

過酸化脂質刺激による単球 CD36 の細胞内局在の 変化に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 低密度リポ蛋白 (low density lipoprotein; LDL) の取り込みに関与する受容体はスカベンジャー受容体と呼ばれ動脈硬化研究の主要なターゲットである。CD36 はスカベンジャー受容体に属し血管内皮細胞, 単球, マクロファージ, 血小板などの動脈硬化に関係が深い細胞に発現している。CD36 は種々の刺激で短時間のうちに細胞内局在を変化させることが知られている。ラット骨格筋や心筋ではインスリンや電気刺激によって細胞質から細胞膜に CD36 が移動し, マウスセルトリ細胞が生殖細胞や精子形成途中に生成する遺残体を貪食する際にも CD36 がセルトリ細胞の細胞質から細胞膜へ移動する。CD36 の細胞内局在変化はある条件下で惹起され, 標的物質の細胞内への取り込みに関係すると考えられるが, 詳細は明らかではなく, 他の細胞における CD36 の細胞内局在変化にいたっては殆ど報告がない。そこで, マクロファージの前駆細胞である単球に注目し, 動脈硬化の惹起要因である酸化 LDL やその成分の過酸化脂質の刺激がヒト単球 CD36 の細胞内局在にどのような変化を起こすかを明らかにする目的で研究を開始した。動脈硬化を合併する代表的疾患のひとつとして慢性腎不全が挙げられる。近年慢性腎不全血液透析患者においてフローサイトメトリー (FACS) を用いた検討で末梢血単球の CD36 発現量が顕著に増加していることが明らかにされた。一方, 透析膜に対する異物反応の結果として酸化ストレスが亢進し, 透析後に酸化 LDL や過酸化脂質の血中濃度が増加することが報告されている。これらの知見に基づき本研究では, 血液透析による血漿過酸化脂質の変化を観察するとともに透析が単球 CD36 の細胞内局在に及ぼす影響について検討した。また, 酸化 LDL および酸化 LDL 中の成分である過酸化脂質が単球 CD36 の細胞内局在に与える影響を観察する目的で, 培養マウス単球系細胞を用いて酸化 LDL および過酸化脂質による刺激後の CD36 の細胞内局在変化を共焦点顕微鏡にて観察した。

【材料と方法】 対象患者は慢性透析患者 15 例で全例が血液透析を行っていた。培養細胞はマウス単球系細胞である RAW264.7 細胞を用いた。培養実験に用いた過酸化脂質は cholesteryl ester hydroperoxide (CEOOH) として cholesteryl linoleate monohydroperoxide を用い, triglyceride hydroperoxide (TGOOH) として 2-linoleoyl-1-oleoyl-3-palmitoylglycerol monohydroperoxide を用いた。これらはヒト血漿において CEOOH あるいは TGOOH として最も多い物質である。また健常血清から LDL を分離し, これを金属酸化して酸化 LDL を作製した。ヒト末梢血単球表面 CD36 の発現量は FACS で CD14 陽性細胞における CD36 の平均蛍光強度 (Mean fluorescence Intensity; MFI) として測定した。ヒト末梢血単球 CD36 mRNA の定量には Real-time PCR を用い GAPDH mRNA の発現量で補正し相対量として数値化した。血漿酸化 LDL 濃度は, 協和メディックス社の酸化 LDL 測定試薬「MX」にて, 血漿過酸化脂質 (CEOOH, TGOOH) の濃度は化学発光 HPLC にて測定した。RAW264.7 における CD36 の局在変化の画像的評価は共焦点顕微鏡ニコン MRC-1024 (油浸, 1000 倍) を用いた。対応する 2 群間の差の検定には Wilcoxon の符号順位検定で, 対応しない 2 群間の差の検定には Mann-Whitney の U 検定で解析し, $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

