

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 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591164

研究課題名（和文） ABCトランスポーターによる細胞コレステロール輸送と炎症反応制御

研究課題名（英文） Roles of ABC transporters in cellular cholesterol transport and inflammatory response

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（和文）：インスリンがアポリポタンパク質依存性 HDL 新生反応を抑制することを発見し、インスリンの新しい作用として、ABCA1 の分解促進と HDL 新生能の比活性低下のあることを明らかにした。また、スタチンならびに HDL アポリポタンパク質の投与により、マクロファージの ABCA7 タンパク質増加と食作用活性増強の生じることも発見した。siRNA およびノックアウトマウスを用いた実験から、食作用活性化は ABCA1 ではなく ABCA7 を介することが証明できた。

研究成果の概要（英文）：We found that insulin impairs through modulation of ABCA1 activity by two different mechanisms. One is enhancement of ABCA1 protein degradation and the other is lowering the ABCA1 specific activity. We also confirmed that ABCA7 enhances phagocytosis, which can be further augmented by apolipoproteins and statins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：HDL, ABCA1, ABCA7, phagocytosis

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) 食作用とABCタンパク質

食作用は細胞の基本的な機能の一つで、アポトーシス細胞の除去やマクロファージの泡沫化等、生理的/病的なさまざまな場面で行われる。食作用は細胞膜の変形や移動を伴うため細胞コレステロール動態と密接に関係しており、事実、ラテックスビーズ食によるSREBPの活性化の報告 (PNAS 102:13129, 2005) も存在する。ただし、ABCA1の食作用への関与については、促進的に働くという報告と抑制的に働くという報告とがあり、統一見解は得られていない。

申請者らはABCA7の転写制御機構を追う過程でこれがSREBP2の支配下にあることを発見し、ABCA7が細胞コレステロールレベルの変動に対してABCA1とは逆方向の発現制御を受けることを証明した。しかも、線維芽細胞のABCA7発現レベルはラテックスビーズ食に伴って上昇し、ABCA7の強制発現/発現抑制により食食能も増強/減弱するという、positive feedback loopを形成していることも見出した (JLR 47:1915, 2006)。これらの知見はABCA7が単なるABCA1の代替物ではないことを強く示唆する。

2. 研究の目的

本研究計画は上記の知見に基づき、ABCA1のみならずABCA7による反応も共に解析することにより、これらによるHDL新生、食作用ならびに急性期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含む実験動物を材料に用い、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) ABCA1によるHDL新生制御とインスリン抵抗性

慢性炎症と関連が深いとされるインスリン抵抗性/高インスリン血症は、動脈硬化性疾患の主要リスクファクターの一つである。インスリン抵抗性/高インスリン血症は低HDL血症を伴う頻度が高いため、インスリンのABCA1依存性HDL新生への影響を調べた。インスリンが2つのメカニズムによりapoA-I依存性HDL新生を抑制することを明らかにした。1つはPI3キナーゼ活性化がABCA1タンパク質分解を促進するため、もう1つはABCA1がインスリンレセプターによるリン酸化を受け、タンパク質量の変化なしにHDL放出速度低下を生じるためであった。さらに、ABCA1上のY1206を後者の機序に関与する特異的なリン酸化部位と同定し、これの変異によるインスリンの効果消失も証明した。ラットインスリン抵抗性モデルでも、高インスリン血症は血糖値や体重の影響なしにABCA1の比活性を抑制し、HDLの生合成を低

下させる事が確認された。

(2) ABCA1によるHDL新生制御と翻訳後修飾
ABCA1のアミノ酸配列中にはCaM結合配列が認められ、ここにはCa²⁺依存性にCaMの結合すること、細胞内CaM量の減少に伴ってABCA1のタンパク質レベルとapoA-I依存性HDL新生は低下することを確認した。CaMはその活性の有無にかかわらずABCA1安定化作用を持ち、ABCA1への結合量はCaM阻害剤W7存在下の方が多かった。以上より、ABCA1にもCaMが結合し、これがABCA1安定化とHDL産生増加に働いていることが示された。

(3) ABCA1によるSAA-HDL形成とアミロイドーシス

ABCA1ノックアウトマウスへのアミロイドーシス誘発実験を行い、野生型マウスの反応と比較した。ABCA1を介したSAA-HDL形成はSAAの血中濃度維持に必須であり、アミロイド沈着量を決定する重要な因子であることが示された。

