

## 論文の内容の要旨

論文題目 副腎における中性コレステロールエステル水解の  
生理的意義—新規同定リパーゼ Nceh1 とホルモン感受性  
リパーゼ (Lipe) の役割

指導教員 門脇 孝教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 太田啓介

### 序文

生体において副腎はステロイド産生臓器として重要な役割を担っている。ステロイドは遊離コレステロールを前駆体として各種酵素による代謝を経て合成されるが、マウスの副腎において遊離コレステロールの供給は主に 3 つの経路でなされる。

- 1) 細胞外からの scavenger receptor class B type 1 (SR-B1, gene symbol Scarb1) 受容体を介したコレステロールエステルの選択的取り込みならびに細胞内代謝
- 2) 細胞内 de novo 合成
- 3) 細胞内に蓄積されたコレステロールエステルの水解による遊

## 遊離コレステロールの供給

マウスの血液では LDL よりも HDL が豊富であり、副腎におけるコレステロールエステルの大部分が SR-BI 受容体を介して HDL より取り込まれる事が知られている。

Hormone-sensitive lipase (HSL, gene symbol Lipe) は細胞内に存在する中性リパーゼであり、脂肪細胞、精巣、肝臓、副腎など様々な組織で発現し、コレステロールエステルから遊離コレステロールを分離する酵素活性を持ち、副腎におけるステロイド合成に関与している事が示されている。

Lipe 遺伝子欠損マウスを用いた副腎での解析において副腎内コレステロールエステルの著明な増加を認め、さらにコレステロールエステルの水解活性のほとんどを Lipe が担っているとする報告がなされている。

最近我々の研究室においてバイオインフォマティクスの手法を用いて新規リパーゼである neutral cholesterol ester hydrolase 1 (Nceh1) を同定し、Nceh1 と Lipe の遺伝子欠損マウスを作成する事により、マクロファージにおいてこれらが重要なコレステロールエステル水解酵素であることを示した。Nceh1 は脳、腎臓、心臓ならびに副腎でも発現が認められる。

今回我々は Nceh1 遺伝子欠損マウス、Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスを用いて副腎における中性コレステロールエステル水解酵素である Nceh1 と Lipe の生理的意

義について検討した。

## 結果

まず副腎重量の測定では Nceh1 遺伝子欠損マウス、Lipe 遺伝子欠損マウス、Nceh1/Lipe 遺伝子欠損マウスの順に重量の増加を認めた (Nceh1 遺伝子欠損マウスで 1.10 倍、 $p < 0.05$ 、Lipe 遺伝子欠損マウスで 1.26 倍、 $p < 0.01$ 、Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスで 1.62 倍、 $p < 0.01$ ) 。

次に蛍光法にてコレステロールエステルを測定した。その結果 Nceh1 遺伝子欠損マウス、Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 遺伝子欠損マウスにおいてコレステロールエステルの増加を認めた (Nceh1 遺伝子欠損マウスで 1.32 倍、 $p < 0.05$ 、Lipe 遺伝子欠損マウスで 2.84 倍、 $p < 0.01$ 、Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスで 3.63 倍、 $p < 0.01$ )。続いて Hoechst 33258 により DNA 含量を蛍光法で測定した結果、Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいてのみ DNA 含量の増加を認めた (1.26 倍、 $p < 0.05$ )。

さらに中性コレステロールエステルの水解活性を測定した。

まず副腎の全細胞溶解液では Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいて著明な水解活性の低下を認めた (Lipe 遺伝子欠損マウスで 0.11 倍、 $p < 0.01$ 、Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスで 0.08 倍、 $p < 0.01$ )。

また Lipe と Nceh1 は細胞内における局在が異なることから、副腎

の蛋白を細胞質分画とマイクロソーム分画に分け中性コレステロールエステルの水解活性を測定した。

細胞質分画においては全細胞溶解液と同様の傾向を認めた (Lipe 遺伝子欠損マウスで 0.16 倍、 $p < 0.01$ 、Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスで 0.10 倍、 $p < 0.01$ )。一方マイクロソーム分画では Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいて更なる水解活性の低下を認め、後者でより顕著であった (Lipe 遺伝子欠損マウスで 0.13 倍、 $p < 0.01$ 、Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスで 0.04 倍、 $p < 0.01$ )。

さらにコルチコステロン分泌への影響を ACTH 負荷試験にて確認したが、コルチコステロンの基礎値、ACTH 負荷後の値ならびに負荷後の値から基礎値を引いた差のいずれにおいても有意な差を認めなかった。

