



## Effects of nitric oxide on cholesterol metabolism in macrophages

清水, 洋志

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1741

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001741>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 清水洋志

(三重県)

博士の専攻 分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1136号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成10年3月31日
学位論文題目	Effects of nitric oxide on cholesterol metabolism in macrophages (マクロファージのコレステロール代謝における一酸化 窒素(NO)の影響)

審査委員 主査 教授 横山光宏  
 教授 春日雅人 教授 前田盛

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

動脈硬化病変は血管内膜下におけるコレステロールに富んだ泡沫細胞の存在で特徴付けられる。マクロファージ由来の泡沫細胞は特に動脈硬化巣の初期病変における主体をなすものである。ゆえに、マクロファージでのコレステロールの代謝の解明は動脈硬化の発症、進展のメカニズムを解明するために重要である。

NO は種々の生理的および、病理的状況において働く重要なシグナル伝達物質である。NO は L-arginine より NO 合成酵素 (NOS) の働きにより合成される。NOS には神経細胞に存在する nNOS、内皮細胞に存在する eNOS、そしてマクロファージ、血管平滑筋細胞、肝細胞、巨核芽球などの多くの細胞に分布する iNOS の 3 種類の isotype が存在する。エンドトキシン (LPS) や IFN- $\gamma$ などのサイトカインはマクロファージに存在する iNOS を誘導し、NO を合成するが、一方コレステロールの代謝にも影響を与えることが報告されている。しかし、これらエンドトキシンやサイトカインのコレステロール代謝に与える影響が NO 産生を介しているか否かの報告はなされていない。そこで今回我々は、NO がマクロファージのコレステロール代謝に与える影響に関し、マウスのマクロファージを用いて検討した。

#### 【方法】

細胞はマウスのマクロファージの J774A.1 細胞を用いた。低比重リポタンパク (LDL) を正常人の空腹時血漿より超遠心法により分離し、さらに無水酢酸を酢酸ナトリウム存在下に加えることによりアセチル化 LDL を作製した。マクロファージを LDL ないしアセチル化 LDL 存在下に LPS にて刺激、培養した後、マクロファージより産生される NO を Griess 法にて測定するとともに、マクロファージの細胞内コレステロール含量を Heider&Boyett 法により定量した。さらに、NOS の阻害薬である N<sup>o</sup>-monomethyl-L-arginine (以下 L-NMA) 及び、NOS の基質である L-arginine を添加し NO の産生調節を行ない、各条件下にて NO 産生がマクロファージの細胞内コレステロール蓄

積に与える影響を検討した。

次にマクロファージを外因性の NO ドナーである S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) 存在下に LDL ないしアセチル化 LDL とともに培養した後マクロファージの細胞内コレステロール含量を測定した。

### 【結 果】

1. 0 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の LPS は濃度依存性にマクロファージの NO 産生を亢進させた。NO 産生量は LDL ないしアセチル化 LDL 存在下のいずれの状況においても同程度であった。

2. LDL 存在下においては LPS 刺激はマクロファージの細胞内コレステロール含量に変化を与えたなかった。一方、アセチル化 LDL によりマクロファージの細胞内コレステロールエステル含量は著明に増加したが、LPS 刺激はこの細胞内コレステロールエステル蓄積効果を濃度依存性に抑制した (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の LPS により 37.7% 抑制)。

3. LDL ないしアセチル化 LDL 存在下のいずれの状況においても L-NMA を添加することにより LPS 刺激による NO 産生は抑制され、さらに過剰量の L-Arginine を加えることにより NO 産生は回復した。しかし、これらの NO 産生の変動は、LDL 存在下におけるマクロファージの細胞内コレステロール蓄積に影響を与えたず、アセチル化 LDL 存在下における LPS 細胞内コレステロール蓄積の抑制効果にも影響を与えたなかった。

4. SNAP を添加することにより外因性に NO を作用させても LDL ないしアセチル化 LDL によるマクロファージの細胞内コレステロール含量には変化はみられなかった。

### 【考 察】

NO は血管平滑筋細胞、マクロファージなどの動脈硬化巣に存在する種々の細胞で産生される。NO の生理活性として cyclic GMP の上昇による血管のトヌス調節がひろく知られているが、他にも血管平滑筋細胞の増殖抑制、血小板の機能抑制、単球や好中球の走化、接着の抑制、さらにはマクロファージによる LDL の酸化を抑制する効果などが報告されている。また、高脂血症家兎において NO が内膜の肥厚を抑制することも報告されている。しかしながら、NO が細胞内、とくにマクロファージの脂質代謝に与える影響については今までに報告はない。

我々は今回の研究においてマクロファージのコレステロール代謝に与える NO の影響について検討した。マクロファージの内因性 NO 産生刺激として LPS を用いた。LPS は LDL ないしアセチル化 LDL 存在下のいずれの状況においても濃度依存性に NO の産生を亢進させ、かつ LDL ないしアセチル化 LDL の間で NO の産生量に差は認められなかった。LPS はアセチル化 LDL によるマクロファージの細胞内コレステロール蓄積効果を抑制したが、この効果は L-arginine, L-NMA による内因性 NO 産生の調節、SNAP 投与による外因性 NO 添加のいずれによっても影響されないことより、NO を介さない他の機構によるものと考えられた。

