

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293213

研究課題名(和文) マクロファージ脂肪毒性の解除を利用した新規動脈硬化治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for atherosclerosis based on alleviation of lipotoxicity of macrophages

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化巣の泡沫細胞は脂肪滴内にコレステロールエステル(CE)蓄積したマクロファージである。CEを水解する酵素として、以前から知られていたホルモン感受性リパーゼ(Lipe)に加えて、私たちは中性コレステロールエステル分解酵素(NCEH1)を同定した。Cre/lox系を用いて、マクロファージ特異的にNceh1またはLipeを過剰発現するトランスジェニックマウス(Tg)を作成した。腹腔マクロファージにおけるNceh1、LipeのmRNA発現量は野生型に比して3倍程度高発現したラインを得た。今後、動脈硬化抑制効果を評価し、動脈硬化の新規治療法の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Foam cells in atheromatous lesions are characterized by macrophages loaded with cholesteryl ester in lipid droplets. The cellular CE is hydrolyzed not only by hormone-sensitive lipase (Lipe) but also by neutral CE hydrolase 1 (NCEH1), which we identified as a unique CE hydrolase functional in human and murine macrophages. It is plausible that overexpression of NCEH1 in macrophages is protective against atherosclerosis not only by reducing the burden of CE, but also alleviating other immunological lipotoxicity. To test these hypotheses, we have generated mice overexpressing Nceh1 or Lipe in a macrophage-specific manner using Cre/lox technology. The peritoneal macrophages expressed 3-fold higher levels of mRNA compared with those from wild-type mice. We are going to examine the effects of the transgene on the development of atherosclerosis.

研究分野：代謝学

キーワード：動脈硬化 泡沫細胞 マクロファージ コレステロール リパーゼ トランスジェニック マウス 小胞体ストレス

1. 研究当初の背景：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。

コレステロールエステル(CE)は細胞質内の脂肪滴(lipid droplets, LDs)に蓄積し、その分解には中性域で作用する CE 水解酵素の関与が重要である。脂肪細胞の LDs に蓄積したジアシルグリセロール(DG)やトリアシルグリセロール(TG)を水解するホルモン感受性リパーゼ(LIPE)も中性 CE 水解活性を有するため、LIPE がマクロファージの中性 CE 水解活性と考えられてきた。ところが、Lipe 欠損マウスのマクロファージには中性 CE 水解活性が多量に残存しており、第 2 の酵素の存在が予測された ( Osuga J et al. PNAS 2000;97:787-92. )。

そこで、LIPE の酵素活性中心に類似した構造を有する遺伝子群の中から、マクロファージに高発現し、中性 CE 水解活性を有する遺伝子を探索し、その条件を有する遺伝子 KIAA1363、AADA1 を同定した。中性 CE 水解酵素としての機能的側面に注目し、この遺伝子を NCEH1 と Nceh1 の名称で HUGO と MGI にそれぞれ登録した。組み換え変異体を作成し、それをマクロファージに発現して、細胞内局在や酵素活性を検討した。その結果、NCEH1 は N 末端の疎水性アミノ酸配列によって小胞体膜に固定され、酵素の活性中心は小胞体の内腔に存在することが判明した。

Nceh1 欠損マウス由来の腹腔マクロファージ(MPM)の中性 CE 水解活性は低下し、細胞外へのコレステロール放出も低下した。Lipe 欠損マウス由来の MPM も中性 CE 水解活性低下を示し、Nceh1 と Lipe の両者を欠損したマクロファージの中性 CE 水解活性は 90%近く低下した。これら 2 種類の酵素でマウス腹腔マクロファージの中性 CE 水解活性の大半を担っている。マクロファージにおけるそれぞれの酵素の血清脂質と独立した動脈硬化への影響を調

べるために、骨髄移植モデルを用いて動脈硬化を比較した。その結果、ドナーが Lipe<Nceh1<Nceh1+Lipe 欠損の順に、動脈硬化病変面積の増大が認められた。このようにマウスではマクロファージの LDs 内 CE 水解には Nceh1 と Lipe の両者が重要であると結論された。一方、ヒト単球由来マクロファージは LIPE を発現しておらず、LIPE 阻害剤や NCEH1 のノックダウンの結果からも、ヒトでは NCEH1 が中心的に活性を担っていると考えられる。

