

[原著] マクロファージ泡沫化過程における細胞内脂質転送 蛋白 (Sterol Carrier Protein₂ : SCP₂) の発現調節機構

時 永 耕太郎

(1996年8月28日受付, 1996年10月23日受理)

要 旨

初期動脈硬化病巣においてはマクロファージが変性 low density lipoprotein (LDL) を取り込んで泡沫細胞となる過程が重要と考えられている。コレステロールの細胞内輸送・代謝に与する最も有力な細胞内脂質転送蛋白と考えられている sterol carrier protein₂ (SCP₂) は変性 LDL の取り込みに伴いマクロファージが泡沫化する過程においてその含量が増加する事が明らかにされている。今回、マクロファージ泡沫細胞形成過程における SCP₂ の遺伝子発現とその調節機構について検討を行った。まず変性 LDL である Acetylated-LDL (Ac-LDL) によりマクロファージが泡沫化し SCP₂ 含量の増加する際、mRNA レベルの変動を Northern blot 法で解析したところ SCP₂ の mRNA の増加が認められた。次にこの SCP₂ の遺伝子発現が増強する機序について検討した。acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害剤である EAB-309 の添加により Ac-LDL によるマクロファージ中コレステロールエステルの増加は著明に抑制され、遊離コレステロールは増加した。その際、この細胞中の SCP₂ 含量と mRNA レベルの増加が認められた。さらに、この増加が細胞内遊離コレステロールの増加によるものかどうかを調べる目的で 25-OH cholesterol を添加したところ SCP₂ 含量、mRNA レベルは増加した。しかし、Ac-LDL による SCP₂ 増加が Ac-LDL がマクロファージのスカベンジャー受容体を介したシグナルによるものかどうかを明らかにするための maleylated bovine serum albumin (Mal-BSA) の添加は影響を与えなかった。これらの成績から Ac-LDL によるマクロファージの泡沫細胞形成過程における SCP₂ の増加はその遺伝子発現の増強によること、その発現増強した機序としてスカベンジャー受容体からのシグナルよりも細胞内遊離コレステロールの増加が重要であることが明らかとなった。SCP₂ の泡沫細胞形成における重要性を示唆し、動脈硬化の脂質沈着過程の病因解明上重要な知見と考えられた。

Key words : マクロファージ, Sterol carrier protein₂, コレステロール,
泡沫細胞形成, 遺伝子発現調節機構

略語一覧 : SCP₂ : Sterol carrier protein₂, Ac-LDL : acetylated low density
lipoprotein, ACAT : acyl-CoA : cholesterol acyltransferase,
25-OH cholesterol : 25-hydroxy cholesterol, Mal-BSA :
maleylated bovine serum albumin

千葉大学医学部内科学第二講座

Kotaro TOKINAGA : Regulation of Sterol Carrier Protein₂ (SCP₂) Gene Expression
in Macrophages during Foam Cell Formation

2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received August 28, 1996, Accepted October 23, 1996.

I 緒 言

動脈硬化症は血管壁へのコレステロールエステルの沈着を特徴とし、特に初期の動脈硬化病巣においては血液中より遊走してきたと考えられるマクロファージの泡沫細胞形成過程が重要と考えられている[1]。変性 LDL はマクロファージのスカベンジャー受容体に結合後[2]、細胞内に取り込まれライソゾームにおいて水解された後、遊離コレステロールが産生される。遊離コレステロールは細胞内を転送されミクロゾームの acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT) により再エステル化されコレステロールオリエイトとなり細胞内に脂肪滴として蓄積され泡沫細胞が形成される[3,4]。このようにマクロファージの泡沫細胞形成過程においてはコレステロールの細胞内転送・代謝が存在していると考えられる。変性リポ蛋白やその取り込み機構についてはスカベンジャー受容体のクローニングを初めとする一連の精力的な研究により大幅な進歩が見られたのに対し、マクロファージの泡沫細胞形成過程における細胞内コレステロール移送の調節機序に関する研究は殆ど行われていない。

コレステロールは疎水性脂質でありその細胞内移送、代謝には両親媒性の転送蛋白の存在が必要であると考えられている[5]。近年細胞内移送、代謝に関与すると考えられている最有力の蛋白質として sterol carrier protein₂ (SCP₂) が注目されている。SCP₂ は non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) と呼ばれ[6] 分子量13,200 の塩基性蛋白質であり、それ自体は全く酵素活性を示さないがコレステロールおよびその前駆体の細胞内転送を促進することにより種々の臓器における細胞内コレステロール代謝に関わっている[5-7]。肝臓におけるコレステロールの生合成[5]、胆汁酸の合成[9]、副腎皮質においてはステロイドホルモンの生合成過程におけるミトコンドリアの外膜から内膜へのコレステロールの転送促進[10]、また肝臓、腸管、副腎皮質、動脈壁における ACAT によるコレステロールエステル化に対する促進効果が報告されている[7,8,11]。また SCP₂ はコレステロール代謝の盛んな臓器に多く分布していることが明らかとなっている[12]。

このように細胞内コレステロール代謝に密接な役割を有している SCP₂ の動脈硬化病巣のマクロファージ泡沫化過程における役割を解析する事は、動脈硬化の病因・病態を解明する上で重要なテーマと考えられる。この問題については従来ほとんど研究はなされていなかったが、伴は動脈壁にも SCP₂ が存在していることを明らかにし、同蛋白が動脈硬化症のコレステロール代謝に関与しうる可能性を示した[11]。最近になり、木野は泡沫細胞形成のモデルであるラット腹腔マクロファージに SCP₂ が存在し、Ac-LDL 添加によるマクロファージ泡沫化過程において SCP₂ 含量が増加する事をはじめて報告した[13]。以上のような背景より、SCP₂ の泡沫細胞形成過程における役割を解明するためには、マクロファージの泡沫細胞化過程における SCP₂ の遺伝子発現とその調節機構を解析する事が不可欠であると考えられる。そこで本研究ではまずラット腹腔マクロファージにおける Ac-LDL による泡沫細胞形成過程において SCP₂ 含量が増加する際の mRNA レベルの変動を調べ遺伝子発現増強の可能性を検討し、次に SCP₂ の遺伝子発現増強の機序についての検討を行った。

