

- C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A., & Cavazzana-Calvo, M. (2003) *Science*, 302, 415-419.
- 7) Montier, T., Benvegna, T., Jaffres, P.A., Yaouanc, J.J., & Lehn, P. (2008) *Curr. Gene Ther.*, 8, 296-312.
- 8) Belur, L.R., Frandsen, J.L., Dupuy, A.J., Ingbar, D.H., Largaespada, D.A., Hackett, P.B., & McIvor, R.S. (2003) *Mol. Ther.*, 8, 501-507.
- 9) Geurts, A.M., Yang, Y., Clark, K.J., Liu, G., Cui, Z., Dupuy, A.J., Bell, J.B., Largaespada, D.A., & Hackett, P.B. (2003) *Mol. Ther.*, 8, 108-117.
- 10) Harrington, J.J., Van Bokkelen, G., Mays, R.W., Gustashaw, K., & Willard, H.F. (1997) *Nat. Genet.*, 15, 345-355.
- 11) Mills, W., Critcher, R., Lee, C., & Farr, C.J. (1999) *Hum. Mol. Genet.*, 8, 751-761.
- 12) Yang, J.W., Pendon, C., Yang, J., Haywood, N., Chand, A., & Brown, W.R. (2000) *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1891-1902.
- 13) Katoh, M., Ayabe, F., Norikane, S., Okada, T., Masumoto, H., Horike, S., Shirayoshi, Y., & Oshimura, M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321, 280-290.
- 14) Oshimura, M. & Katoh, M. (2008) *Reprod. Biomed. Online*, 16, 57-69.
- 15) Kazuki, Y., Hoshiya, H., Kai, Y., Abe, S., Takiguchi, M., Osaki, M., Kawazoe, S., Katoh, M., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Kajitani, N., Yoshino, T., Shirayoshi, Y., Ogura, A., Shinohara, T., Barrett, J.C., & Oshimura, M. (2008) *Gene Ther.*, 15, 617-624.
- 16) Hoshiya, H., Kazuki, Y., Abe, S., Takiguchi, M., Kajitani, N., Watanabe, Y., Yoshino, T., Shirayoshi, Y., Higaki, K., Messina, G., Cossu, G., & Oshimura, M. (2009) *Mol. Ther.*, 17, 309-317.
- 17) Ren, X., Tahimic, C.G., Katoh, M., Kurimasa, A., Inoue, T., & Oshimura, M. (2006) *Stem Cell Rev.*, 2, 43-50.
- 18) Otsuki, A., Tahimic, C.G., Tomimatsu, N., Katoh, M., Chen, D.J., Kurimasa, A., & Oshimura, M. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 1018-1025.
- 19) Suda, T., Katoh, M., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Kazuki, Y., Inoue, T., & Oshimura, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340, 1053-1061.
- 20) Kakeda, M., Hiratsuka, M., Nagata, K., Kuroiwa, Y., Kakitani, M., Katoh, M., Oshimura, M., & Tomizuka, K. (2005) *Gene Ther.*, 12, 852-856.
- 21) Yamada, H., Kunisato, A., Kawahara, M., Tahimic, C.G., Ren, X., Ueda, H., Nagamune, T., Katoh, M., Inoue, T., Nishikawa, M., & Oshimura, M. (2006) *J. Hum. Genet.*, 51, 147-150.
- 22) Kawahara, M., Inoue, T., Ren, X., Sogo, T., Yamada, H., Katoh, M., Ueda, H., Oshimura, M., & Nagamune, T. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1770, 206-212.
- 23) Shitara, S., Kakeda, M., Nagata, K., Hiratsuka, M., Sano, A., Osawa, K., Okazaki, A., Katoh, M., Kazuki, Y., Oshimura, M., & Tomizuka, K. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 807-811.
- 24) Yamada, H., Li, Y.C., Nishikawa, M., Oshimura, M., & Inoue, T. (2008) *J. Hum. Genet.*, 53, 447-453.
- 25) Yamaguchi, S., Ren, X., Katoh, M., Miyata, K., Fukushima, H., Inoue, T., & Oshimura, M. (2006) *Chromosome Science*, 9, 65-73.

