

## 論文要旨

論文題目：**Effect of Synthetic Retinoid Am80 on Atherogenic Model**

和訳：合成レチノイド **Am80** の粥状硬化モデルに対する効果

指導教官：永井良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名：武田憲文

### 論文要旨：

#### 【1】はじめに

レチノイン酸受容体 $\alpha/\beta$  (RAR $\alpha/\beta$ ) の選択的アゴニストである Am80 は、オールトランス型レチノイン酸(ATRA)と比較して、RAR $\alpha$ への結合が特異的かつ強力で副作用も少ないことから、急性前骨髄球性白血病 (APL)の治療薬として使用されている。一方で Am80 は、平滑筋の増殖を抑制することでマウス血管傷害後の新生内膜形成を抑制することや、インターロイキン-6 (IL-6)シグナルを抑制することで様々な疾病モデルを緩和することが報告されてきた。IL-6 は、マクロファージのスカベンジャー受容体である CD36 の発現制御や粥状硬化に強く関与することが知られることから、IL-6 抑制作用も有する Am80 がマクロファージに作用し、粥状硬化の形成に影響する可能性が考えられる。今回、私は Am80 がマクロファージの IL-6 産生や泡沫化に与える影響を *in vitro* で検討し、粥状硬化モデルである *Apolipoprotein-E (ApoE)* 欠損マウスに実際に投与した際の効果について検討した。

## 【2】方 法

(1) 細胞培養：Raw264 細胞（マウス・マクロファージ細胞株）、マウス腹腔マクロファージ、ヒト単球性白血病由来細胞（THP-1 細胞）を使用し、前者は 10%FBS を含む DMEM 液、後 2 者は 10%FBS を含む RPMI1640 液で培養した。

(2) 遺伝子・蛋白発現量の測定：遺伝子発現量はリアルタイム定量的 RT-PCR 法を用いた。蛋白発現量は市販の測定キット（ELISA 法）を用いた。

(3) ルシフェラーゼアッセイ：ヒト IL-6 プロモーターやヒト CD36 プロモーターを連結したルシフェラーゼ遺伝子、および *LzcZ* 遺伝子を Lipofectamin 2000(Invitrogen) を用いて Raw264 細胞に導入した。ルシフェラーゼ活性は $\beta$ -galactosidase 活性で補正した。

(4) リポ蛋白質の精製：ヒト血漿から、分画遠心法を用いて低比重リポ蛋白(LDL: 1.019-1.063 g/mL)を精製した。酸化およびアセチル化 LDL の作成には、CuSO<sub>4</sub> および無水酢酸を使用した。

(5) コレステロール含有量の測定：細胞内コレステロールをヘキサン・イソプロパノール混合液を用いて抽出、enzymatic fluorometric microassay 法で測定した。

(6) フローサイトメトリー解析：FACSCalibur 及び解析ソフト CellQuest を用いた。  
(CD36 と SR-A の細胞表面蛋白の定量化)

(7) *ApoE* 欠損マウスの解析：高コレステロール食（20%脂質、0.15%コレステロール含む）を給餌し、粥状硬化は大動脈展開標本（上行大動脈—総腸骨動脈部）(Sudan IV 染色) と大動脈洞部（Oil Red O 染色）で解析した。

(8) 組織解析：Oil Red O 染色、マッソントリクロム染色、免疫組織学染色(IL-6)など。

## 【3】結 果

### (1) Am80 のマクロファージ・IL-6 産生抑制作用

初めに、Am80 がマクロファージにおける IL-6 産生に与える影響を検討した。Raw264 細胞を用いた検討では、変性（酸化またはアセチル化）低比重リポタンパク (modified LDL) 投与後に活性化される PKC の活性化剤 PMA (12-myristate 13-acetate)や、アンジオテンシン II を投与後に産生される IL-6 は、Am80 を前処置することで濃度依存的に抑制された。

このメカニズムを検討するため、ヒト IL-6 プロモーター(-651~+1 : pIL6-luc651)を用いたルシフェラーゼアッセイを施行した。PMA 投与後に上昇したプロモーター活性は Am80 を投与することで同様に抑制された。IL-6 プロモーター内に存在する NF $\kappa$ B と C/EBP $\beta$ の結合領域などの関与を検討するため、これらの遺伝子変異体を作成・検討したところ、NF $\kappa$ B の変異体 (pIL6-luc651  $\Delta$ NF- $\kappa$ B) では Am80 の抑制効果は依然認められたが、C/EBP $\beta$ の変異体 (pIL6-luc651  $\Delta$ C/EBP $\beta$ ) では、この抑制作用は消失し

た。Am80 は C/EBP $\beta$  の発現量には影響を与えないため、Am80 の IL-6 抑制作用には、IL-6 遺伝子プロモーターの C/EBP $\beta$  結合部位での C/EBP $\beta$  との相互作用が重要であることが示唆された。

### (2) Am80 の *in vitro* マクロファージ泡沫化抑制作用

IL-6 は、マクロファージのスキャベンジャー受容体である CD36 の発現制御や粥状硬化に強く関与することから、Am80 の IL-6 発現抑制作用がマクロファージ泡沫化に与える影響を次に検討した。マウス腹腔マクロファージに変性 LDL (酸化 LDL やアセチル化 LDL) を投与すると泡沫化するが、Am80 を前投与することでその泡沫化反応や、細胞内コレステロール含有量が減少した。

