

平成21年4月13日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590056  
 研究課題名（和文）脳内コレステロール代謝における中性コレステロールエステラーゼの役割  
 研究課題名（英文）A role of the neutral cholesterol esterase in the cholesterol metabolism in the brain  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：石井 伊都子（Itsuko ISHII）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
 研究者番号：00202929

研究成果の概要：脳は血液脳関門（BBB）もよって体循環から隔離されており、独自のコレステロール de novo 合成経路が発達しており、体循環と隔離されているとされてきた。しかし、本研究でマウスに高コレステロール食を給餌すると、血中のコレステロール値が上昇し、長期投与で体重が減少し、脳内の BBB の透過性が高まることが明らかになった。また、脳内での中性コレステロールエステラーゼを介したコレステロールのリサイクルの系も存在することが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,300,000	690,000	2,990,000
20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
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：薬学・医療系薬学

キーワード：コレステロール、脳、中性コレステロールエステラーゼ、スタチン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳内コレステロール代謝に関する情報が極めて少なく、コレステロール運搬経路における BBB の役割が明らかになっていないことがあげられる。

(2) 脳のコレステロールは新規合成されると考えられてきたが、脳内にも中性コレステ

ロールエステラーゼを経由した遊離コレステロール産生するリサイクル経路が存在すると考えられる。

(3) 体循環中の血中コレステロール値が脳内コレステロールの代謝に影響を与える可能性がスタチンを投与した患者の疫学から明らかになっている。

## 2. 研究の目的

本研究では脳内で中性コレステロールエステラーゼが関与するコレステロール代謝機構を明らかにするとともに、血中コレステロール値がBBBを介して脳のコレステロールの代謝にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 高コレステロール食による脳の変化の観察: C57BL/6J マウスに高コレステロール食を 2~6 ヶ月与え、経時的に脳を免疫染色で観察した。
- (2) マイクロアレイによる高コレステロール食により変化する脳内 mRNA の探索: C57BL/6J マウスに高コレステロール食を 2 および 4 ヶ月与え、マイクロアレイにて増減する mRNA を明らかにした。
- (3) MRI による BBB の透過性の解析: C57BL/6J マウスに高コレステロール食を 4 ヶ月与え、carboxy-PROXYL をプローブに用いて MRI にて BBB の透過性をと測定した。
- (4) 脳細胞における中性コレステロールエステラーゼ活性の確認: ミエリンを除く、脳細胞画分に中性コレステロールエステラーゼ活性を検討した。
- (5) ヒト中性コレステロールエステラーゼ過剰発現マウス (HU3/CES2 TG マウス) による脳内コレステロール代謝の解析: 2 ラインの HU3/CES2 TG マウスを確立し、脳内コレステロール代謝を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 高コレステロール食による脳の変化の観察: 野生型マウスに高コレステロール食を給餌し、脳の切片をヘマトキシリン・エオジン染色し観察をした。高コレステロール食給餌期間が 4 ヶ月以内では大きな変化が無かったが、4 ヶ月を過ぎると、脳細胞の一部が脱落している様子が観察された (図 1)。

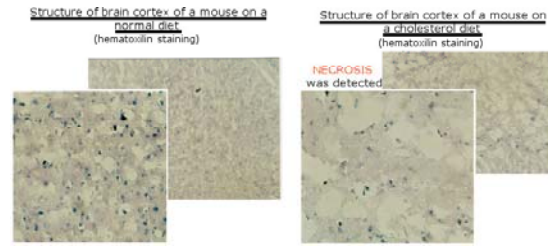


図 1 高コレステロール食給餌マウスの脳の観察

普通食給餌マウスに比べ、高コレステロール食を給餌マウスでは、細胞が存在しない面積が多い。上記の結果から、高コレステロール食を給餌すると、脳の細胞がネクロシスを起こし、細胞が脱落したと考えられる。従って、高コレステロール食は BBB を介して脳に何らかの影響を及ぼすと考えられた。

- (2) マイクロアレイによる高コレステロール食により変化する脳内 mRNA の探索: 高コレステロール食を給餌した後、脳に発現する mRNA をマイクロアレイにより比較した。その結果、コレステロール代謝に関する蛋白質 (ABCA1, ABCG1, ACAT, HMG-CoA reductase, scavenger receptors, LDL receptors, VLDL receptor 等) が増加した。蛋白質も確認したとこり、同じように変化していることが明らかになった。

一方、脳下垂体前葉から分泌される成長ホルモンの mRNA は殆ど発現していなかった。血中の成長ホルモン濃度を ELISA によって測定したところ、個体差が大きく、再現性を取るのが困難であった。脳下垂体後葉から分泌されるホルモンの mRNA については大きな変化がみられなかった。これらのデータについては、脳下垂体前葉について特異的な反応かどうか、再現性を含めて検討する予定である。

以上の反応から、脳では体循環のコレステロールは BBB を介して何らかの方法で感知している可能性が示された。

- (3) MRI による BBB の透過性の解析: C57BL/6J マウスに高コレステロール食を 4 ヶ月与え、

carboxy-PROXYL が脳内に到達するかどうかを調べたところ、普通食給餌マウスは脳に入らなかったのに対して、高コレステロール食給餌マウスは脳に入り蓄積した。また、一度はいると、脳から排出されにくいことが明らかになった。更に、carboxy-PROXYL は腎臓ら尿に排出する時間も、普通食給餌マウスに比べて高コレステロール食給餌マウスでは、遅延することが明らかになった。これらのことから、高コレステロール食を給餌すると、脳だけでなく、体内の血管の透過性を変化させ、体外への排出時間にも影響を及ぼす可能性が示された。

