域約 1.1kb のプロモーター領域 (-257) に T→G 変異 (-257T>G) のプロモーター多型が認められた (図 3)。 -257T>G における T のホモ接

しかしながら、有意差は認めないものの低 HDL血症 (HDL <35 mg/dl) の合併頻度が高い傾向が認められた (Table 1).

② 脂質プロファイルでは、各ジェノタイプ間で総コレステロール値、中性脂肪、LDLコレステロール値、HDLコレステロール値に明らかな有意差は認めなかった (Table 2).

Table 2. Serum Lipid Profiles of Patients in Different ABCG1 Genotype Groups

	T/T (n=32)	T/G (n=57)	G/G (n=20)	p value
TC (mg/dl)	172±33	181±36	179±43	NS
TG (mg/dl)	132±71	124±60	154±80	NS
LDL-C (mg/dl)	103±31	111±32	108±35	NS
HDL-C (mg/dl)	44±11	46±15	41±11	NS
non-HDL-C (mg/dl)	128±33	136±37	128±47	NS
HDL-C/LDL-C ratio	0.47±0.10	0.47±0.10	0.42±0.10	NS
TG/HDL-C ratio	0.45±0.10	0.46±0.10	0.42±0.10	NS

TC indicates total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; Data shows Mean±S.D.; NS, not significant.

③ ABCG1の動脈硬化性疾患への関与を明らかにするために、冠動脈造影におけるAHA冠動脈狭窄度から算出した Gensini の冠動脈重症度スコアとABCG1遺伝子プロモーター-257T>G多型ジェノタイプとの関連性を検討した。

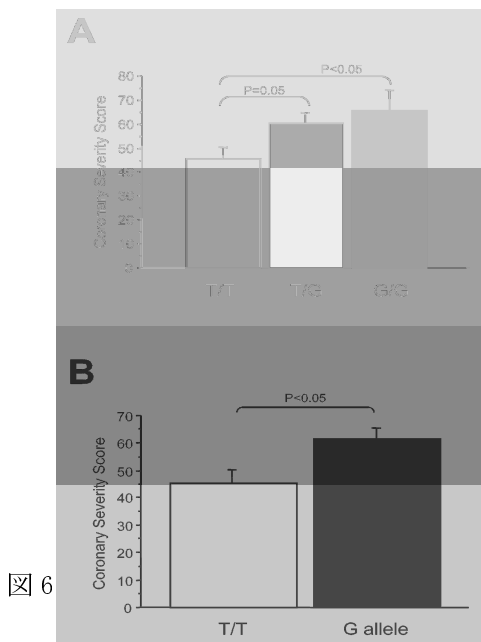


図 6

その結果、Gensini 冠動脈重症度スコアは、T/TジェノタイプではT/G、G/G各ジェノタイプと比べて有意(P<0.05)に低値であった。つまり、Gアレルを持つ者は冠動脈スコアが有意に高いことが明らかとなった (図6)。

(6) 多変量ロジスティック解析

次に、ABCG1 遺伝子プロモーター-257T>G多型と冠動脈重症度を検討するために、冠動脈一枝病変と多枝病変患者に対して多変量ロジスティック解析をおこなった。

一枝病変と多枝病変群において、年齢、BMIの他、高血圧、糖尿病、脂質異常症罹患率や

脂質異常治療薬投与に明らかな差はみとめられなかった。血中脂質に関しては、多枝病変群において総コレステロールが有意に高値であったが、LDLコレステロール、中性脂肪、HDLコレステロールの値は2群間に有意な差は認められなかった (table 3)。

	Overall (n=109)	Single vessel (n=33)	Multi-vessel (n=76)
TC (mg/dl)	172±33	181±36	179±43
TG (mg/dl)	132±71	124±60	154±80
LDL-C (mg/dl)	103±31	111±32	108±35
HDL-C (mg/dl)	44±11	46±15	41±11
non-HDL-C (mg/dl)	128±33	136±37	128±47
HDL-C/LDL-C ratio	0.47±0.10	0.47±0.10	0.42±0.10
TG/HDL-C ratio	0.45±0.10	0.46±0.10	0.42±0.10

TC indicates total cholesterol; TG, triglyceride; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; Data shows Mean±S.D.; NS, not significant.

冠動脈一枝病変と多枝病変患者群における ABCG1 遺伝子プロモーター-257T>G 多型ジェノタイプの発現頻度を Table 4 に示す。冠動脈多枝病変患者において、G/Gジェノタイプが有意に頻度が高いことが明らかとなった (Table 4)。

	Overall (n=109)	Single vessel (n=33)	Multi-vessel (n=76)
T/T (n,%)	32 (29.4%)	10 (30.3%)	10 (13.2%)
T/G (n,%)	57 (52.3%)	12 (36.4%)	45 (59.2%)
G/G (n,%)	20 (18.4%)	5 (15.2%)	15 (19.7%) *

* p<0.05, by the chi-square analysis;

多変量ロジスティック解析による補正された ABCG1 遺伝子プロモーター-257T>G 多型の G アレルに対する冠動脈多枝病変の相対危険度は優性効果 (Odds ratio 2.1 P=0.027) および劣性効果 (Odds ratio 3.5 P=0.005)が認められた (Table 5)。

Variable	Effect of the G allele	Odds ratio (95% CI) ^{a,b}	P value
T/T vs. T/G vs. G/G	Additive effect	2.1 (1.1 - 4.0)	0.027
(T/T vs. T/G) and (T/G vs. G/G)	Dominant effect	3.5 (1.5 - 8.5)	0.005
(T/T and T/G) vs. G/G	Recessive effect	1.4 (0.5 - 4.2)	0.571

^a Logistic regression analysis of (1) additive, recessive, and dominant effects of T to ABCG1 G allele on LDL concentrations; Interval; * Reference category: heterozygote.

