

## 論文の内容の要旨

論文題目 Transcriptional regulation of class A macrophage scavenger receptor and its role in macrophage apoptosis

和訳 クラス A スカベンジャー受容体の転写調節とアポトーシスにおける役割

指導教官 児玉 龍彦  
東京大学大学院医学系研究科  
平成9年4月入学  
医学博士課程  
分子細胞生物学専攻

氏名 廖 海孫 (Haisun Liao)

院生番号 77314

アテローム性動脈硬化の発症における細胞生物学な鍵となる現象はマクロファージ由来の泡沫細胞の形成である。血管壁に血液中の低比重リポ蛋白 (LDL) 由来のコレステロールが沈着し、酸化変性などの修飾を受けると集積してきたマクロファージがスカベンジャー受容体ファミリーの蛋白を発現してこれを貪食し泡沫化すると考えられている。スカベンジャー受容体クラスAは、高いエンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、細胞接着活性を示す3量体膜蛋白型受容体で、マクロファージ特異的な発現を示す。この受容体の発現の結果、血管壁に蓄積した変性LDL由来のコレステロールを蓄積しつつ、泡沫細胞形成にいたると考えられている。

私はマクロファージ特異のクラスAスカベンジャー受容体の発現の分子機構を明らかにしその泡沫細胞形成における役割を明らかにしようと考えた。同時に、アテローム病巣において集積するクラスAスカベンジャー受容体発現マクロファージがアポトーシスに抵抗性を示す事と、その誘導にどのような関連があるかを明らかにしようと考えた。このため下記の4つの研究を継続して行った。

第一に、実験の基礎としてマクロファージへの新規の高効率遺伝子導入法を開発した。

マクロファージ系細胞における遺伝子発現の検討に大きな問題となるのは、マクロファージ系細胞に高効率で遺伝子導入を行うことが困難なことである。マクロファージ系細胞へのエレクトロポレーションの条件の検討を行い、至適DNA濃度 (50ug/ml)、ポレーション時のRPMI 1640の使用、960uF、400V、室温 (冷却をさける) という条件により従来より20倍の導入遺伝子発現効率の向上をえた。

第二に、クラスAスカベンジャー受容体のプロモーターの解析を進めた

上記の条件において、まずクラスAスカベンジャー受容体のプロモーター領域の解析を行い、マウスの培養マクロファージ系細胞において、-630から+50の配列中に上流6

kbまででのもっとも促進的効果を示すエレメントが存在することを明らかにし、-504から-485の領域にマクロファージ特異の転写調節領域があり、マクロファージ特異的に核蛋白が結合することをDNAフットプリント、ゲルシフトアッセイで証明した。

第三に、上記の遺伝子導入法を用いて、マクロファージ機能に重要なサイトカインIL-6によるクラスAスカベンジャー受容体転写活性調節の分子機構を検討した。

IL-6は蛍光標識アセチルLDLの取り込みをマクロファージにおいて著しく抑制することを発見した。次にIL-6が濃度依存的に1型およびII型の両方のクラスAスカベンジャー受容体mRNAの発現を抑制することを発見した。そこでマクロファージ系細胞への遺伝子導入法を用いて-630から+50の配列のルシフェラーゼをレポーターとした転写活性がIL-6により抑制されることを証明した。とくにAP-1/e tsシスエレメント活性が抑制されることがわかった。

第四に、クラスAスカベンジャー受容体発現がマクロファージのアポトーシス抑制に働くことをいくつかの実験系で検討した。

PMA処理THP-1細胞は、NaFの5mMまでの細胞死誘導において生存率が有意に上昇する。この細胞死はTUNELアッセイなどでアポトーシスによると考えられた。CHO細胞はクラスAスカベンジャー受容体を過剰に発現させるとNaFによるアポトーシス誘導に対し、同様な生存率の有意な上昇を示した。THP-1細胞のフォルボルエステルによるマクロファージ系への分化にともなっては、CPP32とFasリガンドの誘導が見られたが、Bcl-2レベルは不変であった。クラスAスカベンジャー受容体のアポトーシス抑制の分子機構は不明であり今後の検討が必要と思われる。クラスAスカベンジャー受容体を強制発現したCHO細胞で、酸化LDLまたは7ketocholesterolにより誘導されるアポトーシスに抵抗性になる。一方、クラスAスカベンジャー受容体欠損マクロファージは、上記の濃度範囲で生存率は有意に低下し、マクロファージのアポトーシス抑制活性はクラスAスカベンジャー受容体の機能に依存することが強く示唆された。

本研究においてクラスAスカベンジャー受容体のマクロファージ特異の発現には、-630から+50の間のプロモーター領域にある-504/-485新規エレメントおよびAP-1/e tsエレメントが重要であること、IL-6はこれらの領域を通じてクラスAスカベンジャー受容体の発現を抑制すること、アポトーシス誘導に抵抗性を与えることが示された。

クラスAスカベンジャー受容体欠損マウスでは50%以上の酸化LDL取り込み能力が残存するにもかかわらず、アテローム病巣サイズは顕著に縮小することが知られている。今回のクラスAスカベンジャー受容体のアポトーシス抵抗性への関与と、炎症性サイトカインによるその発現抑制は、動脈硬化発症におけるクラスAスカベンジャー受容体のあらたな関与のメカニズムの理解に重要なものと考えられる。