

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590384
 研究課題名 (和文) 高脂血症病態のマクロファージに出現する ACAT1 陽性後期エンドゾームの機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of the ACAT-1-positive late endosomes in cholesterol-rich macrophages

研究代表者

坂下 直実 (SAKASHITA NAOMI)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
 (現 徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・教授)
 研究者番号：90284752

研究成果の概要 (和文)：高脂血症病態のマクロファージに出現する ACAT1 陽性後期エンドゾームの機能解析を行った。その結果、このオルガネラは効率的な細胞内遊離コレステロールのエステル化に貢献する一方、食食した異物の分解や殺菌を行うファゴゾームの成熟遅延をもたらすことが明らかになった。興味深いことにこの ACAT1 陽性後期エンドゾーム陽性マクロファージの異物分解・殺菌能の障害は ACAT 阻害剤を用いて ACAT1 の酵素活性を阻害すると改善することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：We functionally analyzed ACAT1-positive late endosomes (ACAT1-LE) which appears in cholesterol-rich macrophages. ACAT1-LE contributed effective cholesterol esterification, in addition, they showed impaired phagosomal maturation. Interestingly, such impairment partially correlated by pharmacological inhibition of cholesterol esterification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

異物食食細胞として生体防御の中心的役割を果たすマクロファージは活発なコレステロール代謝能を持っている。事実、粥状動脈硬化病巣では大量のコレステロールを取り込んで泡沫化したマクロファージが様々な生理活性物質を産生して粥腫の形成を促進している。われわれは粥状動脈硬化症の研究を通じて高脂血症病態に出現する泡沫化

マクロファージには後期エンドゾーム/ライソゾーム (食食された異物を分解・消化するオルガネラ) と ACAT1 (遊離コレステロールをエステル化する小胞体酵素) が機能的に融合し、ACAT1 陽性後期エンドゾーム (ACAT1-LE) が出現することを明らかにした。生化学的検討の結果、この ACAT1-LE は細胞内において効率的に遊離コレステロールのエステル化を行って

り、マクロファージ泡沫化を促進していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

上述のごとく、コレステロール負荷を受けた泡沫化マクロファージには ACAT1-LE が出現するが、細胞生物学的観点からすれば本来小胞体に存在する ACAT1 が異物処理の場である後期エンドゾームに移動することは異常な事態と考えられる。このため、ACAT1-LE 陽性マクロファージの後期エンドゾーム機能、特に異物分解処理能を細胞生物学的に検討するために一連の実験を行った。

3. 研究の方法

ヒトマクロファージ細胞株である THP1 を用い、メチルβサイクロデキストリン-コレステロール複合体存在下に培養してこれを泡沫化させ、ACAT1-LE を誘導した。まず、ACAT1-LE 誘導マクロファージと通常のマクロファージで異物貪食能を比較し、次いで異物を貪食した後のファゴゾームの成熟、異物処理能を検討した。さらに ACAT 酵素活性が異物処理能に及ぼす影響を明らかにするため、ACAT 阻害剤存在下に異物処理能の変化を観察した。

4. 研究成果

一連の実験の結果、ACAT1-LE 誘導マクロファージは異物貪食能の低下と共に貪食した異物を容れるファゴゾームの成熟遅延を示し、バクテリア殺菌能の障害を来すことが明らかとなった。これらの異常は ACAT 阻害剤を用いて ACAT 酵素活性を阻害すると正常化した。これらの実験データより、ACAT1-LE 陽性マクロファージでは遊離コレステロールが効率的にエステル化されて遊離コレステロール含有量が減少し、ファゴゾームの成熟遅延→バクテリア殺菌能の障害に到ったと考えられる。この研究成果はメタボリック症候群を初めとする高脂血症病態においてマクロファージの異物貪食・処理能の異常を細胞生物学的に明らかにしたものであると同時に、生活習慣病として国民的課題になっている高脂血症がマクロファージの機能異常を引き起こすことを実験的に証明したものである。今後、ACAT1 陽性後期エンドゾームにおける遊離コレステロール減少がファゴゾームの成熟遅延をもたらすメカニズムを分子細胞生物学的に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

