

表 題 アシル-CoA コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT1)欠損マウスの皮膚黄色腫、動脈硬化病変形成におけるインフラマソームの役割に関する研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 若林 徹治

担当指導教員氏名 自治医科大学 内科学講座 内分泌代謝学部門 教授
石橋 俊

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
内分泌代謝疾患・病態解析学
代謝疾患学

2018年1月10日申請の学位論文

目次

1. 要旨	1
2. 略語一覧	4
3. 研究の背景と目的	5
3-1. 動脈硬化の形成	5
3-2. マクロファージのコレステロール代謝	6
3-3. ACAT(アシル CoA : コレステロール・アシルトランスフェラーゼ)	7
3-4. ACAT に関するこれまでの知見	8
3-5. NLRP3 インフラマソーム	9
3-6. 研究の目的	10
4. 研究の方法	11
4-1. 骨髄移植モデルの作成	11
4-2. 血漿脂質の測定とリポ蛋白解析	12
4-3. CT スキャン	12
4-4. 動脈硬化病変の解析	12
4-5. 組織学的解析	13
4-6. リポ蛋白とコレステロール結晶の調整	13
4-7. 細胞培養実験	14
4-8. コレステロール含量の測定	14
4-9. リアルタイム PCR 解析	15
4-10. IL-1 β ELISA	16
4-11. 統計学的解析	16
5. 研究の結果	17
5-1. in vivo	17
5-1-1. 骨髄移植モデルの作成	17
5-1-2. 体重および血漿脂質の評価	18
5-1-3. 動脈硬化病変の評価	20
5-1-4. 骨髄細胞以外の ACAT1 欠損モデルでの評価	22
5-1-5. 皮膚病変の表現型	23
5-1-6. 皮膚病変の評価	25
5-2. in vitro	28
5-2-1. コレステロール結晶によるインフラマソームの誘導	28
5-2-2. 泡沫化能の評価	29
5-2-3. 遊離コレステロールによるインフラマソームの誘導	31
5-2-4. 遊離コレステロールによる CHOP、TNF α の誘導	32
6. 考察	33

7. 結語	37
8. 謝辞	38
9. 引用文献	39

1. 要旨

[背景]

動脈硬化形成の初期過程として、マクロファージに脂質が蓄積した泡沫細胞が観察される。マクロファージに取り込まれたリポ蛋白中のコレステロールエステルは、リソソームにて遊離コレステロールに分解される。遊離コレステロールは小胞体でアシル CoA コレステロールアシルトランスフェラーゼ 1(ACAT1)により、再びコレステロールエステルとなり細胞質内に蓄積して泡沫化する。本研究室で作製した全身性 ACAT1 欠損マウスは、泡沫化の抑制により、動脈硬化を抑制する一方で、皮膚黄色腫を来した。また、他の研究室の骨髄移植法を用いた骨髄細胞特異的 ACAT1 欠損マウスでは、同様の皮膚黄色腫が認められる一方、動脈硬化の増悪が報告された。

皮膚黄色腫形成機序については、皮下のマクロファージが取り込んだリポ蛋白由来コレステロールを ACAT1 が欠損しているためエステル化できず、その結果、細胞内に過剰に蓄積した遊離コレステロールが、細胞死や炎症を来す可能性が考えられた。

一方、動脈硬化形成機序として、コレステロール結晶によるインフラマソーム活性化の関与が近年報告された。ACAT1 の欠損は、細胞内に遊離コレステロールを増加させるため、それによるインフラマソームの活性化が、皮膚黄色腫や動脈硬化形成に関わっている可能性がある。

[目的]

骨髄移植法を用いて作製した骨髄細胞特異的 ACAT1 欠損マウスの皮膚黄色腫や動脈硬化形成におけるインフラマソームの関与を明らかにする。

[方法]

①骨髄移植法による動脈硬化の評価

8 週齢の野生型マウス、ACAT1 欠損マウス、インフラマソーム欠損マウス(NLRP3 欠損マウス)、ACAT1/NLRP3 二重欠損マウスをドナーとして骨髄細胞を採取する。この骨髄細胞を放射線照射後の 8 週齢の高コレステロール血症モデルマウス(LDL 受容体欠損マウス;LDLrKO)をレシピエントとして移植する。移植を受けた LDL 受容体欠損マウスに 12 週齢から高コレステロール食を負荷し、血中リポ蛋白プロフィール、皮膚病変、および動脈硬化病変を評価する。ACAT1 欠損によって誘発される皮膚病変が、インフラマソーム欠損により改善するか、また動脈硬化形成への寄与について検討する。

②マクロファージにおけるインフラマソーム誘導、泡沫化能の評価

野生型マウス、ACAT1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス、ACAT1/NLRP3 二重欠損マウスからチオグリコール酸誘導腹腔マクロファージ(MPM)を採取する。

i) 培地にコレステロールクリスタルを添加し、MPM のインフラマソーム活性化により産生が誘導される IL-1 β の培地中の濃度を評価する。

ii) 培地にアセチル化 LDL を添加し、コレステロールエステルと遊離コレステロール細胞内含量を評価する。

iii) ii) の条件で、培地中の IL-1 β 濃度と諸種の炎症性サイトカインや小胞体ストレスマーカー CHOP の遺伝子発現を qPCR にて評価する。

[結果]

野生型マウス、ACAT1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス、ACAT1/NLRP3 欠損マウスの骨髓細胞を、 γ 線 9Gy 照射した LDL 受容体欠損マウスに移植し(各群 11~13 匹、それぞれ Wild BMT、ACAT1KO BMT、NLRP3KO BMT、DKO BMT と表記)、高コレステロール食を負荷したところ、体重や血漿脂質は 4 群間に差は認めなかった。Wild BMT に比し NLRP3KO BMT の、ACAT1KO BMT に比し DKO BMT の動脈硬化病巣面積の有意な縮小を認めた：大動脈起始部横断面における病巣面積($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)；Wild BMT：25.0 \pm 8.2、NLRP3KO BMT：15.6 \pm 8.6、ACAT1KO BMT：36.7 \pm 4.9、DKO BMT：27.4 \pm 10.2。また、ACAT1KO BMT と DKO BMT では動脈硬化病巣の Oil red O 染色性が低下し、中性脂質の乏しい病巣を呈した。四肢の皮膚容積は ACAT1KO BMT が Wild BMT に比して有意に増加したが、DKO BMT は Wild BMT と差が無かった。ACAT1KO BMT の皮膚では、皮下組織へのマクロファージなどの炎症細胞の浸潤やコレステロール空隙を伴う壊死巣などの病理学像を呈し、炎症性マクロファージのマーカーである MCP-1 \cdot TNF α \cdot IL-6 や、小胞体ストレスマーカーである CHOP、インフラマソームがその分泌に関与する IL-1 β などの遺伝子発現の亢進が確認された。これらの変化は DKO BMT では改善した。

野生型マウス、ACAT1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス、ACAT1/NLRP3 二重欠損マウスから MPM を採取し(それぞれ、Wild MPM、ACAT1KO MPM、NLRP3KO MPM、DKO MPM と表記)、コレステロール結晶や ATP といった既知のインフラマソーム誘導物質を培地中に添加したところ、NLRP3KO MPM や DKO MPM では IL1 β の分泌自体をほとんど認めず、Wild MPM と ACAT1KO MPM では IL1 β の分泌量が増加したが、両群間に差は認められなかった。培地中にアセチル化 LDL を添加したところ、Wild MPM と NLRP3KO MPM では同等のコレステロールエステルの蓄積が認められたのに対し、ACAT1KO MPM と DKO MPM ではコレステロールエステルの蓄積はほとんど認めず、遊離コレステロール含量が有意に増加した。アセチル化 LDL を添加し

たいずれの腹腔マクロファージにおいても IL-1 β の分泌亢進は認められなかったが、ACAT1KO MPM と DKO MPM では Wild MPM と NLRP3KO MPM と比較し、CHOP や TNF α の遺伝子発現の亢進が認められた。

[考察]

骨髄由来細胞特異的 ACAT1 欠損モデルで認められた皮膚病変は NLRP3 欠損の導入によりほぼ完全に消退したことから、インフラマソーム活性化を介した炎症が惹起された結果、皮膚黄色腫の形成が促進されたと考えられた。動脈硬化病変に関しては、ACAT1 欠損の有無によらず、NLRP3 欠損マウスの移植モデルにおいて病巣面積縮小が認められたことから、動脈硬化形成にも部分的にインフラマソームが寄与していることが示唆された。

ACAT1 欠損 MPM にアセチル化 LDL を添加すると、遊離コレステロールの含量は増加する一方、IL-1 β の分泌亢進が認められず、細胞内遊離コレステロールの蓄積が NLRP3 インフラマソームを直接活性化する可能性は否定的であった。この時、ACAT1 欠損 MPM における CHOP や TNF α の遺伝子発現は亢進していた。遊離コレステロール蓄積による小胞体ストレスなどから導かれた細胞死により、コレステロール結晶や ATP といった危険シグナルが放出され、その結果、周囲の細胞の NLRP3 インフラマソームが間接的に活性化される機序が考えられた。

[結論]

骨髄由来細胞における ACAT1 欠損は、主に NLRP3 インフラマソームを介して高コレステロール血症に随伴する皮膚黄色腫の形成を惹起する。一方、ACAT1 欠損による動脈硬化形成には NLRP3 インフラマソームの関与は限定的である。ACAT1 欠損による細胞内遊離コレステロールの蓄積は小胞体ストレスなどで細胞死を招き、死細胞からの危険シグナルによって間接的に NLRP3 インフラマソームを活性化させている可能性が示唆された。

2. 略語一覧

本論文において、以下の略語を用いた。

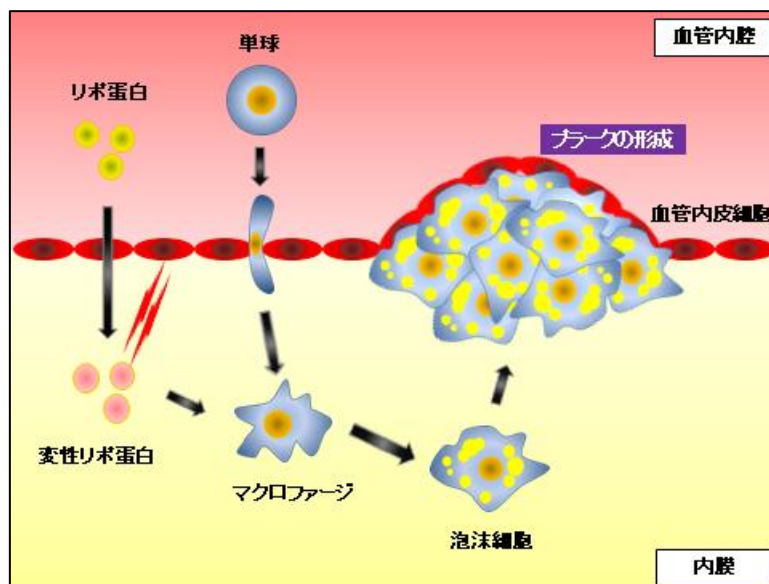
ACAT ; acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
ATP ; adenosine 5' - triphosphate disodium salt hydrate
Apo ; apolipoprotein
BMT ; bone marrow transplantation
CD ; cluster of differentiation
CE ; cholesteryl ester
CHOP ; C/EBP homologous protein
CT ; computed tomography
DAMP ; damage-associated molecular pattern
EDTA ; ethylenediamine-tetraacetic acid
FC ; free cholesterol
HE ; Hematoxylin and Eosin
HPLC ; high performance liquid chromatography
IL ; interleukin
LDL ; low density lipoprotein
LDLr ; LDL receptor
LPS ; lipopolysaccharide
Ly6G ; lymphocyte antigen 6 complex, locus G
MCP-1 ; monocyte chemoattractant protein-1
MOMA-2 ; Monocyte/Macrophage-2
MPM ; mouse peritoneal macrophage
NLRP3 ; NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
PAMP ; pathogen-associated molecular pattern
PBS ; phosphate buffered saline
PCR ; polymerase chain reaction
PMSF ; phenylmethylsulfonyl fluoride
SR ; scavenger receptor
TC ; total cholesterol
TG ; triglyceride
TLR ; Toll like receptor
TNF α ; tumor necrosis factor- α
VLDL ; very low density lipoprotein