また細胞増殖への関与を調べるため、血清 ACTH の測定を行ったが、いずれにおいても有意な差を認めなかった。

そしてヘマトキシリン-エオジン染色を行った。Lipe 遺伝子欠損マウスでは束状層において脂肪滴の増加ならびに細胞の肥大を認め、X-zone においては syncytial lipid structure (SLS) と呼ばれる変性細胞も存在していた。更に Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスでは上記と同様の組織学的変化が更に顕著に認められた。

また抗 Nceh1 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、野生型マウスで主に皮質の束状層と思われる部位が染色された。さらに副腎

の細胞増殖を確認する目的で抗 Ki67 抗体を用いて免疫組織染色を行ったが、いずれの群においても皮質、髓質ともに有意な陽性細胞の増加を認めなかった。

副腎におけるコレステロール代謝ならびにステロイド合成系に関与するとされる遺伝子を中心にノーザンブロットを行った。野生型マウスにくらべLipe遺伝子欠損マウスならびにNceh1/Lipe二重遺伝子欠損マウスにおいてAbca1の発現の低下（0.71倍、0.74倍）ならびにHmgcs1の発現の増加を認めた（2.96倍、3.26倍）。そして組織学的検討にて皮質のX-zoneに変性細胞も認めたことから、マクロファージの浸潤を確認する目的にCd68の発現を確認した。その結果Lipe遺伝子欠損マウスならびにNceh1/Lipe二重遺伝子欠損マウスにおいてCd68の発現の著明な上昇（5.53倍、8.17倍）を認めた。

上記にて発現に変化を認めた Hmgcs1、Abca1 ならびに Cd68 に加え Hmgcr の発現を Quantitative real-time PCR を用いて確認した。

その結果 Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいて Hmgcs1 の発現の上昇（1.77 倍、1.76 倍）、Hmgcr の発現の上昇（1.92 倍、1.59 倍）、Abca1 の発現の低下（0.72 倍、0.61 倍）ならびに Cd68 の発現の著明な上昇（5.00 倍、7.23 倍）を認めた。

## 考察

今回の研究では Nceh1 遺伝子欠損マウス、Lipe 遺伝子欠損マウス

ならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいて重量の増加が認められ、特に後二者において著明であった。Lipe の副腎での寄与に関する既報において、組織学的な検討は散見されるが副腎の大きさについて記載されたものはなく、これが初めての報告であると考えられる。

また Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいて、副腎コレステロールエステルの蓄積の増加ならびに中性コレステロールエステル水解活性の著明な低下を認め、いずれも後者でより顕著な差を認めた。既報では副腎内コレステロールエステル水解に関しては Lipe がほとんどその役割を担っていると報告があるが、Nceh1 もコレステロールエステルの水解に関し少なからず寄与している可能性が示された。

さらに副腎細胞内コレステロールエステル水解活性の低下によりステロイド合成に影響が出る可能性を考え ACTH 負荷試験を行ったが、コルチコステロン分泌に明らかな差を認めなかった。既報では Lipe 遺伝子欠損マウスにて ACTH 負荷後にコルチコステロン分泌の低下を認めたとする報告と変わらないとする報告がある。副腎へのコレステロールの供給は SR-B1 受容体を介した経路が最も重要であることから、ステロイド合成に対する細胞内コレステロールエステル水解の寄与の程度はそれほど大きくない可能性も考えられた。

そしてヘマトキシリン-エオジン染色による組織学的検討では皮質の束状層を中心に細胞内の脂肪滴の蓄積ならびに細胞肥大を

認めた．抗 Nceh1 抗体を用いた免疫組織染色で皮質の束状層が染色されたが、既報では Lipe は主に皮質、それも束状層に存在しているとされており、Nceh1 と Lipe は協調して主に皮質の束状層にてコレステロールエステルの水解に寄与している可能性が示唆された．

Lipe 遺伝子欠損マウスならびに Nceh1/Lipe 二重遺伝子欠損マウスにおいて、de novo コレステロール合成酵素である Hmgcs1 の発現上昇ならびにコレステロール細胞外排出に関与する Abca1 の発現の低下が Northern blot ならびに RT-PCR において示された．その他の細胞内コレステロールの取り込みやステロイド合成に関与する遺伝子の発現に差を認めなかったことから、細胞内コレステロールエステルの水解により供給されるコレステロールが、細胞内コレステロールホメオスターシス維持に重要である可能性が示唆された．

今回我々は副腎におけるコレステロールエステル水解酵素である Lipe ならびに Nceh1 の副腎における役割を検討した．その結果副腎におけるコレステロールエステルの水解に関しては Lipe が主要な役割を担っているが、Nceh1 も Lipe とともに作用する事で副腎内コレステロール代謝に重要な働きを有しているものと考えられた．