

論文の内容の要旨

論文題目 リゾホスファチジルコリンに対する血管内皮細胞の新規応答機構

氏 名 守田 麻由子

1、LysoPC 分子種の違いによる HUVEC の細胞応答の比較

酸化変性した低密度リポタンパク質 (Low density Lipoprotein ; LDL) は、動脈硬化症の発症・進展に対して重要な役割を担うとされている。酸化 LDL 中にリゾホスファチジルコリン (Lysophosphatidylcholine ; LysoPC) は約 50% を占めており、酸化 LDL の主要脂質構成成分となっている。そのため動脈硬化症に対する LysoPC の働きは重要であると考えられる。LysoPC のシグナル伝達機能として、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) のリン酸化、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の産生、Ca 流入などが報告されている。LysoPC 分子種によって細胞応答や生体内での反応に違いがある。また LysoPC の受容体として G-protein coupled receptor 4 (GPR4) や PAF 受容体が機能していると考えられており、これらを介したシグナル伝達の研究が進められている。GPR4 は内皮細胞において強く発現している。GPR4 は炎症性ストレスによって発現が増加し、また血管形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では生体内に多く含まれる 2 種の LysoPC、1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:0-LysoPC) および 1-Stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:0-LysoPC) を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell ; HUVEC) の LysoPC 分子種に対する細胞応答の違いを比較することを目的とした。また GPR4 に注目し LysoPC 分子種による細胞応答の違いに対する GPR4 の関与を明らかにすることを目的とした。

実験には HUVEC を用い、LysoPC は 30 μ M で用いた。マイクロアレイ解析および Real time-PCR 法によって LysoPC に対する遺伝子の発現変動を解析した。MAPK のリン酸化は Western blotting 法を用いて解析した。ROS 産生量は化学発光の測定によって行い、細胞内への Ca²⁺ 流入量の測定は蛍光強度の測定により行った。また RNAi によって HUVEC の GPR4 をノックダウンし、MAPK のリン酸化、ROS 産生、Ca²⁺ 流入に対する GPR4 の関与を解析した。

マイクロアレイ解析による細胞応答の比較では、LysoPC 分子種の違いによる応答の違いはみられず、2 つの LysoPC によってほぼ共通の遺伝子の発現が誘導された。HUVEC において 16:0-LysoPC および 18:0-LysoPC 刺激により MAPK がリ

ン酸化された。LysoPC 分子種の違いによって、リン酸化のピークを迎える時間に違いが見られた。18:0-LysoPC で刺激をした場合、16:0-LysoPC で刺激した場合と比べ、その時間に遅れが生じた。ROS 産生と Ca^{2+} 流入では、18:0-LysoPC は 16:0-LysoPC に比べて産生開始の時間が遅かった。これより LysoPC の細胞内への取り込み方に違いがあると考えられた。GPR4 をノックダウンした HUVEC では、LysoPC による MAPK のリン酸化、活性酸素産生、 Ca^{2+} 流入は抑制されなかった。ノックダウンされずに残った GPR4 によってシグナル伝達が行われている可能性がある。しかし siRNA によって GPR4 は 6 割~7 割程度ノックダウンされているのに対し、ROS の総産生量や Ca^{2+} 流入量に差がみられなかったことから、これらの細胞応答に GPR4 が関与している可能性は低い。以上より LysoPC によるシグナル伝達には、GPR4 を介さない経路が存在することが示唆された。また 18:0-LysoPC 刺激によって発現の誘導された遺伝子 INSIG1、KLF10、PTGER4、FOSL2 および BACH1 の発現誘導が抑制された。これより GPR4 を介するシグナル伝達によって制御される遺伝子が存在することが示され、LysoPC 分子種による遺伝子発現の違いが示された。

2、LysoPC 刺激による SREBP の活性化

酸化 LDL およびその構成成分を用いたマイクロアレイ解析の結果より、LysoPC によって特異的に発現が誘導され、酸化 LDL およびオキシステロール類によって発現が抑制される遺伝子群がみつかった。この遺伝子群の特徴としてプロモーター領域に Sterol Regulatory Element -Binding Protein (SREBP) が結合する SRE 配列を持つこと、コレステロール合成、調節に関わる遺伝子であることが挙げられる。SREBP はコレステロールによって制御される転写因子である。

