

4. プラークの形成と退縮の分子機序

石橋 俊*

糖尿病におけるプラークの形成には血清脂質代謝異常が中心的な役割を担っている。血管壁に侵入した血清リポタンパクは、そこで酸化変性を受け、単球を引き寄せる。単球はマクロファージに分化後、変性リポタンパクを取り込んで、コレステロールエステル(CE)を蓄積した泡沫細胞となる。この時の取り込み経路としてA型スカベンジャー受容体(SR-A)が主要であり、状況によってはSREC-Iなどの他のスカベンジャー受容体群も寄与する。また、スカベンジャー受容体群の一部は、糖化蛋白(AGE)を認識して糖尿病性血管障害の形成に関与する可能性がある。

取り込まれたCEはリソソーム内の酸性リパーゼ(LAL)による水解を受け、遊離コレステロール(FC)となる。FCは小胞体においてACAT-1の作用を受け、再びCEとなって細胞内に蓄積し、泡沫細胞を形成する。CEの過剰蓄積に虚血が加わると泡沫細胞は自壊して、細胞内脂質を細胞外に放出してしまう。この場合、脂質に富んだ壊死組織は炎症性機転を刺激して、プロテアーゼによる線維性被膜の断裂とプラークの破綻へと進むことになる。一方、蓄積したCEを失ってプラークの退縮へと向かう場合もある。この時の最初のステップであるCE水解に与る酵素は、LALと異なり中性域に至適pHを有するため中性CE水解酵素(NCEH)と総称されている。NCEHの強制的誘導は、CEの消失、SR-Aの発現低下、ABCA-1の発現誘導などを伴うため、FCの過剰蓄積をきたさずに細胞内CEを消失せしめる。NCEHの候補分子として脂肪細胞が貯蔵するトリグリセリド(TG)を水解する分子であるホルモン感受性リパーゼ(HSL)が有力視されてきた。しかし、HSLを欠損するマクロファージにも、野生型と同レベルのNCEH活性が発現している。今後、NCEHの同定と活性調節機構の解明が、糖尿病における動脈硬化の発症予防を考える際にも重要と考えられる。

Molecular Mechanisms of plaque progression and regression

SHUN ISHIBASHI Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Jichi Medical School



*いしばし・しゅん：自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門教授。昭和57年東京大学医学部卒業。平成1年東京大学医学部第三内科助手。同年米国テキサス大学分子遺伝学教室留学。平成6年東京大学医学部第三内科助手。平成13年現職。主研究領域／糖尿病、高脂血症、動脈硬化。

Key words

動脈硬化
マクロファージ
プラーク
糖尿病

はじめに

糖尿病における動脈硬化の促進は臨床的によく知られているが、その分子機序には不明な点が多く残されている。2型糖尿病の随伴病態として近年注目を集めているメタボリックシンドロームは動脈硬化の危険因子の集積状態であることからわかるように、糖尿病における動脈硬化の促進機序も多面的である。したがって、プラークの形成と退縮の分子機序の解明が、先決問題と考える。

1. 単球・マクローファージ由来の泡沫細胞の形成機序

LDLは血管内皮を通過して、内膜下の細胞外マトリックスに沈着する。そこで、酸化変性を受け、酸化脂質などの化学メディエーター、さらに周辺の細胞からMCP-1やMCSFなどのサイトカインが放出する。これらは、血管内皮細胞における細胞接着因子の発現誘

導と共同して、流血中の単球を内膜下に遊走・固定する。ここで、成熟マクローファージに分化する。

成熟マクローファージは多様なリポタンパク受容体を発現している(図)。LDLレセプターとスカベンジャーレセプターである。マクローファージを泡沫化する β -VLDL取り込みの主要経路はLDLレセプターである¹⁾。スカベンジャーレセプターにはA型スカベンジャーレセプター(SR-A)がその代表であり、その他に、CD36, SRB1, マクロシアリン, Fc γ RII, LOX1, SREC-1²⁾, FEEL1/2³⁾などがマクローファージに発現して変性リポタンパクを認識しうるレセプターとして同定されている。

これらのリポタンパクレセプター経路で細胞内に取り込まれたリポタンパクは、リソソームにおいて分解を受ける。CEもリソソーム酸性リパーゼ(LAL)によって遊離コレステロール(FC)と脂肪酸に分解される。遊離コレステロールは主に小胞体において、脂