【結果】 血漿 CE00H は透析後に 2.7 倍の有意な上昇を認めた ($p < 0.01$)。血漿 TGO0H は透析後に 2.0 倍の有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。一方、血漿酸化 LDL 濃度は透析後に 1.3 倍の有意 ($p < 0.01$) な上昇を認めたが、増加率は過酸化脂質よりも小さかった。血液透析前後の末梢血単球表面 CD36 の発現量を定量したところ透析開始時と比較し透析開始 4 時間後では 1.14 倍の有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。透析開始 6 時間後では、透析開始 4 時間後と比較すると 0.81 倍の有意な減少を認めた ($p < 0.01$)。透析開始時と透析開始 6 時間後では有意差は認められなかった。末梢血単球 CD36mRNA は透析開始 4 時間後と 6 時間後で透析前と比較して有意な減少を認めた ($p < 0.01$)。透析 4 時間後と透析 6 時間後の間には有意差は認めなかった。酸化 LDL 刺激前には、CD36 は RAW264.7 細胞の細胞質に均一に存在したが、酸化 LDL もしくは CE00H 刺激 30 分後には細胞膜へと移動した。しかし非酸化 LDL もしくは TGO0H の刺激では CD36 の局在変化は認められなかった。

【考察】 本研究では、透析後の血漿過酸化脂質や酸化 LDL の増加に伴い、一過性の末梢血単球 CD36 の細胞膜発現量増加が観察された。しかし CD36mRNA の増加を伴わなかったことから CD36 の細胞内局在が変化した可能性が示唆された。また、培養 RAW264.5 細胞の酸化 LDL や CE00H による刺激後の CD36 局在変化を共焦点顕微鏡で観察したところ、酸化 LDL と CE00H の刺激で CD36 の細胞膜への局在変化が観察された。これまで CD36 の細胞内局在変化についてはラットの骨格筋細胞や心筋細胞、マウスのセルトリ細胞において報告されており CD36 には標的物質の取り込み需要の急激な増加に対応して細胞膜へ細胞内局在変化をする性質を有することが考えられていた。今回、過酸化脂質の刺激で単球 CD36 が細胞内局在を変化させることを明らかとした意義は、①血管内の単球が過酸化脂質の増加に対応して短時間で CD36 を細胞表面に増やすという生理現象を発見したこと、②末梢血単球表面 CD36 を定量する上で特定の条件下で発現量に変化することがわかったこと、③短時間における末梢血単球表面 CD36 の発現量の変化を測定することで血中過酸化脂質の変化を推定する臨床検査として応用できる可能性があることが挙げられる。末梢血単球の CD36 が過酸化脂質の増加で細胞膜に細胞内局在変化するという現象が生体内でどういった役割を担っているかについての解明はこれからの課題であるが細胞の酸化ストレス応答としての一面であることが推測される。CD36 が細胞膜に移動することにより酸化リポ蛋白などの酸化ストレスを単球が迅速に処理し、その後のマクロファージや泡沫細胞への分化を促進し、より強力な酸化ストレス応答を引き起こす可能性が考えられる。また、末梢血単球が過酸化脂質代謝に果たす役割は小さいと考えられるが、入手と測定が容易な末梢血単球から得られる細胞内局在変化に関する情報から過酸化脂質代謝研究における多くの手がかりを得ることが出来る可能性もある。

【結論】 過酸化脂質 (CE00H) の増加に反応して末梢血単球の CD36 が細胞膜に細胞内局在変化していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