3. 研究の背景と目的

3-1. 動脈硬化の形成

近年、心筋梗塞や脳卒中といった心血管疾患が世界的に増加傾向にあり、死因の大部分を占めるようになってきた。こうした疾患の大部分は、動脈硬化の進行によって引き起こされることから、動脈硬化の予防は現代人の健康にとって不可欠である。しかし、そのメカニズムについては未解明な点も多い。

加齢や高血圧・糖尿病などの生活習慣病あるいは感染症などによって血管内皮細胞が障害を受けると、血液中の LDL を中心としたリポ蛋白が血管内膜下の細胞外基質に沈着する。沈着したリポ蛋白が酸化変性を受けると、内皮細胞に接着因子が発現するようになり、血液中の単球が内膜下に走化・侵入し、マクロファージへと分化する。マクロファージはスカベンジャー受容体を介して変性したリポ蛋白を際限なく取り込み、細胞内でコレステロールエステルとして蓄積させる。脂肪滴として観察されるほど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は泡沫細胞と呼ばれる。泡沫細胞が多数出現するようになると、血管内で盛り上がった黄色調の病変として肉眼的にも観察される粥腫(プラーク)が形成され、これが動脈硬化形成の初期段階と考えられている(図 1)⁽¹⁾。

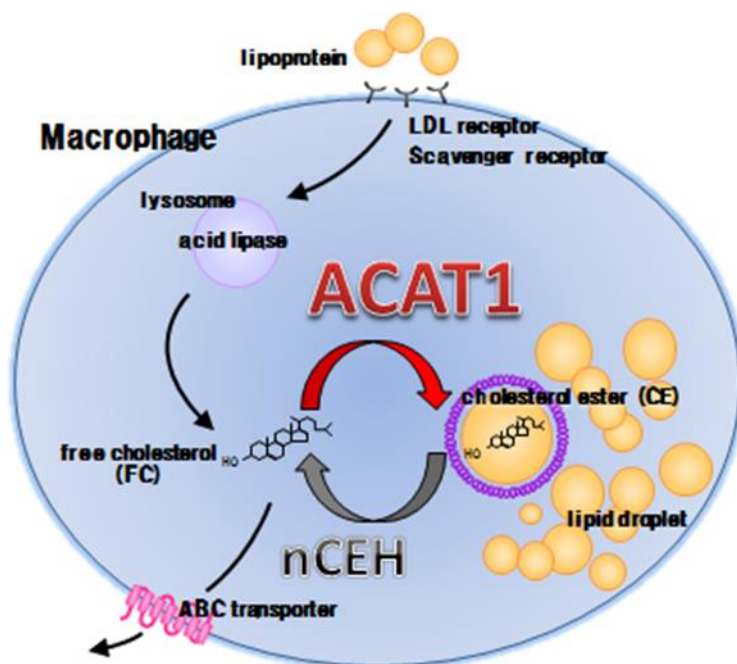


(図 1)動脈硬化の形成初期

動脈硬化の初期は、泡沫化したマクロファージの集簇に特徴付けられる。

3-2. マクロファージのコレステロール代謝

動脈硬化病変において、マクロファージは変性したリポ蛋白を SR-A I / II を代表とする様々なスカベンジャー受容体を介して細胞内に取り込む。取り込まれたリポ蛋白中のコレステロールエステルはライソゾームの酸性リパーゼ (lysosomal acid lipase : LAL) による水解を受けて、遊離コレステロールと脂肪酸に分解される。遊離コレステロールの一部は細胞膜の構成成分などとして利用されるものもあるが、大部分は小胞体上に存在するアシル CoA : コレステロール・アシルトランスフェラーゼ 1 (ACAT1) によって再エステル化され、コレステロールエステルとして細胞質内に蓄積される。また、細胞質には中性コレステロールエステル水解酵素 (neutral cholesterol ester hydrolase : nCEH) 活性があり、コレステロールエステルは遊離コレステロールに水解され、細胞外にある apoA I などへ ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) を介して流出される経路も存在する (図 2)⁽²⁾。



(図 2)マクロファージのコレステロール代謝

細胞内コレステロールの恒常性を保つために様々な因子が関わっている。

3-3. ACAT(アシル CoA : コレステロール・アシルトランスフェラーゼ)

ACATは、コレステロールの3位の水酸基にアシルCoAから脂肪酸を転移し、コレステロールエステル合成を触媒する細胞内小胞体酵素である。

ACATには、ACAT1とACAT2の2つのアイソザイムがあるが、生体内におけるそれぞれの組織分布には動物種による違いが見られる。ACAT1は、ヒトを含む霊長類、マウス、ラットにおいて生体内に広く分布し、特に副腎やマクロファージなどに高発現している。一方、ACAT2はヒトにおいては主に小腸に、ヒトを除く霊長類、マウス、ラットなどでは小腸および肝臓に局限している。ヒトの肝臓ではACAT1・ACAT2共に発現が認められ、何らかの役割分担をしている可能性がある。

ACAT活性が重要な生理的役割をもつ細胞・臓器として、肝臓、小腸、マクロファージ、ステロイドホルモン産生臓器(副腎や精巣・卵巣)が挙げられる。ACATにより生成されたコレステロールエステルは、リポタンパクの構成要素として、肝臓ではVLDLの、小腸ではカイロミクロンの分泌に寄与し、ステロイドホルモン産生細胞では原料となるコレステロールをコレステロールエステルとして合成・貯蔵するのに寄与している。また、動脈硬化病変ではマクロファージの泡沫化に重要な役割を担っている⁽³⁾。

3-4. ACAT に関するこれまでの知見

ACAT を阻害あるいは欠損させることは、小腸でのコレステロール吸収阻害、肝臓での VLDL 合成抑制、血管壁におけるマクロファージ泡沫化の抑制、という 3 つの作用から高コレステロール血症や動脈硬化の治療ターゲットとして期待され、これまで様々な研究がなされてきたが、その有効性に関しては未だ議論がある。実験動物に対しては、選択的 ACAT1 阻害剤ならびに非選択的 ACAT 阻害剤にて動脈硬化を抑制できた研究も多いが⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾、ヒトに対しては、これまで ACAT 阻害剤の動脈硬化に対する有効性を示せた臨床試験は存在しない⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。遺伝子改変マウスを用いた研究でも相反する結果を示す報告があり、我々は動脈硬化モデルマウスを ACAT1 欠損マウスと交配すると動脈硬化が改善することを過去に報告しているが⁽¹³⁾、骨髄移植法を用いた骨髄細胞特異的 ACAT1 欠損マウスにて動脈硬化が増悪するという結果が報告されている⁽¹⁴⁾。また、最近では Cre-LoxP システムを用いて作成した骨髄系細胞特異的 ACAT1 欠損モデルでは、動脈硬化が改善するという報告もあり⁽¹⁵⁾、動脈硬化における ACAT1 の役割については未だ一定の見解が得られていない。

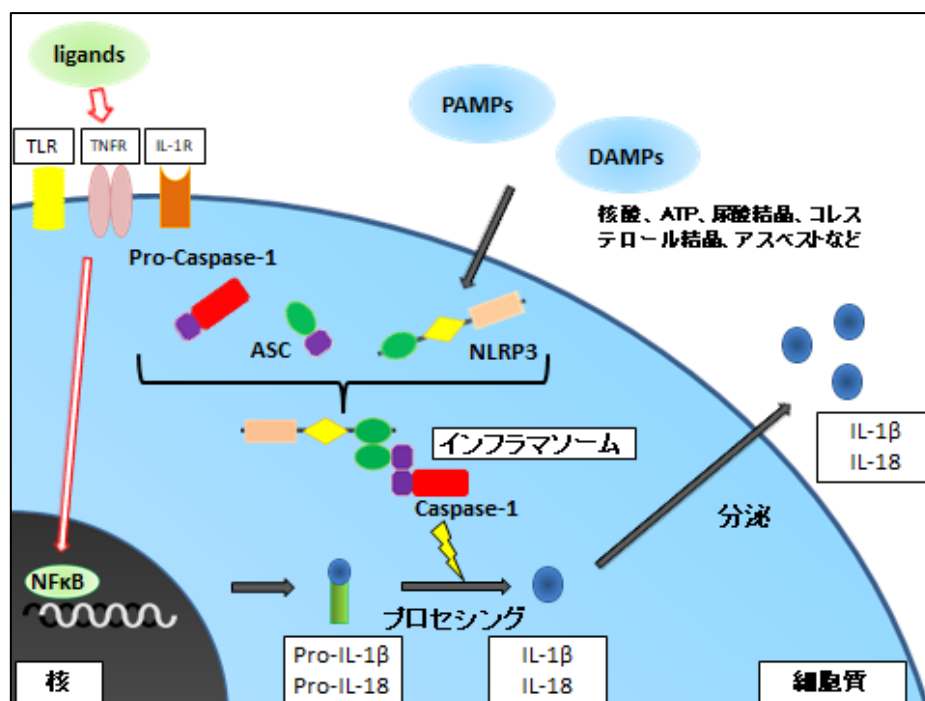
一方、興味深いことに、我々が報告した全身性 ACAT1 欠損マウスでも、骨髄移植法を用いた骨髄細胞特異的 ACAT1 欠損マウスや Cre-LoxP システムを用いた骨髄系細胞特異的 ACAT1 欠損マウスでも、血清コレステロール値が上昇すると、顕著な皮膚症状を呈することが共通して報告されている⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。組織学的には、皮下に炎症細胞浸潤とコレステロール結晶を認め、皮膚黄色腫と類似する病変と考えられる。

このように動脈硬化が必ずしも改善しないこと、また皮膚病変が出現することに関しては、ACAT1 阻害によって細胞内遊離コレステロールが蓄積することによる細胞毒性が考えられている。実際、マクロファージに ACAT 阻害薬と変性リポ蛋白を添加し、細胞内遊離コレステロールを蓄積させると CHOP や TNF α ・IL-6 といった遺伝子発現が亢進するという報告がなされている⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾。