これらの遺伝子の発現が LysoPC によって誘導されることから LysoPC が SREBP の活性に影響していると推察される。しかし LysoPC が SREBP に対してどのような機能を持ち、遺伝子の発現制御に関与しているか明らかにされていない。本研究では LysoPC に対する新たな応答機構として SREBP に着目し、HUVEC の LysoPC に対する新規応答とその機構を明らかにすることを目的とした。

本実験には HUVEC を用いた。遺伝子の発現解析はマイクロアレイ解析および Real time-PCR 法を用いた。LysoPC 刺激後の SREBP の活性化を Western blotting 法を用いて解析し、細胞内および培養上清中のコレステロール含量を放射活性の測定によって定量した。

コレステロールの合成や調節に関わる遺伝子 (LDLR, INSIG1, HMGCR, CYP51A1, SQLE, IDI1, HMGCS1) の発現は LysoPC の刺激後、30 分で発現が誘導され、8 時間までにピークをむかえた。これより LysoPC がコレ

ステロールの調整、合成を誘導することが示唆された。これらの遺伝子の発現制御には SREBP が関わっていることが報告されている。従って LysoPC によって SREBP が活性化されていることが推察された。またこれらの遺伝子の発現が LysoPC によって誘導されたことから、細胞内のコレステロール含量が減少していると考えられた。次に LysoPC 刺激による SREBP の活性化を Western blotting 法によって解析した。通常 SREBP2 は膜上に分子量約 120kDa の Precursor form で存在している。LysoPC 刺激によって膜上の Precursor form の SREBP2 は時間経過とともに減少し、核抽出物において分子量約 68 kDa の Mature form の SREBP2 が増加した。LysoPC の濃度を $10\mu\text{M}$ にしても $30\mu\text{M}$ の場合と同様に SREBP2 の核移行が観察された。SREBP2 が活性化されたことから細胞内のコレステロール含量が減少していると考えられた。そこで LysoPC 刺激後の細胞内および培養上清中のコレステロール含量を測定した。LysoPC 刺激後 30 分で細胞内のコレステロール含量は明らかに減少し、これに伴って培養上清中のコレステロール含量が増加した。LysoPC によって細胞内のコレステロールが引き抜かれ、培養上清に放出されることが示された。SREBP2 の活性化およびコレステロールの引き抜きは 16:0-LysoPC および 18:0-LysoPC の 2 種の LysoPC で確認された。

本研究では LysoPC 刺激により活性化されることを確認した。そのメカニズムを以下に示した。

- ① LysoPC によって細胞からコレステロールが放出される。
- ② コレステロールの減少を感知する。
- ③ SREBP が小胞体からゴルジ体へ移動し、プロテアーゼによる切断を受ける。
- ④ 活性化した SREBP が核へ移行する。
- ⑤ SREBP の制御する遺伝子の発現が誘導される。

以上より LysoPC が SREBP の活性を介してコレステロール合成、調整を制御する可能性が示された。マイクロアレイ解析により、18:0-LysoPC も 16:0-LysoPC と同様にコレステロールの合成、調製を制御する遺伝子の発現を誘導することが示されている。したがって、LysoPC によるコレステロール合成の制御は、結合する脂肪酸に関わらず LysoPC に共通してみられる働きであると考えられた。さらに SREBP が制御するコレステロール合成に関わる遺伝子の発現が誘導されたことから、新たにコレステロールが合成されることが予測される。LysoPC 刺激によって減少した細胞内のコレステロールは、これらの遺伝子の発現誘導により、時間経過とともに合成されることが予想される。LysoPC 刺激により活性化された SREBP によって発現した遺伝子の細胞内でのコレステロール合成への寄与や、LysoPC によって減少する細胞内のコレステロールの回復する機構の解明が必要である。