

肥満は動脈硬化の危険因子となることが知られており、動脈硬化は心筋梗塞や脳卒中といった重篤な疾患の発症につながる。本邦における死因として心疾患および脳血管障害が占める割合は依然高く、新たな治療薬開発の観点からも、動脈硬化の病態メカニズムを研究することは重要である。肥満状態では、血中遊離脂肪酸レベルが上昇し、メタボリックシンドロームの主要因の一つとなる。加えて、心血管系疾患のリスクも上昇させることから、動脈硬化を促進していると考えられる。しかしながら、そのメカニズムについては十分に理解されていない。従って、その機序を明らかにすることは、治療・予防の観点からも意義あることである。

遊離脂肪酸によるマクロファージスカベンジャー受容体の発現制御

動脈硬化の最初の過程は、血管内皮活性化による接着因子の誘導により、循環血中の単球が接着し、内皮下へ浸潤、マクロファージへと分化して、酸化 LDL を取り込み、泡沫化することで発症する。酸化 LDL の取り込みはスカベンジャー受容体を介して行われる。スカベンジャー受容体とは、酸化などにより変性した LDL の取り込みを担う受容体の総称である。酸化 LDL の取り込みに焦点を当て、マクロファージスカベンジャー受容体の発現が遊離脂肪酸によりどのように制御されるかを検討した。

酸化 LDL に対する主要な取り込み受容体である LOX-1 および CD36 の発現レベルが種々の遊離脂肪酸により、どのような影響を受けるかヒト単球由来 THP-1 細胞で検討した。遊離脂肪酸として、飽和脂肪酸 4 種と不飽和脂肪酸 3 種を用いた。LOX-1 発現は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸およびステアリン酸で有意に亢進し、不飽和脂肪酸では影響を受けなかった。一方、CD36 発現はラウリル酸で若干亢進したが、他の脂肪酸では影響を受けなかった。パルミチン酸により LOX-1 発現が最も亢進したこと、およびパルミチン酸は血中に最も高濃度に存在する飽和脂肪酸であることから、パルミチン酸に焦点を当て、実験を進めた。パルミチン酸による LOX-1 発現上昇は、他のマクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞およびマウス腹腔マクロファージでも認められた。一方で、他のスカベンジャー受容体 (SR-AI, SR-BI および CD68) の発現上昇は起こさなかった。また、パルミチン酸刺激により酸化 LDL の取り込みは亢進し、siRNA により LOX-1 発現を抑制すると、取り込み亢進は消失したことから、パルミチン酸による酸化 LDL の取り込み亢進は、LOX-1 発現上昇を介していると考えられた。

肥満や糖尿病では、血中遊離脂肪酸濃度は 1 mM に達すると報告されており、本実験で用いた脂肪酸濃度は病態生理的範囲内であると考えられた。従って、病態時に濃度上昇したパルミチン酸が、動脈硬化巣に浸潤したマクロファージの LOX-1 発現上昇を介して酸化 LDL の取り込みを亢進し、泡沫化を促進する可能性が示唆された。

パルミチン酸による LOX-1 発現上昇の作用機序の解析

パルミチン酸による LOX-1 発現制御については他に報告がなく、その機序を検討した。パルミチン酸の作用点として、細胞外で Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 に作用することが報告されている。一方、細胞内に取り込まれ、ROS 産生を介した MAP キナーゼ活性化あるいは小胞体 (ER) に作用して ER ストレス反応を惹起する経路も知られている。そこで、これらの経路の関与について検討した。

細胞外作用点である TLR2 および TLR4 の関与について検討した。マクロファージに分化させた THP-1 細胞を用い、siRNA により各分子の発現をノックダウンしたところ、LOX-1 の発現上昇は影響を受けなかったが、TLRs 活性化により誘導される IL-6 は約 50% 抑制されたことから、TLRs の関与は少ないと考えられた。次に、細胞内作用点の可能性を検討した。パルミチン酸は細胞内で、Acyl-CoA-synthetase (ACS) により palmitoyl-CoA に代謝され、ミトコンドリアあるいは小胞体に輸送される。ACS 阻害剤である Triacsin C は LOX-1 発現誘導を抑制した。また非代謝性パルミチン酸アナログ 2-Br-パルミチン酸は LOX-1 発現を誘導しなかったことから、パルミチン酸が細胞内に取り込まれることが重要と考えられた。ラジカルスカベンジャー N-acetylcysteine (NAC) および ラジカル産生阻害薬 diphenyleneiodonium (DPI) は LOX-1 発現を抑制したことから ROS の関与が示唆された。ROS は p38 MAPK を活性化することが知られているため、その関与を検討した。パルミチン酸刺激により p38 MAPK が活性化し、この活性化は NAC により抑制された。p38 MAPK の阻害剤 (SB-203580, SB-202190, SB-239063) は LOX-1 発現を濃度依存的に抑制したことから、p38 MAPK の関与が示唆された。