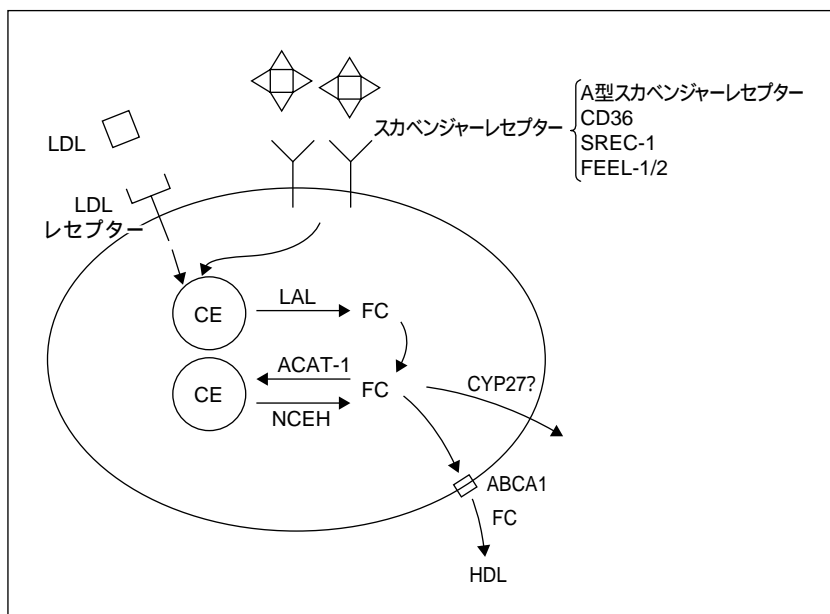


図 泡沫細胞内のコレステロール代謝

脂肪酸と再びエステル体を形成して CE となって細胞内に蓄積する。この反応を触媒する酵素が ACAT (Acyl-CoA : cholesterol acyltransferase) と呼ばれている。CE は Cholesterol esterase あるいは中性 CE 水解酵素 (neutral cholesterol ester hydrolase ; NCEH) の作用を受けて、FC と脂肪酸に分解される。FC は ABCA1 によって細胞外のアポ AI へ受け渡され、HDL を形成する。

2. 泡沫細胞形成と動脈硬化における ACAT の役割

TY Chang らによって、ACAT が初めてクローニングされた。その後、これとは構造的に異なる ACAT が存在することが明らかにされた。前者を ACAT1、後者を ACAT2 と呼んでいる。ACAT1 は 7 カ所の膜貫通領域を有する小胞体蛋白であり、全身のほぼ全ての組織に発現が認められる。肝細胞、Kupffer 細胞、副腎皮質、皮膚、小腸上皮細胞、ニューロン、マクロファージなどである。ACAT1 はヒトの動脈硬化巣に存在する。また、ACAT1 の蛋白・mRNA とともに、単球からマクロファージへの分化に伴って増加する。

動脈硬化における ACAT の役割については、ACAT 阻害剤を用いた実験結果が多数報告されている。しかし、ACAT1 と ACAT2 を選別して阻害する特異的阻害剤がないために、ACAT1 の阻害効果だけを証明した実験結果はない。F-1394⁴⁾や beauveriolides⁵⁾などの ACAT 阻害薬の抗動脈硬化作用が動物モデルにおいて証明されている。

われわれは、ACAT1 のノックアウトマウス (ACAT1 -/-) を作製した⁶⁾。ACAT1 -/- そのものでは、眼瞼のマイボーム腺に脂肪が見られず、そのためか、眼裂を細めた顔貌を呈する以外には、目立った表現形は認められなかった。ACAT1 -/- から採取した腹腔マク

ロファージには ACAT 活性はほとんど検出されず、アセチル LDL や bVLDL による泡沫化も認められなかった。動脈硬化への効果を調べるために、アポ E ノックアウトマウスや LDL レセプターノックアウトマウスに交配してそれぞれのダブルノックアウトマウス (ACAT1 -/- ; apoE -/- , ACAT1 -/- ; LDLR -/-) を作成し、コレステロール負荷を行った。どちらのマウスにも全身のびまん性皮膚黄色腫が出現し、脱毛が観察された。顕微鏡的には、泡沫細胞の浸潤とコレステロール沈着による真皮層の著明な肥厚と皮下脂肪の消失、皮脂腺の萎縮などが観察された。大動脈弁周囲の横断切片の Oil-Red O 染色像、大動脈から抽出した脂質における CE 量で評価する限り、ACAT1 -/- は ACAT1 +/+ に比較して大動脈に形成されたアテローム性動脈硬化は縮小傾向を示した。しかし、その効果は部分的であり、ACAT がいないからといって、泡沫細胞の形成や CE 蓄積が完全に抑制されるとは限らないことが示された。

