

## 審査の結果の要旨

氏名 原 眞純

本研究は、アポ蛋白質であるアポEについて、それがリポ蛋白レセプターのリガンドとなる以外に、脂質代謝に関わる細胞や酵素に対して直接持つと考えられる作用について、主要アイソフォーム間での相違の検討を行っている。最初に、マクロファージのコレステロール引き抜きへの効果について、次に、VLDL 上の中性脂肪のリポ蛋白リパーゼ (LPL) による水解 (リポリシス) への効果について検討を行い、以下のような知見が得られている。

1. アデノウイルスベクターを用いてアポEをマクロファージ系培養細胞である RAW264.7 細胞に発現させると、細胞内コレステロールの減少がおき、アイソフォーム間では、アポ E2 で細胞内コレステロールの減少が大きく、E4 で小さい結果となった。一方、細胞表面のプロテオグリカンの合成を阻害した条件で同じ実験を行うと、細胞内コレステロールの減少の程度は大きくなり、アイソフォームでは、アポ E3 で細胞内コレステロールの減少の程度が大きく、次いで E4、E2 の順となっていた。この結果から、アポ E がコレステロールを純粋に引き抜く作用は E3>E4>E2 の順で強いことが明らかになったが、同時に、生理的に細胞表面に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と共に細胞表面にプロテオグリカンを介して接着することが引き抜きに影響を及ぼすことが明らかとなり、この接着は、E4 で大きく、E2 で小さいことが示された。
2. HeLa 細胞によって産生させた外因性のアポEを RAW 細胞に加えたところ、やはりアポE2で細胞内コレステロールの減少が大きかったが、細胞表面のプロテオグリカンを減少させると、アイソフォーム間での相違は消失した。これにより、外因性のアポEによる純粋なコレステロール引き抜きについては、アイソフォーム間では相違を認めないことが示された。一方で、プロテオグリカンが存在する生理的な条件では、内因性と同様に、引き抜かれたコレステロールの細胞表面への接着が起こることが示された。接着後のコレステロールの代謝については現段階では不明であるが、後に細胞内に再度取り込まれる可能性も想定され、生理的な条件ではアポ E4 で細胞内コレステロールの引

き抜きが小さく、E2 で大きい可能性が示唆された。これは、アポ E4 遺伝子を持つことが、血清コレステロールレベルに関係なく虚血性心疾患の独立した危険因子であることの一因である可能性も考えられた。

3. アポ E と LDL 受容体のダブルノックアウトマウスにアデノウイルスでアポ E アイソフォーム遺伝子を発現させることで、LDL 受容体による取り込みの影響を受けず、尚且つ各アイソフォームのみをアポ E として持つ VLDL を採取し、基質である中性脂肪とアポ E との比を変化させて LPL と反応させ、水解率を比較した。その結果、アポ E は濃度依存性にリポリシスを抑制し、リポリシスを促進する作用は認められなかった。アポ E の濃度が低いとアイソフォーム間での相違は認められなかったが、ヒトの血中濃度に近い条件ではアポ E4 ではリポリシスの抑制が小さいことが判明した。アポ E2 はリポリシスを強く抑制し、これはアポ E 濃度が大きくなるにつれて顕著となることも示された。上記の結果は、アポ E2 遺伝子を持つヒトで特に食後に高中性脂肪血症を示すこと、また、アポ E4 遺伝子を持つヒトで LDL コレステロールが高値となっていることの一因である可能性が考えられた。
4. アポ E がリポリシスを抑制する機序として、LPL の活性化因子であるアポ CII を VLDL より排除する可能性が指摘されているため、本実験で用いた VLDL について等電点電気泳動を行ってアポ CII 量の減少を検討したところ、アポ E 濃度の上昇に伴ってアポ CII の減少を認めたが、アイソフォーム間では、アポ E4 でむしろ減少しており、リポリシス抑制の結果を説明するものではなかった。
5. また、アポ E アイソフォームの違いにより、VLDL 中のコレステロールの含有率に差があることがリポリシス抑制の相違につながっていることも考えられたことから、この点についても検討を行った。その結果、アイソフォーム間ではアポ E2 で VLDL 中のコレステロール含有量が高く、これがリポリシスの抑制に関与している可能性が考えられたが、アイソフォーム内では、アポ E の増加に伴って、VLDL のコレステロール含有量が著明に低下するにもかかわらず、リポリシスが抑制されており、コレステロール含有量の増加以外の要因がリポリシスの抑制に関与していることが示唆された。

以上、本論文は、アポ E の脂質代謝への直接的な効果という面から、マクロファージからのコレステロール引き抜き、VLDL のリポリシスに対するアイソフォーム間の相違を明らかにした。本研究は、脂質代謝および動脈硬化におけるアポ蛋白質の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。