

学 位 論 文 題 名

Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves
endocytosis and resecretion
in a calcium-dependent pathway

(アポ蛋白 AI へのコレステロールの排出は、
カルシウム依存性のエンドサイトーシスと再分泌を伴う)

学位論文内容の要旨

コレステロールを過剰に貪食して泡沫化した単球由来マクロファージは動脈硬化初期の脂肪線条の形成において中心的役割を果たしている。マクロファージからのcholesterol effluxによる泡沫化防止,脱泡沫化は動脈硬化病変の予防,退縮に重要な意義を持つが、長年の取り組みにも関わらずその機序の解明に至っていない。これまでのところ高比重リポ蛋白 (High Density Lipoprotein ; HDL)粒子や脂質を含まない遊離のアポ蛋白AI, E等が細胞からコレステロールを引き抜くことが知られている。この際の経路に、1)物理化学的な拡散作用による経路 (passive diffusion pathway) と2)細胞膜表面に存在が予想される受容体、特にアポ蛋白受容体を介しての経路 (active apolipoprotein-mediated pathway) の2つが存在すると考えられている。共著者Smith JDはマウスのマクロファージ系細胞であるRAW264とアポ蛋白E, およびAIを用い、cAMPによってapolipoprotein-mediated pathway のアポ蛋白受容体がRNAレベルで誘導されることを示した(J Bio Chem, 1996)。

本研究では、非特異的結合がアポ蛋白Eよりも少ないアポ蛋白AIを主に用いて、apolipoprotein-mediated pathwayについてさらに検討した。具体的には、Raw264 細胞をアセチル化LDLで泡沫化させ、cAMPを添加後、アポ蛋白AIあるいはEを加えることによりapolipoprotein-mediated effluxを誘導し、その際のアポ蛋白AIあるいはEの細胞への結合、培地中への再分泌、それに伴うcholesterol efflux及びそのeffluxの性格について観察した。

その結果、電子顕微鏡下の観察では、金コロイド標識アポ蛋白AIはcAMPで前処置した場合にのみクラスリン被覆小包あるいは小顆とみなされる部位に認められた。またクラスリン被覆小包を介した経路を選択的に阻害すると報告されているChlorpromazineや高張性培地の使用によりcholesterol effluxは抑制された。以上から、アポ蛋白へのcholesterol effluxはクラスリン被覆小包を介して行われることが確認された。

再分泌試験では、cAMP前処置細胞において、90分のインキュベーション後に¹²⁵I-標識アポ蛋白AIの約60%がアポ蛋白AIとして再分泌され、約30%が分解され、約10%が細胞内にとどまっていた。またChase studyでは、アポ蛋白AIの再分泌に伴ってcholesterol effluxが起こ

ることが示された。これらの現象はアポ蛋白Eを用いた場合にも観察された。

これらによりアクセプターである遊離のアポ蛋白が細胞に一度取り込まれた後、再分泌されることによりCholesterol effluxが起こることが確認された。また、カルシウムを含まない培地ではcAMPにより誘導されるcholesterol effluxが強く抑制されることから、このeffluxのカルシウム依存性が示された。どの段階にカルシウムが必要か検討したところ、cAMPによるアポ蛋白受容体の導入、アポ蛋白の細胞への結合、及びアポ蛋白の細胞外への再分泌はカルシウム非依存性であることが示され、残る可能性としてアポ蛋白の細胞内への取り込みあるいは脂質のアポ蛋白への受け渡しにカルシウムが必要なことが示唆された。

これまでに、低比重リポ蛋白(Low Density Lipoprotein ; LDL)やHDLがクラスリン被覆小胞に取り込まれることは複数の研究室から報告されていたが、脂質を伴わない遊離アポ蛋白が、細胞内に取り込まれ脂質とともに再分泌されるという報告は初めてのものである。HDLをアクセプターとして用いた我々の実験や他の研究者からの報告が示すように、この経路は遊離アポ蛋白によるeffluxだけでなく、HDL粒子によるeffluxにも働いていると考えられる。さらに遊離アポ蛋白AIによる脂質排出経路は幼若HDL(nascent HDL, あるいはprebHDL)を生成するので、HDLの生成と成熟に関与するとも考えられる。これを支持するようにapolipoprotein-mediated pathwayに欠陥があるTangier病患者において、アポ蛋白AI産生が正常であるにもかかわらず血中ではアポ蛋白AIやHDLが欠損し、組織ではコレステロールが蓄積する。この重要なapolipoprotein-mediated pathwayのアポ蛋白受容体の分離同定作業は多くの施設で試みられているところである。今回の研究は、この経路がカルシウム依存性のクラスリン小胞を介したアクセプターの取り込みと再分泌を伴う点を明らかにしたもので、今後のこの方面の研究に貢献しうるものと思われる。

