

## 論文の内容の要旨

論文題目 動脈硬化形成におけるリゾホスファチジルセリンの  
マクロファージに対する作用の解明

氏名 西川真子

### 【背景】

多機能性生理活性脂質として知られているリゾホスファチジン酸(LysoPA)は、構造上グリセロリゾリン脂質という脂質に分類され、基礎研究から、血小板の活性化、血管内皮障害など動脈硬化性疾患の病態生理に関わる可能性が考えられていた。我々は、ヒトにおいて LysoPA と動脈硬化性疾患との関連を証明するために、狭心症患者の心臓カテーテル検査時の大腿動脈血を採取して血漿リゾリン脂質を測定したところ、正常冠動脈患者と安定狭心症患者に比べて、急性冠症候群(ACS)患者で有意に LysoPA が高値であり、また、リゾホスファチジルセリン(LysoPS)、リゾホスファチジルイノシトール(LysoPI)、リゾホスファチジルグリセロール(LysoPG)、リゾホスファチジルエタノールアミン(LysoPE)などの微量成分リゾリン脂質(以下、マイナーリゾリン脂質)も LysoPA と同様に ACS 患者血漿で高値であった。マイナーリゾリン脂質は、相同する分子種の LysoPA と強い相関を示していた。血液中に最も多く存在するリゾリン脂質であるリゾホスファチジルコリン(LysoPC)から LysoPA を産生する酵素であるオートタキシン(ATX)は、他のマイナーリゾリン脂質にも作用し、LysoPA を産生することが知られており、マイナーリゾリン脂質が LysoPA に変換することにより動脈硬化性疾患の病態形成に関与している可能性が考えられた。しかし、マイナーリゾリン脂質は、その一部の特異的受容体も同定されつつあり、LysoPA やスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)と同じように潜在的な脂質メディエーターとして働くと考えられている。例えば、LysoPS はマスト細胞の脱顆粒反応の促進、T リンパ球の増殖・分化の抑制、マクロファージのアポトーシスを起こした細胞の貪食の促進などの作用をもつことがわかっている。よって、マイナーリゾリン脂質は、動脈硬化性疾患の発症との関与は未だ解明されていないが、LysoPA を介して動脈硬化の病態形成に関与している可能性とともに、直接、動脈硬化形成に関与する細胞に働いている可能性も考えられた。

### 【目的】

本研究は、動脈硬化の病態生理におけるマイナーリゾリン脂質の役割について調べるため、特にマクロファージに対する作用について明らかにすることを目的とした。

### 【方法および結果】

マクロファージは酸化低密度リポ蛋白(oxLDL)からコレステロールを受け取り、細胞内にコレステロールを蓄積し泡沫細胞となり、動脈硬化部位のプラークへ浸潤し、脂質コアを形成する。また、プラークの破綻の原因となる炎症においても、重要な役割をもつ。以上から、マウス単球系細胞株である RAW 264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージ(MPMs)を用いて、コレステロール蓄積と炎症に関する、マイナーリゾリン脂質のマクロファージに対する影響を研究した。

RAW 264.7 細胞に oxLDL(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )とともに各種 18:1 リゾリン脂質(10  $\mu\text{M}$ )を投与し、24 時間培養した。その後、細胞内脂質をメタノール/クロロホルムを用いて抽出し、細胞内総コレステロール量を酵素法にて測定し、細胞の蛋白量によって補正した。oxLDL とともに 18:1 LysoPS を投与した群のみ、oxLDL 単独群と比べて、有意に細胞内総コレステロール量が増加した。LysoPS 投与後の培養液の LysoPA 濃度は感度以下であった。入手し得た各分子種 LysoPA でも同様に細胞内コレステロール量を測定したが、相違を認めなかった。催動脈硬化作用が報告されている LysoPA よりも、LysoPS の方が有意な細胞内コレステロール増量であったため、この結果を受けて、以下はマイナーリゾリン脂質のうち LysoPS に着目して、追検討した。

細胞内の総コレステロール量の増加は LysoPS の容量依存的であった。RAW 264.7 細胞をリポポリサッカライド(LPS)で活性化し、同様に検討したところ、LysoPS 1  $\mu\text{M}$  以上でコレステロール量が増加した。RAW 264.7 細胞に oxLDL を加えず、LysoPS のみを投与した場合や、酸化していない LDL と LysoPS を投与した場合は、細胞内の総コレステロール量は変わらず、細胞内総コレステロール量の増加は、コレステロールの細胞内における合成ではなく、oxLDL 特異的な細胞内取り込みの増強によることが示唆された。