山口 繁幸^{1,2}, 大林 徹也²,
香月 康宏¹, 押村 光雄¹

(¹鳥取大学大学院医学系研究科

機能再生医科学専攻生体機能医工学講座,

²鳥取大学生命機能研究支援センター動物資源開発分野)

Advantages and applications of human artificial chromosome vector

Shigeyuki Yamaguchi^{1,2}, Tetsuya Ohbayashi², Yasuhiro Kazuki¹, and Mitsuo Oshimura¹ (¹Department of Biomedical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, 86 Nishi-cho, Yonago, Tottori 683-8503, Japan; ²Divisions of Laboratory Animal Science, Research Center for Bioscience and Technology, Tottori University, 86 Nishi-cho, Yonago, Tottori 683-8503, Japan)

HDL 産生トランスポーター ABCA1 の肝での二重転写制御機構

1. はじめに

食物由来や肝臓で合成されるコレステロールは、低密度リポタンパク (LDL) の形で末梢組織に供給される。しかし末梢細胞はコレステロールを分解するシステムを持たないため過剰のコレステロールは蓄積し、血管壁のマクロファージでは泡沫化して動脈硬化の引き金となる。高密度リポタンパク (HDL) は細胞表面からコレステロールを引き出して肝に運ぶ役割を持つ。肝ではコレステロールは胆汁酸に転換され、胆汁を経て体外に排出される。このように HDL を使って行われる末梢から肝臓へのコレステロール輸送は「コレステロール逆転送系」と呼ばれ、体内のコレステロールホメオスタシス維持に重要な役割を担っている (図 1)¹⁾。コレステロール逆転送が低下する低 HDL 血症では動脈硬化性疾患のリスクが上昇し、逆に HDL 値が高いとリスクが低下することから、HDL は善玉コレステロールと呼ばれている。

HDL の形成には細胞膜に存在する ABC トランスポーター A1 (ABCA1) が決定的な役割を持ち、遺伝子異常は HDL 欠損症の原因となる¹⁾。ABCA1 は 12 回膜貫通型のタンパク質であり、ATP のエネルギーを利用して細胞内からリン脂質とコレステロールを輸送し、細胞外ドメインに結合するアポリポプロテイン A-I (アポ A-I) と HDL 粒子

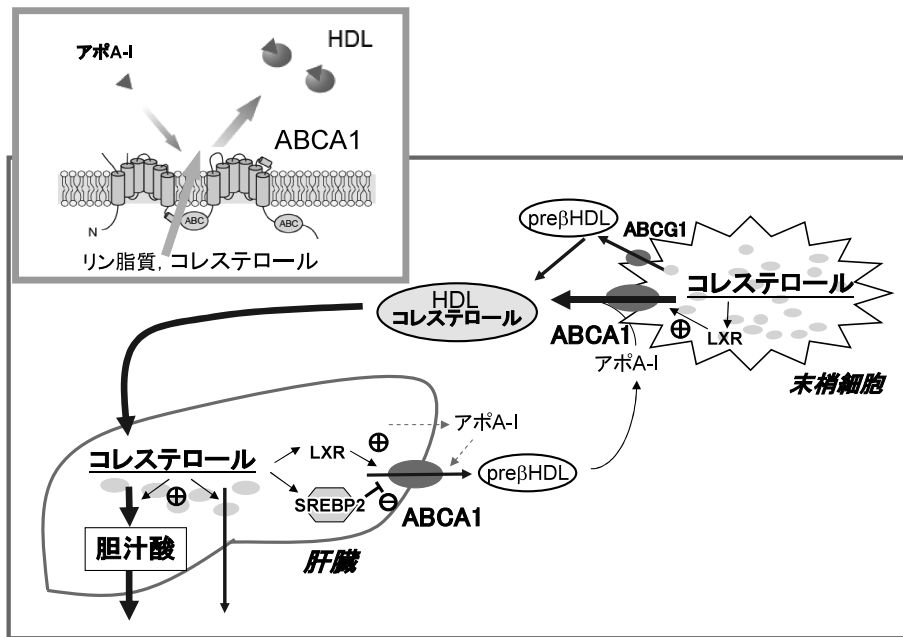


図1 コレステロール逆転送系における末梢と肝の ABCA1 の役割

ABCA1 は細胞外のアポ A-I に細胞内のリン脂質とコレステロールを輸送して HDL を形成する (上図)。HDL は末梢組織からコレステロールを搬出し、胆汁酸への転換排出の場である肝に輸送する役割を担う。「コレステロール逆転送」と呼ばれるこのシステムで、末梢 ABCA1 はコレステロール含量の高い HDL を形成して細胞からコレステロールを放出し、肝 ABCA1 はアポ A-I にリン脂質を付加して preβHDL を形成し、末梢組織に安定に供給する役割を持つ。

