

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010-2012

課題番号：22390187

 研究課題名（和文）酸化ステロールエステルによる小胞体ストレスの誘導機構の解明と  
その病態における意義

 研究課題名（英文） Study on the endoplasmic stress induced by oxsterol ester and its  
implication to diseases

研究代表者

石橋 俊 (ISHIBASHI SHUN)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90212919

研究成果の概要（和文）：小胞体内腔に酵素活性中心を有する中性コレステロールエステル水解酵素(NCEH1)は CE だけでなく、酸化ステロールのひとつ 25 水酸化コレステロール (25-HC) エステルに対する水解活性を有する。ヒト単球由来マクロファージでは NCEH1 が主要な CE 水解酵素であり、その阻害によって細胞内の CE 含量が増加する。25-HC を添加後に惹起される腹腔マクロファージ(MPM)の小胞体ストレス応答と細胞死誘導は Nceh1 欠損によって著明に亢進した。この時、小胞体内の 25-HC エステル含量が増加した。ACAT 阻害剤または Acat1 欠損マウスを用いて、コレステロールのエステル化が阻害されると、25-HC 添加後の小胞体ストレス応答と細胞死誘導は消失する。従って、小胞体内における 25-HC エステルの直積が小胞体ストレスを惹起すると考えられた。更に、Nceh1 欠損による動脈硬化病変の悪化は、Acat1 欠損の導入によって相殺された。以上より、酸化ステロールのエステル化やエステル体の水解はマクロファージの小胞体ストレス制御を介して、動脈硬化等の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：NCEH1, an microsomal protein which hydrolyzes cholesterol ester (CE), mediates the hydrolysis of esterified form of 25-hydroxycholesterol (25-HC), one of oxysterols. In human monocyte-derived macrophages, NCEH1 is responsible for the CE hydrolysis. Absence of Nceh1 augmented endoplasmic reticulum (ER) stress responses and subsequent apoptosis in murine peritoneal macrophages after exposure to 25-HC. In parallel, it increased 25-HC ester contents in ER. Inhibition of ACAT1 by inhibitors or genetic ablation reversed this phenomenon almost completely. Thus accumulation of 25-HC ester in ER may trigger ER stress responses in macrophages. Consistently, ablation of Acat1 attenuates the aggravated atherosclerosis in LDL receptor knockout mice to which Nceh1-deficient bone marrow was transplanted. In conclusion, esterification of oxysterols and hydrolysis of their esterified forms modulate ER stress thereby playing a critical role in the development of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：小胞体ストレス・細胞死・マクロファージ・コレステロール・オキシステロール

コレステロールは動脈硬化病巣形成において中心的役割を果たしている。動脈硬化の初期病巣には、細胞内にコレステロールをエステル体として蓄積したマクロファージである泡沫細胞が豊富に存在し、その一部はアポトーシスを呈し、進行性病変に見いだされる炎症性・増殖性・壊死性変化への移行過程の鍵を握っていると考えられる。しかし、その詳細な分子メカニズムについては不明であった。

一般に、小胞体ストレスは、小胞体において合成された蛋白が適正に折り畳まれない時の細胞の適応反応 (UPR) と考えられてきた。しかし、カルシウム代謝障害、脂質負荷、低酸素、エネルギー欠乏、感染でも同様の反応が惹起されることが明らかにされつつある。軽度の小胞体ストレスは細胞増殖を誘導するが、長期にわたる過剰のストレスはアポトーシスを惹起する。このうち、脂質負荷と小胞体ストレスとの関連については、アセチル LDL と ACAT 阻害剤を培養マクロファージに同時添加すると、小胞体ストレスが惹起されることが Tabas らによって報告されている。

以上のように、コレステロールや酸化ステロールの負荷、ACAT の活性調節、NCEH1 の活性調節は動脈硬化巣の小胞体ストレスと細胞死を制御し、そこを標的として新たな動脈硬化治療法を開発できるかもしれない。

