



Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway by high-density lipoprotein in macrophages

Tsuda, Shigeyasu

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7056号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007056>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B₄
pathway by high-density lipoprotein in macrophages

マクロファージにおける 5-リポキシゲナーゼ/ロイコトリエン B₄ を制御
する高比重リポ蛋白 (HDL) の新しい機構

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座
循環器内科学分野
(指導教員：平田健一教授)

津田 成康

1. 背景

高比重リポ蛋白 (HDL) は末梢組織で余剰になったコレステロールを肝臓へ運ぶコレステロール逆転送作用に関与し、さらに抗炎症作用にも関わることで、動脈硬化予防に重要な役割を果たしている。低 HDL コレステロール (HDL-C) は心血管疾患のリスクとなることが多くの観察研究より証明されてきたが、HDL-C を増加させる薬剤治療 (コレステロールエステル転送蛋白阻害薬) を用いた臨床研究では、これまでのところ心血管疾患の発症抑制効果が見られない。一方で、HDL の質、すなわちコレステロール逆転送作用の低下が、HDL-C 量の低下よりも重要な動脈硬化性疾患の危険因子であるとの報告から、近年 HDL の質・機能の評価、さらに HDL がもたらす炎症制御機構が注目されている。

マクロファージは動脈硬化病変において重要な役割を担う免疫細胞であり、近年様々な生理活性脂質 (脂質メディエーター) が、その機能に関わっていることが知られつつある。従来 HDL はコレステロール逆転送の過程において、マクロファージ表面に発現する受容体 ABCA1 や ABCG1 を介して相互作用することが知られているが、HDL がマクロファージ機能全般にどのような影響を及ぼすか、十分に検討されていなかった。

2. 目的

HDL の蛋白・脂質の質が HDL-マクロファージ相互作用に与える影響を検討する。

3. 方法

健常人と動脈硬化疾患患者の血漿より HDL (健常人 HDL: Healthy HDL と表記、動脈硬化疾患患者 HDL: coronary artery disease HDL: CAD HDL と表記) を超遠心法によって分取後、HDL を活性化させたマウスマクロファージ (Raw cell) と incubation し、産生された脂質メディエーターを液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS/MS: liquid chromatography-mass spectrometry) を用いて測定した。

脂質メディエーター産生を制御する酵素発現を検討するため、マクロファージ蛋白、または HDL 蛋白をウエスタンブロット法で解析した。

HDL の脂質をカルボシニアン蛍光色素で染色後、マクロファージと incubation し、共焦点顕微鏡を用いて HDL の挙動を観察した。また HDL 粒子そのものからの脂質メディエーター産生能を評価するため、重水素ラベルした基質を HDL に加え、HDL から産生される重水素ラベルされた脂質メディエーターを LC/MS/MS を用いて測定した。

マクロファージの食食作用の評価には、蛍光ラベルされたザイモザン粒子を用いて phagocytosis assay を実施した。

4. 結果

『Healthy HDL は活性化マクロファージ 5-L0 をプロテアソーム分解することで、マクロファージからの LTB₄ 産生を抑制する』

HDL と活性化マクロファージを incubation すると、Healthy HDL ではマクロファージから産生される LTB₄ が低下するのに対して、CAD HDL ではこの LTB₄ 抑制が見られない。この機序として、LTB₄ 産生に必要なマクロファージ 5-L0 の発現が Healthy HDL 処理でのみ有意に低下することを見出した。この Healthy HDL による 5-L0 発現低下は、ユビキチン・プロテアソーム阻害薬の前投与によって阻害されたことから、Healthy HDL はマクロファージ 5-L0 をユビキチン・プロテアソーム分解することが示唆された。CAD HDL はマクロファージ 5-L0 を分解できないため、マクロファージからの LTB₄ 産生が増加していたと考えられる。

『Healthy HDL 粒子はクラスリン依存性エンドサイトーシスを介してマクロファージへ取り込まれる』

HDL-マクロファージ相互作用の違いの原因を検討するため、マクロファージと incubation した際の HDL の挙動を観察した。興味深いことに Healthy HDL はマクロファージへ数分～数十分というタイムコースで取り込まれるのに対し、CAD HDL はほとんどマクロファージへ取り込まれなかった。Healthy HDL のマクロファージへの取り込みはクラスリン阻害薬 PitStop2 の前投与によって阻害されたことから、Healthy HDL はクラスリン依存性エンドサイトーシスによってマクロファージに取り込まれることを明らかにした。