3-5. NLRP3 インフラマソーム

動脈硬化は血管壁への過剰な脂質の蓄積が主因であるのと同時に、炎症が関与する慢性炎症疾患でもあるという概念が近年浸透してきている。炎症には自然免疫も獲得免疫もその病態形成に関与することが知られてきているが⁽¹⁹⁾、その中でも特に動脈硬化の惹起経路として注目されているのが、感染が関与しない無菌性炎症の担い手の一つであるインフラマソームと呼ばれる細胞内蛋白複合体である。

その代表である NLRP3 インフラマソームは、パターン認識受容体の Nod 様受容体(Nod-like receptor : NLR)である NLRP3、アダプター分子 ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)、カスパーゼ-1の複合体から構成される。NLRP3 は、病原体の分子パターン(pathogen-associated molecular pattern : PAMP)だけでなく、生体由来の危険シグナル(damage-associated molecular pattern : DAMP)もパターン認識し、カスパーゼ-1の活性化を介して、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の前駆体を切断して成熟・分泌させ、炎症を惹起する(図 3)⁽²⁰⁾。



(図 3)NLRP3 インフラマソームの機構

様々な PAMPs や DAMPs をパターン認識し、最終的に IL-1 β ・IL-18 といった炎症性サイトカインを細胞外へ放出する。

最近、コレステロール結晶がマクロファージの NLRP3 インフラマソームを活性化し、動脈硬化を増悪させるということが報告された⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾。これまでは完成した動脈硬化巣においてのみ認められると考えられていたコレステロール結晶が、実は病巣初期から検出されるということが見出され、動脈硬化の形成初期段階から、インフラマソームによる炎症が関与していることが示唆された。実際、NLRP3 の構成分子を欠損したマウスでは、動脈硬化が改善することが示されている⁽²¹⁾⁽²⁴⁾。

3-6. 研究の目的

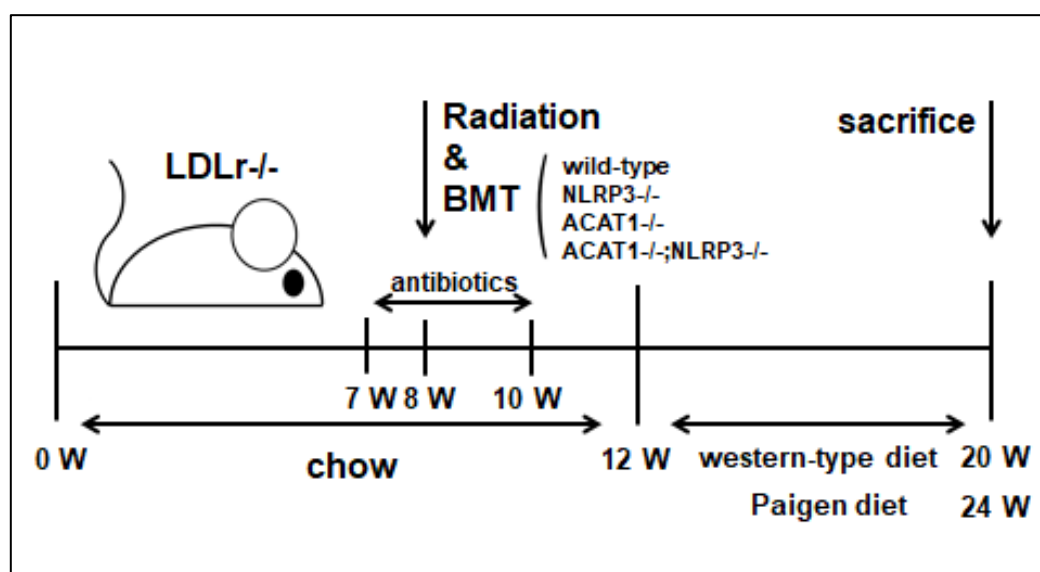
泡沫化を抑制するはずの ACAT1 阻害によって、必ずしも動脈硬化が改善しない、あるいは黄色腫様の皮膚症状が誘導される機序として、ACAT1 阻害による遊離コレステロール蓄積に伴う細胞毒性が考えられる。ACAT1 が阻害されたマクロファージでは、取り込んだリポ蛋白由来のコレステロールはコレステロールエステルとしてではなく、遊離コレステロールとして蓄積するため、細胞毒性の強い遊離コレステロールが細胞を破壊し、炎症トリポ蛋白の定着、それに引き続く更なるマクロファージの誘導を促進するという悪循環を形成するのではないかと推測される。マクロファージでの遊離コレステロールの蓄積が細胞毒性を来す機序として、小胞体ストレスや TNF α ・IL-6 といった炎症性サイトカイン分泌の関与がこれまで報告されているが⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾、インフラマソームとの関連を報告したものはない。

そこで、マクロファージでの ACAT1 阻害で誘導される動脈硬化や皮膚病変について、NLRP3 インフラマソームが関与するかどうかを調べるため、骨髄移植法を用いて、骨髄細胞特異的な ACAT1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス、およびその 2 重欠損マウスを作製し、皮膚黄色腫や動脈硬化形成の検証を行った。

4. 研究の方法

4-1. 骨髄移植モデルの作成

8週齢雌の LDL 受容体欠損マウス(LDLrKO)に 9Gy の放射線を全身照射し、骨髄細胞を死滅させた。翌日、8週齢雄の野生型マウス(C57BL/6J マウス; WT)、ACAT1 欠損マウス(ACAT1KO)、NLRP3 欠損マウス(NLRP3KO)、ACAT1/NLRP3 二重欠損マウス(DKO)の大腿骨骨髄から採取した骨髄液を、 5×10^6 個の骨髄細胞が含まれるように調整し、放射線照射した LDLrKO マウスに尾静脈注射した⁽²⁵⁾。感染予防のため、移植後のレシピエントマウスには酸性水(pH2.6)を自由投与し、さらに7週齢から10週齢までの期間には、100mg/L neomycin(Sigma)および10mg/L polymyxin B(Sigma)入りの酸性水(pH2.6)を自由投与した。移植を受けたレシピエントマウスには、4週間の通常食期間の後、12週齢より高コレステロール食を投与した。使用した高コレステロール食は、動脈硬化病変を評価する群には Western-type diet(含 0.21%(w/w) コレステロール, 20%(w/w) 乳脂肪)(Research Diets)を8週間投与し、皮膚病変を評価する群には Paigen Diet(含 1.25%(w/w) コレステロール, 15%(w/w) ココアバター, 0.5%(w/w) コール酸)(オリエンタル酵母)を12週間投与した。高コレステロール食負荷後、動脈硬化評価のためレシピエントマウスを安楽死させ、解剖を行った(図4)。



(図4)骨髄移植モデルの作成

骨髄細胞を置換した後に高コレステロール食を負荷し、病変を評価した。

4-2. 血漿脂質の測定とリポ蛋白解析

レシピエントマウスの血漿脂質を、高コレステロール食負荷前後で評価した。16時間絶食後に採血を行い、血漿中の総コレステロールの測定はデタミナーTC II(協和メデックス社)、トリグリセライドの測定はLタイプワコー TG・Mキット(和光純薬社)を用いた。さらに HPLC 法にてリポ蛋白解析を行った⁽²⁶⁾。

4-3. CT スキャン

レシピエントマウスの皮膚病変を評価するため、12週間の高コレステロール食負荷後に CT スキャン(Latheta LCT-200; 日立アロカメディカル社)を用いて後肢の皮膚肥厚について定量を行った。体動によるアーチファクトを避けるため、マウスをイソフルラン(和光純薬社)で麻酔した上でスキャンを行った。両後肢の体軸断面像(96 μm スライス厚)を 600 μm の間隔で撮像し、骨を除いた横断面積を計測した。足関節周囲の 10 スライスでの平均値を皮膚肥厚度とした。

4-4. 動脈硬化病変の解析

8週間の高コレステロール食負荷後に、レシピエントマウスを安楽死させ、心臓を摘出した。摘出した心臓を 48時間以上 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬社)に浸透させた後、10% ショ糖 10分間、15% ショ糖 10分間、20%ショ糖 60分間に順に置換した。OCT コンパウンド(サクラファインテックジャパン社)に包埋し、液体窒素で凍結した。大動脈洞起始部から上行大動脈移行部にかけてクリオスタットにて 6 μm 厚で薄切し、凍結切片を作成した。そのうち、60 μm 間隔で 4つの切片を選択し、動脈硬化病変の面積定量のために使用した。切片は Oil Red O(武藤化学社)にて脂肪染色し、ヘマトキシリン(サクラファインテックジャパン社)にて核染色を行い、水溶性封入剤 CC マウント(コスモ・バイオ社)で封入した上で、光学顕微鏡 AX-80(オリンパス社)にてデジタルイメージを取得した⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾。取得した切片のデジタルイメージを Adobe Photoshop 6 software(Adobe Systems)にて解析し、4つの切片における染色領域の平均面積を動脈硬化病変として定量した。

4-5. 組織学的解析

12週間の高コレステロール食負荷後に、レシピエントマウスを安楽死させ、後肢と背中皮膚を採取した。採取した組織は10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬社)に浸透させた後、後肢に関してはクエン酸ギ酸溶液にて骨の脱灰処理を行い、パラフィン包埋後にマイクロトームにて6 μ m厚で薄切し、パラフィン切片を作成した。一般的なヘマトキシリン・エオジン(HE)染色のプロトコールに従い、ヘマトキシリン(サクラファインテックジャパン社)で核染色、エオジン(サクラファインテックジャパン社)で細胞質染色を行い、非水溶性封入剤マウントクイック(コスモ・バイオ社)で封入した上で、光学顕微鏡AX-80(オリンパス社)にてデジタルイメージを取得した。

免疫染色は次の工程で行った。大動脈起始部の凍結切片に対し、Avidin/Biotin Blocking Kit(Vector Labs)による内在性Avidin/Biotinのブロッキング、ヤギ血清によるブロッキング、0.3%過酸化水素による内在性ペルオキシダーゼのブロッキング、など行った上、600倍希釈したMoma-2の1次抗体(Bio-Rad)で処理し、4°C下で一晩留置した。その後、200倍希釈したビオチン標識2次抗体(Vector Labs)で処理し、37°C下で2時間留置した。avidin-biotin peroxidase complex(Vector Labs)で室温30分間処理した後、DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)(Sigma)で明視化した。ヘマトキシリン(サクラファインテックジャパン社)にて核染色を行い、水溶性封入剤CCマウント(コスモ・バイオ社)で封入した上で、光学顕微鏡AX-80にて画像を取得した。

大動脈起始部の凍結切片におけるモバットペンタクローム染色も、既報のプロトコールで行い⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾、同様にデジタルイメージを取得した。

取得した切片のデジタルイメージをAdobe Photoshop 6 software(Adobe Systems)にて解析し、2つの切片における染色領域の平均面積を定量し、動脈硬化病変全体の面積で補正した。