を形成する (図1上)¹⁾。本稿では、HDL を最も多く生産する肝の ABCA1 について、末梢とは異なる役割²⁾と独自の転写制御機構³⁾を解説したい。

2. 肝と末梢の ABCA1 は異なる役割を持つ

末梢マクロファージの ABCA1 はマウスで選択的に欠損させても血中 HDL 低下はわずかである⁴⁾。一方、肝特異的 ABCA1 欠損マウスでは血中 HDL が 80% 低下し、肝 ABCA1 が HDL 生産に最も重要な役割を持つことが判明した⁵⁾。HDL コレステロールを処理する肝が、血中 HDL の大部分を生産することは一見矛盾するように思われる。しかしその後、肝の ABCA1 はコレステロール含量の低い preβHDL 粒子を形成してコレステロール回収のために末梢に供給し、末梢の ABCA1 は細胞コレステロールを放出してコレステロール含量の高い HDL を形成する役割分担 (図1) が明らかにされた²⁾。

肝で合成分泌される遊離アポ A-I は、血中では不安定で腎で分解される。その消失は肝 ABCA1 が欠損するとより速やかに起こることから、肝 ABCA1 がアポ A-I に脂質を

付加して安定化する役割が明らかになった⁵⁾。

肝 ABCA1 が未成熟の、末梢の ABCA1 がコレステロール含量の高い成熟した HDL を形成する役割は次のように実証された。全組織の ABCA1 欠損マウスにアデノウイルスベクターで肝のみに ABCA1 を回復させても、血中に出現する HDL 粒子のコレステロール含量は低い。ところが肝特異的 ABCA1 欠損マウスに同じ処理を行うと、コレステロール含量が高く粒子径が大きい HDL が出現し、肝 ABCA1 は主にリン脂質を含む HDL を形成すること、コレステロール積込みには末梢 ABCA1 が必要であることが示された²⁾。同じ結果は、肝 ABCA1 が形成する HDL に似たリン脂質/アポ A-I 複合体を肝特異的 ABCA1 欠損と全欠損マウスに静脈注射する実験からも得られている²⁾。

肝と末梢の ABCA1 はどのような機序でコレステロール含量の異なる HDL 粒子を形成するのであろうか？ 培養細胞が産生する HDL のコレステロール/リン脂質の比率は細胞の種類により異なり、強制発現系では ABCA1 発現が増えるとコレステロール含量が増加する⁶⁾。したがって、アポ A-I とリン脂質から HDL を形成することが ABCA1

の基本的機能であり、HDLのコレステロール含量は、ABCA1の局在する細胞膜ドメインの環境や細胞内コレステロール輸送系とのリンクの有無により変わる可能性が考えられる。ABCA1は細胞膜の非ラフトドメインに局在するとされるが異論もある。また未成熟の pre β HDL に細胞コレステロールを移す機能を持つ ABCG1 が ABCA1 と協調して働くことも (図1)⁷⁾、コレステロール含量の高い HDL を産生する要因の一つと思われる。ABCG1 はマクロファージ系細胞での発現が高く、肝ではクッパー細胞や内皮細胞に強く発現している⁸⁾。

3. 肝と末梢の ABCA1 はコレステロールに異なる発現応答を示す

マクロファージや繊維芽細胞の ABCA1 は細胞にコレステロールを負荷すると発現が上昇し、細胞内コレステロールを放出して HDL を産生することにより細胞内コレステロールホメオスタシスが保たれる。この応答はオキシステロールを感知して活性化する核内受容体 liver X receptor (LXR) が ABCA1 プロモーターを直接活性化するメカニズムによる⁹⁾。逆にヒドロキシメチルグルタリル (HMG)-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンやスクアレンエポキシダーゼ阻害剤により、コレステロール生合成経路で生成する内因性 LXR リガンドが低下し、ABCA1 発現は低下する¹⁰⁾。