『CAD HDL は LTB₄ を産生する』

HDL 取り込みにおける違いの原因が、HDL そのものの質の違いにあると考え、HDL 中の蛋白発現をウェスタンブロット法で確認したところ、CAD HDL は LTB₄ 産生に必要な 5-L0 や LTA₄ hydrolase を有しているのに対し、Healthy HDL にはこれらの蛋白が全く発現していないことを確認した。さらに、重水素ラベルした基質を HDL と加え、産生された重水素ラベル化脂質メディエーターを LC/MS/MS で解析すると、CAD HDL から重水素ラベルされた LTB₄ が産生されることを見出した。これらの結果から、CAD HDL は LTB₄ 産生に必要な酵素群を含有しており、自ら LTB₄ を産生することが明らかになった。

『LTB₄ は HDL のマクロファージへの取り込みを阻害し 5-L0 分解を妨げる』

HDL から局所で産生される LTB₄ が、HDL-マクロファージ相互作用に与える影響を検討するため、LTB₄ を添加して Healthy HDL とマクロファージを incubation した。この結果、Healthy HDL のマクロファージへの取り込みは低下し、マクロファージ 5-L0 の分解効果も低下することを確認した。このことから、LTB₄ が HDL のマクロファージ

への取り込みを阻害し、HDL による 5-L0 分解を抑制することが示唆された。また Healthy HDL との incubation によって、マクロファージ食食能力が亢進することが確認できたが、この効果も LTB₄ の添加により抑制されることが明らかとなった。

『LTB₄ 受容体拮抗薬が及ぼす HDL-マクロファージ相互作用への影響』

LTB₄ 添加による Healthy HDL-マクロファージ炎症制御機構の抑制は、LTB₄ 受容体拮抗薬によって改善することが確認できた。また LTB₄ 受容体拮抗薬の前投与は CAD HDL のマクロファージへの取り込みも促進することが明らかとなった。

5. 考察

Healthy HDL は活性化されたマクロファージへ取り込まれ、5-L0 を分解することで、マクロファージからの LTB₄ 産生を抑制することを明らかにした。一方、CAD HDL は自らが LTB₄ を産生し、HDL のマクロファージへの取り込みが阻害されるため、HDL によるマクロファージへの炎症抑制効果が消失していた。

HDL は肝細胞や血管内皮細胞へ取り込まれることは知られているが、本研究では HDL がマクロファージへクラスリン依存性エンドサイトーシスによって取り込まれ、ユビキチン・プロテアソーム系によって 5-L0 が分解されることを明らかにした。今後、HDL のマクロファージへの取り込みがどのような機序でプロテアソーム分解を制御するか検討を進める必要がある。

今回の研究では、HDL から産生される生理活性脂質が周囲の細胞に影響を与え、という、新たな HDL-細胞間相互作用が明らかとなった。CAD HDL は自ら炎症性脂質メディエーターを産生し、マクロファージの炎症を遷延させることから「機能不全 HDL」と表現することができる。また LTB₄ 受容体拮抗薬が CAD HDL の「機能不全」を改善することが期待され、今後 LTB₄ 受容体拮抗薬は、動脈硬化性疾患に対する 1 つの治療戦略に成り得るのではないかと考える。

6. 結語

HDL に含有される蛋白・脂質の質の違いが HDL から産生される機能性脂質の産生に影響を及ぼし、HDL-細胞間相互作用に直接的な影響を及ぼすことが明らかとなった。HDL から産生される機能性脂質に対し薬理的に介入することが、動脈硬化性疾患で認められる「機能不全 HDL」の機能改善に結びつくことが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2750 号	氏 名	津田成康
論 文 題 目 Title of Dissertation	マクロファージにおける5-リポキシゲナーゼ/ロイコトリエンB4を 制御する高比重リポ蛋白 (HDL) の新しい機構 Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway by high-density lipoprotein in macrophages		
審 査 委 員 Examiner	主 査 小川 涉 Chief Examiner 副 査 古屋敷智之 Vice-examiner 副 査 中 村 俊 一 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