1. Ohgami N, Ida-Eto M, Sakashita N, Sone M, Makashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada

A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takashasi M, Kato M. Partial impairment of c-Ret at tyrosine 1062 accelerates age-related hearing loss in mice. *Neurobiology of Aging* 2011, in press 査読有

2. Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, Sakashita N, Takeya M, Tsukamoto S, Ikeda T: Triterpenoids isolated from *Zizyphus jujuba* inhibit foam cell formation in macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, in press 査読有

3. Sakashita N, Motooka Y, Suganuma M, Ohnishi K, Fujiwara Y, Nakagawa T, Ichiyasu H, Takeya M: A case of pulmonary capillary hemangiomatosis with pulmonary fibrosis associated with MMP-9 related pulmonary remodeling. *Pathology International* 61(5):306-312, 2011 査読有

4. Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Mera K, Sakashita N, Takeya M, Ikeda T, Araki T, Nohara T, Nagai R: Natural Compounds Containing a Catechol Group Enhance the Formation of N(ε)-(carboxymethyl)lysine of the Maillard Reaction. *Free Radical Biological Medicine* 50(7):883-891, 2010 査読有

5. 花田法久, 富山信博, 堀和樹, 草野秀一, 吉田泰司, 川田康誠, 内野良仁, 坂下直実: 転移性肺腫瘍切除後 Trastuzumab 投与し 4 年間無再発乳癌の 1 例。癌と化学療法 37(13):2905-2907, 2010 査読有

6. Ohgami N, Ida-Eto M, Shimotake T, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M: c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(29):13501-13506, 2010 査読有

7. Lei XF, Fujiwara Y, Chang CCY, Chang TY, Takeya M, Sakashita N: Association of ACAT1-positive vesicles with late endosomes/lysosomes in cholesterol-rich human macrophages. *Journal of Atherosclerosis and*