3. 泡沫細胞形成と動脈硬化における NCEH の役割

血管やマクロファージの NCEH 活性の存在が知られていた。この NCEH 活性は cAMP アナログや forskolin によって増加する。このような性質は脂肪組織のトリグリセリドリパーゼとして精製されたホルモン感受性リパーゼ (hormone-sensitive lipase) に共通するため、マクロファージの NCEH を HSL と同一とする報告も多数みられる。

われわれは HSL ノックアウトマウス (HSL -/-) を作製し、HSL -/- における各臓器の NCEH 活性を測定すると、白色脂肪細胞 (WAT) や褐色脂肪細胞 (BAT)、精巣、副腎の NCEH 活性は、測定感度以下に減少していた⁷⁾。すなわち、これらの臓器の NCEH 活

性の大半は HSL で説明できる, 一方, 腹腔マクロファージの NCEH 活性は, 野生型由来のものとは変わらない活性を示していた. このことは, 腹腔マクロファージの NCEH 活性の大半は HSL とは異なる分子に由来することを示唆している.

興味深いことに, HSL のもう 1 つの基質である TG の水解酵素活性, TG リパーゼ活性についても redundancy が証明された⁷⁾. すなわち, HSL -/- 由来の WAT や BAT には, 相当量の TG リパーゼ活性が残存する. しかも, この TG リパーゼはイソプロテレノールなどのカテコラミン刺激によって活性化を受ける. したがって, HSL と同様のホルモン感受性を有していた. この点に関し, さらに胎児由来線維芽細胞 (MEF) を調整し, 脂肪細胞分化誘導培地で培養して, 白色脂肪細胞として検討した⁸⁾. HSL -/- MEF 由来脂肪細胞の TG リパーゼ活性も HSL +/+ MEF 由来脂肪細胞と同様に, イソプロテレノールや TNF α によって上昇し, それぞれ, PKA 阻害薬である H89 と PPAR γ 作動薬である troglitazon によって阻害される. ただし, HSL +/+ MEF 由来脂肪細胞と比較すると, HSL -/- MEF 由来脂肪細胞の TG リパーゼ活性は約 50% に減少していた.

肥満形成への HSL の関与について以下の実験を行った⁹⁾. すなわち, レプチン欠損 ob/ob マウスと HSL -/- を交配して, レプチンを欠損する HSL -/- を作製し, その体重, 脂肪重量, 脂肪組織像, 摂餌量, 酸素消費量などを検討した. Lep^{ob/ob}/HSL^{-/-} の体重増加は, 8 週齢鈍化し, 10 週齢以降に停止した. これは, 主に白色脂肪組織の重量の減少によって説明できる. WAT では, 断面積が拡大した脂肪細胞の増加と共に, 脂肪蓄積のない小型細胞の増加が観察された. WAT において, 成熟脂肪細胞の分化マーカーである C/EBP α や PPAR γ の発現が減少し, 逆に, 前駆脂肪細胞

の分化マーカーである C/EBP β の発現が増加した. このことは, WAT における脂肪細胞の分化障害がを指示する結果であり, 増加した小型細胞は前駆脂肪細胞である可能性が高い. Lep^{ob/ob}/HSL^{-/-} は摂餌量が低下し, 酸素消費量の増加は観察されなかった. したがって, Lep^{ob/ob}/HSL^{-/-} の体重減少は主に, 摂食の低下に起因すると考えられた. 視床における NPY と AgRP の発現が低下しているため, HSL 欠損は, 直接的か間接的に, 摂食調節神経ペプチドの発現に影響を与えて, 摂食低下とそれによる体重減少をもたらすと考えられた. 近年, 脂肪酸合成酵素 (FAS) やカルニチンパルミチン酸転移酵素-1 (CPT-1) の阻害剤による摂食抑制が報告されており, 摂食調節における脳内の脂肪酸代謝の重要性を示唆する結果とも解釈される. HSL -/- は脂肪食負荷による肥満にもなりにくい¹⁰⁾. この場合, 摂食抑制以外の機序が関与している可能性が高い.

われわれは, HSL を発現するアデノウイルスベクター (Ad-HSL) を構築し, THP-1 細胞に感染させ, そのコレステロール代謝について検討した¹¹⁾. Ad-HSL を感染した THP-1 細胞では NCEH 活性と TG リパーゼ活性とがともに増加した. このような細胞にアセチル LDL を添加しても, 細胞内 CE の蓄積は起こらない. それには 2 つの理由が考えられた. リポタンパクの取り込み低下がひとつの理由である. SR-A や CD 36 のようなスカベンジャーレセプターの発現が低下し, アセチル LDL の細胞内への取り込みも低下していた. もうひとつの理由は, コレステロールの細胞外への排出 (efflux) の亢進である. ABCA1 の発現も上昇していた. 細胞内の CE の分解が亢進した状態では, コレステロールや脂肪酸はエステル体で存在するよりも, 遊離コレステロールや遊離脂肪酸として存在しやくなると考えられる. そのとき, 遊離コレステロールは核内受容体 LXR を活性化し, 脂肪酸は