II 実験方法

1. 試 薬

[¹²⁵I] anti-rabbit IgF (ab)₂ from donkey, nitrocellulose hybridization transfer membranes, multiprime DNA labeling system, γ -32 dCTP, Hybond-N + nylon membrane, ドライミルクは Amersham (U.K.) より購入した。RPMI1640培養液及び牛胎児血清は Gibco BRL Life Technologies Inc. (U.S.A.) より購入した。径100mm及び35mmの培養 dish は Corning (U.S.A.) より購入した。Electrophoresis calibration kit, Protein G Sepharose 4 FF gel, CNBr-activated Sepharose 4B は Pharmacia AB (Sweden) より購入した。cholesterol, oleic acid, oleyl-CoA, 25-hydroxycholesterol (25-OH cholesterol), p-nitrophenyl phosphate, pepstatin A, antipain, chymostatin, leupeptin は Sigma Chemical 社 (U.S.A.) より購入した。Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

plate (10-20%) は第一化学薬品 (東京) より購入した。レントゲンフィルム (Rxo-H) と intrinsifying screen (HR-8) は富士写真工業 (神奈川) より購入した。マイクロタイタープレートは C. A. Greiner and Sohne (F.R.G.) より購入した。Phosphatase labeled affinity-purified antibody to rabbit IgG (H+L)(goat) は Kirkegaard & Perry Laboratories 社 (U.S.A.) より購入した。薄層クロマトグラフィー用プレート (LK5D) は Whatman Chemical Separation 社 (U.S.A.) より購入した。Time Saver cDNA Synthesis Kit と mRNA purification Kit は Pharmacia LKB 社 (U.S.A.) より購入した。ラット肝 poly (A)⁺RNA は Clontech Laboratories, Inc. 社 (U.S.A.) より購入した。polymerase chain reaction (PCR) のための Gene Amp PCR reagent Kit は Perkin Elmer 社 (U.S.A.) より購入した。acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害剤である EAB-309 は三菱化成 (東京) の鈴木一夫博士の好意により供与された。他の薬品類は和光純薬工業 (株) より購入した。

2. 実験方法

ラット腹腔マクロファージは斎藤らの方法により採取し [14], gentacin 40 μ g/ml, 20% FCS 含有 RPMI1640 培養液に 2×10^6 cells/ml の濃度にて再浮遊した。10ml ずつ直径 100mm の dish に分注し, CO₂ インキュベーター (37°C) で 2 時間培養した後, 培養液を交換し非付着細胞を取り除いた。付着細胞は 20% FCS 含有 RPMI1640 培養液 10ml にて更に 22 時間培養を行った (第一日)。RPMI1640 培養液にて dish を洗浄した後, Ac-LDL 含有あるいは非含有 RPMI1640 (FCS 非含有) 培養液にて 24 時間培養し (第二日), さらに RPMI1640 (FCS 非含有) 培養液に交換し 24 時間培養した (第三日)。なお Ac-LDL は Goldstein らの方法に準じ無水酢酸による反応により調整した [2]。培養後の細胞は回収した後にプロテアーゼ阻害剤 (2mM p-APMSF, 2.5 μ g/ml pepstatin, 2.5 μ g/ml antipain, 2.5 μ g/ml chymostatin, 2.5 μ g/ml leupeptin) 含有 PBS 0.8ml に再浮遊し, Tabas ら [4] の方法に従い 4°C にて Potter Elvehjem homogenizer にて 40 回ホモジナイズした。300 x g, 10 分の遠心を行い細

胞破砕物を除き, 上清を whole homogenate として enzyme immunoassay (EIA 法) による SCP₂ 定量及び Western blot 解析のために使用した。また, 細胞は氷冷 PBS にて二回洗浄した後, Northern blot 解析のための total RNA を調整した。

ACAT 阻害剤である EAB-309 [15] を用いる実験では dimethylsulfoxide (DMSO) を溶解剤として 0.05% (v/v) 以下の濃度で使用したが対照培養液に等量の DMSO を添加した。その際の EAB-309 は Ac-LDL と同時添加とした。

25-OH cholesterol または maleylated bovine serum albumin (Mal-BSA) を用いる実験では, 前培養後 (第一日), 25-OH cholesterol, Mal-BSA 添加培養液にて 37°C にて 24 時間培養した後 (第二日) マクロファージを回収した。25-OH cholesterol の溶解には ethanol を使用したがその際の濃度は 0.2% 以下とし, 対照培養液にも等量添加した。Mal-BSA は Bulter の方法により調整した [16]。

3. マクロファージの whole homogenate の Western blot 解析と enzyme immunoassay (EIA) による定量

Western blot 解析と enzyme immunoassay (EIA) による SCP₂ 微量定量は既報の方法に準じて行った [11]。その際使用する SCP₂ の精製は既に報告した方法に従ってイオン交換カラム及びゲルろ過カラムを用いた二段階精製法により行った [17]。また特異的抗 SCP₂ 抗体は, 精製 SCP₂ を家兎に免疫した抗血清より, Protein G Sepharose 4FF カラムおよび SCP₂ をリガンドとした CNBr-activated Sepharose 4B (SCP₂ 1.5mg/1g CNBr-activated Sepharose 4B) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより作成した [11]。

4. SCP₂ cDNA プローブの調製

Northern blot 解析のハイブリダイゼーションのためのラット SCP₂ cDNA プローブは, ラット肝 cDNA をテンプレートに, 合成オリゴヌクレオチドすなわち CACGAATTCGGAAAGTGGGT CATAAACCTAG と CTCGAATTCTCATCTTG ATGTCCTGAGG をプライマーとした PCR 法にて作成した [18,19]。ラット SCP₂ cDNA プロ-

ブ (664bp) は Billheimer らにより報告されたラット SCP₂ cDNA の502-1165塩基のヌクレオチドをコードしており[20], 既報のラット SCP₂ 塩基配列を完全に含んでいる[21]。

5. Northern blot 解析

ラット腹腔マクロファージの TotalRNA 調整は Auffray と Rougeon の方法により行った[22]。さらに TotalRNA より Northern blot 用の poly (A⁺)mRNA を mRNA Purification Kit を用いて調整した。mRNA は2.0%ホルムアルデヒド含有1.0%アガロースゲルで分離後, Hybond-N + nylon membrane に転写した。プレハイブリダイゼーションを行った後, 5xSSPE [1xSSPE は 0.15MNaCl, 0.01MNaH₂PO₄H₂O, 1mMEDTA (pH7.5)], 2xDenhardt 溶液 [1xDenhardt 溶液は 0.02%(W/V)Ficoll, 0.02%(W/V)polyvinylpyrrolidone, 0.02%(W/V)bovine serum albumin(BSA)], 0.1%SDS, 10 μg salmon sperm DNA/ml, 50%(V/V)ホルムアルデヒドに [α -³²P] dCTP-labeled 664bp SCP₂ cDNA プローブ (random prime labeling, specific activity>1x10⁹cpm/μg), を加え42℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った。0.2%SDS を含む6xSSPE, 室温で15分にて二回, 0.1%SDS を含む1xSSPE, 37℃で15分にて二回, 0.1%SDS を含む1xSSPE, 65℃で30分にて一回の洗浄を行った後, -80℃にて一晩オートラジオグラフィを行った。

