OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Expression and Functional Analyses of Novel Mutations of ATP-Binding Cassette Transporter-1 in Japanese Patients with High-Density Lipoprotein Deficiency
Author(s)	西田, 義治
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43737
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	西田義治（にしだよしはる）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 16831 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Expression and Functional Analyses of Novel Mutations of ATP-Binding Cassette Transporter-1 in Japanese Patients with High-Density Lipoprotein Deficiency （日本人の高比重リポ蛋白欠損症患者に新規に発見されたATP-Binding Cassette Transporter-1変異体の発現および機能解析）
論文審査委員	（主査） 教授 松澤 佑次 （副査） 教授 高井 義美　教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【背景と目的】

多くの疫学的研究において、高比重リポ蛋白（HDL）コレステロールと虚血性心疾患の有病率との間に負の相関が認められており、HDLは動脈硬化防御作用を有すると考えられる。HDLを介した動脈硬化防御機構として最も重要であると考えられるのが、末梢血管壁に蓄積したコレステロールを肝臓へと運ぶコレステロール逆転送系である。この第一段階はCholesterol Efflux（CE）と呼ばれ、apolipoprotein A-1（apo A-1）又は小粒子HDLによる細胞からのコレステロール引き抜きである。Tangier病は家族性HDL欠損、オレンジ扁桃、肝脾腫、動脈硬化を主臨床症状とする全身性の脂質の蓄積を示す疾患であり、CE機構が障害されたモデル疾患と考えられているが、その分子機構は長い間明らかではなかった。1999年、その原因遺伝子としてATP-Binding Cassette Transporter-1（ABCA1）が同定された。一方、ABCA1遺伝子の変異がありCEが障害されているにもかかわらず、Tangier病の表現型を示さない家族性HDL欠損症も報告されており、ABCA1遺伝子変異をもった家族性HDL欠損症の臨床プロファイルは不均一である。疾患に関連した変異体の発現と機能との関係は現在までほとんど検討されていない。

本研究は、私達が発見した日本人の高比重リポ蛋白欠損症患者3症例においてABCA1変異体の発現および機能を解析し、病態との関連を検討したものである。

【方法】

① 3症例のABCA1遺伝子解析　血清HDLの低下を認めた3症例の白血球DNAを用い、ABCA1遺伝子をPCRにて増幅後direct sequenceした。

② 患者由来皮膚線維芽細胞における内因性ABCA1の発現　ABCA1遺伝子の転写活性因子であるLXR・RXRのリガンドによる誘導下または非誘導下で、RT-PCR法にてmRNA発現を、Western blot法にて蛋白発現を解析した。

③ 過剰発現系でのABCA1変異体の蛋白発現　各々の症例の変異ABCA1に対応するABCA1 cDNA-FLAGを作製し、Cos-7細胞に過剰発現させた後、Western blot法にて蛋白の発現を解析した。

④ apo A-1を介した細胞からのコレステロール引き抜き能　患者由来皮膚線維芽細胞を用いた系と過剰発現系（Cos-7細胞またはHEK293細胞）で検討した。

【成績】

全症例にABCA1遺伝子の変異が発見され、各々の変異のホモ接合体であった。また、全症例とも線維芽細胞からのCE能はコントロールに比較して著明に低下していた。症例1のABCA1は核酸でG1158A、アミノ酸でA255Tと変異していた。内因性ABCA1の発現は、非誘導下でコントロールに比較してmRNA発現が著明に低下し、蛋白発現は誘導下でも検出できなかった。一方、過剰発現系ではコントロールと変化はなかった。症例2のABCA1は核酸でC5946T、アミノ酸でR1851Xと変異していた。内因性の蛋白発現はtruncated蛋白が抗体に対するエピトープを欠失していたため評価不能であったが、過剰発現系でのABCA1 cDNA-FLAGの蛋白発現および細胞からのCE能は著明に低下していた。症例3のABCA1は核酸でA5226G、アミノ酸でN1611Dと変異していた。ABCA1の蛋白発現はコントロールと変化はなかったが、線維芽細胞およびABCA1 cDNA-FLAG過剰発現細胞からのCE能とも著明に低下していた。

【総括】

症例1ではABCA1 mRNAの発現異常、症例2ではABCA1蛋白の発現異常、症例3ではABCA1蛋白の三次構造の変化等による機能異常を来すことが、HDL欠損症の原因であると考えられた。本研究はHDL欠損症患者のABCA1分子が成熟した機能蛋白となるまでの異なった段階で障害を受けていることを明らかにした。本研究によりHDLを介したコレステロール引き抜き機構さらには動脈硬化防御機構解明の発展に重要な情報を与えると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Positional cloningによって、ATP-Binding Cassette Transporter-1（ABCA1）は、家族性HDL欠損症の一部の原因であることが示され、動脈硬化防御機構であるコレステロール逆転送系の重要な分子の一つであると考えられる。しかしながら、ABCA1の発現と機能の相互関連は未だ全く明らかではなかった。

本研究において、申請者は、極めて稀なHDL欠損症患者において3種の異なるABCA1変異体を発見した後、その発現系を確立し、それぞれがABCA1分子のmRNA発現から成熟機能蛋白となるまでの異なった段階で障害を受ける結果コレステロール引き抜き機構が破綻していることを明らかにした。

本研究は今後のコレステロール引き抜き機構さらには動脈硬化防御機構解明の発展に重要な情報を与えると考えられ、極めて意義深く、学位に十分値するものである。