PPAR を活性化しうる。LXR は PPAR による活性化調節を受けることが分かっている。ABCA1 はこのようにして活性化された LXR によって転写が促進されるのではなかろうか？

NCEH の活性誘導は、動脈硬化治療の有効な戦略である可能性がある。そのためには、マクロファージの内因性 NCEH の正体から明らかにしてゆく必要があろう。

〔文献〕

- 1) Perrey S, Ishibashi S, Kitamine T, *et al* : The LDL receptor is the major pathway for beta-VLDL uptake by mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis* 2001 ; 154 (1) : 51 - 60.
- 2) Tamura Y, Osuga J, Adachi H, *et al* : Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-1) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004 ; 279 (30) : 30938 - 30944.
- 3) Tamura Y, Adachi H, Osuga J, *et al* : FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2003 ; 278 (15) : 12613 - 12617.
- 4) Chiwata T, Aragane K, Fujinami K, *et al* : Direct effect of an acyl-CoA : cholesterol acyltransferase inhibitor, F-1394, on atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Br J Pharmacol* 2001 ; 133 (7) : 1005 - 1012.
- 5) Namatame I, Tomoda H, Ishibashi S, *et al* : Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 (3) : 737 - 742.
- 6) Yagyu H, Kitamine T, Osuga J, *et al* : Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem* 2000 ; 275 (28) : 21324 - 21330.
- 7) Osuga J, Ishibashi S, Oka T, *et al* : Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 (2) : 787 - 792.
- 8) Okazaki H, Osuga J, Tamura Y, *et al* : Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase : evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 2002 ; 51 (12) : 3368 - 3375.
- 9) Sekiya M, Osuga J, Okazaki H, *et al* : Absence of hormone-sensitive lipase inhibits obesity and adipo-

genesis in Lep ob/ob mice. *J Biol Chem* 2004 ; 279 (15) : 15084 - 15090.

- 10) Harada K, Shen WJ, Patel S, *et al* : Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 ; 285 (6) : E1182 - 1195.
- 11) Okazaki H, Osuga J, Tsukamoto K, *et al* : Elimination of cholesterol ester from macrophage foam cells by adenovirus-mediated gene transfer of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 2002 ; 277 (35) : 31893 - 31899.

質 疑 応 答

座長(岩本) どうもありがとうございます。石橋先生にはプラークの形成、特に foam cell におけるスカベンジャー受容体について、それからコレステロールの代謝に関する酵素のノックアウトマウスなどの話を中心にお話しいただきました。そうした研究の成果が治療につながるのではないかというお話だったかと思います。

野田光彦(虎の門病院) 先生のお話の本題からはちょっと外れるかもしれませんが、HSL ノックアウトマウスの食欲のところに興味があったのですが、先生は、フィードバック制御によって、たとえば malonyl CoA が蓄積されて、CPT-1 に抑制がかかって食欲が低下するという推測をされたということでしょうか。

石橋 さまざまなディスカッションが可能だと思っておりますが、本当のことはまだわからないのです。ですから現象としてはここまでしかわかっていないので、いろいろ受ける批判としては、本当に脳の HSL の phenotype なのか、それとも脂肪組織なり他の臓器の欠損の phenotype を見ている可能性がないか、たとえば間接的に、これはレプチン欠損状態ですが、摂食を調節するような他の血中のペ

ブチドの濃度に変化がきている可能性もありますので、問題は、全臓器的なノックアウトマウスを作るなり、視床下部に直接 HSL を発現させて、この phenotype が rescue されるかというあたりをまず解決した後に、実際のメカニズム、先生がおっしゃるような malonyl CoA、あるいはβ酸化系のところが最終的な target になっているかを調べる必要があるのではないかと考えています。

野田 可能性としては、ノックアウトによって、代謝経路的には malonyl CoA が増えるという可能性はあるわけですね。

石橋 代謝経路的には、フィードバックが

脂肪酸代謝にどれだけ効いているかはわかりませんが、SREBP 等の、コレステロール代謝ではフィードバックがきちんとかかっていますが、脂肪酸代謝系ではフィードバックの存在はいわれていませんので、その点に関しては、先生がご指摘の通りまだまだ未解決な問題が多いといわざるを得ません。実際は speculation に終わってしまいますので、これから調べて行く必要があるかと思います。

野田 フィードバックは、酵素反応的にはありうるわけでしょうね。

石橋 可能性はあると思います。

座長 どうもありがとうございました。