6. その他の測定

蛋白濃度は牛γ-グロブリンを標準物質として Bradford の方法により測定した[23]。コレステロール, コレステロールエステルの定量は斎藤らの方法に準じて行った[14]。

7. 統計処理

データ解析は東芝 J-3100SGT computer を用い“Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs”を使用し行った。有意差検定には“t-Test: Group Data”を用いた。

Ⅲ 結 果

1. 腹腔マクロファージにおける SCP₂ の Western blot 及び Northern blot 解析

図1-(A) に特異的抗 SCP₂ 抗体を用いて行ったラット腹腔マクロファージ, ラット肝臓 cytosol 分画, ラット肝臓より精製した SCP₂ の Western blot 分析の結果を示す。ラット腹腔マクロファージ中にラット肝臓より精製した SCP₂ と同じ分子量 (13.2KDa) を有する蛋白質が認められた。ラット肝臓 cytosol 分画には特異的抗 SCP₂ 抗体に反応する58kDa の別の蛋白が存在したが, ラット腹腔マクロファージ中にはこの蛋白質は認められなかった。

図1-(B) に664bp の SCP₂ cDNA 断片をプローブとして行った Northern blot 解析の結果を示す。ラット肝臓には0.8, 1.4, 2.1と2.7kb の4種のパンドが認められ, ラット腹腔マクロファージ中には0.8kb のパンドが認められた。さらに露出時間を長くすることにより1.4kb と2.1kb のパンドも認められた。

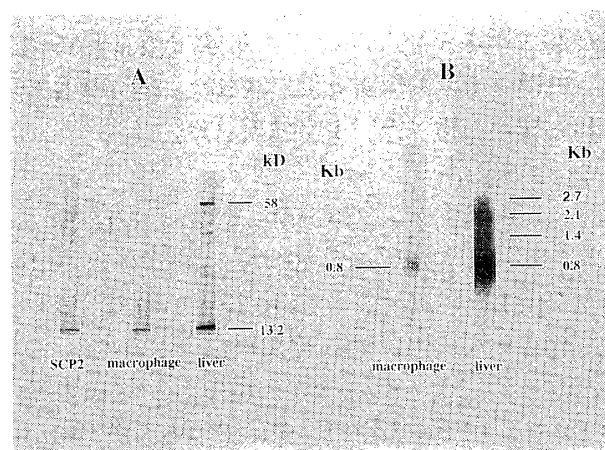


図1: (A) 特異的抗 SCP₂ 抗体を用いて行った Western blot 分析の結果。SCP₂: 精製した SCP₂ (2ng/well), macrophage: ラット腹腔マクロファージ whole homogenate (15 μg/well), liver: ラット肝臓 cytosol 分画 (2 μg/well)。

(B) SCP₂ cDNA 断片をプローブとして行った Northern blot 解析の結果。macrophage: ラット腹腔マクロファージ mRNA (4 μg/well), liver: ラット肝臓 mRNA (2 μg/well)。

2. Ac-LDL によるラット腹腔マクロファージ 泡沫細胞化と SCP₂ 含量の変動にともなう mRNA レベルの変動

図2-(A)-1 は Ac-LDL 50 μg/ml 添加, 非添加時のラット腹腔マクロファージ中の遊離コレステロール含量の変動を, 図2-(A)-2 はコレステ

ロールエステル含量の変動を示す。ラット腹腔マクロファージ中の遊離コレステロール含量とコレステロールエステル含量は Ac-LDL50 μ g/ml 添加群ではともに経時的に増加をみとめ、Ac-LDL 非添加群に比べ添加48時間後には有意な増加が認められた。

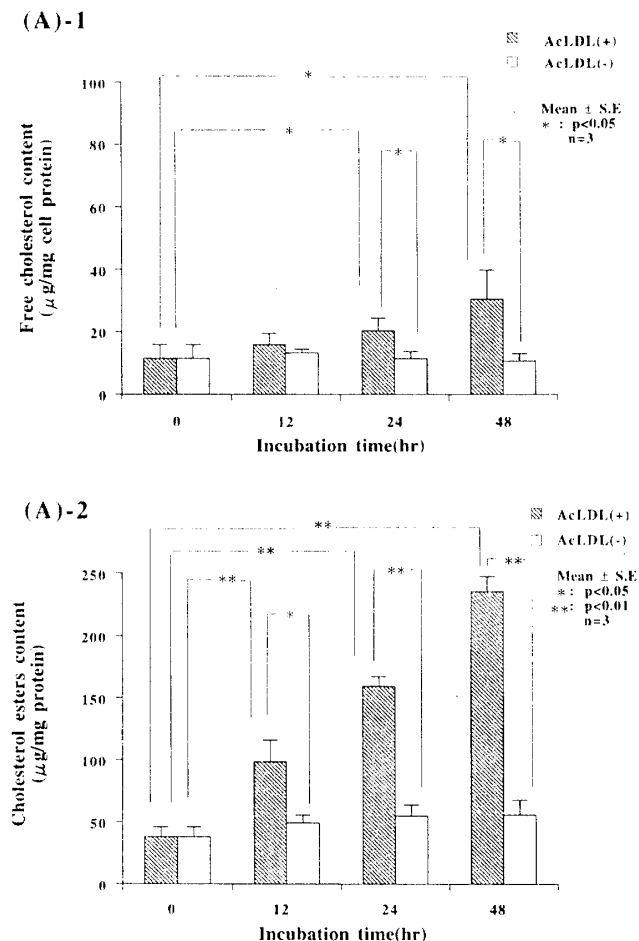


図2: (A)-1はAc-LDLによるラット腹腔マクロファージ泡沫化過程における遊離コレステロール含量の経時的変動。斜線の棒グラフ: Ac-LDL50 μ g/ml添加した群, 白抜きの棒グラフ: Ac-LDL非添加群。

(A)-2はAc-LDLによるラット腹腔マクロファージ泡沫化過程におけるコレステロールエステル含量の経時的変動。斜線の棒グラフ: Ac-LDL50 μ g/ml添加した群, 白抜きの棒グラフ: Ac-LDL非添加群。

図2-(B)はその際のラット腹腔マクロファージ中とSCP₂含量の変動を示す。Ac-LDL非添加群においてはSCP₂含量は48時間後まで有意な増加はみられなかったが、Ac-LDL50 μ g/ml添加した群では経時的にSCP₂含量の増加を認め、48時間後には非添加群の約1.5倍に増加していた。