オキシステロールのひとつ 25 水酸化コレステロール(25-OHC)を Nceh1 欠損マウス由来 MPM の培養液中に添加すると、著しく小胞体ストレス反応が増大した。この現象は 25-OHC 以外のオキシステロールや Lipe 欠損マウス由来 MPM では観察されない。また、細胞内のコレステロールをエステル化する ACAT の阻害によって小胞体ストレスの増大は阻止される。従って、25-OHC エステルの小胞体における異常蓄積が小胞体ストレスを惹起すると考えた。一方、25-OHC はコレステロール 25 水酸化酵素(CH25H)によって生成される。また、Toll-like 受容体 4(TLR4)リガンドであるリポポリサッカライド(LPS)刺激によって CH25H は顕著に誘導され、Nceh1 の発現は 6 時間を nadir に抑制される。従って、LPS 刺激初期の小胞体ストレス誘導に内因性 25-OHC を介した機序が介在している可能性がある。

更に、25-OHC 自体に B リンパ球の IgA 生成抑制作用が報告されているが (Bauman D et al. PNAS 2009;106:16764-167649)、25-OHC がオキシステロール 7 水酸化酵素(CYP7B1)の代謝を受けて生成される 7 $\alpha$ ,25 ジヒドロキシコレステロール(7 $\alpha$ ,25-OHC)は B リンパ球の G 蛋白共役受容体 EB12 のリガンドであり (Liu C et al. Nature 2011;475:519-523; Hannedouche S et al. Nature 2011;475:524-527)、リンパ系組織での B リンパ球反応を制御していることが報告された ( Yi et al. Immunity 2012;37:535-548 )。従って、25-OHC エステルを水解して 25-OHC に変換する NCEH1 は、これらの代謝物の濃度調節を介して近傍の B リンパ球機能も制御してい

る可能性がある。

以上のように、マクロファージの内因性 NCEH1 を誘導、または外来性 NCEH1 の導入は、単に LDs 内の CE 水解を促し、コレステロールの除去につなげるだけでなく、25-OHC や 7 $\alpha$ ,25-OHC の代謝を介して、マクロファージ自身の小胞体ストレスと周囲の B リンパ球の機能調節を担っている可能性がある。これらの現象は動脈硬化発症・進展やその他の炎症性疾患との関連が予測される。従って NCEH1 は動脈硬化を始めとした炎症性疾患の新たな治療標的として期待できる。

## 2 . 研究の目的

Nceh1 または Lipe をマクロファージ特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス(Tg)を作成する。それぞれのマクロファージにおけるコレステロール代謝、小胞体ストレス応答性等を調べる。更に、動脈硬化モデルマウスに Nceh1 または Lipe のトランスジーンを導入して、動脈硬化抑制効果を評価する。

## 3 . 研究の方法

### A)マクロファージ特異的 Tg マウスの作成と解析

A-1)CAG-floxedLacZ-Nceh1  
、  
CAG-floxedLacZ-Lipe の Tg マウスの樹立 :  
Pm111(pCAG-floxedLacZ-linker;Minamoto et al. Nat Med 2009;15:1082-1087)の XhoI-NotI に Nceh1 と Lipe を挿入した pCAG-floxedLacZ-Nceh1  
、  
pCAG-floxedLacZ-Lipe 構築した。直線化後マウス受精卵前核へのマイクロインジェクション法で Tg マウスを作成する。

A-2) マクロファージ特異的に Nceh1(LysM-Cre<sup>+</sup>;CAG-floxedLacZ-Nceh1<sup>+</sup>)または Lipe を欠損するマウス(LysM-Cre<sup>+</sup>;CAG-floxedLacZ-Lipe<sup>+</sup>)の樹立 :  
LysM-CreTg マウスと