## 2. 研究の目的

Nceh1 欠損マクロファージにおける 25-HC による小胞体ストレスの誘導が、25-HC エステルの小胞体蓄積によって惹起されるとの仮説をたて、その分子機構

の解明を第一の目的とする。次に、Acat1 の欠損がこの過程の阻止を介して、抗動脈硬化作用を有するか否かを遺伝学的に検証する。更に、他の臓器においても同様の過程が病態の形成に関与していないかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Nceh1 の基質特異性等の生化学的検討、発現調節、酸化ステロールエステルに対する水解活性の比較

(2) ヒト単球由来マクロファージ (HMM) の CE 水解における NCEH1 の意義  
NCEH1、LIPE、CES1 を発現する組換えアデノウイルスを構築し、過剰発現細胞における中性 CH 水解活性を測定する。また細胞内 CE の挙動を観察する。

HMM に LIPE 阻害剤 76-0079 または NCEH1 阻害剤 AS115 を添加し、細胞内 CE の挙動を観察する。

同様に、CES1、NCEH1 に対する shRNA を発現する組換えアデノウイルスを構築し、HMM において、それぞれの酵素をノックダウンした際の細胞内 CE の挙動を観察する。

(3) ヒト大動脈組織における NCEH1 の発現

ヒト大動脈組織を用いて抗 NCEH1 抗体、抗 CD68 抗体等で免疫染色を行う。

(4) 酸化ステロール添加に対する小胞体ストレス応答

Nceh1 欠損、Lipe 欠損、Nceh1 と Lipe の両者を欠損するマウスから腹腔マクロファージを調整し、25-HC をはじめとする酸化ステロール添加後の細胞死を TUNEL 法と MTT 法、小胞体ストレスシグナル分

子(Xbp-1(s), Chop, Gadd34, Bip)の mRNA 発現を Northern blot または real-time PCR で解析する。ACAT 阻害の効果を検討する。

(5) Acat1 欠損マウスとの交配実験  
Nceh1 欠損マウスを Acat1 欠損マウスと交配し、両者を欠損したマウス(Nceh1<sup>-/-</sup>;Acat1<sup>-/-</sup>)を作成する。マクロファージを調整し、25-HC 添加時の小胞体ストレス、細胞死の誘導を評価する。

次に、WT、Nceh1 欠損、Acat1 欠損、Nceh1<sup>-/-</sup>;Acat1<sup>-/-</sup>マウスをドナーとして、それぞれの骨髄を Ldlr 欠損マウスに移植する。生着確認後、Paigen diet 負荷後、大動脈の動脈硬化病変面積、TUNEL 染色、透過電顕、免疫染色を評価する。

#### 4. 研究成果

##### 1) ヒト単球由来マクロファージ(HMM)の CE 水解における NCEH1 の役割

HMM の分化に伴い、NCEH1 の発現と中性 CE 水解酵素活性が並行して増加した。一方、HMM に LIPE の発現は認められず、CES1 の発現は分化に伴う増加は認められなかった。更に、株化マクロファージである THP-1 と U937 は HMM に比して大量の CES1 を発現しているが、中性 CE 水解酵素活性は低かった。

マクロファージに分化させた THP-1 に組み換えアデノウイルス感染による遺伝子導入法を用いて NCEH1、CES1、LIPE を過剰発現させると、中性 CE 水解酵素活性は LIPE>NCEH1 に検出されるが、CES1 には検出されなかった。また、AcLDL 添加によって細胞内に蓄積した CE は、LIPE>NCEH1 の過剰発現によって減少したが、CES1 の過剰発現では減少を示さなかった。

HMM の中性 CE 水解酵素活性は LIPE 阻害剤 76-0079 による阻害を受けず、NCEH1 阻害剤 AS115 のよる阻害を受けた。AcLDL によって CE を蓄積させた HMM に HDL を添加後の CE 蓄積の減少量は、76-0079 によっては有意に阻害されないが、AS115 のよる有意な阻害を受けた。

shRNA を発現する組み換えアデノウイルスを HMM に感染させ、NCEH1 と CES1 をノックダウンした場合、NCEH1 をノックダウンした場合のみ細胞の中性 CE 水解酵素活性が減少した。