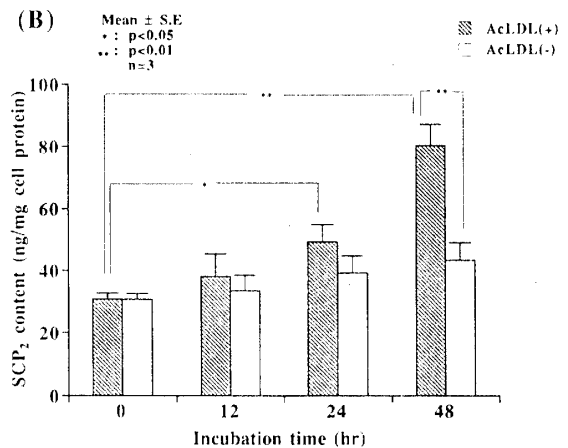


図2: (B) Ac-LDLによるラット腹腔マクロファージ泡沫化過程におけるSCP₂含量の経時的変動。斜線の棒グラフ: Ac-LDL50 μ g/ml添加した群, 白抜きの棒グラフ: Ac-LDL非添加群。

図3-(A)はAc-LDL50 μ g/ml添加, 非添加時のラット腹腔マクロファージ whole homogenateのWestern blot分析の結果を示す。13.2 KDaのSCP₂のバンドはAc-LDL添加時において非添加時に比べ増強を認めた。

図3-(B)はAc-LDL50 μ g/ml添加, 非添加にて培養した時のラット腹腔マクロファージにおけるmRNAレベルをNorthern blot法で解析し

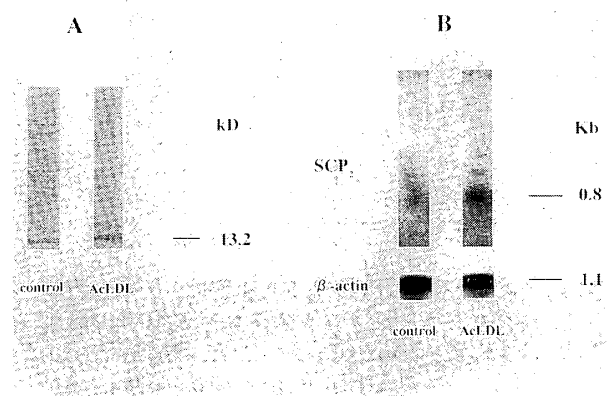


図3: (A)はAc-LDL50 μ g/ml添加, 非添加時のラット腹腔マクロファージ whole homogenate (15 μ g/well)のWestern blot解析の結果。control: Ac-LDL非添加時, Ac-LDL: Ac-LDL50 μ g/ml添加時。

(B)はAc-LDL50 μ g/ml添加, 非添加時のラット腹腔マクロファージmRNA (4 μ g/well)のNorthern blot解析の結果。control: Ac-LDL非添加時, Ac-LDL: Ac-LDL50 μ g/ml添加時。

た結果を示す。Ac-LDL 非添加時に比べ Ac-LDL 50 μ g/ml 添加時に 0.8kb の SCP₂ mRNA のバンドは増強を認めた。

3. ACAT 阻害剤 EAB-309 の SCP₂ 遺伝子発現に及ぼす影響

図 4-(A) は Ac-LDL 50 μ g/ml での培養にて EAB-309 100nM を添加および非添加時のラット腹腔マクロファージ中の遊離コレステロール、コ

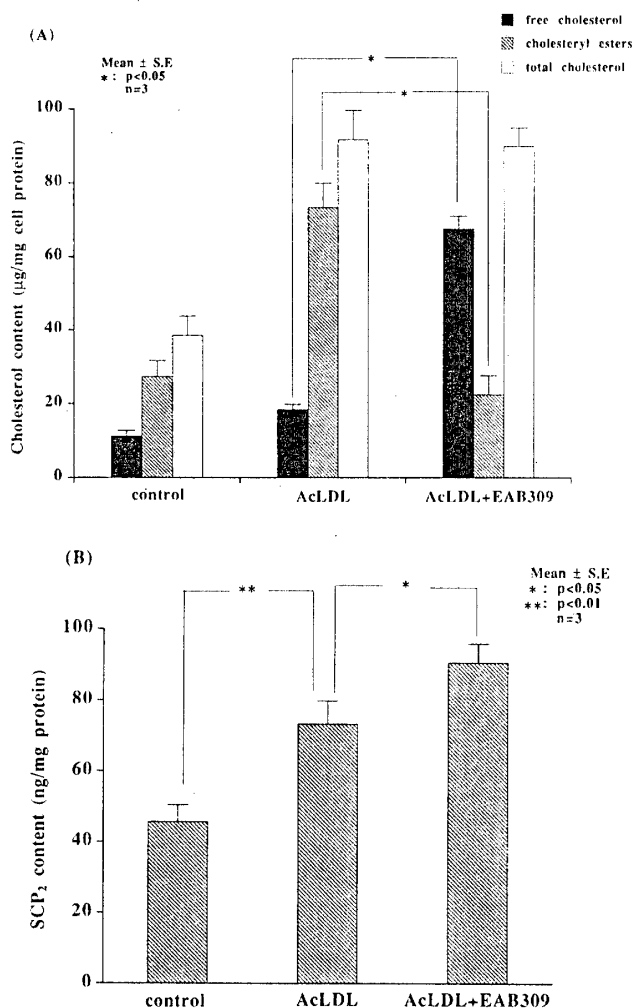


図 4: (A) ACAT 阻害剤 EAB-309 のラット腹腔マクロファージ中コレステロール含量におよぼす影響。control: Ac-LDL 非添加時, Ac-LDL: Ac-LDL 50 μ g/ml 添加時, Ac-LDL+EAB309: Ac-LDL 50 μ g/ml での培養にて EAB-309 100nM を同時添加。黒塗りの棒グラフ: 遊離コレステロール含量, 斜線の棒グラフ: コレステロールエステル含量, 白抜きの棒グラフ: 総コレステロール含量。

(B) ACAT 阻害剤 EAB-309 のラット腹腔マクロファージ SCP₂ 含量におよぼす影響。control: Ac-LDL 非添加時, AcLDL: Ac-LDL 50 μ g/ml 添加時, AcLDL+EAB309: Ac-LDL 50 μ g/ml での培養にて EAB-309 100nM を同時添加。

レステロールエステル, 総コレステロール含量の変化を示す。ACAT 阻害剤の EAB-309 の添加により Ac-LDL によるコレステロールエステルの増加は著明に抑制され, 細胞内遊離コレステロールは EAB-309 の添加により著明に増加した。