変性 LDL は、マクロファージスキャベンジャー受容体である SR-A や CD36 を介して細胞内に取り込まれるため、Am80 がこれら受容体の発現量に与える影響を検討した。PMA (PKC activator) は、マクロファージ細胞株 (マウス : 腹腔マクロファージ、Raw264 細胞、ヒト : THP-1 細胞) のスキャベンジャー受容体の発現を誘導するため、この系を用いて検討したところ、Am80 は腹腔マクロファージや Raw264 細胞での 2 種の受容体発現誘導(mRNA)を減弱させ、THP-1 細胞での SR-A 発現誘導を減弱させた。この際、THP-1 細胞では、Am80 が CD36 発現を誘導する結果となったが、これはマクロファージ細胞株の種属や分化度の相違が原因である可能性がある。本研究では、マウス腹腔マクロファージと同様な性質を有する細胞株・Raw264 細胞を至適モデルと判断して以下の検討を行った。

Am80 は、酸化 LDL 投与後の SR-A と CD36 の発現誘導やコレステロール含有量増加を抑制した。これらの作用が IL-6 シグナルを介するものかを判断するために、Am80 投与後に IL-6 を外的投与したところ、スキャベンジャー受容体の発現抑制作用は部分的に回復した。さらに蛋白レベルでのスキャベンジャー受容体発現量を検討するために、FACS 解析で SR-A, CD36 発現量を検討したところ、Am80 投与後に発現量は低下し、この作用は IL-6 の外的投与で部分的に回復できた。これらから、Am80 は IL-6 発現と IL-6 シグナルを介したスキャベンジャー受容体発現の両者への抑制作用を介して泡沫化を抑制していることが明らかとなった。

### (3) Am80 の *in vivo* 粥状硬化抑制作用

Am80 の *in vitro* マクロファージ泡沫化抑制作用が明らかとなったため、粥状硬化モデルである ApoE 欠損マウスへの Am80 投与効果を検討した。8 週齢マウスに高コレステロール食を給餌し、Am80 (1.0mg/kg/doy) を 2 ヶ月間連日投与としたところ、体重変化や血中脂質値、血中 IL-10 値 (抗炎症性サイトカイン) には影響はなかったが、血中 IL-6 や IL-1 $\beta$  値 (炎症性サイトカイン) は低下していた。

大動脈展開標本 (entire aorta, Sudan IV 染色) や大動脈洞部(aortic roots, Oil Red O 染色)を用いて粥状硬化を検討したところ、いずれも Am80 投与群で粥状硬化が有意に減弱し、粥状硬化にも有用である可能性が示唆された(entire aorta: vehicle-treated,  $7.3 \pm 0.8$  %; Am80-treated,  $0.5 \pm 0.3$ %;  $P < 0.01$ ; aortic roots: vehicle-treated,  $206429 \pm 12352$   $\mu\text{m}^2$ ; Am80-treated,  $149021 \pm 19282$   $\mu\text{m}^2$ ;  $P <$

0.01)。

大動脈洞部の IL-6 発現量を、免疫組織学的染色法を用いて検討したところ、Am80 投与群でその発現量は低下していた。またマッソントリクロム染色を用いた検討では、大動脈洞から冠動脈周囲での細胞外マトリックスの蓄積が、Am80 投与群で抑制されていた。

#### 【4】考 察

Am80 は、マクロファージのスカベンジャー受容体(CD36, SR-A)発現とその泡沫化を抑制した。また Am80 を投与した *ApoE* 欠損マウスでの粥状硬化は有意に抑制された。

私の研究結果は、Am80 の抗粥状硬化作用の一部は IL-6 シグナルの抑制を介していることを示しているが、*ApoE* と *IL-6* の二重ホモ欠損マウスでは、むしろ粥状硬化が増悪することが報告されている。この相違の原因としていくつかの機構が考えられる。*ApoE*・*IL-6*二重ホモ欠損マウスでは、血漿脂質値が上昇し、抗炎症性サイトカインである IL-10 低下が認められた。IL-6 は多機能性のサイトカインであり、完全欠損により炎症や代謝に多様な影響を与えたものと考えられる。これに対して、Am80 投与は IL-6 発現を完全に抑制するものではなく、脂質値や IL-10 値、体重変化にも有意差を認めなかった。また、Am80 はマクロファージ以外にも作用することが考えられる。Am80 には(1)平滑筋増殖抑制、(2)抗凝固作用、(3)血管新生抑制作用、(4)T細胞からの IL-10 誘導作用(抗粥状作用)、(5)その他の炎症性サイトカイン抑制作用(IL-1 $\beta$ )、などが報告されており、いずれも粥状硬化を抑制する機序として重要である。

Am80 が IL-6 産生を抑制する機序として、その誘導に関与する C/EBP $\beta$ の機能抑制が考えられた。既に脂肪分化の系で、同機序に起因したレチノイン酸による転写抑制作用が報告されている。

私の結果は、「ATRA がヒト単球性白血病細胞 (THP-1) の CD36 発現を誘導する」という従来報告とは異なる。Am80 を用いて検討したところ、THP-1 細胞では、Am80 も同様に CD36 発現を誘導することが確認された。これは、レチノイン酸が THP-1 細胞の分化誘導にも関与した結果ではないかと考えられ、マクロファージ泡沫化のモデル、細胞種、マクロファージ分化度などの様々な要素を今後さらに検討していく必要がある。今回の実験では、マウス腹腔マクロファージと同様の反応性を有したマウス・マクロファージ細胞株 Raw264 細胞を主に使用した。

#### 【5】おわりに

Am80 は、*ApoE* 欠損マウスの粥状硬化を抑制した。粥状硬化症の予防および治療に有益な薬剤となる可能性が示唆された。