一方著者らは、肝由来細胞の ABCA1 はタンパク質、mRNA とともに合成 LXR アゴニストで上昇するもののステロールでは逆に低下し、スタチンでは低下せず、独自のコレステロール応答を示すことを見いだした (図2A)³⁾。またマウス肝の ABCA1 はコレステロール食不応答であることが複数報告されており、肝 ABCA1 は末梢細胞とは異なる独自の発現制御を受けることを確信した。

4. 肝の ABCA1 は肝型と末梢型のプロモーターによる二重の発現制御を受ける

そこで肝独自の ABCA1 発現制御機構を解析した³⁾。ラット肝および小腸の ABCA1 mRNA を 5'-RACE (rapid amplification of cDNA end) 法により分析すると、小腸ではエクソン1から転写が開始される既存の ABCA1 mRNA (末梢型) のみが検出されたが、肝には末梢型の他にエクソン2から転写される ABCA1 mRNA が存在しており、肝型と命名した (図2B)。肝型と末梢型の ABCA1 mRNA はマウスおよびヒト肝にも検出され、二重制御が種を超えて存在することが示唆される。末梢型および肝型は翻訳開始

点より上流に転写が開始されており、同じ N 末端を持つタンパク質が生成すると考えられる。ラットのほとんどの組織では主に末梢型が存在していたが、肝および腎では末梢型以外の mRNA の存在量が大きく、肝では 2/3 が肝型であった。

ラット肝由来の McARH7777 細胞では、肝型 ABCA1 mRNA はステロールで低下し、スタチンで増加した。前述したような肝独自の応答は、肝型応答と末梢型応答を加算することで説明できる。エクソン1上流の末梢型プロモーターは LXR により制御され、LXR アゴニスト TO901317 で活性化され、LXR 内因性リガンドを低減させるスタチン処理で活性が低下する。これに対し、エクソン2上流に見いだした肝型プロモーターは、LXR アゴニストに応答せず、スタチンにより活性化された (図2B)。このような肝型プロモーターのスタチン/ステロール応答は -221 領域に存在する sterol responsive element (SRE) が担っていた。SREBP-2 はコレステロール欠乏により活性化され核内移行する転写因子であるが、実際にスタチンで SREBP-2 の核内移行型が増加し、この SRE 配列に結合すること、さらに肝型プロモーターのコレステロール低下による活性化は SREBP-2 が担うことを、siRNA ノックダウンや核内移行型 SREBP-2 発現により明らかにした。さらに、肝 ABCA1 の二重制御は *in vivo* でも機能し、胆汁酸吸着樹脂/スタチン投与でラット肝のコレステロールを 20% 低下させると、末梢型 ABCA1 mRNA の低下と肝型の増加、肝 ABCA1 タンパク質と血中 HDL の上昇が認められている。

5. 末梢 ABCA1 は細胞内コレステロールホメオスタシスと病態を制御する

遊離コレステロールは細胞毒であり、細胞内のコレステロールレベルは SREBP-SCAP (SREBP cleavage activating protein) 系がコレステロールレベルの感知と合成・取込み・エステル化の転写制御を行い常に一定に保たれる。ABCA1-HDL 系も細胞内コレステロールホメオスタシスの維持に大きく貢献しており、ABCA1 欠損による細胞へのコレステロール蓄積が病態発現につながる例が知られている。マクロファージの ABCA1 は欠損しても血中 HDL レベルには大きく影響しないが、動脈硬化モデルで欠損すると病態が進展する¹¹⁾。また膵ベータ細胞特異的に ABCA1 が欠損するマウスでは、ベータ細胞にコレステロールが蓄積し、インスリン分泌の低下により 2 型糖尿病を発症する¹²⁾。