4-6. リポ蛋白とコレステロール結晶の調整

リポ蛋白の調整のため、絶食後の健常人より血液を採取し、血漿を遠心分離した。細菌の繁殖やタンパク質の変性を防ぐため、分離した血漿に0.05% EDTA \cdot NaN₃、1mM PMSF(和光純薬社)、Proteinase inhibitor cocktail(Sigma)を加え、さらに超遠心法にてLDL分画(比重:1.019~1.063g/mL)を分離した⁽³¹⁾。分離したLDLを等量の飽和酢酸ナトリウム溶液(和光純薬社)で希釈し、無水酢酸(和光純薬社)で処理し、アセチル化させた⁽³²⁾。リポ蛋白の濃度はPierce BCA

protein assay kit (Thermo Scientific)を使用し測定した。アガロースゲル電気泳動にて、LDL との荷電の違いから、アセチル化を確認した⁽³³⁾。

コレステロール結晶の調整のため、コレステロール(sigma)を 10mg/mL とするようエタノールに溶解し、10%の滅菌水を混和させた後、遠心エバポレーターにて有機溶媒を蒸発させた。得られたコレステロール結晶を細胞培養液に懸濁させ、超音波ホモジナイザーにて細砕した。

4-7. 細胞培養実験

8~12 週齢雌の WT マウス、ACAT1KO マウス、NLRP3KO マウス、DKO マウスの腹腔内に 2mL の 5%(w/v)チオグリコレート(和光純薬社)を注射し、3 日後に PBS(ナカライテスク社)で腹腔内を洗浄し、腹腔洗浄液を回収した。遠心して得た細胞塊を細胞培養液 DMEM(Sigma)(含 10% fetal bovine serum, 100units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Gibco))に細胞数 1×10^6 個/mL の濃度に懸濁させ、12well または 24 well プレートに播種した。37°C、5%CO₂ の条件下で 3 時間培養後に、非接着細胞を除去し、接着細胞をマクロファージ (MPM)として使用した。

MPM の IL-1 β 分泌を確認する際は、各種刺激の 10 時間前に 100ng/mL lipopolysaccharide(LPS)(Sigma)を添加する前処置を行った。続いて、100 μ g/mL \cdot 200 μ g/mL \cdot 500 μ g/mL のコレステロール結晶や 5mM の Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate(ATP)(Sigma)をそれぞれ 6 時間および 1 時間添加した後、培養上清を回収した。アセチル化 LDL を添加する際は、細胞を飢餓状態にするため、24 時間前に無血清の RPMI1640 培地(Sigma)(含 100units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin)に切り替えた。

4-8. コレステロール含量の測定

皮膚組織におけるコレステロール含量を測定するため、液体窒素で凍結させた皮膚組織を SK ミル II (トッケン社)で破砕し、Bligh \cdot Dyer 法に準じて脂質抽出を行った⁽³⁴⁾。アセチル化 LDL を添加した細胞のコレステロール含量を測定するため、イソプロパノール/ヘキサン混合液を用いて細胞内脂質抽出を行った⁽³⁵⁾。抽出した脂質において、総コレステロールの測定をデタミナー TC II (協和メデックス社)、遊離コレステロールの測定をデタミナー L FC (協和メデックス社)を用いて行い、コレステロールエステルの含量は総コレステロールと遊離コレス

テロールの差として計算した。皮膚組織に関しては、脂質抽出前の皮膚重量を補正として用いた。細胞に関しては、脂質分離後に 0.1N NaOH で抽出した蛋白を Pierce BCA protein assay kit にて濃度測定し、全蛋白量を補正として用いた。

4-9. リアルタイム PCR 解析

皮膚組織およびマクロファージより、AGPC(acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction)法に準じて RNA を抽出した⁽³⁶⁾。抽出した RNA から、high-capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems)を用いて cDNA を合成した。各遺伝子に特異的なプライマー、プローブにより、StepOnePlus RealTime PCR instrument (Applied Biosystems)を用いて cDNA を増幅し、 β actin 遺伝子を内在性コントロールとして $\Delta\Delta CT$ 法を用いて各遺伝子発現を比較した。使用した各プライマー、プローブの配列を表 1 に示す。

Gene	Forward	Reverse	Probe
β actin	CGATGCCCTGAGGCTCTTT	TGGATGCCACAGGATTCCA	CCAGCCTTCCTTCTT
TNF α	AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG	TGTGAGGGTCTGGGCCATA	CCTCCCTCTCATCAGTT
IL-1 β	CTCTTGTTGATGTGCTGCTG	GACCTGTTCTTTGAAGTTGACG	TTCCAAACCTTTGACCTGGGCTGT
CHOP	CATCCCCAGGAAACGAAGAG	GCTAGGGACGCAGGGTCAA	AAGAATCAAAAACCTTCACTACT
Ly6G	TTGACAGCATTACCAGTGATCT	GCGTTGCTCTGGAGATAGAAG	AATCTCTGCCTTCCCATCTGCCC
CD3e	CCTTCCTATTCTTGCTCCAGT	ACGTACTTGTACCTGAAAGCTC	CATCTGTATCACTCTGGGCTTGCTGA
CD4	CGTGATAGCTGTGCTCTGAA	GTTCTCTCCATGTCCAACCTAA	ACTGAGAGTGTGTCATGCCGAACCAG
CD8a	GTCATGTAGTAGTTGTAGCTTCCT	CACTCTCATCTGCTACCACA	TTCTCTGAAGGTCTGGGCTTGCC
MCP-1 *	Mm00441242_m1		
IL-6 *	Mm00446190_m1		
CD68 *	Mm00839636_g1		

(表 1)リアルタイム PCR 解析に使用したプライマー・プローブ配列

* Applied Biosystems 社製品。

4-10. IL-1 β ELISA

皮膚組織から蛋白を抽出するため、液体窒素で凍結させた皮膚組織を SK ミル II (トッケン社) で破碎し、Lysis バッファー(含 25mM Tris[pH 2.8], 2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 20kIU/mL aprotinin) で速やかに懸濁した。細胞片や不純物を遠心分離し、上清を回収し、全蛋白濃度を Pierce BCA protein assay kit で測定し、IL-1 β は mouse ELISA kit (Becton Dickinson) を用いて測定し、全蛋白濃度で補正した。細胞実験においては、無血清の培地を使用し、回収した培地上清の IL-1 β 濃度を同じく mouse ELISA kit を用いて測定した。

4-11. 統計学的解析

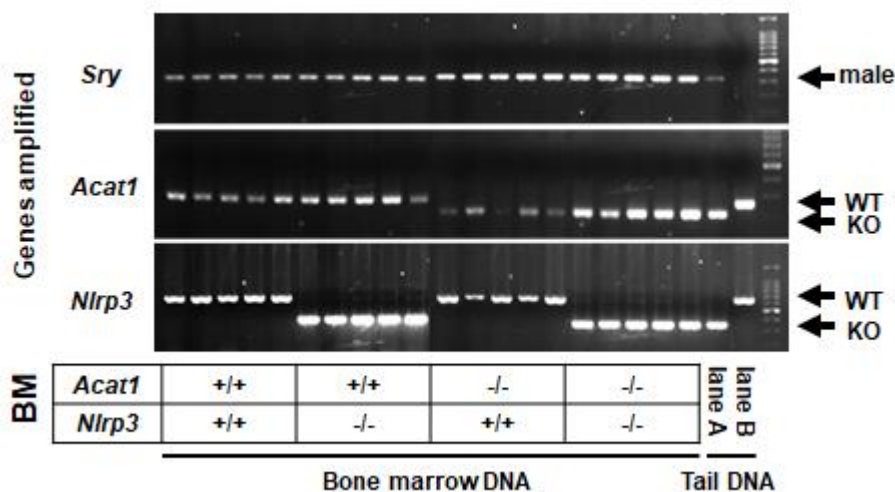
データは平均値 \pm 標準偏差で示した。2群間の平均値の比較は Mann-Whitney の U 検定で検定し、多群間の多重比較は one-way ANOVA の後、tukey 法により検定した。正規分布・等分散でないサンプルでの多群間の多重比較は Kruskal-Wallis 検定の後、Steel-Dwass 法により検定した。全ての解析は GraphPad Prism version 6.0(GraphPad Software)を使用し行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意と判定した。

5. 研究の結果

5-1. in vivo

5-1-1. 骨髄移植モデルの作成

骨髄移植によって骨髄細胞が置換されているかどうかを確認するため、移植を受けたレシピエントマウスの大腿骨骨髄から採取した骨髄液よりゲノム DNA を抽出し、*Sry*・*Acat1*・*Nlrp3* 遺伝子の PCR を行った。*Sry* は哺乳動物の Y 染色体上に存在する雄性決定遺伝子であり、雌を使用したレシピエントマウスには本来存在しない遺伝子であるが、骨髄移植後の骨髄細胞に発現を認め、雄であるドナーの遺伝子が導入されていることが確認された(図 5)。また、*Acat1* 遺伝子や *Nlrp3* 遺伝子に関しても、レシピエントマウスの骨髄細胞での発現は、ドナーとして使用したマウスの遺伝子発現と一致しており、骨髄細胞がほぼ完全に置換されていることが確認できた(図 5)。



(図 5)レシピエントマウスの骨髄細胞における DNA-PCR

レシピエントマウスの骨髄から DNA を抽出し、各遺伝子の PCR を行った。移植に使用したドナーマウスの遺伝子型を下段に示した。*Sry* 遺伝子の lane A には、ポジティブコントロールとして野生型雄マウスの DNA を使用した。*Acat1* 遺伝子・*Nlrp3* 遺伝子の lane A にはネガティブコントロールとしてそれぞれの遺伝子欠損マウスの DNA を使用し、lane B にはポジティブコントロールとして野生型マウスの DNA を使用した。コントロールの DNA は尾から抽出した。

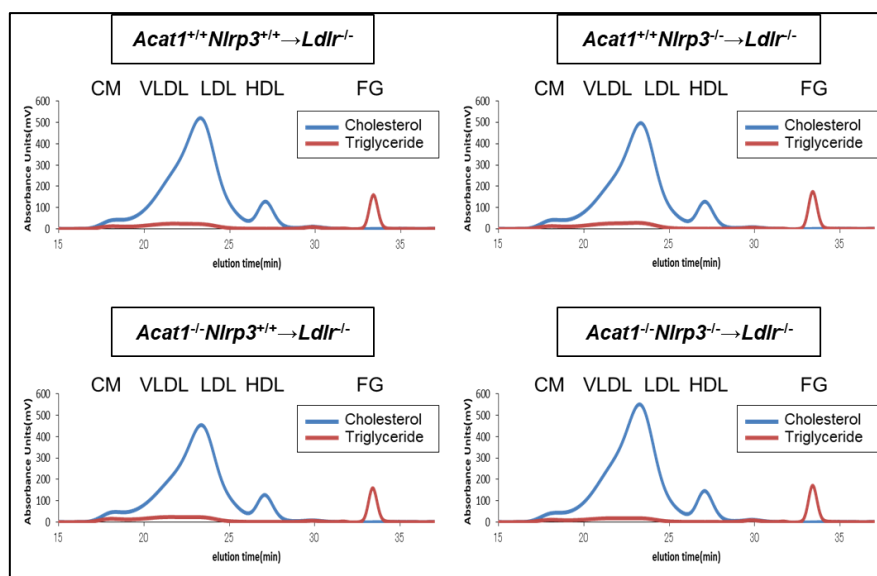
5-1-2. 体重および血漿脂質の評価

レシピエントマウスの体重および血漿脂質(総コレステロール、トリグリセライド)を、高コレステロール食開始直前と負荷後の2点で測定した(表 2AB)。

動脈硬化病変評価のために Western-type Diet を8週間投与した群と、皮膚病変評価のためによりコレステロール含量の高い Paigen Diet を12週間投与した群とで実験を行った。高コレステロール食を負荷する前においては、体重や血漿脂質について移植した4群間に有意な差は認めなかった。高コレステロール食負荷後には、いずれも顕著な総コレステロール値上昇を認めたが、コレステロール含有量の多い Paigen Diet を投与した群で、より顕著な上昇を認めた。トリグリセライドに関しては、いずれも高コレステロール食負荷前後で有意な差は認めなかった。