- Thrombosis 17(7): 740-750, 2010 査読有
8. Sakashita N, Chang CC, Lei X, Fujiwara Y, Takeya M, Chang TY: Cholesterol loading in macrophages stimulates formation of ER-derived vesicles with elevated ACAT1 activity. *Journal of Lipid Research* 51(6): 1263-72, 2010 査読有
 9. Takemura K, Sakashita N, Fujiwara Y, Komohara Y, Lei X, Ohnishi K, Suzuki H, Kodama T, Mizuta H, Takeya M: Class A scavenger receptor promotes osteoclast differentiation via the enhanced expression of receptor activator of NF- κ B (RANK). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391(4):1675-1680, 2010 査読有
 10. Ohnishi K, Komohara Y, Sakashita N, Iyama K, Murayama T, Takeya M: Macrophages in Langerhans cell histiocytosis are differentiated toward M2 phenotype - their possible involvement in pathological process -. *Pathology International* 60(1):27-34, 2010 査読有
 11. Komohara Y, Takemura K, Lei X, Sakashita N, Harada M, Suzuki H, Kodama T, Takeya M: Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to up-regulation of nitric oxide and IFN- γ production by tumor-associated macrophages. *Cancer Science* 100(11):2160-2166, 2009 査読有
 12. Yajima I, Kumasaka M, Thang ND, Yanagishita T, Ohgami N, Kallenberg D, Naito Y, Yoshikawa T, Sakashita N, Kato M: Zinc finger protein 28 as a novel melanoma-related molecule. *Journal of Dermatological Sciences* 55(1), 68-70, 2009 査読有
 13. 堀和樹, 花田法久, 草野秀一, 鶴本泰之, 坂下直実, 内野良仁: Imatinib Mesylate 低用量投与後に切除した胃 Gastrointestinal Stromal Tumor の1例。 *癌と化学療法* 35(10): 1749-1751, 2008 査読有
 14. Honda T, Kaikita K, Tsujita K, Hayasaki T, Matsukawa M, Fuchigami S, Sugiyama S, Sakashita N, Ogawa H, Takeya M: Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice with metabolic disorders. *Journal of molecular cell cardiology* 44(5):915-926, 2008 査読有
 15. Shiraki N, Umeda K, Sakashita N, Takeya M, Kume K, Kume S: Differentiation of mouse and human ES cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13(7):731-746, 2008 査読有
 16. Inoue S, Ohta M, Li Z, Zhao G, Takaoka Y, Sakashita N, Miyakawa K, Takada K, Tei H, Suzuki M, Masuoka M, Sakaki Y, Takahashi K, Yamamura KI: Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. *Transgenic Research* 17(5):817-826, 2008 査読有
 17. Sakashita N, Yamada M, Nakagawa T, Yamasaki H, Takeya M: Leiomyomatoid angiomatous neuroendocrine tumor of the myometrium: case study with ultrastructural analysis. *Human Pathology* 39(5):788-792, 2008 査読有
 18. Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, Yamagata K, Sakashita N, Takeya M. Immunochemical detection of Ne-(carboxyethyl)lysine using a specific antibody. *Journal of Immunological Methods* 332(1-2):112-120, 2008 査読有
 19. Hiyoshi M*, Suzu S*, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S(*equal contribution): Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111(1):243-250, 2008 査読有
- [学会発表] (計 3 3 件)
1. 藤原章雄、工藤梨乃、菰原義弘、野原稔弘、坂下直実、竹屋元裕. Onionin A のマクロファージ活性化抑制作用。第 100 回日本病理学会総会第 100 回日本病理学会総会 (横浜) 2011. 4. 28-30.
 2. 坂下直実、本岡大社、菅沼雅人、藤原章雄、中川雄伸、一安秀範、竹屋元裕. MMP9 過剰産生による肺毛細血管基底膜破壊の結果、広範な肺線維症を合併した肺毛細血管腫症の剖検例。第 100 回日本病理学会総会第 100 回日本病理学会総会 (横浜) 2011. 4. 28-30.
 3. 上川将史、坂下直実、雷小峰、竹屋元裕. ACAT1 陽性後期エンドゾームの誘導