C57BL6J マウスの腹腔に刺激物質であるチオグリコレートを投与し、4 日間後に腹腔マクロファージを回収、PBS で洗浄し、培養プレートに接着した生細胞のみを MPMs として用いて、同様の検討を行った。RAW 264.7 細胞と同様に MPMs でも、LysoPS は oxLDL の取り込みを増強させると考えられた。

また、コレステロール取り込みに関与するスカベンジャー受容体(CD36、マクロファージスカベンジャー受容体 1:MSR1、酸化低密度リポ蛋白受容体 1:LOX-1、Toll 様受容体 4:TLR4)の LysoPS による発現の調節を調べた。LPS を投与しない RAW 264.7 細胞に、LysoPS 1  $\mu\text{M}$  を投与して 24 時間培養後に mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて解析した。すべての受容体の発現が有意に増加することが確認され、LysoPS はスカベンジャー受容体の発現を増加させることにより、oxLDL の取り込みを増加させることが示唆された。

次に、RAW 264.7 細胞と MPMs を用いて、LysoPS による炎症性メディエーター(IL-6, TNF $\alpha$ , matrix metalloproteinase 2 : MMP-2, MMP-9, Monocyte chemotactic protein-1 : MCP-1)の発現量の調節を調べた。LysoPS 10  $\mu\text{M}$  を投与して 4 時間培養後に mRNA を抽出し解析した。LysoPS 投与により、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞と、LPS で活性化した MPMs で TNF $\alpha$  と MMP-9 の発現が有意に減少し、LPS で活性化した MPMs ではさらに、IL-6 と MCP-1 の

発現も有意に減少していた。

また、NFκB 活性に対する LysoPS の効果を調べるために、p65 の Ser536 と IκB-α の Ser32 のリン酸化を調べた。LysoPS を投与し 4 時間培養後に、細胞の蛋白成分を抽出し、ウエスタンブロット法を用いて検出した。LPS で活性化した RAW 264.7 細胞と MPMs の両方で、LysoPS が p65 と IκB-α のリン酸化を抑制することが確認され、LysoPS が NFκB 活性を抑制することが示唆された。

また、LysoPS が動脈硬化の発症に関与することが知られている小胞体ストレスに与える影響について検討した。LysoPS 投与により、RAW 264.7 細胞において小胞体ストレスによる XBP-1 splicing の抑制がみられた。MPMs では、各群間で相違を認めなかった。

LPS で活性化した MPMs において、LysoPS の投与により炎症性メディエーターの mRNA 量が有意に減少していたことから、LysoPS が抗炎症性に働く新規活性化マクロファージ(M2 様マクロファージ)の発現に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、MPMs に LysoPS 10 μM を投与し 4 時間後に、マクロファージマーカーの mRNA 量を調べたところ、LPS で活性化した MPMs で M2 様マクロファージマーカーである CD163 の発現が有意に増加していた。

上述のとおり、oxLDL 取り込みの増加は、LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、LPS を投与していない MPMs、LPS で活性化した MPMs の実験モデルすべてにおいて確認されたが、炎症性サイトカイン、小胞体ストレスに対する効果は実験モデル間で異なっていた。この実験モデル間の LysoPS の異なる反応を解明するために、LPS を投与していない RAW 264.7 細胞、LPS で活性化した RAW 264.7 細胞、LPS を投与していない MPMs で LysoPS 受容体の発現パターンが異なる可能性について調べた。今までに報告されている LysoPS 受容体(GPR34, P2Y10, A630033H20, GPR174)と LysoPS により活性化しマクロファージの貪食を促進することが報告されている G2A 受容体のすべてが、RAW 264.7 細胞と MPMs の両方で発現していることを確認した。次に、LysoPS 受容体の発現量をリアルタイム PCR 法にて調べ、受容体の発現量が実験モデル間で大きく異なることが判明した。これらの結果より、実験モデル間でみられる LysoPS の生物学的効果の違いが、LysoPS 受容体の発現パターンの違いによるものである可能性が考えられた。

#### 【結論】

LysoPS はマクロファージにおいて、泡沫細胞形成を促進する催動脈硬化作用を有する一方で、炎症性メディエーターの発現や NFκB 活性、小胞体ストレスを抑制し、炎症に関しては抗動脈硬化作用をもつことが示唆された。