図 4-(B) は EAB-309 の添加により, Ac-LDL によるコレステロールエステルの増加を抑制し, 遊離コレステロールのみが増加する条件において, SCP₂ 含量を EIA 法によって測定した結果を示す。Ac-LDL によるマクロファージ中 SCP₂ 含量の増加は, ACAT 阻害剤の EAB-309 の添加により抑制されず, むしろさらなる SCP₂ 含量の増加が認められた。

図 5 は Ac-LDL 50 μ g/ml での培養にて EAB-309 100nM を添加および非添加時のラット腹腔マクロファージの SCP₂ mRNA レベルの変動を Northern blot 法で解析した結果を示す。EAB-309 の添加によるマクロファージ SCP₂ の蛋白レベルの増加は Northern blot 解析法において 0.8 kb の SCP₂ mRNA バンドの増強をとまっていた。

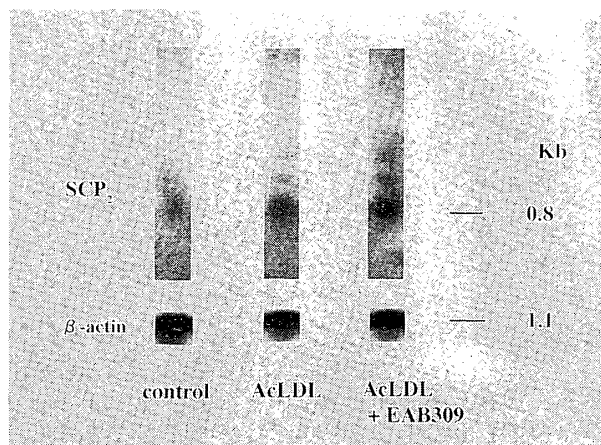


図 5: EAB-309 添加の Ac-LDL による SCP₂ 遺伝子発現増強効果におよぼす影響をラット腹腔マクロファージ mRNA (4 μ g/well) の Northern blot 法で解析した結果。control: Ac-LDL 非添加時, AcLDL: Ac-LDL 50 μ g/ml 添加時, AcLDL+EAB309: Ac-LDL 50 μ g/ml での培養にて EAB-309 100nM を同時添加。

4. 25-OH cholesterol と maleyl BSA (Mal-BSA) の SCP₂ 遺伝子発現に及ぼす影響

図 6-(A) は 25-OH cholesterol を 5 μ g/ml 添加培養時のラット腹腔マクロファージ中の SCP₂

含量の経時的变化を EIA 法により検討した結果を示す。25-OH cholesterol 非存在時には有意な SCP₂ 含量の変動はみられなかった。25-OH cholesterol 5 μ g/ml 存在時におけるマクロファージ中 SCP₂ 含量は経時的に増加し培養12時間にて最高レベルに達した。

図6-(B) は25-OH Cholesterol の濃度を変えて添加したときの腹腔マクロファージ中の SCP₂ 含量の変化を示す。腹腔マクロファージ中の SCP₂ 含量は、25-OH Cholesterol 非添加群に比べ25-OH Cholesterol を2 μ g/ml 添加時に2.1倍、5 μ g/ml 添加時に2.5倍と濃度依存性に増加が認められた。

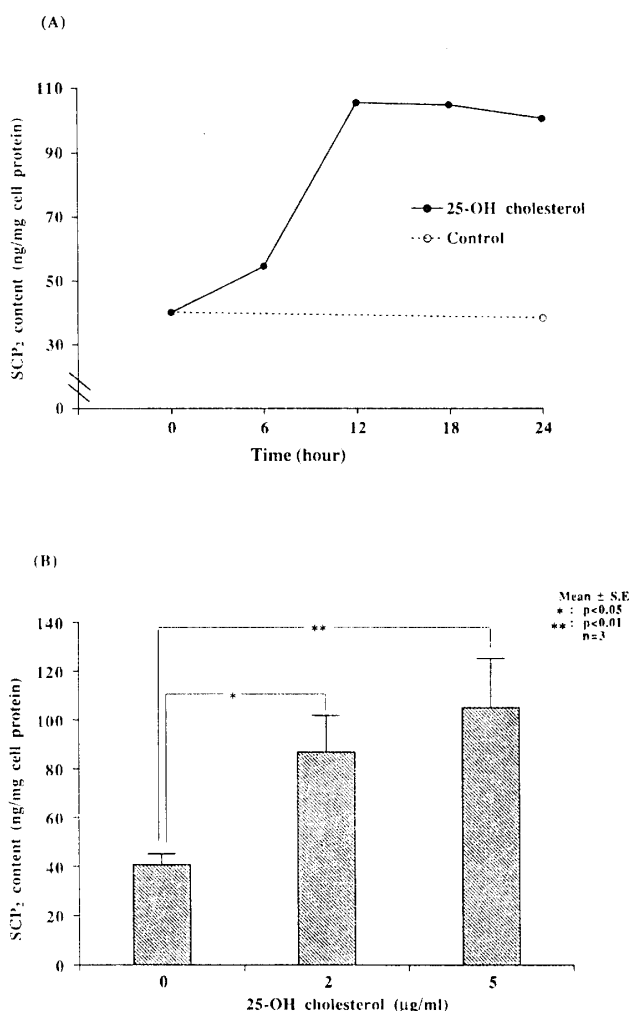


図6: (A) 25-OH Cholesterol を5 μ g/ml 添加培養時のラット腹腔マクロファージ中の SCP₂ 含量の経時的变化。

(B) 25-OH Cholesterol の添加量を変えた時のラット腹腔マクロファージ中の SCP₂ 含量の変動。

図7はスカベンジャー受容体を介したマクロファージ活性化因子として知られる Mal-BSA のラット腹腔マクロファージ中 SCP₂ 含量に及ぼす影響を示す。25-OH cholesterol (5 μ g/ml) 添加により SCP₂ 含量が非添加時に比べ2.5倍に増加したのとは異なり、Mal-BSA (300 μ g/ml) 添加は SCP₂ 含量に影響を与えなかった。

図8は25-OH Cholesterol 添加時と Mal-BSA 添加時のラット腹腔マクロファージにおける、SCP₂ の mRNA の Northern blot 解析の結果を示す。25-OH cholesterol (5 μ g/ml) 添加時の SCP₂ の蛋白レベルの増加は Northern blot 解析