##### 2) ヒト動脈硬化病巣における NCEH1 の発現

20 例の剖検症例の大動脈標本を用いて NCEH1 に対する免疫染色を行った。マクロファージマーカーの CD68 陽性細胞数と NCEH1 陽性細胞数は比例関係にあり、連続切片を用いた検討では、CD68 陽性細胞が NCEH1 陽性細胞に対応していた。

##### 3) Nceh1 欠損は 25-HC 添加後のアポトーシスおよび小胞体ストレス誘導を増強する。

野生型 MPM と Nceh1 欠損 MPM に 10  $\mu$ g/ml の 25-HC を添加すると、アポトーシスの指標である DNA laddering と TUNEL 陽性細胞数は NCEH1 欠損 MPM で顕著に増加した。より弱く 27-HC でも同様の現象が確認されたが、他のオキシステロール (5  $\alpha$  6  $\alpha$  -epoxycholesterol、5  $\beta$  6 メータ -epoxycholesterol、7  $\beta$ -HC、7-ketocholesterol、24-HC) では観察されなかった。

Fig. 1

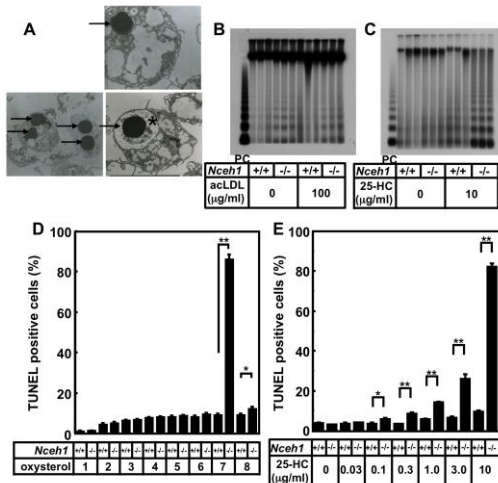
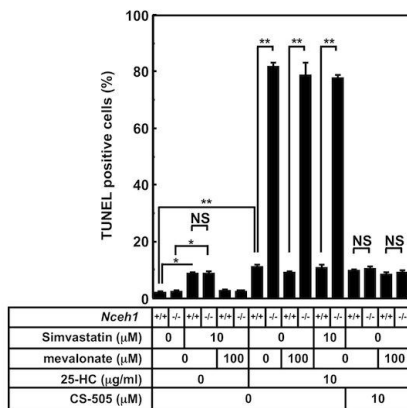


Fig. 6



25-HC 添加後に Nceh1 欠損 MPM は野生型 MPM に比較して顕著に小胞体ストレス指標 (Xbp-1 のスプライシング、Bip、Chop、Gadd34 の mRNA 発現) が増大した。この時、細胞の小胞体画分における 25-HC エステルの増加も観察された。これらの現象は Lipe 欠損 MPM では観察さ

れなかった。

4) 25-HC 添加によって誘導される Nceh1 欠損 MPM の小胞体ストレスは ACAT1 阻害によって阻止される。

非選択的 ACAT 阻害剤 CS-505 や ACAT1 選択的 ACAT 阻害剤 K-604 を添加すると、25-HC 添加で Nceh1 欠損 MPM において観察される小胞体ストレス増大と TUNEL 陽性細胞数の増加が阻止された。一方、ACAT2 選択的 ACAT 阻害剤 PPPA には上記の効果は確認できなかった。Nceh1 欠損 MPM の CHOP 発現亢進は Nceh1/Acat1 欠損 MPM で消失した。

5) Nceh1 は CE のみならず 25-HC エステルに対しても水解活性を有する。

25-HC にオレイン酸をエステル結合して 25-HC のエステル体 (25-HC oleate) を作成した。組換えアデノウイルスでヒト HSL、NCEH1、CEH、TGH1、TGH2 を過剰発現し HEK293 細胞に強発現した。HSL と NCEH1 は Cholesterol oleate と 25-HC oleate に対して水解活性を示したが (Vmax:1890vs46.5 pmol/min/mg 蛋白、Km:23.7 と 6.4mM)。