(4) ABCA7による食作用制御とステロール代謝

J774とマウス腹腔マクロファージを用い、HDLアポリポタンパク質ならびにスタチン投与がABCA7発現と食作用活性に与える効果を調べた。

スタチンならびにHDLアポリポタンパク質の投与により、マクロファージのABCA7タンパク質増加と食作用活性増強が見られた。siRNAおよびノックアウトマウスを用いた実験から、食作用活性化はABCA1ではなくABCA7を介することが確認された。以上より、ABCA7はin vitroでもin vivoでも食作用を正に制御していること、スタチン投与によるABCA7転写活性化、HDLアポリポタンパク質によるABCA7タンパク質分解抑制は、ともに食作用を増強することが証明された。

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9件) すべて査読あり

① Yokoyama S, Arakawa R, Wu CA, Iwamoto N, Lu R, Tsujita M, Abe-Dohmae S.

Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis.

Biochim Biophys Acta. 2012

Mar;1821(3):547-551. Epub 2011 Jul 31.

DOI: 10.1016/j.bbali.2011.07.017

② Jayaraman S, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Cavigiolio G.

Impact of self-association on function of apolipoprotein A-I.

J Biol Chem. 2011 Oct 14;286(41):35610-23.

Epub 2011 Aug 11.

DOI:10.1074/jbc.M111.262485

③ Ito J, Nagayasu Y, Kheirollah A, Abe-Dohmae S, Yokoyama S.

ApoA-I enhances generation of HDL-like lipoproteins through interaction between ABCA1 and phospholipase C γ in rat astrocytes.

Biochim Biophys Acta. 2011

Dec;1811(12):1062-1169. Epub 2011 Sep 1.

DOI:10.1016/j.bbali.2011.08.016

④ Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML, Yokoyama S.

HMG-CoA reductase inhibitors enhance phagocytosis by upregulating ATP-binding cassette transporter A7.

Atherosclerosis. 2011 Aug;217(2):407-414.

Epub 2011 Jun 23.

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.031

⑤ Nonomura K, Arai Y, Mitani H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S.

Insulin down-regulates specific activity of ATP-binding cassette transporter A1 for high density lipoprotein biogenesis through its specific phosphorylation.

Atherosclerosis. 2011 Jun;216(2):334-341.

Epub 2011 Feb 22.

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.021

⑥ Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Yokoyama S.

Roles of ATP-Binding Cassette Transporter A7 in Cholesterol Homeostasis and Host Defense System.

J Atheroscler Thromb. 2011 Apr

18(4):274-281. Epub 2010 Dec 14. Review

DOI:10.5551/jat.6726

- ⑦ Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML, Yokoyama S. Helical apolipoproteins of high-density lipoprotein enhance phagocytosis by stabilizing ATP-binding cassette transporter A7. J Lipid Res. 2010 Sep 51(9):2591-2599. Epub 2010 May 22. DOI:10.1194/jlr.M006049
- ⑧ Iwamoto N, Lu R, Tanaka N, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. Calmodulin Interacts With ATP Binding Cassette Transporter A1 to Protect From Calpain-Mediated Degradation and Upregulates High-Density Lipoprotein Generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Jul 30(7):1446-1452. Epub 2010 Apr 15. DOI:10.1161/ATVBAHA.110.203927
- ⑨ Arakawa R, Tsujita M, Iwamoto N, Ito-Ohsumi C, Lu R, Wu CA, Shimizu K, Aotsuka T, Kanazawa H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. Pharmacological inhibition of ABCA1 degradation increases HDL biogenesis and exhibits antiatherogenesis. J Lipid Res. 2009 Nov 50(11):2299-2305. Epub 2009 May 20. DOI:10.1194/jlr.M900122-JLR200

[学会発表] (計 23 件)

- ① Sumiko Abe-Dohmae PI3 kinase negatively regulates apolipoprotein-dependent HDL generation HDL Satellite for ISA 2012 2012年3月31日-4月1日 Cairns
- ② Sumiko Abe-Dohmae PI3 kinase inhibits HDL generation through reducing protein levels of ABCA1 and ABCA7 International Symposium on Atherosclerosis (ISA) 2012年3月28日 Sydney
- ③ Nobukiyo Tanaka HMG-CoA Reductase Inhibitors Enhance Phagocytosis by Up-regulating ABCA7 International Symposium on Atherosclerosis (ISA) 2012年3月27日 Sydney
- ④ 堂前純子 PI3 キナーゼによるアポリポタンパク質依存性 HDL 新生反応の制御 第 84 回日本生化学会 2011年9月23日 京都
- ⑤ Nobukiyo Tanaka A Molecular Ground for Enhancement of the Host-Defense System by Statins. 第 75 回日本循環器学会 2011年8月3日 横浜