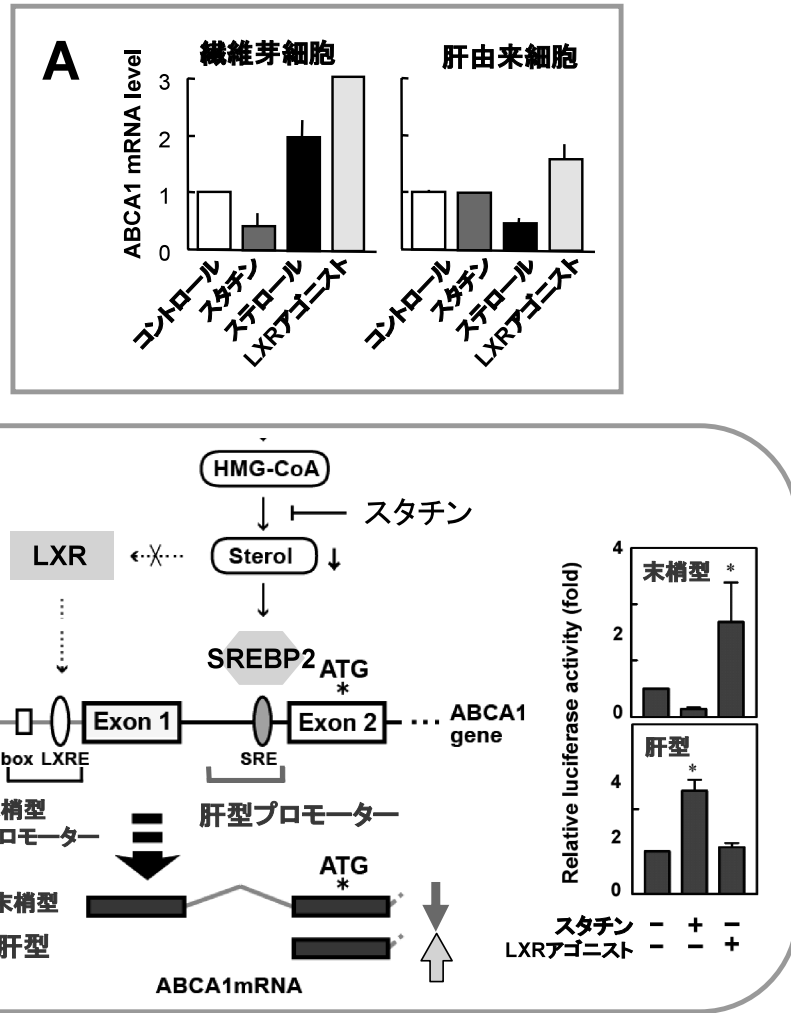


図2 肝 ABCA1 は二重のプロモーターにより独自の転写制御を受ける
 (A)末梢と肝の ABCA1 発現は細胞内コレステロール状態に異なる応答を示す. (B)肝では末梢型と肝型の二つのプロモーターにより, 2種類の ABCA1 mRNA が転写される. スタチン処理でコレステロールが低下すると, LXR 依存の末梢型活性は低下し, SREBP-2 による肝型は活性化する. この二重制御により肝特異的な応答がもたらされる.

6. 肝の二重制御はなぜ存在するのか？

末梢では LXR 応答プロモーターが ABCA1-HDL 系を介して細胞へのコレステロール蓄積を防ぐ. 肝の ABCA1 発現はなぜ, LXR-末梢型と SREBP-2-肝型の二重プロモーター制御を受けるのであろうか? 肝は「コレステロール逆転送系」の終末で, 末梢組織から運び出したコレステロールを処理する役割を持つ (図1). コレステロール濃度が高まり LXR が活性化されると, 胆汁酸への転換反応の律速酵素 CYP7A1 とともに, 胆管にコレステロールを排出する ABCG5/ABCG8 の発現が上昇する¹³⁾. ABCA1 末

梢型プロモーターは強力に活性化されるが, このまま ABCA1 発現が過剰に上昇すると, 肝内のコレステロールは再び末梢に輸送される危険がある. そこで SREBP-2 依存の肝型プロモーター活性が低下することにより, 再輸送を防ぐのかもしれない. また逆に肝内のコレステロールが枯渇した場合には, LXR 活性が低下しても SREBP-2 依存の肝型プロモーターが活性化すれば一定の ABCA1 発現と preβHDL 生産を維持することができ, 末梢からコレステロールを回収できる. このように, アクセルとブレーキを備えた肝の二重制御システムは, コレステロール逆転送系における肝 ABCA1 の役割に深く関連していると思われ