我々の興味の一つは NO がスカベンジャー受容体の活性に影響を与えるか否かである。LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  はマクロファージの iNOS を誘導するが、一方これらは、マクロファージのスカベンジャー受容体活性を抑制することが報告されている。我々の実験で得られた LPS によるマクロファージの細胞内コレステロール蓄積の抑制効果はスカベンジャー受容体活性を抑制することによるものと推察されるが、NO はこの受容体活性の抑制には関与しないと考えられる。

LDL 存在下で NO はマクロファージの細胞内コレステロール含量に影響を与えたなかった。ヒト单

球由来マクロファージで LPS は LDL 存在下における細胞内コレステロールのエステル化を促進するとの報告がなされているが、我々の結果は異なっていた。これは一つには細胞種の違いによるのかかもしれない。また、NO は細胞内の cyclic GMP を上昇させることによりその生理活性の一部を発揮する。J774 マクロファージにおいて cyclic AMP はコレステロールエステルの水解を促進するが cyclic GMP にはその作用がない事が既に報告されている。我々の検討においては LDL、アセチル化 LDL のいずれの存在下にても NO は細胞内のコレステロールの分画に影響を与えることなく、過去の報告を支持する結果であった。

### 【総括】

動脈硬化の発症、進展に NO は重要な役割を果たすことが明らかにされているが、NO はマクロファージの細胞内コレステロール代謝に影響を与えないことが示された。

### 論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞で產生される一酸化窒素 (NO) の生理活性として血管のトーネス調節、血管平滑筋細胞の増殖抑制、血小板の凝集抑制、単球や好中球の走化、接着の抑制、さらにはマクロファージによる LDL の酸化の抑制などが報告されている。また、高脂血症家兎において NO が内膜の肥厚を抑制することも報告されている。更に、NO は血管平滑筋細胞、マクロファージなどの動脈硬化巣に存在する種々の細胞でも產生される。エンドトキシン (LPS) や IFN- $\gamma$ などのサイトカインはマクロファージに存在する誘導型 NO 合成酵素 (NOS) を誘導し、NO を合成するが、一方コレステロールの代謝にも影響を与えることが報告されている。しかし、NO がマクロファージのコレステロールの代謝に影響を与えるかどうか、更に、エンドトキシンやサイトカインのコレステロール代謝に与える影響が NO 产生を介しているか否かの報告はなされていない。そこで今回我々は、NO がマクロファージのコレステロール代謝に与える影響に関して検討した。マウスのマクロファージの J774A.1 細胞を用い低比重リポタンパク (LDL) を健常人の血漿より超遠心法により分離し、さらに無水酢酸を酢酸ナトリウム存在下に加えることによりアセチル化 LDL を作成した。マクロファージを LDL ないしアセチル化 LDL 存在下に LPS にて刺激、培養した後、マクロファージより產生される NO を Griess 法にて測定するとともに、マクロファージの細胞内コレステロール含量を Heider&Boyett 法により定量した。さらに、NOS の阻害薬である N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (以下 L-NMA) 及び、NOS の基質である L-arginine を添加し NO の產生調節を行い、各条件下にて NO 产生がマクロファージの細胞内コレステロール蓄積に与える影響を検討した。次にマクロファージを外因性の NO ドナーである S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) 存在下に LDL ないしアセチル化 LDL とともに培養した後マクロファージの細胞内コレステロール含量を測定した。以下の結果を得た。

1. LPS は濃度依存性にマクロファージの NO 产生を亢進させ、NO 产生量は LDL とアセチル化 LDL 存在間で差を認めなかった。
2. LDL 存在下においては LPS 刺激はマクロファージの細胞内コレステロール含量に変化を与えたかった。一方、アセチル化 LDL 存在によりマクロファージの細胞内コレステロールエステル含量は著明に増加したが、LPS 刺激はこの細胞内コレステロールエステル蓄積効果を濃度依存性に抑制した (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の LPS により 37.7% 抑制)。
3. LDL ないしアセチル化 LDL 存在下のいずれの状況においても L-NMA を添加することにより LPS 刺激による

NO 産生は抑制され、さらに過剰量の L-arginine を加えることにより NO 産生は回復した。しかし、これらの NO 産生の変動は、LDL 存在下におけるマクロファージの細胞内コレステロール蓄積に影響を与える、アセチル化 LDL 存在下における LPS の細胞内コレステロール蓄積の抑制効果にも影響を与えたかった。4. SNAP の添加により外因性に NO を作用させても LDL ないしアセチル化 LDL によるマクロファージの細胞内コレステロール含量には変化がみられなかった。以上の如く、内因性 NO の増減および外因性 NO 投与はマウスマクロファージの細胞内コレステロール蓄積に影響を及ぼさなかった。LPS によるマクロファージの細胞内コレステロール蓄積の抑制効果はスカベンジャー受容体活性を抑制する効果によるものであるが、L-arginine, L-NMA による内因性 NO 産生の調節、SNAP 投与による外因性 NO 添加のいずれによっても影響されないことより、NO はこの受容体活性の抑制には関与しないことが示された。

本研究はマクロファージのコレステロール代謝について NO の影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった脂質代謝調節と NO の産生制御が異なる機序で行われ、両者間に cross talkがないことを明らかにし、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。