

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Elimination of Cholesterol Ester from Macrophage Foam Cells by Adenovirus-mediated Gene Transfer of Hormone-sensitive Lipase

和訳 組み換えアデノウィルスを用いたホルモン感受性リパーゼ過剰発現によるマクロファージの脱泡沫化

指導教官 木村 哲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 岡崎 啓明

文明の近代化に伴う生活習慣の変化により、近年の我が国において、糖尿病・高脂血症・高血圧・肥満などのいわゆる生活習慣病は著しく増加している。これらの疾患を危険因子として発症する脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患もまた増加しており、その発症は生活の質を著しく低下させるだけでなく、死因としても現在の我が国において最多のものとなっており、その治療は重要な課題である。現在のところ動脈硬化性疾患の治療は、上述の危険因子の管理に加えて、閉塞した血管を開通させる内科的カテーテル治療や外科的治療を主体としている。しかし、様々な合併症の存在によりこれらの侵襲的治療が不可能となる症例も数多く、新たな動脈硬化治療法の開発が望まれている。

血管の内腔を被っている血管内皮細胞は、生来様々な侵襲に耐えているが、上述の危険因子の存在によって侵襲を受けやすくなると言われている。侵襲部位の周囲にはマクロファージ (M ϕ) などの炎症細胞が浸潤し、活性化された M ϕ は血中の変性リポ蛋白を取り込むことにより脂質を蓄積し泡沫化 M ϕ となる。この泡沫化 M ϕ の集積により、侵襲部位は脂質を多く含む粥状動脈硬化病変へと進展し、さらには血管を閉塞するに至る。従って、この M ϕ 泡沫化の抑制は、動脈硬化病変の治療の標的として重要である。

M ϕ 泡沫化は、スカベンジャー受容体による変性リポ蛋白の取り込みにより始まる。取り込まれたリポ蛋白中のコレステロールエステル (CE) は一旦ライソゾームで分解された後、acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) によって再エステル化され、CE として細胞内に蓄積し、泡沫化 M ϕ となる。

従って、ACAT の抑制は M ϕ 泡沫化を抑制する可能性があり、これまで多くの研究がなされてきた。様々な ACAT 阻害剤が粥状動脈硬化病変の抑制を目的に作られ、*in vitro* では M ϕ への CE 蓄積を抑制することが示され、*in vivo* でも動脈硬化抑制効果を示す報告もあった。しかし、われわれは以前に、ACAT1 ノックアウトマウスを作成し動脈硬化モデルマウス (LDL 受容体欠損マウス・apoE 欠損マウス) と交配することにより、ACAT1 欠損の動脈硬化に及ぼす影響について検討したところ、ACAT1 欠損は動脈硬化病変の CE 含量を減少させるが著しい病変の改善はもたらさず、逆に黄色腫などの副作用をもたらすことを見出し、ACAT 阻害の治療的意義に疑問を投げかけた。その後、M ϕ 特異的な ACAT1 欠損は逆に動脈硬化を悪化させることが報告された。これは、M ϕ 特異的な ACAT1 欠損によって細胞内に遊離コレステロール (FC) が蓄積し、これにより細胞毒性・細胞死がもたらされ、これにより動脈硬化病変が悪化するためと考えられた。従って、現在では M ϕ 特異的な ACAT1 阻害による泡沫化抑制は、動脈硬化病変の治療手段として考えにくくなった。

さて、M ϕ に蓄積した CE は、中性 CE 水解酵素 (NCEH) によって分解されるといわれている。従って NCEH 活性の増加は、やはり泡沫化を抑制する可能性がある。従来、M ϕ の NCEH は、脂肪細胞において中性脂肪分解酵素 (TGL) として働いているホルモン感受性リパーゼ (HSL) と同一であるとされていた。そこで、M ϕ の NCEH の機能を明らかにするため、われわれは HSL ノックアウトマウスを作成したが、HSL 欠損の M ϕ にも NCEH 活性は残存していたため完全な NCEH 欠損は得られず、結局、M ϕ 泡沫化における NCEH の機能は明らかとはならなかった。そこで今回は、NCEH の M ϕ 泡沫化における役割、その動脈硬化病変の治療手段としての可能性を検討するため、NCEH の責任分子の一つである HSL を泡沫化 M ϕ に過剰発現させた。