本研究では、ABCG1はHDL新生にはあまり関与せず、HDLのコレステロール引抜き作用あるいはHDLの脂質修飾に大きく関与していることが明らかとなった。さらに ABCG4に関しては、従来言われてきた HDL 依存性のコレステロール引抜き作用の他に ApoA-I, ApoE 依存性のコレステロール引抜き作用に関与していることが新たに解明できた。

日本人において、ABCG1 遺伝子 Exon 1 上流域約 1.1kb のプロモーター領域に転写調節機能を有すると考えられる-257T>G 遺伝子多型の存在を世界ではじめて明らかにした。虚血性心臓病の日本人男性患者において、ABCG1 遺伝子プロモーター-257T>G 多型は血清脂質値には影響を与えないが、冠動脈病変の重症化・多枝化に関連していることが示唆された。またこの ABCG1 プロモーター多

型は冠動脈病変の重症化の予測因子として重要であることも示唆された。これらの結果は、ヒトにおいて ABCG1 がリポ蛋白の脂質構成に影響し動脈硬化進行への防御機構として作用していることが明らかとなった。

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 10 件)

① Kanta Fujimi, Yoshinari Uehara, Satomi Abe, Akira Kawamura, Sankar Devarajan, Shin-ichiro Miura, Keihiro Saku and Hidenori Urata, Homocysteine Induced Oxidative Stress Upregulates Chymase in Mouse Mastocytoma Cells, *Hypertens Res*, 査読有り, 33 (2), 149-154, 2010

② Furuyama S, Uehara Y, Zhang B, Baba Y, Abe S, Iwamoto T, Miura SI, Saku K., Genotypic effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men, *J Atheroscler Thromb*, 査読有り, 16, 194-200, 2009

③ Kitajima K, Miura SI, Mastuo Y, Uehara Y, Saku K., Newly developed PPAR-alpha agonist (R)-K-13675 inhibits the secretion of inflammatory markers without affecting cell proliferation or tube formation., *Atherosclerosis*, 査読有り, 203 (1), 75-81., 2009

④ Miyachi K, Hankins RW, Uehara Y, Zhang B, Saku K., Homma Y, Shigematsu H, Mikoshiba K., A postmenopausal patient with Tangier disease developing Sjögren's syndrome., *J Rheumatol*, 査読有り, 36 (1), 208-10, 2009

⑤ 上原吉就, 朔啓二郎, 特集: HDLを再考するーわが国のHDL関連遺伝子異常と Cardiovascular Riskを知る, *Vascular Medicine*, 査読無し, 5(2), 100-105, 2009

⑥ Uehara Y, Yamada T, Baba Y, Miura SI, Abe S, Kitajima K, Higuchi MA, Iwamoto T, Saku K., ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain., *Brain Res*, 査読有り, 1217C, 239-246, 2008

[学会発表] (計 13 件)

① Y.Uehara, S.Abe, E.Yahiro, A.Kawamura, T.Iwamoto, SI.Miura, K.Saku, Identification and Cloning of Novel Soluble and Membrane Bound Forms of The Human ATP-Binding Cassette Transporter G4., The 72st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010.3.7, 京都

② 上原吉就, (シンポジウム) Low HDL-C: Role of lipid transporters and apoA-I mimetic peptides, 第 40 回日本動脈硬化学会総会,

2008.7.11, つくば

③ Uehara Y, Furuyama S, Abe S, Okamura K, Miura S, Iwamoto T, Saku K., A Severity of Coronary Artery Disease is influenced by ATP-binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) -257T>G Promoter Polymorphism., The 77th European Atherosclerosis Society Congress, 2008.4.27, Istanbul

④ 古山正大, 上原吉就, 阿部智美, 岡村圭祐, 三浦伸一郎, 張波, 朔啓二郎, ATP-binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) 遺伝子プロモーター多型は冠動脈病変重症度と関連する, 第 39 回日本動脈硬化学会総会, 2007.7.14, 大阪

⑤ 岡村圭祐, 上原吉就, 張波, 三浦伸一郎, 古山正大, 阿部智美, 浦田秀則, 朔啓二郎, ATP-binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) 遺伝子プロモーター多型(T-257G) はスタチンの作用を減弱する, 第 39 回日本動脈硬化学会総会, 2007.7.14, 大阪

⑥ Y.Uehara, M.Higuchi, Y.Baba, T.Iwamoto, T.Yamada, ATP-binding cassette transporter G4 (ABCG4) is highly expressed in Alzheimer brain, The 25th International Psychogeriatric Association Congress, 2007.10.17, Osaka

[図書] (計 1 件)

① 上原吉就, 朔啓二郎, 新・心臓病診療プラクティス 心血管イベントのリスクファクターとその管理, 文光堂, 181-187, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://resweb2.jhk.adm.fukuoka-u.ac.jp/FukuokaUnivHtml/info/4089/R110J.html?P=Sun Jun 6 21:05:42 UTC+0900 2010>

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 YOICHI)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号: 80239053

(H19→H20: 連携研究者)

山田達夫 (YAMADA TATSUO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 60159217

(H19→H20: 連携研究者)

(3)連携研究者

()

研究者番号: