

論文の内容の要旨

論文題目 動脈硬化および炎症におけるマクロファージの役割に関する研究
氏名 鈴木 雅

【序論】

医学の進んだ現在においても、依然として動脈硬化を起因とする心血管系疾患は先進国において死因の上位を占めており、病態の解明さらには治療法の開発が望まれている。動脈硬化は炎症やコレステロールとの関連が深く、また多様な細胞が関与することで動脈壁の肥厚や内腔の閉塞を起こす複雑な病態を示すことが知られる。動脈硬化に関連する細胞のうちマクロファージは、アテローム形成時にコレステロールの集積により泡沫マクロファージとなるとされ、実際に動脈硬化の病理組織では、泡沫化したマクロファージが多く見られる。

異物の排除や炎症に働く細胞として知られるマクロファージは、動脈硬化においてもコレステロールの取り込みやサイトカイン産生などを通じて病態を形成していると考えられている。変性 LDL を取り込んだマクロファージは、コレステロール取り込みと排出の不均衡により泡沫マクロファージとなり、脂質代謝に重要な役割を果たしていることが知られているが、その他の特徴については、十分に明らかになっていない。

動脈硬化に対して保護効果を持つ可能性があるリポ蛋白質として HDL が注目されている。HDL は泡沫マクロファージからコレステロールを取り去り、さらに近年では、抗炎症作用を発揮することによっても動脈硬化に対して保護的に働くことが期待されている。しかしながら、HDL のマクロファージにおける抗炎症作用の詳細についてはまだ十分に明らかになってはいない。

動脈硬化および炎症におけるマクロファージの役割を明らかにすることは、動脈硬化の病態理解を深め、将来における治療法の開発に重要であると思われる。本研究においては、動脈硬化において主要な役割を果たしている泡沫マクロファージの特徴解析および HDL の抗動脈硬化作

用的一端を担うマクロファージの炎症性応答に対する作用の詳細解明を目的とした。

【内容】

1. 泡沫マクロファージの特徴の解析

マクロファージにコレステロールを負荷し泡沫化したマクロファージの遺伝子および蛋白質の網羅的発現解析（プロテオミクスおよびマイクロアレイ）により、泡沫マクロファージの特徴の解析を実施した。

チオグリコレートで誘導したマウスマクロファージをアセチル化 LDL で培養することにより泡沫マクロファージを取得し、無血清培地中に検出される蛋白質をショットガンプロテオミクスによって同定した。培養上清中に蛋白質は 542 種類同定され、Ingenuity Software による蛋白質の相互作用ネットワークの作成で、免疫応答、補体制御、酸化などに関与する蛋白質が相互作用ネットワーク上に複数確認された。次に、これらの発現蛋白質の中で、泡沫マクロファージで発現が変化する蛋白質について解析を実施したところ、泡沫マクロファージの培養上清中のみで検出、もしくはコントロールのマクロファージに対して発現が変化していた蛋白質は 15 蛋白質であった。同様に Ingenuity software を用いてそれら 15 蛋白質とさらに直接関連が示されている蛋白質を用いてネットワークの作成を行ったところ、脂質代謝、リソソーム消化、補体活性化に関与する蛋白質が複数確認された。つまり、泡沫マクロファージにおいて、脂質代謝の制御だけでなく、リポ蛋白質消化のためのリソソーム酵素の増加が起こり、さらには補体産生が変化していることが示された。

遺伝子レベルではどのような変化が見られるのか、次に、マイクロアレイを用いて泡沫マクロファージで変動する遺伝子について解析を行った。泡沫マクロファージにおいて発現に変化が見られた(1.5 倍以上：698 遺伝子)遺伝子を用いて、Ingenuity Software によりネットワークを作成すると、脂質代謝、補体活性化、リソソーム、酸化還元酵素活性に関する遺伝子が変動遺伝子群として確認された。このうち、脂質代謝と補体活性化に関しては遺伝子レベルと蛋白質レベルの両方で共通して変化が見られ、泡沫マクロファージで補体活性化関連因子が変化していることが明らかとなった。この結果は、動脈硬化形成においても泡沫マクロファージの産生する補体が重要な役割を果たしている可能性を示唆していると考えられる。

一般に、コレステロール負荷は炎症を惹起する、つまりコレステロールが慢性炎症の原因だと考えられているため、次に、泡沫マクロファージにおいて M1 マーカーの上昇が見られるか、炎症誘導が起こりやすくなっているかを検討した。コレステロール負荷による泡沫化でマクロファージの M1 化もしくは M2 への極性化が誘導されていることはなく、泡沫マクロファージにおける LPS 刺激時の各種遺伝子発現増加度を見ても、炎症が起こりやすくなっているようなことは無かった。これらの結果から、*in vitro* の泡沫マクロファージにおいて、コレステロール負荷が炎症を惹起しているわけではないことが示された。

2. HDL のマクロファージにおける抗炎症作用の解析

マクロファージに対する HDL の抗炎症作用について、HDL 前処理による LPS 誘導遺伝子の発現変化をマイクロアレイ解析することにより評価した。方法としては、チオグリコレートで