- により C 型 Niemann-Pick 病細胞のコレステロールエステル化能は正常化する。第 100 回日本病理学会総会 (横浜) 2011. 4. 28-30.
4. 坂下直実. コレステロールによるマクロファージの機能制御: ACAT1 陽性特異オルガネラの同定から細胞内コレステロール代謝制御、ファゴゾーム機能障害、C 型ニーマンピック病治療戦略まで。第 45 回熊本大学生命科学研究部・化血研ジョイントセミナー(熊本)2010. 7. 7
 5. 坂下直実、雷小峰、Catherine CY Chang、Ta-Yuan Chang、竹屋元裕. 高脂血症病態のヒトマクロファージに出現する ACAT1 陽性エンドゾーム・ライソゾームの機能解析。第 50 回日本リンパ網内系学会優秀ポスター演題口演 (新潟)2010. 6. 18-19.
 6. XiaoFeng Lei, Naomi Sakashita, Yukio Fujiwara, Catherine CY Chang, Ta-Yuan Chang, Motohiro Takeya, Akira Miyazaki. Translocation of ACAT1 from ER to Late Endosomal Associated Membranes in Cholesterol-rich Human Macrophage. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (Kumamoto)2010. 5. 20- 21.
 7. 藤原章雄、菰原義弘、池田剛、坂下直実、竹屋元裕. Corosolic acid のマクロファージ活性化抑制機構について。第 99 回日本病理学会総会(東京)2010. 4. 27-29.
 8. 坂下直実、山田元大、中川雄伸、山崎秀樹、竹屋元裕. 子宮に発生した leiomyomatoid angiomatous neuroendocrine tumor (LANT) の一例。第 99 回日本病理学会総会(東京)2010. 4. 27-29.
 9. 坂下直実. コレステロールによるマクロファージの機能制御: ACAT1 陽性特異オルガネラの同定から細胞内コレステロール代謝制御、ファゴゾーム機能障害、C 型ニーマンピック病治療戦略まで。第 55 回日本病理学会秋期特別総会日本病理学会学術研究賞受賞講演(東京)2009. 11. 19-20.
 10. XiaoFeng Lei, Naomi Sakashita, Catherine CY Chang, Ta-Yuan Chang, Motohiro Takeya. Translocation of acyl-coenzyme a: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) from endoplasmic reticulum (ER) to late endosomes associated membranes in cholesterol-rich human macrophage. The 10th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop 2009, (Fukushima) 2009. 10. 28-30.
 11. Koji Ohnishi, Yoshihiro Komohara, Yukio Fujiwara, Emi Kiyota, XiaoFeng Lei, Naomi Sakashita, Kenichi Takemura, Motohiro Takeya. Involvement of Macrophage Class A Scavenger Receptor (CD204) in Toll-like Receptor 4 Signal Transduction. The 10th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop 2009, (Fukushima) 2009. 10. 28-30.
 12. 藤原章雄、菰原義弘、池田剛、坂下直実、竹屋元裕. Oleanolic acid のマクロファージ活性化制御作用について。第 82 回日本生化学会大会(神戸)2009. 10. 21-24.
 13. 吉富万希子、藤原章雄、池田剛、永井竜児、坂下直実、竹屋元裕、塚本佐知子. 天然物由来 AGEs 生成阻害剤の探索 (6). 日本生薬学会 第 56 回年会(京都)2009. 10. 3-4.
 14. 坂下直実. コレステロールによるマクロファージの機能制御: ACAT1 陽性特異オルガネラによるコレステロール代謝制御、異物食害障害、C 型ニーマンピック病治療戦略。第 50 回日本細胞組織化学会(大津)2009. 9. 29-30.
 15. XiaoFeng Lei, Naomi Sakashita, Yukio Fujiwara, Catherine CY Chang, Ta-Yuan Chang, Motohiro Takeya. Translocation of ACAT1 from ER to late endosomal associated membranes in cholesterol-rich human macrophages. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会(下関)2009. 7. 17-18.
 16. 大西紘二、菰原義弘、坂下直実、猪山賢一、村山寿彦、竹屋元裕. ランゲルハンス細胞組織球症に浸潤する M2 マクロファージは IL-10 の分泌を介して腫瘍細胞の増殖を抑制する。第 19 回日本樹状細胞研究会(兵庫)2009. 7. 9-11.
 17. 大西紘二、菰原義弘、藤原章雄、坂下直実、清田恵美、竹村健一、竹屋元裕. CD204(class A scavenger receptor)は Toll-like receptor 4 の MyD88 依存性及び非依存性シグナル伝達経路を抑制する。第 49 回リンパ網内系学会総会(兵庫)2009. 7. 9-11.
 18. XiaoFeng Lei, Naomi Sakashita, Yukio Fujiwara, Catherine CY Chang, Ta-Yuan Chang, Motohiro Takeya. Presence of ACAT1 on late endosome (LE) in cholesterol-rich macrophages:

- efficient cholesterol esterification on LE and possible therapeutic strategy for Niemann-Pick disease type C1. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, (Kanazawa) 2009. 6. 3-4.
19. XiaoFeng Lei, Naomi Sakashita, Yukio Fujiwara, Catherine CY Chang, Ta-Yuan Chang, Motohiro Takeya. Translocation of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 enzyme (ACAT1) from endoplasmic reticulum to late endosomal associated membranes in cholesterol-rich human macrophages. International Symposium on Atherosclerosis 2009 (ISA2009), (Boston, USA) 2009. 6. 15-18.
 20. 竹村健一、坂下直実、藤原章雄、菰原義弘、雷小峰、大西紘二、水田博志、竹屋元裕. クラス A スカベンジャー受容体 (CD204) による破骨細胞分化制御の解析。第 98 回日本病理学会総会(京都)2009. 5. 1-3.
 21. 藤原章雄、菰原義弘、池田剛、坂下直実、竹屋元裕. ヒトマクロファージの活性化を制御する天然物由来化合物の探索。第 98 回日本病理学会総会(京都)2009. 5. 1-3.
 22. 坂下直実、雷小峰、キャサリン CY チャン、タ・ユアン・チャン、竹屋元裕. 高脂血症病態のマクロファージは ACAT1 トランスロケーションによりファゴゾームの成熟遅延を引き起こす。第 98 回日本病理学会総会(京都)2009. 5. 1-3.
 23. 雷小峰、坂下直実、藤原章雄、キャサリン CY チャン、タ・ユアン・チャン、竹屋元裕. エンドゾームへの ACAT1 トランスロケーションを用いた Niemann-Pick disease Type C (NPC) の治療戦略の探索。第 98 回日本病理学会総会(京都)2009. 5. 1-3.
 24. 菰原義弘、竹村健一、坂下直実、竹屋元裕. 腫瘍内浸潤マクロファージにおける CD204 (class A scavenger receptor) 発現の意義。第 98 回日本病理学会総会(京都)2009. 5. 1-3.
 25. 岡本竜哉、Shahzada Khan、山部浩茂、藤井重元、澤智裕、河村好章、坂下直実、竹屋元裕、赤池孝章. Helicobacter cinaedi の血清診断法の確立と感染疫学。第 82 回日本細菌学会総会(名古屋) 2009. 3. 12-14.
 26. Koji Ohnishi, Yoshihiro Komohara, Naomi Sakashita, Motohiro Takeya. Infiltrated macrophages suppress proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. The 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe). 2008. 10. 1-5.
 27. 大西紘二、菰原義弘、坂下直実、竹屋元裕. Langerhans cell histiocytosis におけるマクロファージ系マーカーの発現解析と病態との関連性についての検討。第 48 回日本リンパ網内系学会(札幌)2008. 6. 13-14.
 28. 菰原義弘、竹村健一、坂下直実、竹屋元裕. 腫瘍関連マクロファージにおける CD204 (class A scavenger receptor type I and II) 発現の意義。第 48 回日本リンパ網内系学会(札幌)2008. 6. 13-14.
 29. 大西紘二、坂下直実、山下太郎、植田光晴、内野 誠、安東由喜雄、竹屋元裕: 肝移植後に脳出血で死亡した髄膜アミロイドーシス合併家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の剖検例。第 97 回日本病理学会総会(石川)2008. 5. 15-17.
 30. 雷小峰、坂下直実、Catherine CY Chang、Ta-Yuan Chang、竹屋元裕: 高脂血症病態のヒトマクロファージに出現する ACAT1 陽性エンドゾーム・ライソゾームの解析。第 97 回日本病理学会総会(石川)2008. 5. 15-17.
 31. 坂下直実、横瀬千美、藤井一彦、松本充博、竹屋元裕: 肺腫瘍血栓性微小血管症 (PTTM) の剖検解析: 増殖内膜におけるセロトニン受容体の関与。第 97 回日本病理学会総会(石川)2008. 5. 15-17.
 32. 坂下直実: Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) が関与する循環器疾患。第 78 回日本衛生学会総会(熊本), 2008. 3. 28-31
 33. 坂下直実: 肺病変 (pulmonary thrombotic tumor microangiopathy: PTTM)。第 301 回九州・沖縄スライドコンファレンス (鹿児島) 2008. 1. 26.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
坂下直実 (SAKASHITA NAOMI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 9 0 2 8 4 7 5 2
 - (2) 研究分担者
竹屋元裕 (TAKEYA MOTOHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 9 0 1 5 5 0 5 2
菰原義弘 (KOMOHARA YOSHIHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：40449921
藤原章雄 (FUJIWARA YUKIO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：70452886

(3)連携研究者
なし