いずれの高コレステロール食でも、負荷後で体重や血漿脂質について移植した4群間に有意差は認めなかった。高コレステロール食負荷後のリポ蛋白組成を HPLC 法で確認したが、4群間に明らかな差は認めなかった(図 6)。

よって、これら体重や血漿脂質といった因子が、動脈硬化病変や皮膚病変の違いに影響を与えた可能性は低いと考えられた。



(図 6)高コレステロール食負荷後のリポ蛋白分画

Western-type diet 8週間負荷後のレシピエントマウスの血漿を各群プールし(n=12~14)、HPLC法で解析した。各リポ蛋白に分布するコレステロール(青色)とトリグリセライド(赤色)を示している。CM;カイロミクロン、FG;遊離グリセロール。

BM Genotype	N	体重 (g)		総コレステロール (mg/dL)		トリグリセライド (mg/dL)	
		0 week	8 week	0 week	8 week	0 week	8 week
		Wild-type	14	16.8±1.0	19.1±1.1	346±39	1090±199
NLRP3^{-/-}	13	16.0±1.0	18.7±1.4	367±100	936±231	336±155	270±99
ACAT1^{-/-}	13	16.0±0.8	18.9±1.2	331±47	1006±129	302±160	284±96
ACAT1^{-/-};NLRP3^{-/-}	12	15.7±1.1	18.2±1.1	318±70	1157±313	261±69	286±79

(表 2A)高コレステロール食負荷前後の体重・血清脂質

Western-type diet 8 週間前後の体重・血漿脂質の推移。平均値±標準偏差。

BM Genotype	N	体重 (g)		総コレステロール (mg/dL)		トリグリセライド (mg/dL)	
		0 week	12 week	0 week	12 week	0 week	12 week
		Wild-type	17	15.9±1.2	18.3±1.8	370±130	1659±665
NLRP3^{-/-}	15	16.1±1.1	19.7±1.3	385±60	1385±281	223±72	232±71
ACAT1^{-/-}	14	16.3±1.5	19.0±1.7	395±59	1492±467	332±183	193±106
ACAT1^{-/-};NLRP3^{-/-}	15	16.2±1.3	19.2±1.9	395±47	1591±477	260±113	196±102

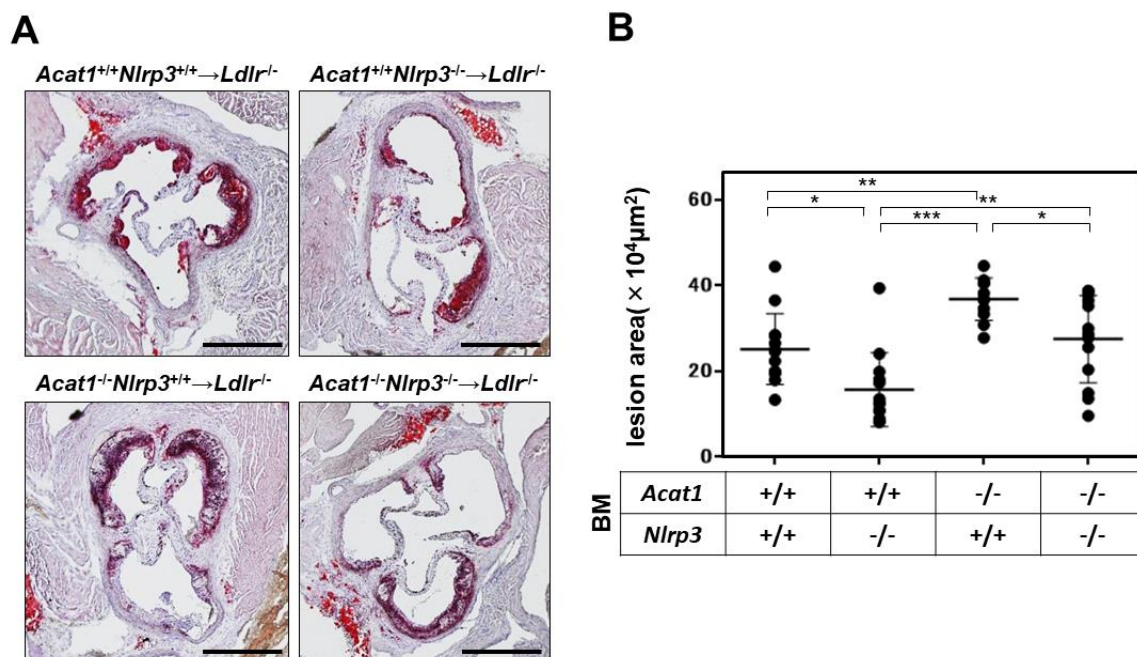
(表 2B) 高コレステロール食負荷前後の体重・血清脂質

Paigen diet 12 週間前後の体重・血漿脂質の推移。平均値±標準偏差。

5-1-3. 動脈硬化病変の評価

8週間の高コレステロール食負荷後に、レシピエントマウスの大動脈起始部において動脈硬化病変の評価を行った(図7)。ACAT1KOマウス移植群とDKOマウス移植群では、Oil Red Oの染色性が弱い病変が観察され、ACAT1欠損によるコレステロールエステルの乏しい病変を反映した結果と考えられた。

NLRP3KOマウス移植群では、Wild-typeマウス移植群と比較し約38%の病変面積縮小を認め、これは過去の報告と合致するものであった。反対に、ACAT1KOマウス移植群では、Wild-typeマウス移植群と比較し約47%の病変面積増悪を認めた。DKOマウス移植群ではACAT1KOマウス移植群よりは有意に改善を認めたが、Wild-typeマウス移植群とは同等で改善を得られなかった。このことは、ACAT1KOの骨髄移植で誘導される動脈硬化病変増悪に関して、NLRP3の寄与は部分的であることを示唆した。



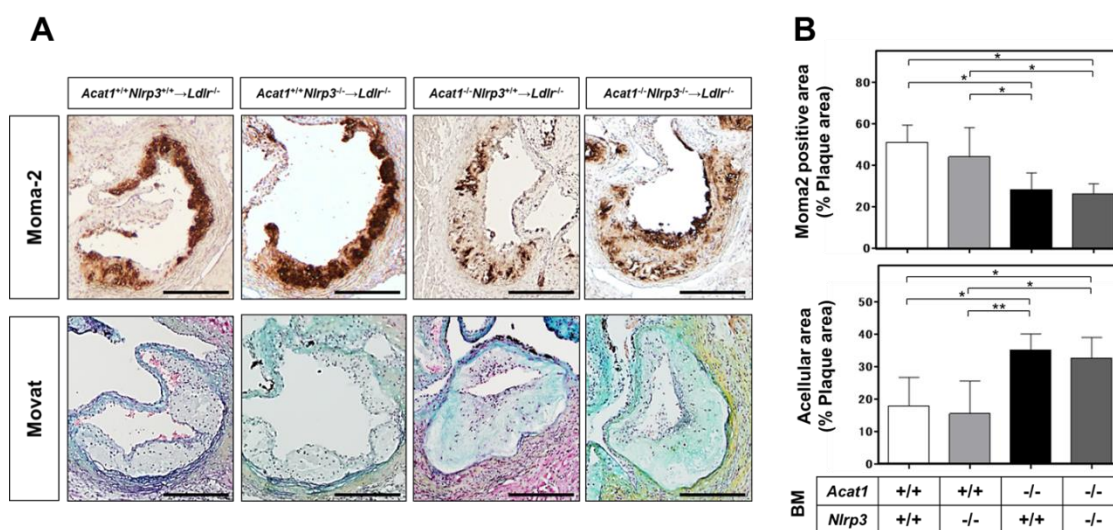
(図7)動脈硬化病変における Oil Red O 染色

A. 8週間の高コレステロール食負荷後の動脈硬化病変における Oil Red O 染色。Scale=500 μ m。

B. 病変面積を定量した。移植に使用したドナーマウスの遺伝子型を下段に示した。平均値±標準偏差。* $p<0.05$;** $p<0.01$ *** $p<0.001$ 。

マクロファージ浸潤の程度を調べるため、動脈硬化病変の Moma-2 染色を行った(図 8)。予想に反し、ACAT1KO マウス移植群では、Wild-type マウス移植群と比較し、Moma-2 染色領域の約 44%縮小を認めた。同様に、DKO マウス移植群では、NLRP3KO マウス移植群と比較し、Moma-2 染色領域の約 40%縮小を認めた。一方、NLRP3 の有無により、Moma-2 染色領域に差は認めなかった。

動脈硬化病変の性状をより詳細に観察するため、動脈硬化病変のモバットペンタクローム染色を行った(図 8)。モバットペンタクローム染色は、核を黒色、筋肉を赤色、フィブリンを鮮赤色、ムチンを鮮青色、膠原繊維・細網線維を黄色、弾性繊維を濃青色、などに染め分ける染色である。ACAT1KO マウス移植群では、Wild-type マウス移植群と比較し、核を認めない無細胞領域が約 94%増大しており、同様に、DKO マウス移植群では、NLRP3KO マウス移植群と比較し、無細胞領域が約 110%増大を認めた。無細胞領域は鮮青色を示し、ムチンに置換されているようであった。このことは、ACAT1 の欠損が、細胞死を促進していることを示唆した。対して、NLRP3 の有無で、無細胞領域に差は認めなかった。