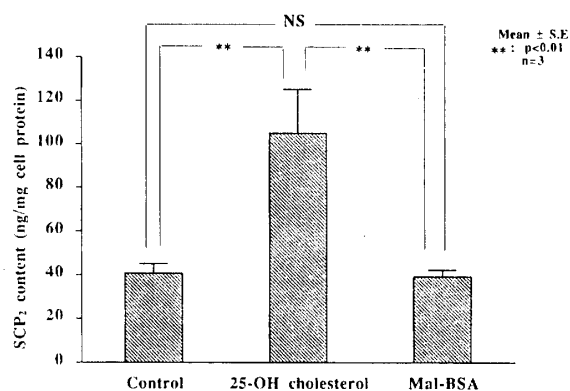


図7: Mal-BSA のラット腹腔マクロファージ中 SCP₂ 含量に及ぼす影響。control: 培養液のみ, 25-OH Cholesterol: 25-OH Cholesterol 5 μ g/ml 添加培養時, Mal-BSA: Mal-BSA 300 μ g/ml 添加時。

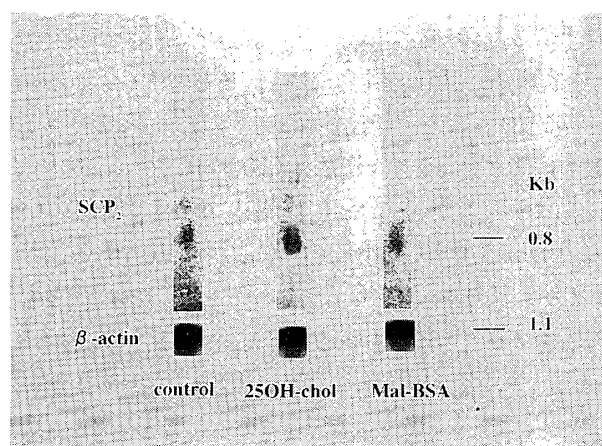


図8: 25-OH Cholesterol 添加時と Mal-BSA 添加時のラット腹腔マクロファージの SCP₂ mRNA の Northern blot 解析の結果。control: 培養液のみ, 25OH-cho: 25-OH Cholesterol 5 μ g/ml 添加培養時, Mal-BSA: Mal-BSA 300 μ g/ml 添加時。

にて SCP₂ mRNA レベルの増加をともなっていた。一方、Mal-BSA (300 μ g/ml) 添加では蛋白レベル同様、SCP₂ mRNA レベルにも影響を与えなかった。

IV 考 案

動脈硬化病巣における脂質沈着機構、とくにマクロファージの泡沫細胞形成における細胞内脂質転送蛋白の役割を解明する目的で今回の研究を行った。SCP₂ がラット腹腔マクロファージ中に存在し、Ac-LDL によるマクロファージ泡沫細胞形成過程において SCP₂ 含量が増加することはすでに明らかにされている。そこで、本研究では泡沫細胞形成過程における SCP₂ の遺伝子発現とその調節機構に的を絞って検討を加えた。

まず、SCP₂ の遺伝子発現について Northern blot 解析をおこなったところ、SCP₂ が最も多く分布するラット肝臓においては 4 種の mRNA すなわち 0.8, 1.4, 2.1, 2.7kb のバンドが認められた。この成績は既存の研究結果と一致している。Sheedorf and Assmann[21], Ossendorp ら[24] は、これら 4 種の mRNA は一つの遺伝子から、differential splicing および alternative adenylation により生ずると報告している。0.8 と 1.4kb のバンドは 15kDa の Pre-SCP₂ 蛋白をコードしているとされ、Pre-SCP₂ は翻訳後にアミノ酸残基が取れ成熟 SCP₂ となるとされている[25,26]。2.1 と 2.7kb のバンドは SCP₂ 抗体と交叉反応を示すいわゆる 58kDa 蛋白をコードしているとされている[21]。ラット腹腔マクロファージにおける検討では、SCP₂ の mRNA は 0.8kb のバンドとして認められたが、ラット肝臓と異なり 2.1, 2.7kb の 58kDa の蛋白をコードするとされる mRNA は、ほとんど検出できなかった。Ac-LDL により腹腔マクロファージが泡沫化する際の SCP₂ 蛋白量の変動について、Western blot 解析、および EIA 法による SCP₂ 微量定量を行ったところ、既報と同様な SCP₂ 蛋白量の増加が認められた。その際 Northern blot 解析にて、SCP₂ の mRNA の増加が認められたことより泡沫細胞形成過程における SCP₂ 蛋白の増加は遺伝子発現の増強による可能性が考えられた。

次に Ac-LDL によりマクロファージが泡沫化する過程において SCP₂ 遺伝子発現がどのような機序により増強されるのかについて検討した。Ac-LDL による泡沫細胞形成過程において SCP₂ が増加した機序としては、二つの可能性、すなわち、Ac-LDL の取り込みにより細胞内コレステロールが増加したことにより SCP₂ が増加した可能性と、スカベンジャー受容体への Ac-LDL の結合シグナルによってマクロファージが活性化された結果 SCP₂ が増加した可能性が考えられた。まず前者の可能性についてであるが、今回の検討では、Ac-LDL を取り込んだマクロファージでは、遊離コレステロールとコレステロールエステルの両者の増加が認められた。そこで、遊離コレステロールの増加とコレステロールエステルの増加のどちらが SCP₂ 遺伝子発現に重要であるか調べるため、まず、ACAT 阻害剤の EAB-309 を用いて SCP₂ の蛋白量および遺伝子発現におよぼす影響を検討した。ACAT 阻害剤の EAB-309 の添加により Ac-LDL を取り込んだ際のコレステロールエステルの増加を抑制し、細胞内遊離コレステロールが著明に増加した条件では、Ac-LDL による SCP₂ 遺伝子発現増強は抑制されずむしろさらなる増強が認められた。このことからマクロファージの SCP₂ 遺伝子発現に重要なのは、細胞内コレステロールエステルの増加ではなくむしろ遊離コレステロールの増加であることが示唆された。

つぎに泡沫細胞形成過程における SCP₂ の遺伝子発現増強が細胞内コレステロールの増加によるのか、あるいはスカベンジャー受容体への変性 LDL の結合によるマクロファージの活性化のいずれによるのかについて検討を加えた。まず第一の可能性について、細胞内コレステロールにより発現調節をうける Apo-E, LDL 受容体, HMG CoA reductase などの蛋白質の遺伝子発現調節の解析に広く用いられている oxysterol の一種である 25-OH cholesterol を用いて検討を加えた。25-OH cholesterol は用量依存的、経時的にマクロファージの SCP₂ 含量および mRNA レベルを増加させることがはじめて明らかになった。25-OH cholesterol は、Apo-E, LDL 受容体, HMG CoA reductase などの蛋白質の遺伝子発現を、コレステロール自体よりも強く促進または