高比重リポ蛋白 (HDL) はコレステロールを肝臓へ運ぶコレステロール逆転送作用に関与し、さらに抗炎症作用にも関わることで、動脈硬化予防に重要な役割を果たしている。本研究では HDL の蛋白・脂質の質が HDL-マクロファージ相互作用に与える影響を検討した。

健康人と動脈硬化疾患患者の血漿より HDL (健康人 HDL: Healthy HDL と表記, 動脈硬化疾患患者 HDL: coronary artery disease HDL: CAD HDL と表記) を超遠心法によって分取後、HDL を活性化させたマウスマクロファージ (Raw cell) と incubation し、産生された脂質メディエーターを液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS/MS: liquid chromatography-mass spectrometry) を用いて測定した。脂質メディエーター産生を制御する酵素発現を検討するため、マクロファージ蛋白、または HDL 蛋白をウエスタンブロット法で解析した。HDL の脂質をカルボシニアン蛍光色素で染色後、マクロファージと incubation し、共焦点顕微鏡を用いて HDL の挙動を観察した。また HDL 粒子そのものからの脂質メディエーター産生能を評価するため、重水素ラベルした基質を HDL に加え、HDL から産生される重水素ラベルされた脂質メディエーターを LC/MS/MS を用いて測定した。マクロファージの食食作用の評価には、蛍光ラベルされたザイモザン粒子を用いて phagocytosis assay を実施した。

HDL と活性化マクロファージを incubation すると、Healthy HDL ではマクロファージから産生される LTB_4 が低下するのに対して、CAD HDL ではこの LTB_4 抑制が見られず、 LTB_4 産生に必要なマクロファージ 5-L0 の発現が Healthy HDL 処理でのみ有意に低下することを見出した。Healthy HDL による 5-L0 発現低下は、ユビキチン・プロテアソーム阻害薬の前投与によって阻害されたことから、Healthy HDL はマクロファージ 5-L0 をユビキチン・プロテアソーム分解することが示唆された。マクロファージと incubation した際の HDL の挙動を観察したところ、Healthy HDL はマクロファージへ数分～数十分というタイムコースで取り込まれるのに対し、CAD HDL はほとんどマクロファージへ取り込まれなかった。Healthy HDL のマクロファージへの取り込みはクラスリン阻害薬 PitStop2 の前投与によって阻害されたことから、Healthy HDL はクラスリン依存性エンドサイトーシスによってマクロファージに取り込まれることを明らかとなった。HDL 中の蛋白発現をウエスタンブロット法で確認したところ、CAD HDL は LTB_4 産生に必要な 5-L0 や LTA_4 hydrolase を有しているのに対し、Healthy HDL にはこれらの蛋白が全く発現していないことを見出した。重水素ラベルした基質を HDL と加え、産生された重水素ラベル化脂質メディエーターを LC/MS/MS で解析すると、CAD HDL から重水素ラベルされた LTB_4 が産生されることを見出した。これらの結果から、CAD HDL は LTB_4 産生に必要な酵素群を含有しており、自ら LTB_4 を産生することが明らかになった。 LTB_4 を添加して Healthy HDL とマクロファージを incubation した結果、Healthy HDL のマクロファージへの取り込みは低下し、マクロファージ 5-L0 の分解効果も低下することが明らかとなった。また Healthy HDL との incubation によって、マクロファージ食食能力が亢進することが確認できたが、この効果も LTB_4 の添加により抑制されることが明らかとなった。さらに、 LTB_4 添加による Healthy HDL-マクロファージ炎症制御機構の抑制は、 LTB_4 受容体拮抗薬によって改善することが確認できた。また LTB_4 受容体拮抗薬の前投与は CAD HDL のマクロファージへの取り込みも促進することが明らかとなった。

本研究は、HDL と機能やマクロファージ機能との関連を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかった 5-リポキシゲナーゼ/ロイコトリエン B_4 経路の関与を初めて証明した報告である。HDL によるマクロファージ機能制御に関して、新規かつ重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。