

動脈硬化惹起性リポ蛋白質の生物学的作用

分担研究者 堀内正公（熊本大学医学部生化学第二講座 教授）

酸化LDLはin vitroにおいて、マクロファージ増殖を誘導する。このメカニズムとして、酸化LDLのリゾリン脂質がスカベンジャー受容体を介して細胞内に効率的に移行し、細胞内カルシウム上昇とそれに続くPKCの活性化が細胞内シグナルとして重要である。また、PKCの活性化に引き続くGM-CSFの産生を介してMφ増殖が誘導される。このGM-CSFの発現にはGM-CSF遺伝子5'端上流の-173bpから-147bpのAP-2結合領域が重要な役割を果たしている。

研究目的

動脈硬化初期病変は内皮細胞下にコレステロールエステルを大量に蓄積したマクロファージ(Mφ)由来の泡沫細胞の集集を特徴としている。この泡沫細胞は酸化LDLなどの変性LDLを細胞内に取り込んで泡沫化したものである。泡沫細胞は種々の生理活性物質を放出し、血管平滑筋細胞の遊走や増殖を介し、動脈硬化病変の進展に促進的に作用する。近年、粥状動脈硬化病変では、血管平滑筋細胞のみならずMφも増殖しているとの報告が見られる。我々は酸化LDLによるMφの泡沫化のみならず増殖を誘導することを見いだした。本研究は、Mφの増殖機構、特に、酸化LDLによるMφ増殖におけるシグナル伝達機構を分子レベルで明らかにすることにより、粥状動脈硬化症の発症機構に基礎的情報を与えることを目的としている。本年度は、酸化LDL刺激によるMφ増殖に関するGM-CSF、並びにGM-CSF発現調節機構を解析した。

研究方法

マウス腹腔Mφに酸化LDLを添加し、細胞数測定、放射性チミジンの取り込みを増殖の指標として検討した。このとき、同時に各種サイトカインの中和抗体を添加し酸化LDLによるMφ増殖に対する作用を検討した。次いで、Mφに酸化LDLを添加し、GM-CSFの発現をRP-PCR及びELISA法を用いてmRNA及び蛋白レベルで検討した。更に、マウスMφ系細胞であるw264.7 cellにGM-CSFの5'端上流を含むいくつかのシフェラーゼをレポーターとするプラスミドを作製し、Raw cellに導入した後、酸化LDLを添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。次いで、GM-CSF5'上流のいくつかのオリゴヌクレオチドを作成し、酸化LDL添加後の核タンパク質とゲルシフトアッセイを行った。

研究結果

酸化LDLによるMφ増殖はGM-CSF抗体で有意に抑制され、また酸化LDLはGM-CSF産生をmRNAおよび蛋白レベルで誘導した。これらの現象はPKC阻害剤カルフォスチンC)により抑制された。これらのことから、酸化LDLによって活性化されたPKCがGM-CSFの産生を促進し、Mφ増殖を誘導していることが考えられた。

酸化LDLはRaw cellに対してもGM-CSF産生をmRNAおよび蛋白レベルで誘導した。

3) ルシフェラーゼアッセイの結果からGM-CSF遺伝子5'端上流の-224bpから-120bpの領域に酸化LDL刺激によってGM-CSFの転写を正に調節する部位を同定した。

4) ゲルシフトアッセイの結果からGM-CSF遺伝子5'端上流の-173bpから-147bpの領域にAP-2結合領域が存在し酸化LDL刺激により本領域に核タンパク質の結合が増加することが明らかになった。

D. 考察

我々はこれまで、酸化LDLによるMφ増殖のシグナル伝達機構として、細胞内カルシウム上昇とそれに続くPKCの活性化が重要であることを明確にしてきた。本年度の検討から、酸化LDLによるMφ増殖はGM-CSF抗体で有意に抑制されること、また酸化LDLはGM-CSF産生をmRNAおよび蛋白レベルで誘導すること、これらの現象がPKC阻害剤により抑制されることから、PKCの活性化に引き続くGM-CSFの産生を介してMφが増殖していることが明らかとなった。しかし、GM-CSF以外にも、酸化LDLによりMφに発現する遺伝子を明らかにしておりこれらのMφ増殖への関与を検討する必要がある。ゲルシフトアッセイの結果から、酸化LDLによるGM-CSFの発現調節にはGM-CSF遺伝子5'端上流の-173bpから-147bpのAP-2結合領域が重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、AP-2α,β,γ,δの中和抗体ではスーパーシフトが認められず、この他のAP-2アイソフォームあるいはAP-2にホモロジーの高い核タンパク質が関与しているものと考えられた。

E. 結論

酸化LDLによるMφ増殖に際して、細胞内カルシウム上昇とそれに続くPKCの活性化が細胞内シグナルとして重要であること。また、PKCの活性化に引き続くGM-CSFの産生を介してMφ増殖が誘導されること。さらに、酸化LDLによるGM-CSFの発現にはGM-CSF遺伝子5'端上流の-173bpから-147bpのAP-2結合領域が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1 Sakai, M. et al. *Trend Cardiovasc. Med.* 1998;8:119-124.

2 Biwa, T. et al. *J. Biol.Chem.* 1998;273:28305-28313.

3 Sakai, M. et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

(1999 in press)