抑制することがすでに諸家により報告されている[27-31]。従って今回の成績はマクロファージにおける SCP₂ の遺伝子発現がコレステロールあるいはその代謝産物である oxysterol により調節されていることをはじめて明らかにした点で極めて注目される。次に、第二の可能性、すなわちスカベンジャー受容体への変性 LDL の結合シグナルによるマクロファージの活性化が SCP₂ の遺伝子発現を増強した可能性について、Ac-LDL と同様マクロファージのスカベンジャー受容体に結合し細胞内に取り込まれ、マクロファージ活性化作用を有する Mal-BSA をもちいて検討した。しかしながら、Mal-BSA は 25-OH cholesterol と異なり今回の検討ではマクロファージの SCP₂ 含量と mRNA レベルに全く影響を与えなかった。従って Ac-LDL による SCP₂ 遺伝子発現増強にスカベンジャー受容体への結合刺激の関与は否定的と考えられた。

今回の一連の検討により Ac-LDL の取り込みによる SCP₂ 遺伝子発現増強の機序としては、スカベンジャー受容体への変性 LDL の結合刺激ではなく、変性 LDL の取り込みによる細胞内遊離コレステロールの増加が重要であることがはじめて明らかにされた。近年 LDL 受容体、HMG CoA reductase、Apo-E などのコレステロール代謝に関与する種々の蛋白について、細胞内コレステロールによる遺伝子発現の研究が盛んに行われている[32,33]。細胞内コレステロールの増加は、LDL 受容体やコレステロール合成の律速酵素である HMG CoA reductase の遺伝子発現を抑制し[34]、コレステロールの細胞外放出に関与すると考えられる Apo-E 蛋白の遺伝子発現を増強させることが明らかとされている[35]。また LDL 受容体、HMG CoA reductase の遺伝子では、5' 端側のプロモーター領域にステロール反応性エレメント (sterol responsive element: SRE) が存在し、コレステロールによる発現調節に関わっているとされている[27]。最近、Goldstein らは LDL 受容体、HMG CoA synthase 遺伝子のプロモーター領域におけるエンハンサーである SRE-1 を認識する蛋白として sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) を報告している。今後は、SCP₂ の遺伝子プロモーター領

域のコレステロールによる発現調節機構の解析が期待される[36]。

マクロファージの泡沫細胞形成過程における SCP₂ の役割に関する研究は始まったばかりである。マクロファージの泡沫化の際、細胞内コレステロールを介して遺伝子発現増強される SCP₂ が、泡沫細胞形成過程においてどのような役割を果たしているかということは動脈硬化の脂質沈着機構の解明において、極めて重要な研究課題と考えられる。マクロファージは Ac-LDL により泡沫細胞化する際、ACAT によるコレステロールエステル化反応は著明に活性化されることは広く知られている[2]。SCP₂ は in vitro で外因性に添加されたコレステロールの ACAT によるコレステロールエステル化反応を促進することが肝臓、腸管、副腎皮質などの種々の組織で明らかになっている[37,38,11]。またマクロファージにおいても、SCP₂ が外因性に添加されたコレステロールの ACAT によるコレステロールエステル化反応を促進する作用のあることが最近明らかにされており[13]、泡沫細胞形成過程において SCP₂ が ACAT に対して促進的役割を担っている可能性も十分に考えられ、今後検討すべき課題のひとつである。一方、Apo-E 蛋白はマクロファージにおいてコレステロールにより遺伝子発現増強をうけ、マクロファージからのコレステロール放出に関与すると考えられている[35,39]。Apo-E 蛋白同様、コレステロールにより遺伝子発現増強をうける SCP₂ もマクロファージからのコレステロールのくみ出し、逆転送系に関与する可能性もあり、今後は、マクロファージ培養細胞系をもちいて遺伝子工学的手法により、泡沫細胞形成過程における SCP₂ の役割の解明が望まれる。

以上、今回の研究により Ac-LDL によるマクロファージの泡沫細胞形成過程において SCP₂ 遺伝子の発現が増強されること、その機序として細胞内コレステロールレベルの上昇が重要であることが明らかになった。この知見は SCP₂ の泡沫細胞形成過程における重要性を示唆し、動脈硬化の脂質沈着過程の病因を解明する上で重要なものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました千葉大学医学部内科学第二講座齋藤康教授ならびに、直接御指導、御援助頂いた千葉大学医学部内科学第二講座講師平井愛山博士に感謝いたします。

SUMMARY

One of the most important steps in the atherosclerosis is the foam cell formation in macrophages by modified LDL. Sterol carrier protein₂ (SCP₂) is thought to be one of highly touted candidate for an intracellular cholesterol carrier. It has been previously reported that incubations with Ac-LDL cause an increase of SCP₂ content in rat peritoneal macrophages during foam cell formation. The present study was designed to clarify the mechanism of the Ac-LDL-induced increase in SCP₂ content in macrophages.

Western blot analysis and Northern blot analysis demonstrated that both SCP₂ protein and its mRNA are expressed in rat peritoneal macrophages. Incubations with Ac-LDL caused an increase of cellular cholesterol (free cholesterol and cholesterol esters) and SCP₂ content in rat peritoneal macrophages. Furthermore, SCP₂ mRNA level was also increased by Ac-LDL treatment.

The inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase further enhanced Ac-LDL-induced increase of SCP₂ protein and its mRNA. Incubations with 25-OH cholesterol also caused a dose-dependent stimulation of SCP₂ gene expression in macrophages, while incubation with Mal-BSA had no effect. These results suggest that increased cellular free cholesterol content is responsible for the enhancing SCP₂ and its gene expression in macrophages.

