

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17519

研究課題名(和文) 25-HC ester のアポトーシス誘導機序の解明および細胞機能への作用解析

研究課題名(英文) Elucidation of the apoptosis mechanism induced by 25-HC ester and analysis of its effects on cellular functions

研究代表者

山室 大介 (Yamamuro, Daisuke)

自治医科大学・医学部・リサーチ・レジデント

研究者番号：20739255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NCEH1欠損マクロファージに25-HCを添加することで、25-HC esterが蓄積し、PERK/eIF2 /ATF4経路を介したアポトーシスが誘発され、Galectin-3やCathepsin D が発現増加することを明らかとした。また、オキシステロールの小胞体センサーを担うOSBPL5/8をsiRNAにてノックダウンしたがPERK/eIF2 /ATF4経路およびアポトーシスは抑制されなかった。以上の結果から、25-HC esterが誘発するアポトーシス誘導メカニズムはOSBPLを介さずにPERK/eIF2 /ATF4経路を活性化してアポトーシスを引き起こすことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のオキシステロールに関する研究報告では、free体またはtotal量(free体とester体の総量)に着目し、その生理活性や疾患発症機序との関連が報告されてきた。生体内オキシステロール類はfree体とester体が存在しており、これらを区別して解析した研究報告はない。本研究ではマクロファージでの25-HC ester蓄積を起因とした新たなアポトーシス誘導メカニズムを明らかとした。マクロファージに対する25-HC esterの新たな生理活性を提示することは、動脈硬化症を始めとしたマクロファージ関連疾患における発症因子としての提示、さらには発症機序の解明へと発展することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the addition of 25-HC to NCEH1-deficient macrophages resulted in the accumulation of 25-HC ester in the endoplasmic reticulum. The accumulation of 25-HC ester induced apoptosis via the PERK/eIF2 /ATF4 pathway, and the Galectin-3 which is involved in macrophage cell function and Cathepsin D which is involved in macrophage foaming were upregulated. In order to analyze the upstream molecules of the PERK/eIF2 /ATF4 pathway, we analyzed Oxysterol binding protein (OSBPL)5/8, which plays an endoplasmic reticulum sensor for oxysterols. OSBPL5/8 was knocked down with siRNA and examined for effects on the PERK/eIF2 /ATF4 pathway activation and apoptosis, but these were not inhibited by OSBPL5/8 (endoplasmic reticulum sensors) knock down. These results suggest that 25-HC ester induces apoptosis by PERK/eIF2 /ATF4 pathway activation without mediated by the OSBPL family.

研究分野：脂質生化学

キーワード：オキシステロール 25-hydroxycholesterol NCEH1 アポトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループはマクロファージに主に発現し、脂肪滴が局在する細胞質の中性域に至適 pH を有するコレステロールエステル(CE)水解活性を担う酵素 中性コレステロールエステル水解酵素 1 (Neutral cholesterol ester hydrolase1: NCEH1) を見出し¹⁾、研究を進めてきた。NCEH1 欠損マクロファージは細胞内に CE を蓄積しやすく、NCEH1 欠損マウスから骨髄移植を受けた LDL 受容体欠損マウスでは動脈硬化病巣が増大した²⁾。このように動脈硬化症を始めとしたマクロファージ関連疾患はマクロファージの細胞機能によって制御されることから、その脂質代謝は疾患発症の重要因子となり得る。コレステロール酸化代謝物であるオキシステロール類は生体機能の調節に必須の役割を担い、多くの疾患との関連が報告されているものの、まだその詳細な分子機序は未解明である。

