

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 雅

「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」と題する本論文は、動脈硬化において重要な役割を果たしている泡沫マクロファージの発現する蛋白質を解析して、補体系の蛋白質の発現が上昇するなどこれまで知られていなかったこの細胞の特徴を明らかにしたこと、HDLが泡沫マクロファージの TRAM に直接作用してその細胞内分布を変えることにより炎症性応答を抑制するという発見をしたことについて記載している。動脈硬化は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が、マクロファージはコレステロールを取り込んで泡沫マクロファージとなり、炎症を惹起することにより動脈硬化の病態形成の主役として機能すると考えられている。しかし、その *in vivo* における機能を発現する上で重要な特徴やそれらの機能を制御する機構に関しての知識は十分に得られているとは言えなかった。泡沫マクロファージの特徴の解析と題する第1章では、動脈硬化および炎症における泡沫マクロファージの役割を明らかにすることにより動脈硬化の病態理解を深めて将来における治療法の開発の基盤とする事を目的として、泡沫マクロファージの発現する蛋白質及び遺伝子の特徴解析を行った。また HDL のマクロファージにおける抗炎症作用の解析と題する第2章では、HDL が抗動脈硬化作用を発現する上で重要なマクロファージの炎症性応答に対する作用を詳細に解明する事を目的とした。

第1章に記載されている研究においては、*in vitro* でマクロファージにコレステロールを負荷して泡沫化させ、mRNA レベルでの遺伝子発現および蛋白質の網羅的な解析により、泡沫マクロファージの特徴の解析を行った。培養上清中に放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、蛋白質の相互作用ネットワークを作成したところ、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。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 種あり、これらは脂質代謝、リソソーム消化、補体活性化に関与していた。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ところ、複数の遺伝子の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の特徴であることが明らかとなった。

さらに、マクロファージの機能との関連を遺伝子発現プロファイルから追究した。一般に、コレステロ

ール負荷は慢性炎症を惹起する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その指標となる M1 マクロファージマーカーの上昇が見られるかを検討した。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 もしくは M2 への極性化が誘導されていることは無かった。従って、in vitro の泡沫マクロファージを解析した結果を見る限り、コレステロール負荷によるマクロファージの変化が M1 マクロファージに見られるような過程で直接炎症を惹起しているわけではない事がわかった。

第 2 章では、動脈硬化に対して保護効果を持つ HDL の泡沫マクロファージに対する作用を、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析した結果から出発して詳細に検討した結果が述べられている。HDL は炎症性の刺激で誘導される遺伝子群のうち TRAM/TRIF 依存経路で活性化されるものに対して抑制作用を示し、MyD88 経路で活性化されるものに対しては抑制作用を示さないことが明らかとなった。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、これらを siRNA によりノックダウンしたが、TRAM/TRIF 経路の抑制作用は変化しなかった。HDL の効果は細胞にコレステロールを負荷した場合も同様に見られ、何れの知見も HDL による抑制効果がコレステロール非依存的である事を強く示唆した。HDL の抑制作用は TLR4 刺激時に特異的に起こることが示唆されたので TRAM が標的であると仮定し、GFP タグをつけた TRAM を強制発現したマクロファージ細胞株を用いて TRAM に対する HDL の影響を評価した。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。これにより、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 による TRAM 依存シグナルの抑制が in vivo でも見られる事は、HDL を構成する主要蛋白である apoA-I を欠損したマウスにグラム陰性菌を投与した際に IFN β の血中濃度が強く亢進することにより示された。

以上の研究により、泡沫マクロファージの遺伝子及び蛋白質の発現における特徴が明らかにされ、炎症性マクロファージとの違いが見出された。また HDL がコレステロール非依存的な TRAM 依存的な経路によってマクロファージの炎症応答を制御することが明らかにされた。本論文は治療法の開発が大きな課題である動脈硬化の病態形成において中心的な役割を果たす細胞である泡沫マクロファージにおける遺伝子発現及び HDL による制御機構について重要な知見を与えるものである。その研究内容は、疾患生物学の発展に資するところが大きく、これを行った鈴木雅は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。