(4) 脳細胞における中性コレステロールエステラーゼ活性の確認: これまでに明らかになっていることとして、中性コレステロールエステラーゼ活性はミエリン髄鞘に存在し、遊離コレステロールを供給することで、ミエリンが電気的に中性となり、神経に伝わった信号が速やかに伝達されると言われている。我々は、脳からミエリン画分を除き、細胞質画分とミクロソーム画分に分画した後、中性コレステロールエステラーゼ活性を検討した。細胞質画分には、低い中性コレステロールエステラーゼ活性が確認された。ミクロソーム画分に肝臓と同程度の比活性が確認された。基質であるコレステロリルエステル (cholesteryl [<sup>14</sup>C]oleate) は、タウロコール酸ナトリウムで可溶化したコレステリルオリエートを加水分解せず、ホスファチジルコリンでリポソーム化したコレステロリルオリエートを加水分解した。脳にはホスファチジルコリンと同程度にホスファルイノシトールが存在するため、ホスファチジルコリン:ホスファルイノシトール (1:1) で、リポソームを作成したところ、活性が増加した。これらのことから、脳細胞にも固有の中性コレステロールエステラーゼ活性を有する蛋白が存在することが確認された。

また、脳細胞の画分を用いて ACAT 活性が存在した。脳の細胞内にコレステロールリサイクル系が存在することが明らかになった。

マウスに高コレステロール食を給餌した後、それぞれの活性を測定したところ、給餌2週間では変化が無かったが、4週間後に両酵素活性が増加した。(2), (3)の結果を併せて考えると、マウスにコレステロール食を給

餌すると、BBBの透過性を亢進し、体循環中のリポ蛋白質が脳に存在する細胞に何らかの影響を及ぼし、細胞内のコレステロールリサイクル系を活性化したと考えられる。

(5) HU3/CES2 TG マウスによる脳内コレステロール代謝の解析: HU3/CES2 はヒトカルボキシエステラーゼファミリーに属し、ヒト白血病由来単球細胞 THP-1 細胞やマウスマクロファージ RAW267.2 細胞に過剰発現すると中性コレステロールエステラーゼ活性を示し、細胞の泡沫化を阻害する酵素である。また、この酵素は、基質である cholesteryl [<sup>14</sup>C]oleate をホスファチジルコリンでリポソーム化した場合と、タウロコール酸で可溶化した場合の両方に活性を示す。この酵素を用いて、トランスジェニックマウスを2ライン樹立した (HU3/CES2 TG マウス)。このマウスは正常に繁殖し、野生型と同様に成長するが、16週齢以降の平均体重が雌雄共に野生型を下回っていた。この TG マウスに高コレステロール食を給餌すると、野生型に比べ感受性が高く、体重減少がみられた。また、個体によっては、皮膚潰瘍等の症状が見られ、生体膜に遊離コレステロールが蓄積していることが予想される。

マイクロアレイの結果は、ABCA1, ABCG1, ACAT, HMG-CoA reductase, scavenger receptors 等のコレステロール代謝に関係するタンパク質の mRNA が増加していたが、高コレステロール食を給餌ほどは大きな変化は無かった。

本研究では、ラインの確立が中心となり高コレステロール食を給餌した際の脳内コレステロール代謝については、解析が終っていない。今後継続する予定である。

#### (6) まとめ

マウスに高コレステロール食を給餌すると、脳の BBB の透過性が亢進し、体循環中に増加した VLDL (very low density lipoprotein) が脳の細胞にレセプターを介して影響し、コレステロールリサイクル系を活性化すると考えられる。脳細胞では、VLDL レセプターの発現が増加し、体循環からの VLDL が脳細胞に供給される可能性が示された。しかし、VLDL の供給が過剰になると、細

胞がネクロシスを起こし、脱落すると考えられる。

## 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 2 件)

1. Akisato Y, Ishii I, Kitahara M, Tamaki T, Saito Y, Kitada M. Effect of pitavastatin on macrophage cholesterol metabolism. Yakugaku Zasshi 2008 ; 128(3), 357-63. 査読有り
2. Suzuki T, Ishii I, Kotani A, Masuda M, Hirata K, Ueda M, Ogata T, Sakai T, Ariyoshi N, Kitada M. Growth inhibition and differentiation of cultured smooth muscle cells depend on cellular crossbridges across the tubular lumen of type I collagen matrix honeycombs. Microvasc Res. 2009; 77(2), 143-9. 査読有り
3. Yoshida M, Tomitori H, Machi Y, Katagiri D, Ueda S, Horiguchi K, Kobayashi E, Saeki N, Nishimura K, Ishii I, Kashiwagi K, Igarashi K. Acrolein, IL-6 and CRP as markers of silent brain infarction. Atherosclerosis. 2009; 203(2), 557-62.

[学会発表] (計 1 件)

1. Ishii I, Pitavastatin inhibit foam cell formation in RAW264.7 macrophages at clinical concentration, XVI International symposium on drug affecting lipid metabolism, 2007.10.7, New York.
2. 宮崎宏史、石井伊都子、有吉範高、北田光一、タウリンクロラミンのコレステロール蓄積抑制作用。日本薬学会第129年会、京都、2009. 3. 26

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 伊都子 (ISHII ITSUKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：00202929

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

北田 光一 (KITADA KOUICHI)

千葉大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90110345

有吉 範高 (ARIYOSHI NORITAKA)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00243957

[その他]

特になし。