

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591339

研究課題名(和文)動脈硬化症における泡沫現象関連遺伝子発現の分子機構の解明と臨床的意義に関する検討

研究課題名(英文)Genetic analysis of molecular mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis

研究代表者

大須賀 淳一 (OSUGA, JUN-ICHI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10334400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：NCEH1は、マクロファージにおける中性至適pHコレステロールエステル水解酵素活性を担う主要な分子である。欠損マウスの解析から、NCEH1は泡沫化や粥状動脈硬化に深く関与することが明らかにされた。酵素活性阻害薬を用いた実験より、ヒトでもNCEH1はマクロファージの主要な分子であることが示され、大動脈でNCEH1はマクロファージの部位に一致して存在することが免疫組織学的に証明された。更に、泡沫過程で酸化ステロールはNCEH1非存在下でアポトーシスを増加して、動脈硬化病変を重症化する可能性が示唆された。NCEH1は粥状動脈硬化の病態を紐解く新たな鍵として診断や治療を含めた臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：NCEH1 plays a principal role for cholesteryl ester hydrolase at optimal neutral pH in macrophages. Gene-knockout studies revealed that NCEH1 would have a deep relationship with foam cell formation and atherosclerotic development. In addition, it is suggested by experiments using the enzymatic inhibitor that NCEH1 might be a main enzyme in human macrophages and immunohistochemical analyses demonstrate that NCEH1 exists in the aortic area stained by anti-CD68 antibody. Furthermore oxysterols could augment the induction of apoptosis in foam cells lacking NCEH1 and advance the severity of atherosclerotic lesions. NCEH1 is a key molecule to understand the pathogenesis of atherosclerosis and lead to clinical applications including its diagnosis and treatment.

研究分野：医歯薬学

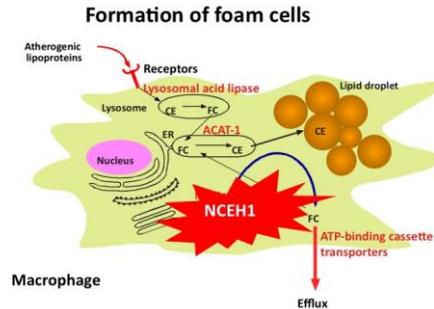
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：マクロファージ コレステロールエステル 泡沫化 粥状動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

泡沫化マクロファージは粥状動脈硬化症の基盤を形成し、病態の発症および進展を司る重要な起点と考えられる。泡沫現象は細胞内コレステロールエステル (CE) の過剰蓄積で、そのメカニズムは以下のような点が明らかにされてきた。すなわち、酸化等の変性を受けた LDL がスカベンジャー受容体を介して細胞内に取り込まれ、ライソゾームで水解されて遊離コレステロール (FC) となる。細胞内 FC の蓄積は細胞毒性があるため、それを回避すべく、FC は小胞体のアシル CoA:コレステロール・アシルトランスフェラーゼ 1 (ACAT-1; acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1) により再エステル化され CE となり細胞質内に蓄積される。CE は疎水性のため脂肪滴となり、この蓄積が泡沫化をもたらす。しかし、一旦蓄積した CE も再分解されることが知られており、ライソゾームでの酸性環境下での水解に対し、中性環境下での水解であるため、neutral cholesterol ester hydrolase (nCEH) と呼ばれてきた。CE の水解により生じた FC は、1) 細胞外にアポ A-I、A-IV などのヘリックス型のアポ蛋白へ ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) などにより efflux される、2) CE に再エステル化される、かはいずれかの経路を辿るが、効率よく細胞外へ efflux されれば泡沫化は軽減することとなる。従って、現在のコンセプトでは、細胞内の CE 蓄積量は ACAT-1、nCEH と ABCA1 などのバランスにより規定されると考えられている。こうした観点から ACAT 阻害薬が開発され、更に現在は ABCA1 の活性化をねらった治療法の開発競争が展開している。しかしながら、これまで nCEH の活性化をねらった研究はほとんどされていない。この原因として nCEH 活性を発揮する蛋白がマクロファージより単離されなかったことがあげられる。

従来古典的なりパーゼである hormone-sensitive lipase (HSL) が nCEH ではないかと推察されてきたが (FEBS Lett 1989;247:205-8、J Lipid Res 1993;34:1969-74)、我々の作成した HSL 欠損マウスのマクロファージには十分な量の nCEH 活性が残存していた (Osuga J et al. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:787-92)。我々はバイオインフォマティクスを駆使して、モチーフ解析によりマクロファージの nCEH の新規候補遺伝子を同定し、NCEH1 (neutral cholesterol ester hydrolase 1) と命名した (Okazaki H et al. J Biol Chem 2008;283:33357-64)。NCEH1 はマクロファージの小胞体に豊富に存在し (Igarashi M et al. J Lipid Res. 2010;51:274-85)、アデノウイルスベクターを用いた過剰発現実験で泡沫化を抑制し、また RNAi による抑制実験でマクロファージの nCEH 活性を約 50%抑制した。さらに、NCEH1 欠損マウスを作製して、泡沫化や動脈硬化への影響について研究を進め



た。NCEH1 欠損のマクロファージでは nCEH 活性が野生型の約 50%に抑制されていた。これと呼応するように NCEH1 欠損は泡沫化を促進し、apoE 欠損マウスの動脈硬化を約 2 倍に促進した (Sekiya M et al. Cell Metab 2009;10:219-28)。さらに NCEH1 欠損マウスと HSL 欠損マウスを交配し、両欠損マウスを作製すると、マクロファージの nCEH 活性は野生型の約 10%となったので、この両者がマクロファージ nCEH の主要な責任分子であることが判明した。泡沫化を誘導すると細胞内 CE 含量は HSL 欠損、NCEH1 欠損、両欠損の順に増加し、両欠損において 2 つのリパーゼは相加的に寄与することが示された。また、野生型、HSL 欠損、NCEH1 欠損、両欠損の骨髄を LDL 受容体欠損マウスに骨髄移植し、in vivo での動脈硬化病変形成を調べたが、病変面積は、この順に従って増大したので、泡沫化の程度と呼応する結果だった。以上より最も主要なマクロファージ nCEH は NCEH1 であり、次に HSL であることが明らかとなった。以上の先行研究で NCEH1 と HSL が泡沫化の量的な程度を調節する因子であることが明らかになった。