(図 8)動脈硬化病変における Moma-2 染色・モバットペンタクローム染色

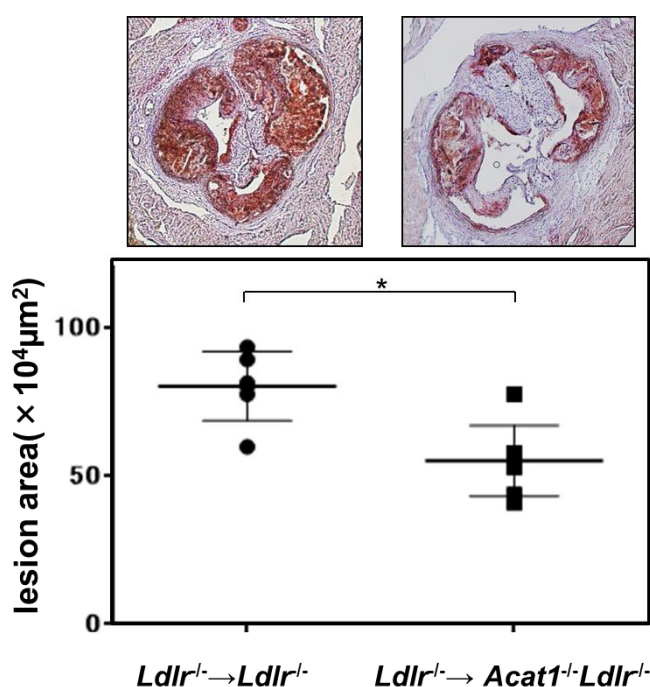
A. 8 週間の高コレステロール食負荷後の動脈硬化病変における Moma-2 染色(上段)およびモバットペンタクローム染色(下段)。Scale=500 μ m。

B. 染色面積を定量し、動脈硬化病変全体における割合(%)を計算した(上段 ; Moma-2 染色陽性領域、下段 ; モバットペンタクローム染色における無細胞領域)。移植に使用したドナーマウスの遺伝子型を下段に示した。平均値±標準偏差。* $p<0.05$;** $p<0.01$ 。

5-1-4. 骨髄細胞以外の ACAT1 欠損モデルでの評価

反対に、骨髄細胞以外での ACAT1 欠損が動脈硬化へ及ぼす影響を確認するため、ACAT1KO/LDLrKO 二重欠損マウスに LDLrKO マウスの骨髄細胞を移植し、12 週間の高コレステロール食(Paigen Diet)を負荷し、LDLrKO マウスに LDLrKO マウスを骨髄移植して同様に食餌負荷した対照群との比較を行った(図 9)。

結果、ACAT1KO/LDLrKO 二重欠損マウスに LDLrKO マウスの骨髄を移植した骨髄細胞以外での ACAT1 欠損モデルの方で、動脈硬化病変面積の縮小を認められた(図 9)。これはマクロファージ以外での ACAT1 欠損が動脈硬化保護的に働いている可能性を示唆した。

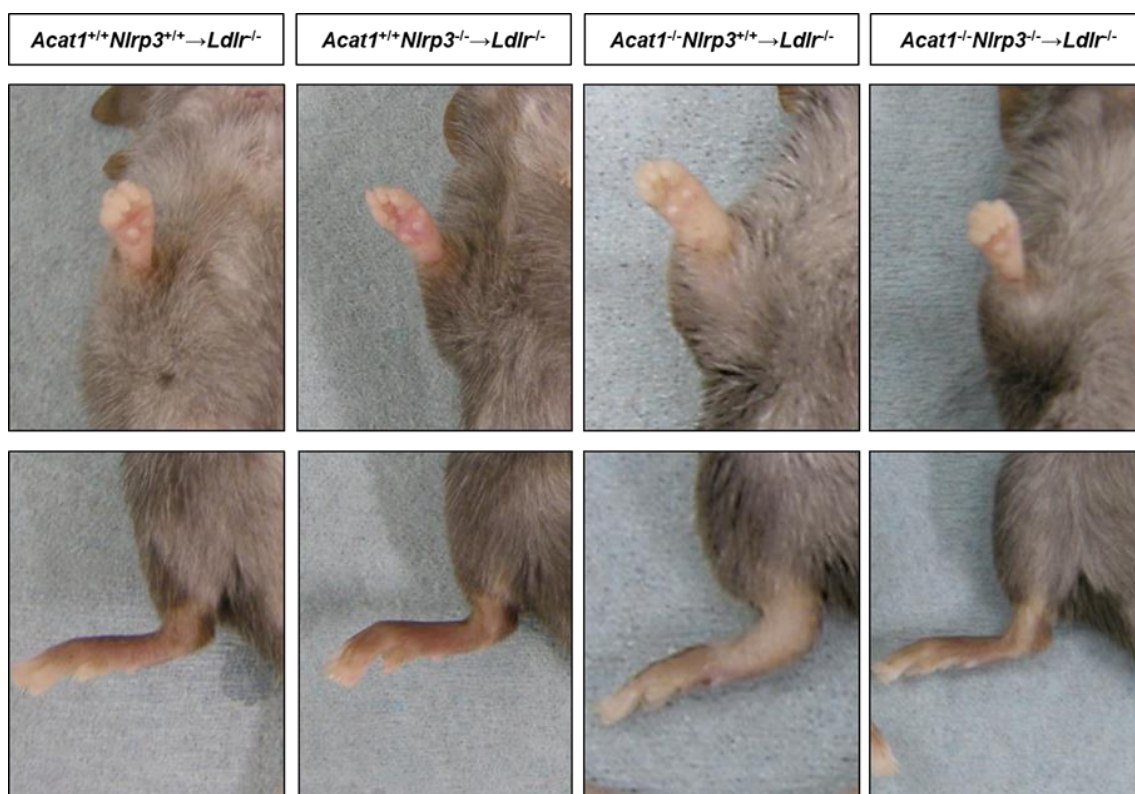


(図 9) 骨髄細胞以外の ACAT1 欠損モデルにおける動脈硬化病変

12 週間の高コレステロール食負荷後の動脈硬化病変における Oil Red O 染色(上段)とその病変面積の定量(n=6)(下段)。平均値±標準偏差。*p<0.05。

5-1-5. 皮膚病変の表現型

Western-type diet の 8 週間投与では皮膚の表現型を確認できなかったため、よりコレステロール含有量の多い Paigen Diet を 12 週間投与したモデルで皮膚病変を解析した。Wild-type マウス移植群および NLRP3KO マウス移植群では、骨髄移植の際の放射線照射の影響で軽度の脱毛を認める以外は、明らかな皮膚の表現型の出現を認めなかった。対して、ACAT1KO マウス移植群において、高コレステロール食負荷後に顕著な皮膚肥厚を認めるようになった(図 10)。特に四肢の足関節周囲に肥厚が目立ち、一部のマウスでは背中等にも肥厚を認めた。ただし、いわゆる皮膚黄色腫のような黄色調の隆起性病変はなく、びまん性の肥厚で、特に色調の変化は認めなかった。特筆すべきことに、DKO マウス移植群においては、同様の皮膚肥厚所見は観察期間中には認められなかった。

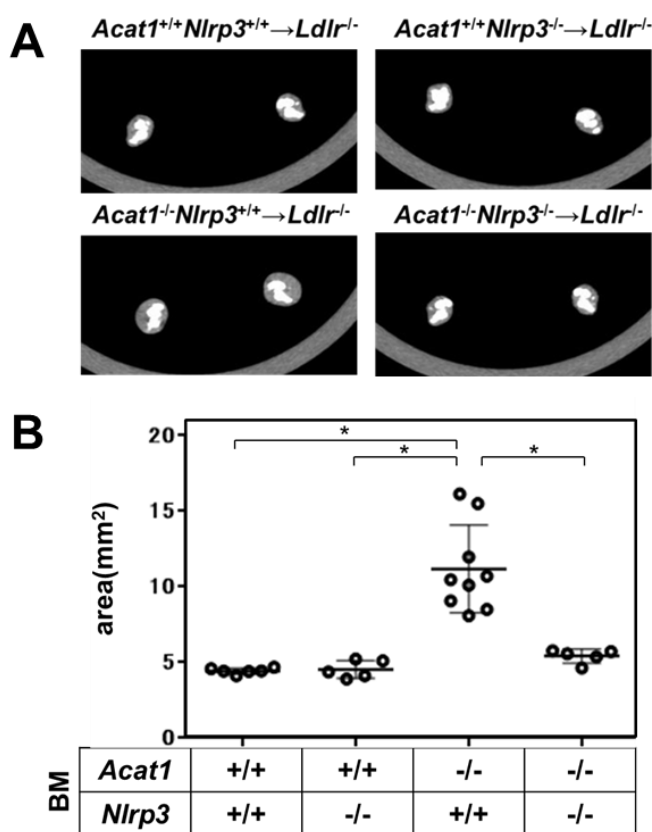


(図 10)ACAT1 欠損骨髄移植マウスにおける四肢肥厚

12 週間の高コレステロール食負荷後の前肢(上段)・後肢(下段)の足関節周囲の肉眼的所見。

続いて、皮膚肥厚の程度を定量的に評価するため、後肢の足関節周囲を CT スキャンし、断面積を計測した(図 11)。

Wild-type マウス移植群、NLRP3KO マウス移植群、DKO マウス移植群の断面積はいずれも同等であったが、ACAT1KO マウス移植群の断面積は他と比較し約 2.5 倍有意に肥厚していた。



(図 11)ACAT1 欠損骨髓移植マウスにおける四肢肥厚

A. 12 週間の高コレステロール食負荷後の後肢足関節周囲の CT スキャン体軸断面像。

B. 骨を除いた横断面積を計測し、10 スライス of 平均値を示した。移植に使用したドナーマウスの遺伝子型を下段に示した。平均値±標準偏差。* $p < 0.05$ 。

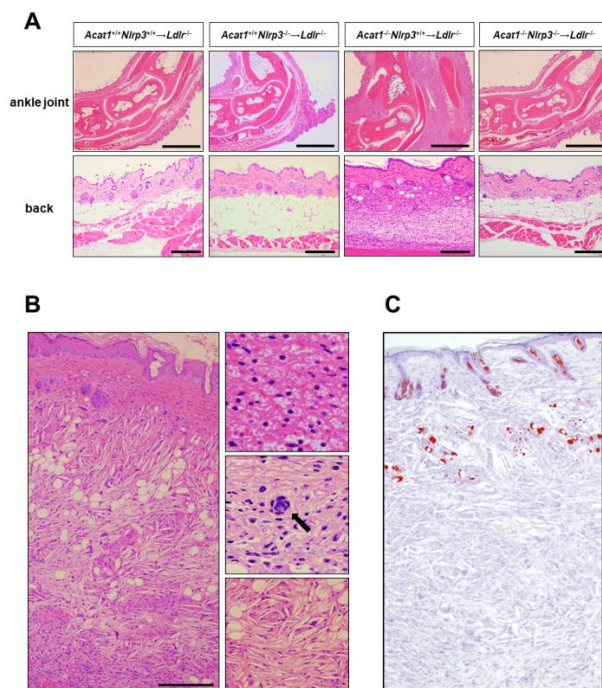
5-1-6. 皮膚病変の評価

12週間の高コレステロール食負荷後のレシピエントマウスから後肢と背中皮膚を採取し、HE染色を行った(図12A,B)。Wild-typeマウス移植群、NLRP3KOマウス移植群、DKOマウス移植群は、いずれも正常な皮膚所見を示したが、ACAT1KOマウス移植群では、真皮～皮下組織にかけて著明な炎症細胞の浸潤を認め、結果として皮膚の肥厚を来していることが分かった。その中で、一部泡沫化したような細胞を認め、マクロファージの集簇体である多核巨細胞も散見され、また大量のコレステロール裂隙(コレステロール結晶の打ち抜き像)が存在し、これらの特徴は皮膚黄色腫に類似した病理像と考えられた(図12B)。また、ACAT1KOマウス移植群の皮膚は脂肪組織が消退しているという特徴も示した。

