

平成 21年 5月 17日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007~2008

課題番号：19591063

研究課題名（和文） HDL 新生反応の炎症反応制御と抗動脈硬化作用

研究課題名（英文） HDL generation as an effector against inflammation and atherosclerosis

研究代表者

堂前 純子 (Abe-Dohmae Sumiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70227700

研究成果の概要：

各種培養細胞および遺伝子改変マウスを用い、 $\alpha 1$ アドレナリンレセプター阻害薬doxazosinのHDL上昇作用ならびに急性期反応における血中Serum amyloid Aの濃度上昇が、いずれもABCA1を介したアポリポタンパク質依存性HDL新生反応の結果であることを示し、各々のメカニズムを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・動脈硬化学

キーワード：HDL, ABCA1, ABCA7, SAA

1. 研究開始当初の背景

(1) HDL新生とABCタンパク質

HDL新生反応は、lipid-freeのアポリポタンパク質と細胞脂質から新たなHDL粒子の形成される細胞生物学的な現象である。遺伝性HDL欠損症（Tangier病）の解析から、血中HDLはHDL新生に起因し、この反応にはABCA1の関与することが示されている。

ABCA7はABCA1に最も高い相同性を持つABCタンパク質であるが、その生体内分布は

ABCA1と大きく異なり、機能も不明である。申請者らは培養細胞にヒトABCA7を発現させた系を用い、ABCA1非存在下でも細胞コレステロールの放出を伴うHDL新生反応の生じることを初めて示した（JBC 279:604, 2004）。ABCA1を介したHDL新生反応とABCA7を介したHDL新生反応には、いくつかの相違点があることも明らかにできた。産生されるHDL中のコレステロールとリン

脂質の比はABCA1導入時の方がはるかに大きいこと、AキナーゼやCキナーゼの活性化をもたらす薬物への反応は同一でないこと等である。さらにゲル濾過HPLCを用いた解析により、ABCA1を介して産生されたHDLとABCA7を介して産生されたHDLでは、HDL粒子の組成が異なることも証明している(JLR 46:1703, 2005)。

(2) 炎症反応とABCタンパク質

Serum amyloid A (SAA)は急性期反応物質の一つで、感染時等には急激な血中濃度上昇が認められる。SAAの生理的機能は明らかにされていないが、SAAがすべての脊椎動物によく保存された形で存在し、侵襲刺激によって誘導される点も種を越えて共通であることから、生体防御機構の基本的かつ重要な役割を果たしているものと想像されている。哺乳類のSAAはHDLのアポリポタンパク質として存在するが、その形成機序や機能は不明である。申請者らは各種培養細胞のSAAに対する反応を調べ、SAAもアポリポタンパク質A-I (アポA-I)と同様に、細胞脂質を引き抜いてHDLを形成すること、SAA依存性HDL新生反応はABCA1/ABCA7の関与するアポA-I依存性HDL新生反応と同じ機構で生じること、SAA含有HDLとアポA-I含有HDLの物理化学的性質は異なること等を明らかにした (JLR 47:1542, 2006)。

2. 研究の目的

本研究計画は上記の知見に基づき、ABCA1とABCA7による反応を共に解析することにより、これらによるHDL新生、ならびに炎症反応のメカニズムと相互の連関を明らかにし、ひいては動脈硬化性血管病変の予防/治療技術開発につなげようとするものである。

3. 研究の方法

各種培養細胞および遺伝子改変マウスを主な材料に用い、ABCA1, ABCA7 遺伝子発現レベルとアポリポタンパク質依存性HDL新生反応、ならびに個体レベルでの炎症反応やHDLレベルの変動等との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) $\alpha 1$ アドレナリンレセプター阻害薬

doxazosinは降圧剤として用いられているが、投与群ではHDL上昇のあることが報告されていた。培養細胞からのHDL新生反応を測定できる系を用い、doxazosinがABCA1遺伝子の転写を活性化することでABCA1タンパク質レベルを上昇させ、細胞からのアポリポタンパク質依存性コレステロール放出を促進することを明らかにした。