- ⑥ Sumiko Abe-Dohmae PI3 kinase inhibits ABCA1- and ABCA7-mediated HDL generation through reducing their protein levels 第 43 回日本動脈硬化学会 2011年7月15日 札幌
- ⑦ Nobukiyo Tanaka Statin enhances phagocytosis by up-regulating ABCA7 第 43 回日本動脈硬化学会 2011年7月15日 札幌
- ⑧ 岩本紀之 PKD/AP2 による ABCA1 と adiponectin の遺伝子発現の共通情報伝達系 第 53 回日本脂質生化学会 2011年5月13日 東京
- ⑨ Sumiko Abe-Dohmae HMG-CoA reductase inhibitors enhance phagocytosis by upregulating ABCA7 第 83 回 日本生化学会 (ワークショップ) 2010年12月8日 神戸
- ⑩ Sumiko Abe-Dohmae HMG-CoA reductase inhibitors enhance phagocytosis by upregulating ABCA7 第 83 回日本生化学会 2010年12月7日 神戸
- ⑪ Nobukiyo Tanaka A new insight of the relation between cholesterol homeostasis and host defense system 第 42 回日本動脈硬化学会 (シンポジウム) 2010年7月16日 岐阜
- ⑫ Kazuhiko Nonomura Mechanism of Lowering HDL Biosynthesis in Hyperinsulinemia States Through Direct Modulation of ATP-Binding Cassette Transporter A1 by Insulin Signaling 第 42 回日本動脈硬化学会 2010年7月16日 岐阜
- ⑬ Nobukiyo Tanaka Helical Apolipoproteins of High-Density Lipoprotein Enhance Phagocytosis by Stabilizing ATP-Binding Cassette Transporter A7 第 42 回日本動脈硬化学会 2010年7月16日 岐阜
- ⑭ Yoshio Yamauchi ABC transporter ABCA1 facilitates bidirectional sterol movement and modulates the regulatory sterol signals 第 42 回日本動脈硬化学会 2010年7月15日 岐阜
- ⑮ Sumiko Abe-Dohmae ABCA1 and serum amyloid A during acute and chronic inflammation 第 42 回日本動脈硬化学会 (シンポジウム) 2010年7月15日 岐阜

- ⑩ Nobukiyo Tanaka Helical Apolipoproteins of High-Density Lipoprotein Enhance Phagocytosis by Stabilizing ATP-Binding Cassette Transporter A7
The 6th International Atherosclerosis Society-sponsored Workshop on High Density Lipoproteins
2010年5月19日 Wistler
- ⑪ S Abe-Dohmae Amyloid A amyloidosis can be induced without SAA-HDL formation or substantial elevation of plasma SAA
The 6th International Atherosclerosis Society-sponsored Workshop on High Density Lipoproteins
2010年5月18日 Wistler
- ⑫ 田中伸享 HDL と生体防衛作用 apoA-I の ABCA7 安定化による食作用の促進
第 82 回日本生化学会
2009年10月22日神戸
- ⑬ 堂前純子 AA アミロイドーシスは SAA-HDL 非存在下でも生じる
第 82 回日本生化学会
2009年10月22日神戸
- ⑭ 堂前純子 ABCA1 ノックアウトマウス由来細胞に見られる脂質蓄積傾向
第 51 回日本脂質生化学会
2009年7月31日 名古屋
- ⑮ 田中伸享 アポリポタンパク質 A-I (apoA-I) による ABCA7 を介したファゴサイトーシスの正の制御
第 51 回日本脂質生化学会
2009年7月31日 名古屋
- ⑯ Sumiko Abe-Dohmae Characterization of fibroblast cell lines derived from ABCA1-Knock out mouse
第 41 回日本動脈硬化学会
2009年7月17日 下関
- ⑰ Noriyuki Iwamoto Calmodulin interacts with ABCA1 to protect it against calpain-mediated degradation and up-regulates HDL generation
第 41 回日本動脈硬化学会
2009年7月17日 下関

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

黒野 智恵子 (Kurono Chieko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50080049

(3) 連携研究者

横山 信治 (Yokoyama Shinji)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：10142192