文 献

- 1) Schaffner T, Taylor K, Bartucci E, Fischer-Dzoga K, Beeson JH, Glagov S and Wissler RW: Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am J Pathol* **100**: 57-73, 1980.
- 2) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK and Brown MS: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Nat Acad Sci USA* **76**: 333-337, 1979.
- 3) Liscum L and Dahl NK: Intracellular Cholesterol Transport. *J Lipid Res* **33**: 1239-1254, 1992.
- 4) Tabas I, Boykow GC and Tall AR: Foam cell-forming J774 macrophages have markedly elevated acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase activity compared with mouse peritoneal macrophages in the presence of low density lipoprotein (LDL) despite similar LDL receptor activity. *J Clin Invest* **79**: 418-426, 1987.
- 5) Noland BJ, Arebalo RE, Hansbury E and Scallen TJ: Purification and properties of sterol carrier protein 2. *J Biol Chem* **255**: 4282-4289, 1980.
- 6) Wirtz KW and Jr Gadella TW: Properties and modes of action of specific and non-specific phospholipid transfer proteins. *Experientia* **46**: 592-599, 1990.
- 7) Kharroubi A, Wadsworth JA, Chanderbhan R, Wiesenfeld P, Noland B, Scallen T, Vahouny GV and Gallo LL: Sterol carrier protein 2-like activity in rat intestine. *J Lipid Res* **29**: 287-292, 1988.
- 8) Chanderbhan R, Tanaka T, Strauss JF, Irwin D, Noland BJ, Scallen TJ and Vahouny GV: Evidence for sterol carrier protein 2-like activity in hepatic, adrenal and ovarian cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* **117**: 702-709, 1983.
- 9) Seltman H, Diven W, Rizk M, Noland BJ, Chanderbhan R, Scallen TJ, Vahouny G and Sanghvi A: Regulation bile-acid synthesis. *Biochem J* **230**: 19-24, 1985.
- 10) Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Irwin D, Dennis P, Lambeth JD and Scallen TJ: Sterol carrier protein 2. Identification of adrenal sterol carrier protein 2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. *J Biol Chem* **258**: 11731-11737, 1983.
- 11) Ban T, Hirai A, Kino T, Oeda T, Fujiki Y, Tamura Y and Yoshida S: Sterol carrier protein 2 (SCP₂)-like protein in rat aorta. *Artery* **18**: 54-70, 1991.
- 12) Chanderbhan RF, Kharroubi AT, Noland BJ, Scallen TJ and Vahouny GV: Sterol carrier protein 2: further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* **12**: 351-370, 1986.
- 13) 木野智重: ラット腹腔 Macrophage の Acetylated LDL (Ac-LDL) による泡沫化過程に於ける細胞内脂質転送蛋白 (Sterol Carrier Protein 2: SCP₂) の動態. *千葉医学* **70**: 303-313, 1994.
- 14) Saitoh I, Saitoh H, Tamura Y and Yoshida S: EPA inhibits cholesterol ester accumulation in rat peritoneal macrophages by decreasing the number of specific binding sites of acetyl LDL. *Clin Biochem* **25**: 351-355, 1992.
- 15) Sekiya T, Inoue S, Shirasaka T, Miyajima

- C, Okushima H, Suzuki K, Kawai M, Mitsuka M and Umezu K.: Synthesis and pharmacological activities of novel optically active inhibitors of acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase: EAB-309 ((R)-N-2 (1,3-benzodioxol-4-yl) heptyl-N'-2, 6-diisopropyl-phenylurea) and its enantiomer. *Chem Pharm Bull* **42**: 586-591, 1994.
- 16) Bulter PJG, Harris JI, Hartley BS and Leberman R: The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains. *Biochem J* **112**: 679-689, 1968.
 - 17) Oeda T, Hirai A, Ban T, Tamura Y and Yoshida S: TSK-Toyopearl gels for the preparative separation of sterol carrier protein 2 from rat liver. *J Chromatogr* **48**: 117-123, 1989.
 - 18) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491, 1988.
 - 19) Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
 - 20) Billheimer JT, Strehl LL, Davis GL, Strauss III JF and Davis LG: Characterization of a cDNA encoding rat sterol carrier protein 2. *DNA Cell Biol* **9**: 159-65, 1990.
 - 21) Sheedorf U and Assmann G: Cloning, expression, and nucleotide sequence of rat liver sterol carrier protein 2 cDNAs. *J Biol Chem* **266**: 630-6, 1991.
 - 22) Auffray C and Rougen F: Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem* **107**: 303-314, 1980.
 - 23) Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* **72**: 248-254, 1976.
 - 24) Ossendorp BC, van Heusden GP, de Beer AL, Bos K, Schouten GL and Wirtz KW: Identification of the cDNA clone which encodes the 58-kDa protein containing the amino acid sequence of rat liver non-specific lipid-transfer protein (sterol carrier protein 2). Homology with rat peroxisomal and mitochondrial 3-oxoacyl-CoA thiolases. *Eur J Biochem* **201**: 233-9, 1991.
 - 25) Fujiki Y, Tsuneoka M and Tashiro Y: Biosynthesis of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) on free polyribosomes as a larger precursor in rat liver. *J Biochem (Tokyo)* **106**: 1126-1131, 1989.
 - 26) Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV and Waterman MR: Studies on the synthesis of sterol carrier protein-2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture. Regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP. *J Biol Chem* **262**: 3713-7, 1987.
 - 27) Goldstein J and M Brown: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430, 1990.
 - 28) Mazzone T, Gump H and Diller P: Macrophage Free Cholesterol Content Regulates Apolipoprotein E Synthesis. *J Biol Chem* **262**: 11657-11662, 1987.
 - 29) Smith LL and Johnson BH: Biological activities of oxysterols. *Free Radic Biol Med* **7**: 285-332, 1989.
 - 30) Takagi K, Alvarez JG, Favata MF, Trzaskos JM and Straus JF: Control of low density lipoprotein receptor gene activity. *J Biol Chem* **264**: 12352-12357, 1989.
 - 31) Miller SC and Melnykovich G: Regulation of cholesterol biosynthesis and esterification by 25-hydroxy cholesterol in a macrophage-like cell line: uncoupling by progesterone. *J Lipid Res* **25**: 991-999, 1984.
 - 32) Dawson PA, Hoffman SL, Vanderwesthuyzen TC, Sudhof MS, Brown MS, and Goldstein JL: Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem* **263**: 3372-3379, 1988.
 - 33) Osborne TF, Gil G, Goldstein JL and Brown MS: Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J Biol Chem* **263**: 3380-3387, 1988.
 - 34) Brown MS and Goldstein JL: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47, 1986.
 - 35) Mazzone T, Basheeruddin K and Poulos C: Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J Lipid Res* **30**: 1055-1064, 1989.
 - 36) Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS and Goldstein JL: Nuclear Protein That Binds Sterol Regulatory Element of Low Density Lipoprotein Receptor Promoter. *J Biol Chem* **268**: 14490-14496, 1993.
 - 37) Gavey KL, Noland BJ and Scallen TJ: The participation of sterol carrier protein 2 in the conversion of cholesterol to cholesterol ester by rat liver microsomes. *J Biol Chem* **256**: 2993-2999, 1981.
 - 38) Oeda T, Hirai A, Ban T, Tamura Y and Yoshida S: The participation of sterol carrier protein 2 in cholesterol esterification in rat adrenal microsomes. *Endocrinol Jpn* **37**: 285-292, 1990.
 - 39) Basu SK, Goldstein JL and Brown MS: Independent pathway for secretion of cholesterol and apolipoprotein E by macrophages. *Science* **218**: 871-873, 1983.