その中、NCEH1 欠損マウスから採取した腹腔マクロファージにオキシステロール類のひとつである 25-Hydroxycholesterol (25-HC) を作用させると、小胞体ストレス関連分子の発現とアポトーシスが顕著に誘導されることを我々は見いだした。この時、マクロファージ内の 25-HC ester 含量は小胞体で顕著に増加していた。一方、エステル化反応を触媒する酵素 (Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase1; ACAT1) の特異的阻害剤を添加すると、これらの現象はほぼ完全に抑制された。従って、NCEH1 欠損による 25-HC ester 蓄積が小胞体ストレス誘導を仲介し、アポトーシスを引き起こすことが示唆された³⁾ (図 1)。25-HC はコレステロール輸送タンパク NPC1 やオキシステロール結合タンパク (OSBP) へ結合し、広範な細胞機能を調節する。一方、マクロファージでは過剰な 25-HC の free 体蓄積は、OSBP/G α_{q11} /PLC β 3 複合体形成を阻害し、Ca²⁺シグナル伝達や Bcl-XL 発現を阻害することでアポトーシスを引き起こすことが報告された⁴⁾。しかし、25-HC ester 体蓄積によるアポトーシス誘導の詳細な機序に関してはまだ未解明である。オキシステロール類は様々な生理活性が報告され、多くの疾患との関連について報告がなされてきたが、その詳細な分子機序は明らかにされていない。その中、我々は NCEH1 欠損マウスから採取した腹腔マクロファージの培養液中に 25-Hydroxycholesterol (25-HC) を添加すると、小胞体ストレス因子 (CHOP や XBP-1 など) とアポトーシス (TUNEL 染色など) が顕著に誘導されることを見いだした。この時、マクロファージの細胞内 25-HC ester 含量が小胞体で顕著に増加していた。一方、エステル化反応を触媒する酵素 (Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase1; ACAT1) の特異的阻害剤 K604 を添加すると、これらの現象はほぼ完全に抑制された (図 2)。従って、NCEH1 欠損による 25-HC ester 蓄積が小胞体ストレス誘導を仲介し、アポトーシスを引き起こすことが示唆された¹⁾。細胞内 25-HC ester 蓄積を起因とした小胞体ストレスおよびアポトーシスの誘導作用は、本研究で初めて明らかとなった。

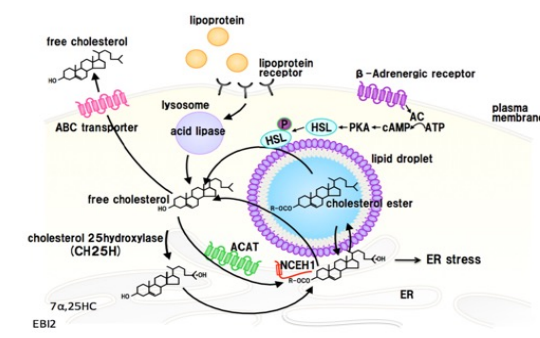


図 1 コレステロールと 25-HC のエステル化および水解機序

と、小胞体ストレス関連分子の発現とアポトーシスが顕著に誘導されることを我々は見いだした。この時、マクロファージ内の 25-HC ester 含量は小胞体で顕著に増加していた。一方、エステル化反応を触媒する酵素 (Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase1; ACAT1) の特異的阻害剤を添加すると、これらの現象はほぼ完全に抑制された。従って、NCEH1 欠損による 25-HC ester 蓄積が小胞体ストレス誘導を仲介し、アポトーシスを引き起こすことが示唆された³⁾ (図 1)。25-HC はコレステロール輸送タンパク NPC1 やオキシステロール結合タンパク (OSBP) へ結合し、広範な細胞機能を調節する。一方、マクロファージでは過剰な 25-HC の free 体蓄積は、OSBP/G α_{q11} /PLC β 3 複合体形成を阻害し、Ca²⁺シグナル伝達や Bcl-XL 発現を阻害することでアポトーシスを引き起こすことが報告された⁴⁾。しかし、25-HC ester 体蓄積によるアポトーシス誘導の詳細な機序に関してはまだ未解明である。オキシステロール類は様々な生理活性が報告され、多くの疾患との関連について報告がなされてきたが、その詳細な分子機序は明らかにされていない。その中、我々は NCEH1 欠損マウスから採取した腹腔マクロファージの培養液中に 25-Hydroxycholesterol (25-HC) を添加すると、小胞体ストレス因子 (CHOP や XBP-1 など) とアポトーシス (TUNEL 染色など) が顕著に誘導されることを見いだした。この時、マクロファージの細胞内 25-HC ester 含量が小胞体で顕著に増加していた。一方、エステル化反応を触媒する酵素 (Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase1; ACAT1) の特異的阻害剤 K604 を添加すると、これらの現象はほぼ完全に抑制された (図 2)。従って、NCEH1 欠損による 25-HC ester 蓄積が小胞体ストレス誘導を仲介し、アポトーシスを引き起こすことが示唆された¹⁾。細胞内 25-HC ester 蓄積を起因とした小胞体ストレスおよびアポトーシスの誘導作用は、本研究で初めて明らかとなった。

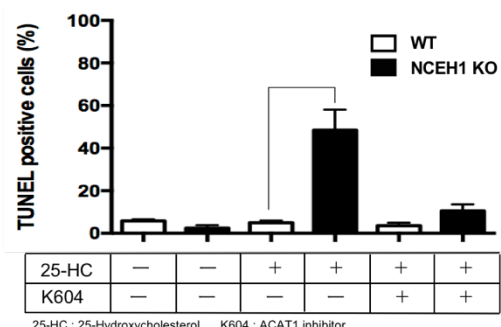


図 2 ACAT1阻害剤によるアポトーシス抑制

2. 研究の目的

本研究では、NCEH1 欠損マクロファージにおける 25-HC ester 蓄積が誘導する小胞体ストレスおよびアポトーシスの分子機序を解明し、25-HC ester のマクロファージ細胞機能への作用機序を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