誘導したマウスマクロファージをアセチル化 LDL で培養することにより泡沫マクロファージとし、その細胞を HDL で 4 時間前処理した後に PBS で洗浄し、LPS 添加後 4 時間後の RNA を回収した。

マイクロアレイの結果、HDL は LPS で誘導される遺伝子群のうち TRAM/TRIF dependent genes (type1 IFN response genes) に対して抑制作用を示し、MyD88 dependent genes (NF κ B などにより誘導) に対しては抑制作用を示さないことが明らかとなった。つまり、HDL が TRAM/TRIF dependent genes を特異的に抑制していることが示唆された。この HDL の抑制作用については、LPS 刺激の代わりに TLR4 のアゴニスト抗体を用いた場合も認められ、また、HDL 同様 LPS と結合することが知られる LDL には HDL のような抑制作用が見られなかったことから、LPS と HDL が直接結合することによって発揮されているのではないことが示唆された。

さらに、HDL およびその主要蛋白である ApoA-I のコレステロール排出を担う輸送蛋白として知られる ABCA1 および ABCG1 を介して HDL の作用が発揮されている可能性を考えた。siRNA により ABCA1 および ABCG1 を抑制したいずれの細胞においてもコントロール細胞同様に HDL による TRAM/TRIF dependent genes である Irf7 や IP-10 の抑制が起こり、HDL の TRAM/TRIF dependent genes 抑制作用は ABCA1 や ABCG1 を介したコレステロール排出作用とは独立して起こっていることが示唆された。HDL の TRAM/TRIF dependent genes 抑制作用がコレステロール非依存的に起こっていることは、コレステロールを負荷した細胞とそうでない細胞におけるマイクロアレイの比較によっても示された (HDL の作用はコレステロール負荷の影響を受けなかった)。

次に、他に TRAM/TRIF dependent genes を誘導することが知られる TLR3(PolyI:C), TLR7/8(R848) のリガンド刺激時の HDL の作用を検討したところ、HDL の TRAM/TRIF dependent genes 抑制作用は LPS 刺激時には見られたものの PolyI:C や R848 刺激時には見られず、TLR4 刺激時に特異的に起こることが示唆された。Toll like receptor から誘導される TRAM/TRIF dependent genes に関して TLR4 と TLR3 の下流シグナルは TRIF 以下が共通であるとされ、TLR4 特異的なシグナル蛋白として TRAM が挙げられる。そこで、GFP タグをつけた TRAM を強制発現した RAW264.7 細胞を用いて TRAM に対する HDL の影響を評価したところ、HDL 無添加や LDL を添加した状態では TRAM は 90% 以上の細胞で細胞膜上にあるのに対して、HDL で処置すると 85% の細胞で細胞内へ移動した。つまり、HDL の抑制作用が TRAM の細胞内への移動を誘導することにより起こっている可能性が示唆された。

HDL を構成する主要蛋白である apoA-I を欠損したマウスではその血中 HDL 濃度が低くなっており、HDL の作用が発揮されにくい状況になっていると思われる。この apoA-I の欠損マウスに対してグラム陰性菌の投与を行った。グラム陰性菌の投与により in vivo における TLR4 の刺激誘導が起こると考えられ、このとき、TRAM/TRIF dependent に誘導されると思われる IFN β の血中濃度が WT に比べて 6 倍程度に増加していた。この結果から、HDL は in vivo においても TRAM/TRIF dependent genes 選択的に抑制作用を示す可能性が示唆された。

【結語】

泡沫マクロファージの特徴解析においては、マクロファージの泡沫化により補体経路が制御

されていることを新たに見出した。ヒトの動脈硬化においても補体成分の変化が見られるヒトの動脈硬化において補体成分の変化が見られる(ATVB 2001, 1214-1219)ことや C3 ノックアウトマウスにおいて動脈硬化が促進される(Circulation 2002, 3025-3031)ことが報告されており、今回の結果は、補体制御の担当細胞として泡沫マクロファージが重要である可能性を示した点で意義のある結果だと思われる。また、in vitro においてコレステロール負荷が必ずしも炎症を起こしているわけではないことを見出したことは、in vivo における慢性炎症とコレステロールの関係を考察する上でも重要な結果であると思われる。

さらに、マクロファージに対する HDL の抗炎症作用の詳細解明においては、HDL がコレステロール非依存的な経路によってマクロファージの炎症を制御することを明らかにした。HDL については多様なメカニズムで動脈硬化に対して保護的に働くことが考えられており、HDL の動脈硬化保護作用の新たな側面を見出すことができたのは大きな発見だと思われる。

今後の研究展望として、補体経路に関しては動脈硬化促進の詳細な機序の解析を行うことで、将来的に補体制御による動脈硬化治療の可能性について解明されることが期待される。また、HDL については、近年、病態時や薬剤治療時の HDL 構成蛋白質の変化や、修飾による機能変化が示されており、今回示した抗炎症作用についてそれらの HDL の差異がどうであるのかについては大変興味深い。また、これら HDL の違いや機能の違いと病態発症との関連性がどうであるのかについても、今後の研究の発展が期待される。