図12CにACAT1KOマウス移植群の皮膚でのOil Red O染色所見を示すが、毛包や残存した脂肪組織に一部染色が認められるのみで、浸潤した炎症細胞にはほとんど染色を認めなかった。

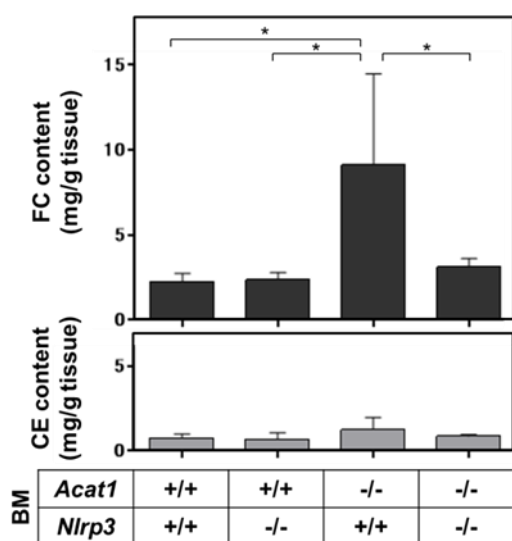
皮膚組織のコレステロール含量を解析したところ、ACAT1KOマウス移植群においてのみ著明なコレステロール含量の上昇を認めたが、その大部分は遊離コレステロールであり、コレステロールエステル含量に関しては他3群と有意な差を認めなかった(図13)。

これらより、ACAT1KOマウス移植群の皮膚・皮下組織ではコレステロールの定着を起こしているが、従来の皮膚黄色腫で見られるように細胞(マクロファージ)内に脂肪滴(コレステロールエステル)として蓄積している訳ではなく、細胞内に遊離コレステロールとして蓄積しているか、あるいは細胞内または外にコレステロール結晶として定着させていることが推測された。



(図 12)皮膚の HE 染色

- A. 12 週間の高コレステロール食負荷後の後肢足関節および背中皮膚の HE 染色。Scale=200 μ m。
- B. ACAT1KO マウス移植群の背中皮膚の HE 染色(強拡大)。Scale=200 μ m。泡沫細胞(右上図)、多核巨細胞(矢印)、コレステロール結晶(右下図)が観察される。
- C. ACAT1KO マウス移植群の背中皮膚の Oil Red O 染色。

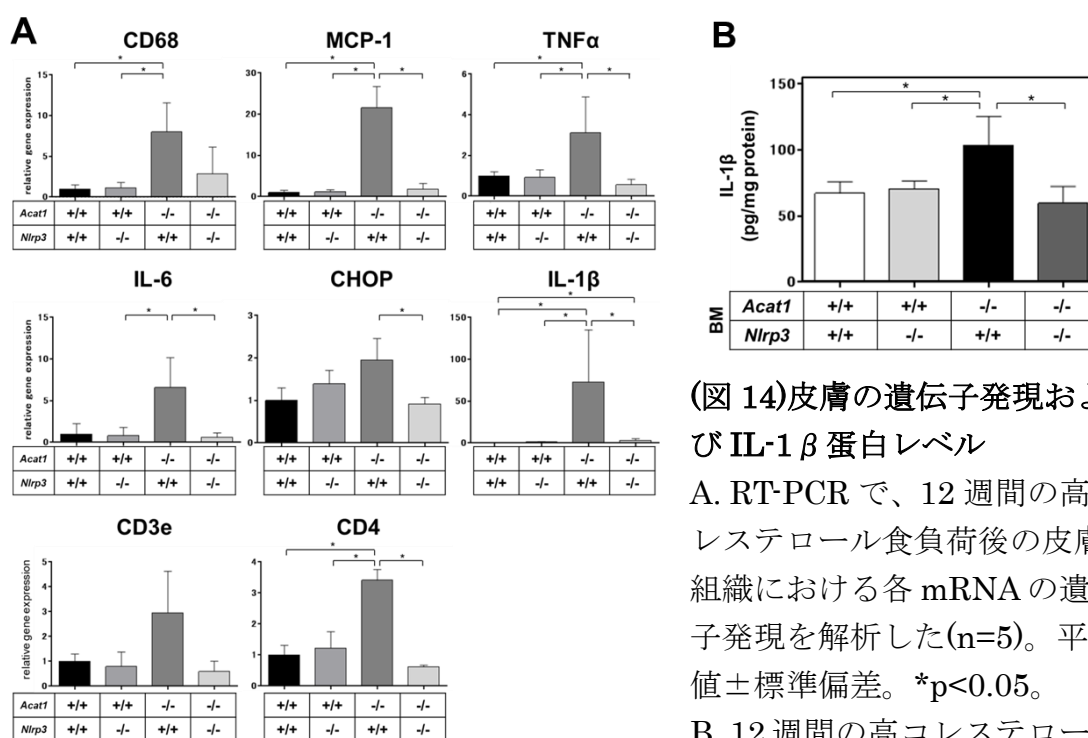


(図 13)皮膚のコレステロール含量

12 週間の高コレステロール食負荷後の皮膚組織におけるコレステロール含量を解析した(n=5)。移植に使用したドナーマウスの遺伝子型を下段に示した。平均値±標準偏差。*p<0.05。FC ; 遊離コレステロール、CE ; コレステロールエステル。

続いて、皮膚組織の遺伝子発現を解析したところ、ACAT1KO マウス移植群においてのみ、CD68、MCP-1、TNF α 、IL-6、IL-1 β の著明な発現上昇を認め(図 14A)。これらの結果から ACAT1KO マウス移植群の皮膚組織ではマクロファージの浸潤が強く、特に炎症性マクロファージである M1 マクロファージの浸潤が強いことが示唆された。その他、Ly6G や CD8 は ACAT1KO マウス移植群においてのみ発現が確認され、他移植群では発現自体が確認できなかった(図表なし)。CD3e や CD4 についても、ACAT1KO マウス移植群においてのみ上昇を認め、これらより ACAT1KO マウス移植群の皮膚組織では一部好中球や T リンパ球の浸潤も存在するものと考えられた。

皮膚組織の IL-1 β の蛋白レベルを解析したところ、比較的規模は小さいが ACAT1KO マウス移植群においてのみ有意な上昇を認め(図 14B)、同皮膚組織でインフラマソームの活性化が起きていることが示唆された。



(図 14)皮膚の遺伝子発現および IL-1 β 蛋白レベル

A. RT-PCR で、12 週間の高コレステロール食負荷後の皮膚組織における各 mRNA の遺伝子発現を解析した(n=5)。平均値±標準偏差。*p<0.05。

B. 12 週間の高コレステロール食負荷後の皮膚組織における IL-1 β 蛋白レベルを解析した(n=5)。平均値±標準偏差。*p<0.05。

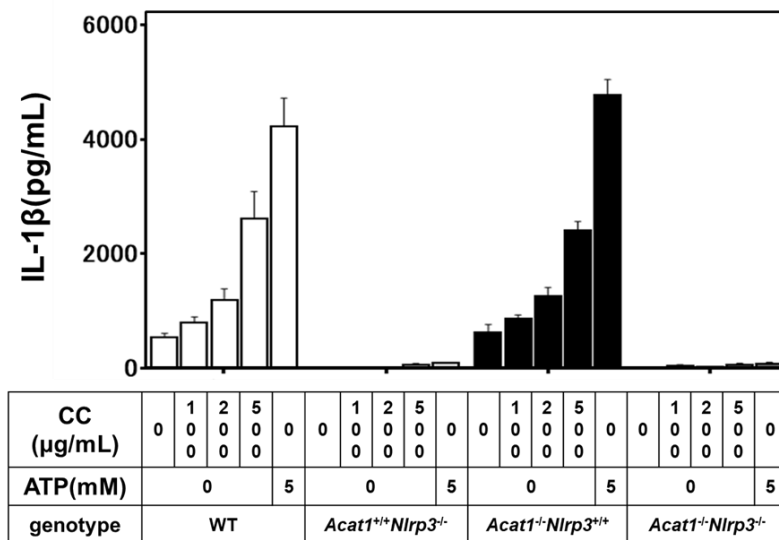
移植に使用したドナーマウスの遺伝子型を下段に示した。

5-2. in vitro

5-2-1. コレステロール結晶によるインフラマソームの誘導

ACAT1KO マウス移植群の皮膚組織において、顕著なコレステロール結晶と遊離コレステロールの蓄積を認めたため、まずコレステロール結晶によるインフラマソーム活性化について、各遺伝子型での違いがあるかどうかを調べた。MPM を回収し、コレステロール結晶による IL-1 β の分泌の程度を解析した(図 15)。IL-1 β の分泌を見るためには、インフラマソーム活性化の前に、細胞内に pro-IL-1 β が十分に存在している必要があるため、LPS の前投与により TLR から NF- κ B に至るシグナルの誘導を行った(priming 処理)。

NLRP3KO マウスおよび DKO マウスより回収した MPM では、コレステロール結晶および ATP による IL-1 β の分泌はほとんど検出されなかった。Wild-Type マウスおよび ACAT1KO マウスより回収した MPM では、コレステロール結晶により濃度依存性に IL-1 β の分泌亢進を認めたと、その程度は 2 群で同等であったため、ACAT1 の有無はインフラマソームの活性化に直接関与しないことが示唆された。



(図 15)コレステロール結晶添加による IL-1 β 分泌

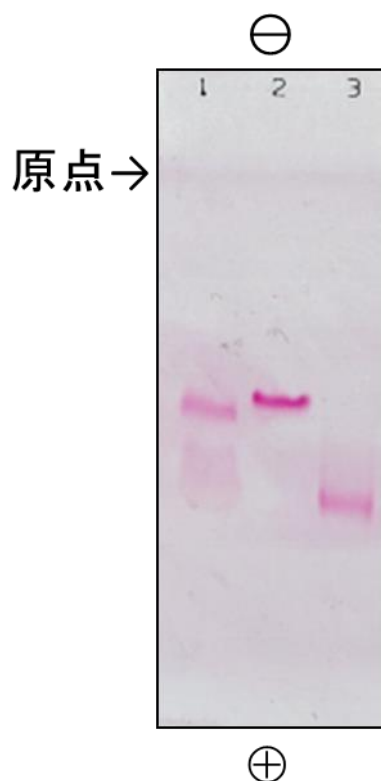
MPM に、LPS 100ng/mL を 10 時間添加した(priming 処理)後、コレステロール結晶および ATP(5mM)をそれぞれ 6 時間および 1 時間添加し、培地上清中の IL-1 β の蛋白レベルを ELISA 法で解析した(n=5)。平均値±標準偏差。使用した腹腔マクロファージの遺伝子型を下段に示した。

5-2-2. 泡沫化能の評価

続いて、ACAT1 欠損による細胞内遊離コレステロールの蓄積がインフラマソームの活性化を起こすかどうかを調べるため、リポ蛋白を MPM の培地に添加する実験を行った。