マクロファージにおいて 25-HC ester 蓄積によって誘導されるアポトーシスの分子機序を解明するにあたり、既知ストレス経路の関与を検証しながら、網羅的な新規標的分子の探索を試みた。

3-1. GCN2/eIF2 α /ATF4 既知経路の機序検討

野生型マウスの骨髄由来マクロファージに 25-HC を添加すると、GCN2/eIF2 α /ATF4 経路などのアミノ酸飢餓シグナルが誘導され、アポトーシスを誘発することが報告された⁵⁾。また、Glutathione、Cysteine、N-acetyl Cysteine といったアミノ酸を供給することでこれらアポトーシス誘導は抑制された。そこで、本研究で見出した 25-HC ester 蓄積が誘導する小胞体ストレスやアポトーシスが、GCN2/eIF2 α /ATF4 経路を介したものなのかを検討した。NCEH1 欠損マクロファージを 25-HC 含有培地にて培養し、上記のシグナル分子(ATF4、IRE1、GCN2、ATF6、Insig1、NPC1、IP3 など) のタンパクおよび mRNA 発現量を western-blotting や real-time PCR などの生化学的手法を用いて解析した。また、さらに上流経路の解析として、オキシステロールの小胞体センサーを担う Oxysterol binding protein (OSBPL)5/8 を siRNA 法にてノックダウンすることでアポトーシスが抑制または増幅されるかどうか検証した。

3-2. 25HC ester が誘発するアポトーシス誘導に関わる新規分子の探索

25-HC ester 蓄積によって誘導される NCEH1 欠損マクロファージにおけるアポトーシス誘導の新たな分子機序の解明を試みた。25-HC 添加によるマクロファージのタンパク発現量の変動を二次元電気泳動法(蛍光標識 2D-DIGE 野生型: Cy3, NCEH1 KO: CY5, 内部標準: Cy2)にて検証した。野生型および NCEH1 欠損腹腔マクロファージに 25-HC 添加条件下で小胞体ストレスを誘導させたサンプルを対照とし、タンパク量に変動が見られたスポットを LC-MS/MS にて解析した。候補タンパクの関連機序を western-blotting や real-time PCR などの生化学的手法を用いて調べた。また、siRNA 法にてノックダウンすることでアポトーシスが抑制または増幅されるかどうか検証した。

4. 研究成果

25-HC ester 蓄積によって誘導される NCEH1 欠損マクロファージにおけるアポトーシス誘導の新たな分子機序の解明を試みるに当たり、25-HC 添加によるマクロファージのタンパク発現量の変動を二次元電気泳動法(蛍光標識 2D-DIGE 野生型: Cy3, NCEH1 KO: CY5, 内部標準: Cy2)にて比較解析した。その結果、13 の候補タンパクに差が見られ、western-blotting 法にて解析した結果、候補タンパクのうち Galectin-3、Cathepsin D といったタンパク発現量の増減が顕著に見られた(図 3)。Galectin-3 はマクロファージの接着・分化・増殖・遊走といった細胞機能に、Cathepsin D はマクロファージ泡沫化や動脈硬化プラークの形成・安定化に関与していることが報告されている。しかしながら、

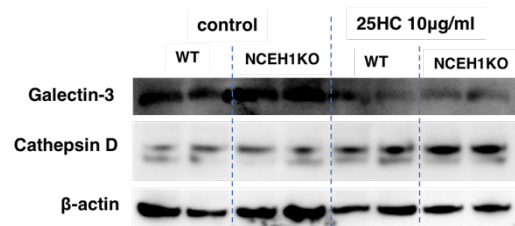


図 3 2D-DIGE 候補タンパクのwestern blotting 結果

これら Galectin-3 や Cathepsin D の阻害剤(pepstatin)を同時添加しても 25-HC による NCEH1 欠損マクロファージにおけるアポトーシス誘導への影響は見られなかった。