(2) 上記(1)の現象の分子生物学的メカニズムを明らかにすることを目的として、ヒトならびにマウスABCA1プロモーター領域の解析を行い、転写制御因子AP2 α がABCA1遺伝子を負に制御していること、doxazosinはAP2 α のリン酸化レベル低下を介してAP2 α によるABCA1遺伝子の転写抑制を解除することを証明した。

(3) 上記(2)のABCA1発現抑制に直接関与するAP2 α のリン酸化部位はSer258であり、リン酸化酵素はprotein kinase Dであることを明らかにした。

(4) ABCA1ノックアウトマウスとLPS投与による急性炎症モデルを用いたin vivo, ex vivo, in vitro実験により、急性炎症時の肝SAA mRNAの誘導と細胞外へのSAAタンパク質放出はABCA1の遺伝子型にかかわらず行われるが、SAAのHDL粒子への組み込みと血中SAA濃度上昇にはABCA1遺伝子産物が必要であることを示した。

(5) ABCA1ノックアウトマウスの炎症刺激に対

する反応を野生型マウスの場合と比較し、ABCA1ノックアウトマウスでは慢性炎症刺激に対しても肝SAA mRNAの誘導はSAA-HDL産生に結びつかないこと、アミロイドーシス発症頻度が野生型マウスと異なること等を見いだした。

- (6) ABCA1ノックアウトマウス由来線維芽細胞のcell lineを樹立し、細胞の不死化や増殖速度はABCA1遺伝子型に無関係であること等を明らかにした。

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4件) すべて査読あり

- (1) Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Rui L, and Yokoyama S.

Involvement of protein kinase D in phosphorylation and increase of DNA binding of activator protein 2[alpha] to downregulate ATP-binding cassette transporter A1

Arterioscler Thromb Vasc Biol.

2008;28:2282-2287

- (2) Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira KI, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Ohno Y, Inoue K, and Sawada JI.

The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines.

Biochem Pharmacol. 2008 ;76:1006-1013.

- (3) Hu W, Abe-Dohmae S, Tsujita M, Iwamoto N, Ogikubo O, Otsuka T, Kumon Y, and Yokoyama S.

Biogenesis of HDL by SAA is dependent on ABCA1 in the liver in vivo.

J Lipid Res. 2008;49:386-393.

- (4) Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Ayaori M, Tanaka N, Kusuhara M, Ohsuzu F, and Yokoyama S.

ATP-binding cassette transporter A1 gene transcription is downregulated by activator protein 2alpha. Doxazosin inhibits activator protein 2alpha and increases high-density lipoprotein biogenesis independent of alpha1-adrenoceptor blockade.

Circ Res. 2007;101:156-165.

[学会発表] (計5件)

- (1) 堂前純子、黒野智恵子、西本静香、横山信治

ABCA1ノックアウトマウス由来線維芽細胞株の樹立とその特性の解析

日本生化学会

2008年12月12日 (神戸)

- (2) 堂前純子、横山信治

ABCA1とHDLコレステロール

日本動脈硬化学会

2008年7月11日 (つくば)

- (3) 胡巍, 堂前純子, 岩本紀之, 公文義雄, 辻田麻紀, 横山信治

ABCA1ノックアウトマウスを用いたSAA-HDL産生機構の解析

日本生化学会中部支部会

2008年5月24日 (岐阜)

- (4) 胡巍, 堂前純子, 岩本紀之, 荻久保修, 大塚隆信, 横山信治

急性炎症期のSAA産生、血中濃度上昇と

ABCA1

日本整形外科学会基礎学術集会

2007年10月25日 (浜松)

- (5) Wei Hu, Sumiko Abe-Dohmae, Noriyuki

Iwamoto, Yoshitaka Kumon, Maki Tsujita,

and Shinji Yokoyama

Serum amyloid A secretion from
hepatocytes and ABCA1

日本動脈硬化学会

2007年7月14日（大阪）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

該当するものなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂前 純子 (Abe-Dohmae Sumiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70227700

(2) 研究分担者

横山 信治 (Yokoyama Shinji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10142192

(3) 連携研究者

なし