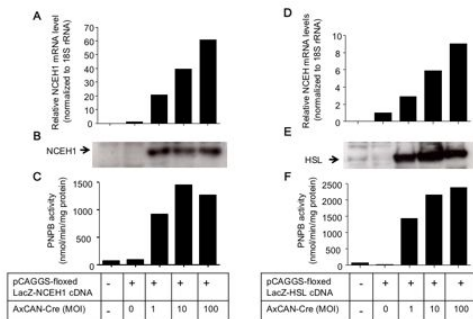
CAG-floxedLacZ-Nceh1  
、  
CAG-floxedLacZ-Lipe の Tg マウスとの交配により、LysM-Cre<sup>+</sup>;CAG-floxedLacZ-Nceh1<sup>+</sup>または LysM-Cre<sup>+</sup>;CAG-floxedLacZ-Lipe<sup>+</sup>を得る。対照には LysM-Cre<sup>-</sup>;CAG-floxedLacZ-Nceh1<sup>+</sup>または LysM-Cre<sup>-</sup>;CAG-floxedLacZ-Lipe<sup>+</sup>を用いる。標的とする遺伝子が、設計どおりに LysM 発現細胞または臓器で発現しているか否かを、腹腔マクロファージ(MPM)を用い、qPCR で確認した。

## 4 . 研究成果

Cre/loxPシステムを用いてマウス NCEH1 遺伝子とマウス HSL 遺伝子のマクロファージ特異的な過剰発現マウスを作製した。loxP-LacZ-loxP(floxed LacZ)という遺伝子配列の後にマウス NCEH1 とマウス HSL の cDNA を挿入した pCAGGS ベクタープラスミドを作製した。これら pCAGGS-floxed LacZ-Nceh1 cDNA あるいは、pCAGGS-floxed LacZ-Lipe cDNA 配列においては、Cre recombinase が作用することにより、loxP site に挟まれた LacZ が除去され、CAG プロモータによる Nceh1 遺伝子あるいは Lipe 遺伝子の過剰作用が発揮される。

これら作成したベクタープラスミドが作動するかを確認するために、invitro での先行実験を行った。ベクタープラスミドを HEK 293 細胞に導入し、ここに Cre recombinase を発現しているアデノウイルス(AxCAN-cre)を種々の感染多重度(MOI)で感染させた。その結果、Nceh1 については、Nceh1 mRNA の 20~60 倍の発現の亢進を認めた(図 A)。また Nceh1 蛋白の過剰発現も確認した(図 B)。次に、この過剰発現した Nceh1 の作用の亢進があるかを調べるために、酪酸 p-ニトロフェニル(PNPB)を基質としたエステラーゼ活性を調べたところ、13 から 18 倍の亢進を確認した(図 C)。同様に Lipe につい

では、Lipe mRNA の 3 から 9 倍の発現の亢進(図 D)、Lipe 蛋白の過剰発現(図 E)、及び PNPB 活性の 20 から 33 倍の亢進を確認した(図 F)。



In vitro での先行実験により Cre/loxP システムを用いた過剰発現システムが作動することが確認できたために、これらベクタープラスミドに対して、制限酵素処理を行い、ベクター由来の DNA 配列を除去すると同時に直線化したトランスジーンを作製した。このトランスジーンを C57BL/6Jcl マウスの受精卵に注入して Tg を作製した。pCAGGS-floxed LacZ-Nceh11 cDNA の伝達は 92 匹の胎盤あるいは出生に対して 5 匹(生存 3 匹)、pCAGGS-floxed LacZ-Lipe CDNA の伝達は 32 匹の胎盤あるいは出生に対して 2 匹(生存マウスは 1 匹)を確認した。

Floxed-lacZ-Nceh1 マウスは 3 匹出生してそれぞれに LysM-Cre を交配してマクロファージ特異的 Nceh1 過剰発現マウスを作成した(M-Nceh1 Tg line 1,2,3)。これらのなかで解析を行えたものは 2 line である(1 line は出生数が現時点ですくないため、増加させる予定である)。また同様に Floxed-lacZ-Lipe マウスは 1 匹出生しそこに LysM-Cre を交配してマクロファージ特異的 Lipe 過剰発現マウスを作製した(M-Lipe Tg line 1)。