る。

最近, SREBP-2 と SREBP-1 遺伝子がコードするマイクロ RNA miR-33 が ABCA1 mRNA を標的として発現を低下する現象が発見された¹⁴⁾。細胞内コレステロール量による miR-33 の変動は大きくなく影響は限定的と思われるが, 末梢細胞では ABCA1 の転写による制御を増強し, 肝では二重転写制御機構とともにコレステロールによる変動を緩和していると考えられる。

HDL は 10 mg/mL 上昇すると冠動脈疾患のリスクが 20~30% 低下すると予想され, HDL 上昇薬が待望されている。核内受容体 LXR アゴニストは末梢型 ABCA1 転写を直接促進するが, 中性脂質合成のマスターレギュレーター SREBP-1c 発現促進により高トリグリセリド血症や脂肪肝の副作用を引き起こすことが薬の開発を阻んでいる¹⁵⁾。肝 ABCA1 の発現量は血中 HDL レベルに最大のインパクトを持ち⁵⁾, 動脈硬化進展にも大きく寄与することが欠損マウスで確認されている¹⁶⁾。肝型転写制御の発見と解明は新薬開発への大きな貢献が期待される。ヒトでも肝型・末梢型の双方向二重制御は共通するが, 遺伝子構造の違いからヒト独自の機構が存在しており, 現在解明を進めている。

- 1) Yokoyama, S. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 20-27.
- 2) Singaraja, R.R., Van Eck, M., Bissada, N., Zimetti, F., Collins, H.L., Hildebrand, R.B., Hayden, A., Brunham, L.R., Kang, M. H., Fruchart, J.C., Van Berkel, T.J., Parks, J.S., Staels, B., Rothblat, G.H., Fievet, C., & Hayden, M.R. (2006) *Circulation*, **114**, 1301-1309.
- 3) Tamehiro, N., Shigemoto-Mogami, Y., Kakeya, T., Okuhira, K., Suzuki, K., Sato, R., Nagao, T., & Nishimaki-Mogami, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 21090-21099.
- 4) Haghpassand, M., Bourassa, P.A., Francone, O.L., & Aiello, R. J. (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 1315-1320.
- 5) Timmins, J.M., Lee, J.Y., Boudyguina, E., Kluckman, K.D., Brunham, L.R., Mulya, A., Gebre, A.K., Coutinho, J.M., Colvin, P.L., Smith, T.L., Hayden, M.R., Maeda, N., & Parks, J.S. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 1333-1342.
- 6) Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., Okazaki, M., Ueda, K., & Yokoyama, S. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 1703-1711.
- 7) Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., & Tall, A. R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9774-9779.
- 8) Bojanic, D.D., Tarr, P.T., Gale, G.D., Smith, D.J., Bok, D., Chen, B., Nusinowitz, S., Lövgren-Sandblom, A., Björkhem, I., & Edwards, P.A. (2010) *J. Lipid Res.*, **51**, 169-181.
- 9) Costet, P., Luo, Y., Wang, N., & Tall, A.R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 28240-28245.
- 10) Wong, J., Quinn, C.M., & Brown, A.J. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 2365-2371.
- 11) Aiello, R.J., Brees, D., Bourassa, P.A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M., & Francone, O.L. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 630-637.
- 12) Brunham, L.R., Kruit, J.K., Pape, T.D., Timmins, J.M., Reuwer, A.Q., Vasanji, Z., Marsh, B.J., Rodrigues, B., Johnson, J. D., Parks, J.S., Verchere, C.B., & Hayden, M.R. (2007) *Nat. Med.*, **13**, 340-347.
- 13) Edwards, P.A., Kast, H.R., & Anisfeld, A.M. (2002) *J. Lipid Res.*, **43**, 2-12.
- 14) Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E., Näär, A.M. (2010) *Science*, **328**, 1566-1569.
- 15) Fiévet, C. & Staels, B. (2009) *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 1316-1327.
- 16) Brunham, L.R., Singaraja, R.R., Duong, M., Timmins, J.M., Fievet, C., Bissada, N., Kang, M.H., Samra, A., Fruchart, J.C., McManus, B., Staels, B., Parks, J.S., & Hayden, M.R. (2009) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 548-554.

最上(西巻) 知子

(国立医薬品食品衛生研究所)

Dual regulation of hepatic ABCA1 gene expression
Tomoko Nishimaki-Mogami (National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)