当研究の誌上発表とほぼ時期を同じくしてTangier病の原因が、ATP binding cassette transporter-1 (ABC-1)の異常であるという報告が出された。このABC-1は、これまでイオン、アミノ酸、ペプチド、糖類等の膜上の転送蛋白として知られていたが、新たにコレステロールの輸送にも関与することが最近明らかにされたものであり、このABC-1がapolipoprotein-mediated pathwayのアポ蛋白受容体そのものであるか、それに密接に関係するものである可能性が高まっている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

学 位 論 文 題 名

Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway

(アポ蛋白 AI へのコレステロールの排出は、
カルシウム依存性のエンドサイトーシスと再分泌を伴う)

コレステロールを過剰に貪食して泡沫化した単球由来マクロファージは動脈硬化初期の脂肪線条の形成において中心的役割を果たしている。泡沫化細胞からの cholesterol efflux による泡沫化防止、脱泡沫化は動脈硬化病変の予防、退縮に重要な意義を持つが、その機序の解明に至っていない。これまで高比重リポ蛋白(High Density Lipoprotein ; HDL)粒子や脂質を含まない遊離のアポ蛋白AI、E等が細胞からコレステロールを引き抜くことが知られているが、この際の経路に、1)物理化学的な拡散作用による経路 (passive diffusion pathway) と2)細胞膜表面に存在が予想される受容体、特にアポ蛋白受容体を介しての経路 (active apolipoprotein-mediated pathway) の2つが存在すると考えられている。本研究は、アポ蛋白AIを介するapolipoprotein-mediated pathwayについて主に検討した。Raw264 細胞をアセチル化LDLで泡沫化させ、cAMPを添加後、アポ蛋白AIあるいはEを加えることによりapolipoprotein-mediated effluxを誘導し、その際のアポ蛋白AIあるいはEの細胞への結合、培地中への再分泌、それに伴うcholesterol efflux及びそのeffluxの性格について観察した。電子顕微鏡下の観察では、金コロイド標識アポ蛋白AIはcAMPで前処置した場合にのみクラスリン被覆小包あるいは小顆とみなされる部位に認められた。またクラスリン被覆小包を介した経路を選択的に阻害するChlorpromazineや高張性培地の使用でcholesterol effluxは抑制された。以上から、アポ蛋白へのcholesterol effluxはクラスリン被覆小包を介して行われることが確認された。再分泌試験では、cAMP前処置細胞において90分のインキュベーション後、 I^{125} 標識アポ蛋白AIの約10%が、なおも細胞内にとどまっており、約60%がアポ蛋白AIとして約30%が分解を受けて、培地中に再分泌されていた。またchase study

では、アポ蛋白AIの再分泌に伴ってcholesterol effluxが起っていた。これらの現象はアポ蛋白Eを用いた場合にも観察された。以上からアクセプターである遊離のアポ蛋白が細胞に一度取り込まれた後、再分泌されることによりcholesterol effluxが起こることが確認された。また、カルシウムを含まない培地ではcAMPにより誘導されるcholesterol effluxが強く抑制されることから、このeffluxのカルシウム依存性が示された。なお、cAMPによるアポ蛋白受容体活性の誘導、アポ蛋白の細胞への結合、アポ蛋白の細胞外への再分泌はカルシウム非依存性であったことから、カルシウムはアポ蛋白の細胞内への取り込みに関与することが示唆された。これまで、低比重リポ蛋白(Low Density Lipoprotein ; LDL)やHDLがクラスリン被覆小胞に取り込まれることは報告されていたが、脂質を伴わない遊離アポ蛋白が細胞内に取り込まれ脂質とともに再分泌されるという報告は初めてのものである。HDLをアクセプターとして用いた実験から、この経路は遊離アポ蛋白のみではなく、HDL粒子によるeffluxにも働いていると考えられる。

公开发表に際して、副査の石橋輝雄教授からassociationとbindingの違い、HDLとアポAIの関係、resecretionされたアポ蛋白の再利用の可能性、LDL泡沫の有無とこの系の関係について、副査の宮崎勝巳教授からeffluxの実体、内因性物質の関与、Tangier病に同定されたABC-1蛋白との関係、クロールプロマジンの作用機序について、また主査の小林邦彦教授から想定される受容体の同定に関する今後の展望について質問があったが、申請者は自らの実験と文献を引用して適切に回答した。

この論文は、動脈硬化発症機構の主体であるマクロファージのcholesterol排出におけるアポ蛋白関連経路を解明した点で高く評価され、今後の動脈硬化の研究に大いに貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。