6) MPM の細胞質と小胞体画分のオキシステロール含量を遊離型とエステル型に分けて LC-MS/MS で定量した。27-HS と 24S-HS のエステル体の小胞体含量が Nceh1 欠損 MPM で有意に増加し、25-HS と 24S, 25HS も増加傾向が認められた。

7) 8 週令雌 LDL 受容体欠損マウスに 9Gy の放射線照射により骨髄を破壊した後に、野生型、ACAT1 欠損マウス、NCEH1 欠損マウス、ACAT1 欠損/NCEH1 欠損マウス骨髄移植を行った。移植 1 か月後より高コレステロール食負荷 (Paigen diet) を 2 カ月行い、動脈硬化への影響を検討した。大動脈全体における動脈硬化病巣面積は

Nceh1 欠損骨髄を移植されたマウスでは、Acat1 欠損骨髄を移植されたマウスに比べて有意に病巣面積が悪化した。

結論：オキシステロールも Acat1 と Nceh1 のよってそれぞれエステル化と加水分解を受ける。Nceh1 の欠損はオキシステロールエステル体の蓄積を招き、小胞体ストレスが惹起される。また、Nceh1 欠損は動脈硬化が促進し、Acat1 の欠損は動脈硬化を抑制する。この過程には、単にコレステロールエステルの蓄積量だけではなく、小胞体ストレス応答性の寄与が想定された。

#### 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] (計 6 件)

(1) Igarashi M, Osuga J, Uozaki H, Sekiya M, Nagashima S, Takahashi M, Takase S, Takanashi M, Li Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Hosokawa M, Fledelius C, Jacobsen P, Yagyu H, Fukayama M, Nagai R, Kadowaki T, Ohashi K, Ishibashi S.

The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages.

Circ Res. 2010;107(11):1387-95.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226613.

(2) Nagashima S, Yagyu H, Takahashi N, Kurashina T, Takahashi M, Tsuchita T, Tazoe F, Wang XL, Bayasgalan T, Sato N, Okada K, Nagasaka S, Gotoh T, Kojima M, Hyodo M, Horie H, Hosoya Y, Okada M, Yasuda Y, Fujiwara H, Ohwada M, Iwamoto S, Suzuki M, Nagai H, Ishibashi S.

Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues-association among CES1 expression, triglyceride lipase activity and adiposity.

J Atheroscler Thromb. 2011;18(3):190-9.

(3) Ohta K, Sekiya M, Uozaki H, Igarashi M, Takase S, Kumagai M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Kubota M, Nishi M, Okazaki H, Iizuka Y, Yahagi N, Yagyu H, Fukayama M, Kadowaki T, Ohashi K, Ishibashi S, Osuga J.

Abrogation of neutral cholesterol ester hydrolytic activity causes adrenal enlargement.

Biochem Biophys Res Commun. 2011;404(1):254-60.

doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.103.

(4) Ohshiro T, Matsuda D, Sakai K, Degirolamo C, Yagyu H, Rudel LL, Omura S, Ishibashi S, Tomoda H. Pyripyropene A, an acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2-selective inhibitor, attenuates hypercholesterolemia and atherosclerosis in murine models of hyperlipidemia.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(5):1108-15.

doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223552.

(5) Nagashima S, Yagyu H, Ohashi K, Tazoe F, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Okada K, Sekiya M, Osuga J, Ishibashi S.

Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death.

Arterioscler Thromb Vasc Biol.

2012;32(8):1824-31.

doi: 10.1161/ATVBAHA.111.240754.

(6) Takahashi M, Yagyu H, Tazoe F, Nagashima S, Ohshiro T, Okada K, Osuga J, Goldberg IJ, Ishibashi S.

Macrophage lipoprotein lipase modulates the development of atherosclerosis but not adiposity.

J Lipid Res. 2013;54(4):1124-34. doi: 10.1194/jlr.M035568.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 俊 (ISHIBASHI SHUN)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90212919

### (2) 研究分担者

大須賀 淳一 (OOSUGA JUNNITI)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10334400

野牛 宏晃 (YAGYU HIROAKI)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60348018