

論文の内容の要旨

論文題目 アポ E アイソフォームのマクロファージからのコレステロール引き抜きおよび VLDL リポリシスに対する効果の相違の研究

指導教官 木村 哲教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月 1 日入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 原 眞純

【はじめに】

アポ E は、リポ蛋白代謝において重要な役割を果たす 34 kDa の蛋白質で、リポ蛋白受容体に対するリガンドとして作用する他に、抗動脈硬化性のリポ蛋白質と考えられている HDL による末梢組織からのコレステロール逆転送系への関与や、アルツハイマー病との関連、抗酸化作用等様々な機能を持つことが指摘されている。

ヒトでは、アポ E 2 (112 Cys、158 Cys)、アポ E 3 (112 Cys、158 Arg)、およびアポ E 4 (112 Arg、158 Arg) の 3 種の主要アイソフォームが存在し、臨床的にも重要な意義をもつことがわかっている。アポ E 4 対立遺伝子を有しているヒトでは、総コレステロール、LDL コレステロールが高値となることが知られ、アポ E 2 ホモ接合体のヒトでは、肥満、糖尿病、甲状腺機能低下などの内分泌異常を併発した場合に、血漿コレステロール、中性脂肪共に上昇し、III 型高脂血症をきたすことが知られている。この他にも、アポ E 4 の対立遺伝子はアルツハイマー病の危険因子であるとの報告もあり、アポ E が多彩な機能を有し、それが主要アイソフォームと関連している多くの報告がある。

本研究では、アポ E の機能のうち、リポ蛋白受容体のリガンドとしての受動的な働きではなく、アポ E が持つ直接の作用として、マクロファージからのコレステロール引き抜きへの効果、VLDL 上の中性脂肪水解(リポリシス)への効果についての検討を行った。最初に、マクロファージからのコレステロール分泌との関連について検討した。アポ E は、主として肝臓で、しかしマクロファージでも発現しており、コレステロールを細胞内に取り込んで泡沫化したマクロファージがアポ E を産生・分泌するの

に伴い、細胞内のコレステロール含量が減少することが知られている。一方、アポ E 欠損マウスに、肝臓で特異的にアポ E アイソフォームを発現させた実験において、血清脂質の値の変化と同時に、動脈硬化巣の進展抑制、退縮が認められ、同時に動脈硬化巣に肝臓由来のアポ E の沈着が認められていることから、アポ E の動脈硬化巣への直接的な作用は、動脈硬化巣で局所的に分泌されたアポ E によらなくても起こりうることを示している。現在までに、マクロファージからのアポ E によるコレステロール引き抜きに関して、アイソフォーム間の相違を、内因性、外因性の両面から検討した研究は報告されていない。

次に、VLDL の中性脂肪水解(lipolysis)に対する効果について検討した。アポ E が VLDL の水解に直接及ぼす作用については、体外での実験の結果より、VLDL 中のアポ E は用量依存的に中性脂肪水解を抑制することが報告されているのに対し、アポ E/LDL 受容体欠損マウスにアポ E を遺伝子導入した実験により、VLDL 上のアポ E は、中等度の量までは中性脂肪水解を促進し、多量では抑制することが示唆されている。この機序については、VLDL 上でアポ CII が排除されるためとの説もあるが、他の原因も含め、解明されていない点も多い。また、各アイソフォームとの関係についての報告は現在のところされていない。

今回の研究では、マクロファージよりのコレステロール引き抜きに関して、内因性にアポ E を発現しないマクロファージ系培養細胞の Raw 264.7 細胞を用い、アポ E アイソフォーム遺伝子をアデノウイルスベクターで導入し、コレステロール引き抜きに対する効果を検討した。また、外因性のアポ E によるコレステロール引き抜きへの効果について、HeLa 細胞に産生させたアポ E アイソフォームを用いて検討を行った。VLDL の中性脂肪水解への効果については、アポ E/LDL 受容体欠損マウスにアポ E アイソフォームを遺伝子導入して各アイソフォームのみを含む VLDL を採取し、さらにアポ E 濃度を変化させながら中性脂肪水解率を検討した。

【方法】

マクロファージ系培養細胞である Raw264.7 細胞を泡沫化し、同力価のアデノウイルスベクターを用いて各アイソフォームの遺伝子を発現させ、60 時間後の細胞内コレステロール量をコントロールウイルス (LacZ 発現ウイルス) を感染させたものと比較した。細胞表面のプロテオグリカン合成阻害剤である β -DX (4-Methylumbelliferyl 7- β D-Xyloside) の作用の下でも実験を行い、細胞表面のプロテオグリカンとの関係についても検討を行った。外因性のアポ E がコレステロール引き抜きに与える効果を検討するため、HeLa 細胞に同じアデノウイルスでアポ E を発現させ、培地内に分泌されたアポ E 濃度を測定して、アイソフォーム間で同じ濃度になるように調製し、泡沫化した Raw 細胞に加えて、細胞内コレステロール量の変化を比較した。

VLDL の中性脂肪水解への効果の検討は、アポ E/LDL 受容体欠損マウスに、アポ E

アイソフォーム遺伝子をアデノウイルスベクターで発現させ、各アイソフォームのみを含む VLDL を採取した。採取した VLDL のアポ E 濃度と中性脂肪(TG)濃度を測定し、アポ E を遺伝子導入しないアポ E/LDL 受容体欠損マウスの VLDL と混合・孵置することで、TG に対するアポ E の濃度を变化させた検体を調製し、体外で LPL と反応させて中性脂肪水解を測定した。各アポ E 濃度での水解率を、アポ E を含まない VLDL と比較すると共に、アイソフォーム間での水解率の相違を検討した。