2. 研究の目的

ヒトのマクロファージにおいても NCEH1 は CE を分解する主要な分子で、ヒト動脈硬化病変においてもその発現を確認している。本研究は、ヒト NCEH1 が動脈硬化症の進展および動脈硬化性疾患の発症への関与について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒトのマクロファージでの NCEH1 の寄与度を NCEH1 活性阻害薬 (AS115) や HSL 活性阻害薬を用いて検討した。

(2) NCEH1 欠損マウスの腹腔マクロファージは 25-水酸化 (25-OH) ステロールの添加でアポトーシスを起こすことを先行研究で見いだしている。AS115 を用いて NCEH1 の活性を低下させた状態での、25-OH ステロールの影響を調べた。アポトーシスのメカニズムとして酸化ステロールエステルの蓄積が関与している可能性があるため、ACAT 阻害薬によるアポトーシスへの影響について調べた。また、NCEH1 欠損マウスでは酸化ステロールの添加で小胞体ストレスが惹起することを見

いだしているため、野生型に AS115 を添加して同様の減少が起きているかどうか検証した。

(3) ヒトの大動脈での NCEH1 や泡沫化関連遺伝子の発現を免疫組織学的な手法で確認し、病変部位の構成細胞や NCEH1 の発現などについても検討を行う。

4. 研究成果

(1) ヒトのマクロファージの nCEH を担う分子として、HSL と cholesterol ester hydrolase (CES1) (*Physiol Genomics*. 2000;2:1-8, *J Lipid Res*. 2003;44:1833-40, *J Clin Invest*. 2007;117:2983-92) が候補と考えられていた。しかし、HSL のヒト単球由来マクロファージでの発現量は非常に低く、HSL 活性阻害薬を用いても nCEH 活性は抑制されないため、HSL のヒト単球由来マクロファージの nCEH を担う分子としての寄与度はほとんどないものと考えられた。同様に、CES1 の発現はマクロファージに認められるものの、nCEH 活性が極めて低く、ヒト単球由来マクロファージにおいてノックダウンしても nCEH 活性への影響はなかった。一方、NCEH1 は単球からマクロファージの分化に伴って発現が誘導され、AS115 により nCEH 活性は 85% までに抑制された。これらの結果より、NCEH1 はヒトマクロファージの主要な nCEH であることが示された (Igarashi *et al.* *Circ Res*. 2010;107:1387-95)。

(2) AS115 による酵素活性の抑制が欠損モデルと同等の効果があるのかを調べるため、野生型マウスの腹腔マクロファージに添加した。AS115 の添加により欠損モデルと同様にコレステロールエステルの蓄積が観察された。25 水酸化ステロールは NCEH1 欠損マクロファージのアポトーシスを小胞体ストレス経路で誘導する。従って、NCEH1 欠損マウスの動脈硬化には、単にコレステロールエステルの蓄積だけでなく、酸化ステロールの関与が考えられた。実際に、25 水酸化ステロールのエステル体は小胞体に存在し、NCEH1 の基質になることも証明された。さらに、ACAT1 欠損マウスを NCEH1 欠損マウスと交配することにより、動脈硬化の進展は抑制されることが示された。酸化ステロールのエステル体も ACAT1 で生成される可能性がある。酸化ステロールエステルから小胞体ストレスひいてはアポトーシスへの経路に関わる分子機序が明らかにして泡沫化を抑制する新規治療の開発につなげたい。

(3) ヒト大動脈の動脈硬化性病変の免疫組織学的検討した結果、NCEH1 は CD68 の染色部位に一致して存在することが明らかとなった。以上の結果より、NCEH1 はヒト単球由来マクロファージの泡沫化に影響する重要な分子で、ヒトの動脈硬化形成にも関与していることが示唆された。

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 5 件)

1: 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*. (査読有) 2013 Apr;54(4):1124-34. doi: 10.1194/jlr.M035568. Epub 2013 Feb 3.

2: Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, Yanai H, Tada N, Gotoda T, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H. Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. *J Atheroscler Thromb*. (査読有) 2013;20(5):481-93. Epub 2013 Mar 7.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/20/5/20_16592/_article

3: 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*. (査読有) 2012 Aug;32(8):1824-31. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.240754. Epub 2012 Jun 14.

4: Wang XL, Osuga J, Tazoe F, Okada K, Nagashima S, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Yagyu H, Okada K, Ishibashi S. Molecular analysis of a novel LCAT mutation (Gly179 → Arg) found in a patient with complete LCAT deficiency. *J Atheroscler Thromb*. (査読有) 2011;18(8):713-9. Epub 2011 May 20.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/18/8/18_8003/_article

5: Sekiya M, Osuga J, Igarashi M, Okazaki H, Ishibashi S. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. *J Atheroscler Thromb*. (査読有) 2011;18(5):359-64. Epub 2011 Apr 6.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/18/5/18_7013/_article

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.jichi.ac.jp/naika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大須賀 淳一 (OSUGA, Jun-ichi)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10334400

(2) 研究分担者

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

野牛 宏晃 (YAGYU, Hiroaki)
自治医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：60348018

(3) 連携研究者

()

研究者番号：