M ϕ は、様々な遺伝子導入手段に抵抗性であることが知られている。例えば、プラスミドトランスフェクションによる泡沫化 M ϕ への HSL 過剰発現の報告もあるが、十分な HSL 活性の上昇は得られず、逆に ACAT 活性の代償性の上昇を認めたため、十分に細胞内の CE 水解反応を促進させられず、CE の水解亢進が泡沫化 M ϕ に及ぼす影響は検討できていなかった。そこで、今回は、組み換えアデノウイルスにより HSL を十分に泡沫化 M ϕ に過剰発現させ得る系で検討した。

1) M ϕ における過剰発現モデルの確立

組み換えアデノウイルスを用いて M ϕ に遺伝子を導入した実験の報告はほとんどなく、M ϕ は組み換えアデノウイルスの感染に抵抗性を持つことが予想されたため、まずわれわれは、様々な細胞株・初代培養細胞に β -galactosidase の組み換えアデノウイルスを感染させることにより、その遺伝子導入効率を検討した。その結果、予想通りほとんどの細胞株・初代培養細胞では高い感染効率が得られなかったが、唯一 THP-1 細胞において、細胞毒性の見られないウイルス濃度において、高い感染効率が認められることを見出した。THP-1 細胞は、泡沫化 M ϕ のモデルとしてよく用いられている細胞株であり、組み換えアデノウイルスを用いた THP-1 細胞への遺伝子導入が M ϕ における蛋白の機能解析の有力な研究手法となることを、初めて示した。

次に、HSL の組み換えアデノウイルス (Ad-HSL) を作成した。これを THP-

1 細胞に感染させることにより、HSL を過剰発現させた。過剰発現を、western blot analysis、northern blot analysis、脂肪分解酵素活性 (TGL 活性・NCEH 活性) の測定により確認した。HSL の過剰発現により、NCEH 活性は、コントロールの約 120 倍に上昇した。

次に、THP-1 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate で刺激することにより、THP-1 M ϕ に分化させ、これにアセチル化 LDL (acLDL) を負荷することにより、細胞内に CE を貯留させ、これを泡沫化 M ϕ のモデルとした。

この細胞に、Ad-HSL を感染させ、以下の実験を行った。

2) HSL の過剰発現による M ϕ の脱泡沫化

泡沫化 M ϕ に HSL を過剰発現させ、細胞内コレステロール濃度を測定した。細胞内 CE は HSL 過剰発現によって完全に消失した。一方、細胞内 FC は増加しなかった。CE の完全な除去が FC の増加を伴わなかったことから、HSL による CE の分解産物である FC は、細胞外に効果的に放出されている可能性が示唆された。この HSL 過剰発現による細胞内 CE の除去効果は、Oil Red O 染色によっても確認された。即ち、acLDL によって増加した脂肪滴は HSL 過剰発現によって著しく減少した。*in vivo* で同様の結果が示されるならば、HSL の過剰発現は泡沫化病変の治療に使える可能性があり、今後の検討が期待される。

上述のように、ACAT 阻害では CE 合成の抑制による FC 蓄積・細胞死を招いたため治療手段となりえなかったため、CE 分解を促進する HSL 過剰発現は、FC 蓄積・細胞死を招く可能性も考えられたが、今回の結果から、驚くべきことに HSL 過剰発現は FC 蓄積をもたらさないことがわかった。さらに、細胞死を検出する MTT 試験では、HSL 過剰発現によって細胞死の増加は認めないことが確認された。この結果は、HSL 過剰発現の治療的可能性を高めるものであった。

HSL 過剰発現によるこの CE 除去効果を、さらに、細胞内の CE 合成能の検討により確認した。¹⁴C ラベルしたオレイン酸からの CE 合成を測定したところ、HSL 過剰発現群では CE 合成の完全な抑制を認めた。これらの細胞では ACAT 活性に変化を認めなかったことから、この CE 除去は純粹に HSL 過剰発現によるものであることが確認された。