続いて、ER ストレスの関与について検討した。パルミチン酸刺激により ER ストレスマーカーである PERK, eIF2 α , JNK の各リン酸化が見られた。タイムコースの検討から、ER ストレス反応は、LOX-1 発現誘導に先行して生じ、また ER ストレスを起こすパルミチン酸濃度は、LOX-1 発現誘導を起こす濃度に一致した。ER ストレス阻害剤 PBA, TUDCA および Salubrinal は LOX-1 発現誘導を抑制した。以上より、ER ストレスの関与が示唆された。他の ER ストレス誘発剤 Thapsigargin でも ER ストレス反応の活性化とともに LOX-1 発現誘導が見られた。Thapsigargin による LOX-1 発現上昇は ER ストレス阻害剤により抑制されたことから、ER ストレスにより LOX-1 発現が誘導されることが確認された。ER ストレス反応における重要な分子である IRE1 および PERK の siRNA によるノックダウンによっても LOX-1 発現誘導が抑制された。また ER ストレスにより活性化される JNK の阻害剤 SP600125 も LOX-1 発現誘導を抑制した。

以上の結果より、パルミチン酸は細胞内に取り込まれ、ROS 産生による p38 MAPK 活性化および ER ストレスによる JNK 活性化を介して LOX-1 発現誘導を起こす可能性が推察された。

パルミチン酸による LOX-1 発現上昇に対する不飽和脂肪酸の影響

オレイン酸やリノール酸などの不飽和脂肪酸には、抗動脈硬化作用があることが報告されており、またパルミチン酸が起こす細胞死や炎症関連分子の発現誘導を抑制できることも報告されており、こうした抗動脈効果作用を研究することは、新たな創薬につながる可能性がある。そこでパルミチン酸による LOX-1 発現誘導に対するオレイン酸およびリノール酸の作用およびその機序について検討した。

オレイン酸およびリノール酸は単独では THP-1 細胞の LOX-1 発現に影響を与えなかったが、パルミチン酸による LOX-1 発現誘導を濃度依存的に抑制し、同時に ER ストレス反応も抑制した。またパルミチン酸による酸化 LDL の取り込み促進も抑制した。この結果より、オレイン酸およびリノ

ール酸は ER ストレスの抑制により LOX-1 発現誘導を阻害することが示唆された。さらに Thapsigargin による LOX-1 発現および ER ストレス反応も、オレイン酸およびリノール酸は抑制した。以上より、オレイン酸およびリノール酸は、ER ストレスを抑制することにより、パルミチン酸による LOX-1 発現誘導を阻害すると考えられた。

遊離脂肪酸による動脈硬化促進の機序を明らかにすることを目的とした本研究において、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が、マクロファージにおいて LOX-1 の発現を選択的に上昇させ、酸化 LDL の取り込みを促進することを明らかにした。その機序として、細胞内において、ROS 産生および ER ストレスを介した p38 MAPK および JNK 活性化の関与の可能性を示した。不飽和脂肪酸であるオレイン酸およびリノール酸は、ER ストレスを抑制することにより、LOX-1 発現誘導を阻害することを示した。本知見は、肥満や2型糖尿病などにおける遊離脂肪酸の濃度上昇、食事や代謝異常による飽和・不飽和脂肪酸の比率変化、酸化ストレスによる不飽和脂肪酸の機能低下などが、マクロファージにおける LOX-1 発現上昇を介した機序により動脈硬化を促進する可能性を示すものであり、博士(薬学)の授与に値すると判断した。