【結果】

β -DX 処理を行わない場合は、アポ E2 を発現した細胞では、泡沫化しない細胞の総コレステロールを 100 として補正した細胞内総コレステロール(245 ± 6.2 : mean \pm SEM)、コレステロールエステル(47 ± 10.3)は、いずれもコントロール(総コレステロール 281 ± 9.4 、コレステロールエステル 86 ± 8.8)より低値となっていたが、アポ E3、E4 ではコントロールと比較して有意な変化は認められなかった。これに対し、 β -DX 処理によりプロテオグリカンの合成を阻害した場合は、すべてのアイソフォームで細胞内コレステロールの低下傾向は増強し、E2(総コレステロール: 150 ± 0.84 、コレステロールエステル: 73 ± 2.8)、E3(総コレステロール: 135 ± 2.1 、コレステロールエステル: 54 ± 2.2)、E4(総コレステロール: 144 ± 5.8 、コレステロールエステル: 56 ± 5.7)と、すべてのアイソフォームで細胞内コレステロールは、コントロール(総コレステロール: 202 ± 7.0 、コレステロールエステル: 95 ± 6.8)と比較して有意に低下した。アイソフォーム間では、総コレステロール、コレステロールエステル共に E3 で低値となっていた。これに対し、E2 では、E3、E4 に比べてコレステロール減少は少なかった。HeLa 細胞により産生された外因性アポ E を加えた実験では、 β -DX 処理を行わないと、E2 では、細胞内総コレステロール(232 ± 13.6)、コレステロールエステル(135 ± 12.2)共に、コントロール(総コレステロール 301 ± 11.2 、コレステロールエステル 188 ± 11.2)と比して有意に低下していた。E3、E4 についても、コレステロールの低下している傾向は認めたが、E3 の総コレステロール(250 ± 6.5)を除いては、有意差は得られなかった。一方、 β -DX 存在下では、E2(総コレステロール: 184 ± 10.7 、コレステロールエステル: 60 ± 9.9)、E3(総コレステロール: 186 ± 5.8 、コレステロールエステル: 58 ± 8.4)、E4(総コレステロール: 179 ± 5.2 、コレステロールエステル: 51 ± 3.9)のようにすべてのアイソフォームで細胞内コレステロールはコントロール(総コレステロール: 214 ± 2.2 、コレステロールエステル: 104 ± 5.9)に比して有意に低下していたが、アイソフォーム間では差を認めなかった。

混和調整した VLDL をウシ LPL により水解し、放出される遊離脂肪酸の定量を行って、VLDL 水解への影響を検討した結果、E2、E3、E4 のすべてのアイソフォームについて、アポ E (TG) 濃度が増すにつれ、中性脂肪水解の抑制が認められた。アイソフォーム間でみると、低濃度ではアイソフォーム間では中性脂肪水解に差を認めなかったが、中等度の濃度ではアポ E4 で中性脂肪水解の抑制が小さいことが示され

た。正常人の VLDL アポ E 濃度に相当するとされる、 $20\mu\text{g}/\text{mg}$ TG の濃度では、アポ E4(96 ± 1.3 : mean \pm SD)は、E2(76 ± 0.5)、E3(81 ± 4.3)と比して中性脂肪水解抑制が弱いことがわかった。アポ E2 の抑制効果は特にアポ E 濃度が高い領域で E3、E4 に比べて強いことがわかった。

【考察】

泡沫化したマクロファージ系細胞にアポ E を内因性に発現させたところ、すべてのアイソフォームで細胞内コレステロールが減少し、アイソフォーム間では E2、E4 と比べて E3 での減少の程度が大きかった。細胞内プロテオグリカンを増加させずに実験を行った結果では、引き抜かれたコレステロールがアポ E と共に細胞表面に接着していると考えられ、プロテオグリカンを介した細胞表面との接着は、E4 で強く、E2 で弱いことが考えられた。HeLa 細胞で作られた外因性のアポ E を加えた結果でも、いずれのアイソフォームにおいても細胞内コレステロールの減少がみられたが、アイソフォーム間での差は認めなかった。このことより、アポ E が純粋にコレステロールを引き抜く作用は E3 で大きく、次いで E4、E2 の順であるが、生理的に細胞表面のプロテオグリカンが存在する状態では、引き抜かれたコレステロールがアポ E と共に細胞表面に接着することに影響されることが示された。この接着により、アポ E4 でのコレステロール引き抜きが少ない可能性が考えられ、これはアポ E4 遺伝子が独立した虚血性心疾患の危険因子であることと関連する可能性が考えられた。

VLDL 中のアポ E 濃度を中性脂肪に対して上昇させると、中性脂肪水解(lipolysis)の抑制を認め、アイソフォーム間では、E4 で抑制の程度が小さく、E2 で大きく抑制する相違があることがわかった。この相違には、VLDL 中のアポ CII の減少、VLDL 中のコレステロール含量の増加が関与していることが考えられたが、他の要因が存在する可能性も考えられた。アポ E2 でリポリシスの抑制が強いことは、マウスでのアポ E アイソフォーム発現の実験で著明な高中性脂肪血症をきたす一因であることを示し、またアポ E2 遺伝子をもつヒトにおいて、特に食後の中性脂肪血症が認められることにも合致する所見と考えられた。一方、アポ E4 でリポリシスの抑制が小さいことで、VLDL より IDL・LDL への代謝が促進されることが予想され、アポ E4 遺伝子が高 LDL コレステロール血症と関連がみられることの一因となっている可能性も考えられた。