3) M ϕ における CE 加水分解に伴う FC 放出のメカニズム

ACAT 阻害も、HSL 過剰発現も、共に CE の減少をもたらす反応であるにもかかわらず、前者は FC の蓄積をもたらすが、後者は FC の増加をもたらさないというのは FC の細胞内動態を考える上で、非常に興味深い結果である。即ち、HSL による CE の水解は、分解産物である FC の細胞外への放出 (FC Efflux) を伴う可能性が示唆され、このメカニズムをさらに追求した。³H-CE で置換した acLDL を取り込ませることにより細胞内 CE を ³H ラベルし、細胞内から細胞外への FC Efflux を測定した。その結果、HSL 過剰発現群では、FC Efflux が増加していることが確認された。さらに northern blot analysis で、FC Efflux の律速段階の一つである、ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の発現が HSL 過剰発現により増加していることがわかった。すなわち、HSL 過剰発現は、CE を水解するだけでなく、少なくとも一部は ABCA1 の増加を介して、FC Efflux を増加させる、というメカニズムが解明され、この結果は、脂肪分解とコレステロールの細胞内動態の關係に新たな知見を加えるものであった。

4) HSL の M ϕ 泡沫化の制御における重要性

従来、M ϕ 泡沫化の制御においては、FC Efflux の他に、変性リポ蛋白の細胞内への取り込み (lipoprotein uptake) が重要であるとされてきた。そこで、次に、HSL の過剰発現が、lipoprotein uptake に及ぼす影響を調べた。acLDL を ^{125}I ラベルし、その細胞内への取込みを測定したところ、HSL 過剰発現群では、lipoprotein uptake が減少していることが示された。さらに、northern blot analysis では、lipoprotein uptake の律速段階であるスカベンジャー受容体 (scavenger receptor A \cdot CD36) の発現が、HSL 過剰発現で減少していることがわかり、これにより lipoprotein uptake が低下したことが示唆された。この結果から、HSL 過剰発現は、CE の水解を亢進するだけでなく、上述の FC Efflux の増加と、lipoprotein uptake の減少を伴うことが初めて分かり、M ϕ 泡沫化の制御における CE 水解の重要性が初めて示された。生体内の種々の M ϕ の中でも、動脈硬化病変の泡沫化 M ϕ の NCEH 活性は特に低いことが報告されており、NCEH が M ϕ 泡沫化の律速段階である可能性がこれまでに示唆されているが、今回の結果から、NCEH 活性の M ϕ 泡沫化の制御における重要性、動脈硬化の治療標的としての重要性が改めて示された。

まとめると、今回の研究は、NCEH が M ϕ 泡沫化の制御において重要な役割を果たしていること、NCEH が動脈硬化の新たな治療標的となりうる可能性を初めて示したものである。*in vivo* での NCEH 活性上昇が、動脈硬化の治療につながるのかが、最終的に興味のあるところであり、今後の発展が期待される。

また上述の通り、M ϕ の NCEH は、HSL 欠損マウスでの知見から、HSL 以外にも存在することがわかっている。同様に、脂肪細胞の TGL は、これまで HSL が主要なものであると考えられていたが、HSL 欠損マウスでの知見から、脂肪細胞の TGL も HSL 以外に存在することが判明している。すなわち、興味深いことに、M ϕ だけでなく、脂肪細胞においてもリパーゼの重複が存在している。私は以前に、この未知のリパーゼは、脂肪細胞においてはそのホルモン感受性や細胞内局在などにおいて HSL とかなりよく似た挙動を示すことを見出し、重複するリパーゼ同士がよく似た分子である可能性の他に、リパーゼ以外の分子による脂肪分解の制御機構が存在する可能性を示唆し報告した。実際、近年複数のグループから、リパーゼ以外の脂質・リパーゼ関連分子 (lipid/lipase-associated molecules: LAMs) が、基質 (脂質) や酵素 (リパーゼ) との相互作用を介して脂肪分解を調節していることが報告されている。M ϕ にもこれらの LAMs が存在することが知られてきており、M ϕ においても、重複する NCEHs だけでなく、これらの LAMs が脂肪分解を制御している可能性がある。脂肪分解の促進により M ϕ 泡沫化の改善を認めた今回の結果を考えあわせると、リパーゼだけでなく LAMs も動脈硬化の治療標的となる可能性があり、未知の NCEH の同定と共に、今後の研究の更なる進展が期待される。