マクロファージを回収するため、上記マウ

スにチオグリコール酸を腹腔投内に投与して腹腔内にマクロファージを誘導した。そのマクロファージより total RNA を抽出して、Nceh1 と Lipe の mRNA 発現を調べた。M-Nceh1 Tg line 1 のマクロファージにおける Nceh1 mRNA は野生型に比べて 0.63 倍と過剰発現が認められなかった。同様に M-Nceh1 Tg line 2 の Nceh1 mRNA は 0.84 倍と過剰発現が見られなかった。この一方で M-Lipe Tg line 1 の Lipe mRNA は 3.56 倍と発現の亢進が認められた。

予備実験においてチオグリコール酸で腹腔マクロファージを誘導した場合、野生型マウスにおいてマクロファージの Nceh1 mRNA が大きく誘導されることが明らかとなった。このことで M-Nceh1 Tg と野生型のマクロファージの Nceh1 mRNA の発現の差がマスクされた可能性がある。そこでチオグリコール酸を用いずに腹腔内常在マクロファージを回収し、mRNA 発現を解析したところ、M-Nceh1 Tg line 1 のマクロファージにおける Nceh1 mRNA は野生型に比べて 2.83 倍と発現の亢進がみられた。

今後は M-Nceh1 Tg line 2, line 3 において同様の遺伝子発現解析を行い、より大きな発現過剰がられたものをその後の実験に用いる。そして M-Nceh1 Tg、M-Lipe Tg それぞれのマクロファージの表現型の解析や、それぞれの骨髄を動脈硬化モデル LDL 受容体欠損マウスに移植して Nceh1 と Lipe の動脈硬化への寄与を検討する。

##### 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](計 6 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. 2013;54(4):1124-34.

(2) Sakai K, Igarashi M, Yamamuro D, Ohshiro T, Nagashima S, Takahashi M, Enkhtuvshin B, Sekiya M, Okazaki H, Osuga J, Ishibashi S. Critical role of neutral cholesteryl ester hydrolase 1 in cholesteryl ester hydrolysis in murine macrophages. J Lipid Res. 2014, 55(10):2033-40.

(3) Sekiya M, Yamamuro D, Ohshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, Okazaki H, Yagyu H, Osuga J, Ishibashi S. Absence of Nceh1 augments

25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages. J Lipid Res. 2014 ;55(10):2082-9

(4) Nagashima S, Yagyu H, Tozawa R, Tazoe F, Takahashi M, Kitamine T, Yamamuro D, Sakai K, Sekiya M, Okazaki H, Osuga J, Honda A, Ishibashi S.

Plasma cholesterol-lowering and transient liver dysfunction in mice lacking squalene synthase in the liver. J Lipid Res. 2015;56(5):998-1005.

(5) Ohshiro T, Ohtawa M, Nagamitsu T, Matsuda D, Yagyu H, Davis MA, Rudel LL, Ishibashi S, Tomoda H. New pyripyropene A derivatives, highly SOAT2-selective inhibitors, improve hypercholesterolemia and

atherosclerosis in atherogenic mouse models. J Pharmacol Exp Ther. 2015;355(2):299-307.

(6) Osaki Y, Nakagawa Y, Miyahara S, Iwasaki H, Ishii A, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Ohashi K, Ishibashi S, Yamada N, Shimano H. Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. Biochem Biophys Res Commun. 2015 23;466(3):536-40

〔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

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

### (2) 研究分担者

自治医科大学・医学部・講師  
永島 秀一 (NAGASHIMA SHUICHI)  
研究者番号: 930406136

自治医科大学・医学部・講師  
高橋 学 (TAKAHASHI MANABU)  
研究者番号: 70406122

自治医科大学・医学部・リサーチレジデント  
山室 大介 (YAMAMURO DAISUKE)  
研究者番号: 20739255