以前の研究報告としては、野生型マウスの骨髄由来マクロファージに 25-HC を添加すると、ISR(Integrated Stress Response)経路のうち GCN2/eIF2 α /ATF4 経路などのアミノ酸飢餓シグナルが誘導されることでアポトーシスを引き起こすことが報告されている。さらに、Glutathione、Cysteine、N-acetyl Cysteine といったアミノ酸を供給することでこれらアポトーシス誘導は抑制されることが報告された。そこで、NCEH1 欠損による 25-HC ester 蓄積が ISR 経路(GCN2、PERK、PKR、HRI、ATF6、eIF2 α 、peIF2 α 、ATF4 など)を活性化するかどうかを調べた。その結果、25HC 添加した NCEH1 欠損マクロファージでは GCN2/eIF2 α /ATF4 経路は活性化されず、PERK/eIF2 α /ATF4 経路が活性化されていた。また、培地中にア

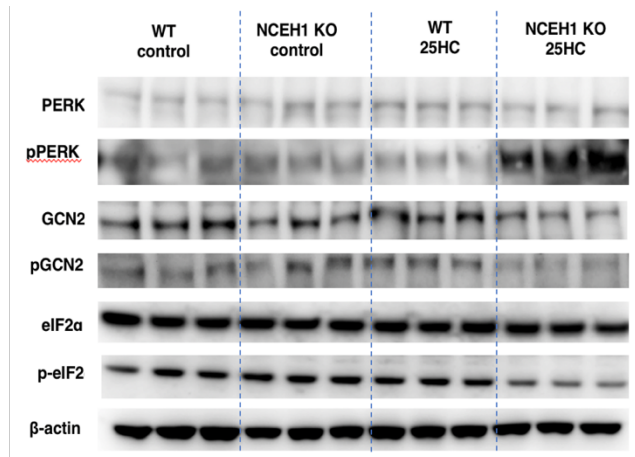


図 4 25-HCが誘発する ISR 経路分子のwestern blotting 結果

ミノ酸を供給することでアポトーシス誘導が抑制されるかどうかについても検討したが、既知報告で見られたアミノ酸供給によるアポトーシスの抑制効果は見られなかった。本結果からも、25-HC ester 蓄積を起因としたマクロファージにおけるアポトーシスの誘導は GCN2/eIF2 α /ATF4 経路などのアミノ酸飢餓シグナルを介していないことが示唆された。

次に、PERK/eIF2 α /ATF4 経路の更なる上流分子の解析を行うにあたり、オキシステロールの小胞体センサーを担う Oxysterol binding protein (OSBPL)5/8 に着目した。MPM の OSBPL5/8 を siRNA にてノックダウンし、PERK/eIF2 α /ATF4 経路およびアポトーシスが抑制されるかどうかを検証した。その結果、OSBPL5/8 をノックダウンしても、25-HC による ER stress マーカーである chop の誘導はほとんど抑制されなかった。

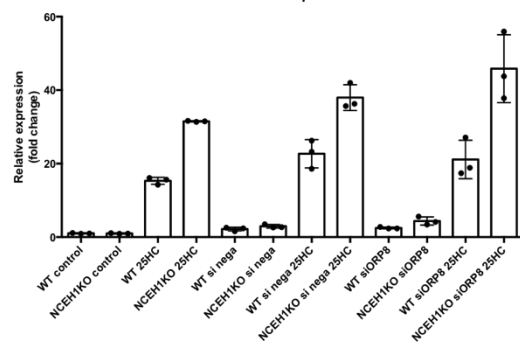
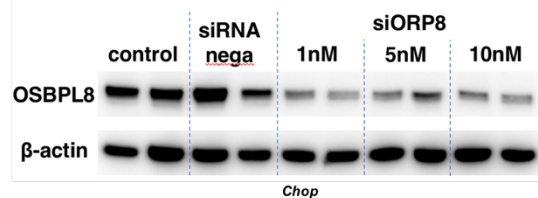


図 5 siORP8 MPM に対する 25-HC 誘発性アポトーシスへの影響

以上の結果から、25-HC ester が誘発する MPM のアポトーシス誘導メカニズムは小胞体センサーの OSBPL ファミリーを介さずに PERK/eIF2 α /ATF4 経路を活性化してアポトーシスを引き起こすことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Daisuke Yamamuro , Hisataka Yamazaki , Jun-Ichi Osuga , Kenta Okada , Tetsuji Wakabayashi , Akihito Takei , Shoko Takei , Manabu Takahashi , Shuichi Nagashima , Adriaan G Holleboom , Masayuki Kuroda , Hideaki Bujo , Shun Ishibashi | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Esterification of 4 -hydroxycholesterol and other oxysterols in human plasma occurs independently of LCAT | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Lipid Research | 6. 最初と最後の頁 1287-1299 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1194/jlr.RA119000512. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------|
| 1. 発表者名 山室 大介 |
| 2. 発表標題 脂質代謝の概日リズムと摂餌刺激 |
| 3. 学会等名 日本動脈硬化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|