過酸化脂質刺激による単球 CD36の細胞内局在の 変化に関する研究

CD36 はスカベンジャー受容体に属し、種々の刺激で細胞内局在を変化させ、標的物質の取り込みに関係するが骨格筋・心筋以外の CD36 の局在変化については殆ど報告がない。そこで動脈硬化に関連する酸化 LDL と過酸化脂質の刺激が単球 CD36 の細胞内局在に及ぼす影響を明らかにする目的で研究を開始した。透析後に酸化 LDL や過酸化脂質の血中濃度が増加することが報告されていたため本研究では、まず血液透析による血漿過酸化脂質の変化を観察し透析が単球 CD36 の細胞内局在に及ぼす影響について検討した。また、酸化 LDL や過酸化脂質の刺激が単球 CD36 の局在に与える影響を観察する目的で、培養マウス単球系細胞 (RAW264.7) CD36 の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。過酸化脂質は cholesteryl linoleate monohydroperoxide と 2-linoleoyl-1-oleoyl- 3-palmitoylglycerol monohydroperoxide を用い、ヒト単球表面 CD36 発現量はフローサイトメトリーの平均蛍光強度で、mRNA の定量は Real-time PCR で測定した。血漿過酸化脂質は化学発光 HPLC で測定した。透析後に血漿 CE00H は 2.7 倍に TG00H は 2.0 倍に酸化 LDL は 1.3 倍上昇した。血液透析前後の単球表面 CD36 の発現量は 4 時間後に 1.14 倍に上昇し、6 時間後に透析前値に復した。単球 CD36 mRNA は 4 時間後と 6 時間後に同程度の減少を認めた。一方 RAW264.7 では細胞質に均一に存在した CD36 が酸化 LDL や CE00H 刺激 30 分後に細胞膜へ局在変化した。酸化 LDL や TG00H では局在変化しなかった。本研究は過酸化脂質の増加で単球 CD36 が短時間で細胞膜に局在変化する点を発見した点、単球表面の CD36 発現量を定量する際、酸化ストレス存在下で発現量が増加する可能性を指摘した点、単球表面 CD36 発現量の短時間の変化が血中過酸化脂質増加に対する生体反応マーカーとして利用できる可能性が考えられた点で意義がある。

副査の畠山鎮次教授から①透析による酸化脂質増加の機序②免疫染色以外の細胞内 CD36 局在確認の手法③CD36 の細胞膜におけるエンドサイトーシス、メンブレントラフィックについての質問があった。副査の筒井裕之教授から④単球 CD36 の局在変化後の細胞接着性の変化⑤透析で過酸化脂質と CD36 の局在変化を測定した検体は同一のものか⑥透析後の過酸化脂質の増加と CD36 の局在変化の相関性⑦糖尿病など動脈硬化を起こしやすい疾患における CD36 の局在変化についての質問があった。主査の小池隆夫教授から⑧健康者にも透析を行ったら単球 CD36 は局在変化を起こすか⑨透析後の過酸化脂質増加を防ぐ方法⑩慢性腎不全の原因疾患で CD36 の局在変化のメカニズムが変わるか⑪酸化 LDL が単球内で CD36 の局在変化を起こす機序⑫本研究の臨床応用と将来展望についての質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は既存の報告や実験結果を引用し、①透析膜との接触で顆粒球が活性化され、ミエロパーオキシシスの活性化よりフリーラジカルが産生され、脂質の

脂肪酸の不飽和結合部が酸化される②単球の細胞分画に分けて、細胞膜と細胞質の CD36 蛋白量をウエスタンブロッティング法で比較する方法③申請者が調べた範囲では確証を得る報告は見つからなかった④CD36 は多くの物質をリガンドとして認識するので血管内皮細胞への接着に関与する可能性もある⑤同一の検体であった⑥相関はしなかった⑦糖尿病や腎不全で末梢血単球の CD36 発現量が増加するとの報告はあるが局在変化の報告は無い⑧透析膜と顆粒球の接触で起こる現象なので健常者でも起こる⑨ビタミン E コーティング透析膜、抗酸化薬の使用⑩原因疾患の比較では違いは無かった⑪シグナルについては不明だが今回の結果より CEOOH 関与の可能性が考えられた⑫生体内細胞で CD36 局在変化を確認する事は困難である。末梢血単球 CD36 の局在変化測定は、入手容易な検体を用いた過酸化脂質への生体応答の有用なマーカーとなりえると回答した。

この論文は、酸化 LDL の細胞内への取り込みに重要な CD36 に関して、ヒト末梢血単球やマウス単球系細胞において細胞内局在変化の解析を行い、過酸化脂質 (CEOOH) の刺激で CD36 が細胞膜に局在変化することを明らかとした点が高く評価され、更に解析を進めることによって入手と測定が容易な末梢血単球からの細胞内局在変化に関する情報から、今後の過酸化脂質代謝研究における多くの手がかりを得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。