まず、健常人血漿より LDL を分離し、無水酢酸によりアセチル化 LDL を作成し、アガロースゲル電気泳動にて確認した。アガロースゲル電気泳動の場合、LDL の泳動位置は LDL 粒子の荷電によって決まり、LDL は酸化や糖化などの変性を受けると、アポ B100 の陰性荷電が増すとされ、LDL 分画が正常検体に比べて陽極にシフトしている時は、LDL が何らかの変性を受けていることを示すと考えられている。

作成したアセチル化 LDL は、通常の LDL の泳動位置より陽極にシフトしており、変性(アセチル化)した LDL になっていることが確認された(図 16)。



(図 16)アセチル化 LDL の作成

全血漿、LDL、アセチル化 LDL をアガロースゲルにて電気泳動した。

lane1 ; 全血漿

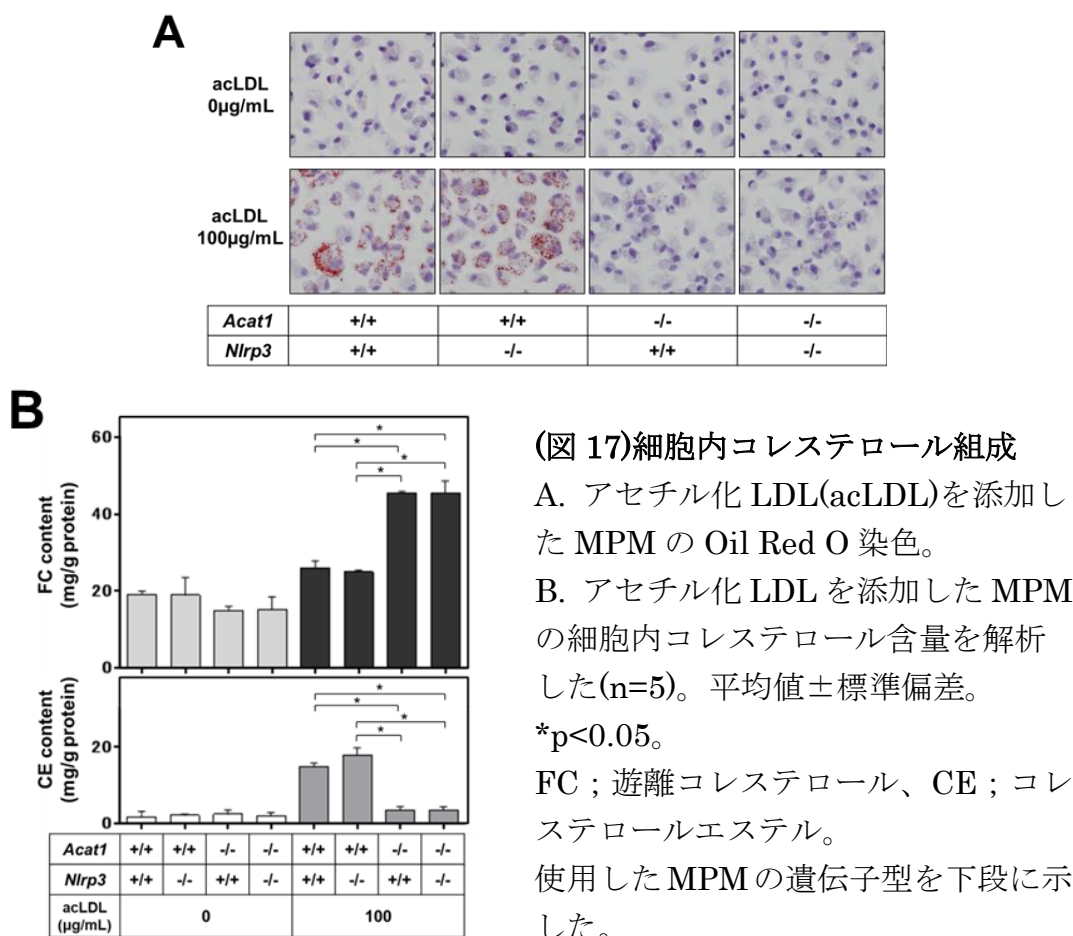
lane2 ; LDL

lane3 ; アセチル化 LDL

MPM に、作成したアセチル化 LDL(100 μ g/mL)を 24 時間添加し、各遺伝子型で泡沫化の仕方に違いがあるかどうかを検証した。

まず、アセチル化 LDL を添加した MPM の Oil Red O 染色を行った(図 17A)。Wild-type マウスと NLRP3KO マウスでは、Oil Red O で脂肪滴(コレステロールエステル)が染色された泡沫細胞が観察されたのに対し、ACAT1KO マウスと DKO マウスではほとんど染色を認めなかった。

続いて、アセチル化 LDL を添加した MPM から脂質を抽出し、細胞内コレステロール含有量を解析した(図 17B)。Wild-type マウスと NLRP3KO マウスでは、アセチル化 LDL 添加後の細胞内遊離コレステロールの上昇はわずかであり、ほとんどがコレステロールエステルとして蓄積されていることが明らかになった。対して、ACAT1KO マウスと DKO マウスでは、コレステロールエステルの含有量はアセチル化 LDL 添加前と変化せず、遊離コレステロールの蓄積を認めた。NLRP3 の有無は、アセチル化 LDL 添加前後いずれにおいても細胞内コレステロール組成への関与は否定的であった。

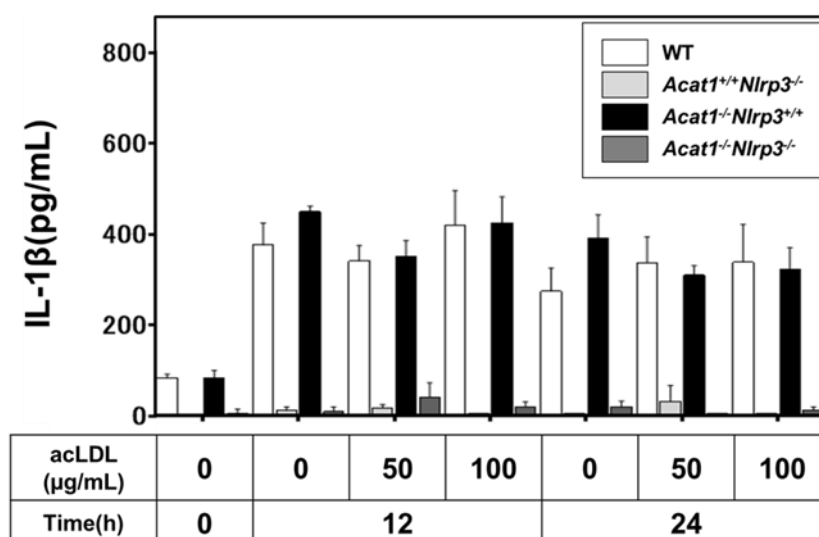


5-2-3. 遊離コレステロールによるインフラマソームの誘導

アセチル化 LDL を添加した MPM にて、IL-1 β の分泌を検証した(図 18)。

NLRP3KO マウスおよび DKO マウスから回収した MPM では、アセチル化 LDL 添加の有無に関わらず、IL-1 β の分泌はほとんど検出されなかった。

Wild-type マウスおよび ACAT1KO マウスから回収した MPM では、LPS の priming 刺激のみで IL-1 β の分泌が 400pg/mL 程度確認されたが、アセチル化 LDL の添加の有無によって IL-1 β の分泌に差は認めなかった。このことは、細胞内コレステロールエステルの蓄積および細胞内遊離コレステロールの蓄積いずれにおいても、少なくとも短期の間には、インフラマソームの活性化には直接関与しないことを示唆した。



(図 18) アセチル化 LDL 添加による IL-1 β 分泌

MPM に、LPS 100ng/mL を 10 時間添加した(priming 処理)後、アセチル化 LDL(acLDL)(100 μg/mL)を 12 時間および 24 時間添加し、培地上清中の IL-1 β の蛋白レベルを ELISA 法で解析した(n=5)。平均値±標準偏差。

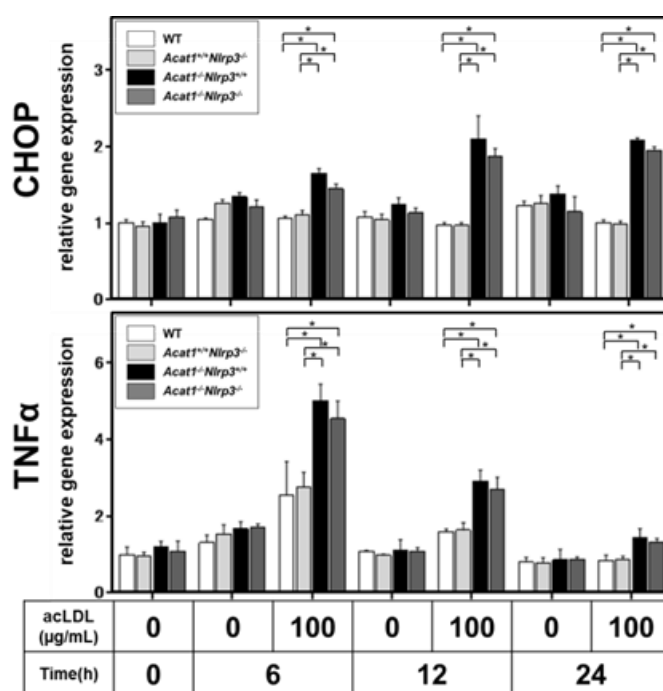
5-2-4. 遊離コレステロールによる CHOP、TNF α の誘導

次に、コレステロールエステルおよび遊離コレステロールの細胞内蓄積が、小胞体ストレスや炎症を惹起するかどうかを確認するため、アセチル化 LDL を培地に添加した MPM にて、CHOP や TNF α の発現を検証した(図 19)。

Wild-type マウスおよび NLRP3KO マウスから回収した MPM では、アセチル化 LDL の添加による CHOP の遺伝子発現の亢進は認めなかったのに対し、ACAT1KO マウスおよび DKO マウスから回収した MPM では、アセチル化 LDL 添加後に CHOP の遺伝子発現の有意な亢進を認めた。

また、Wild-type マウスおよび NLRP3KO マウスから回収した MPM では、アセチル化 LDL 添加 6 時間後にて TNF α の遺伝子発現の亢進を認めたが、ACAT1KO マウスおよび DKO マウスから回収した MPM でより顕著な亢進を認め、その差は 12 時間後・24 時間後まで持続した。

NLRP3 の有無は、アセチル化 LDL 添加前後いずれにおいても、MPM での CHOP や TNF α の遺伝子発現への関与は乏しいようであった。



(図 19)アセチル化 LDL 添加による CHOP・TNF α 遺伝子発現

MPM の培地に、アセチル化 LDL(acLDL)(100 μ g/mL)を添加し、6 時間・12 時間・24 時間時点での RNA を抽出し、CHOP および TNF α の遺伝子発現を解析した(n=5)。平均値 \pm 標準偏差。*p<0.05。

6. 考察

①皮膚病変の解釈

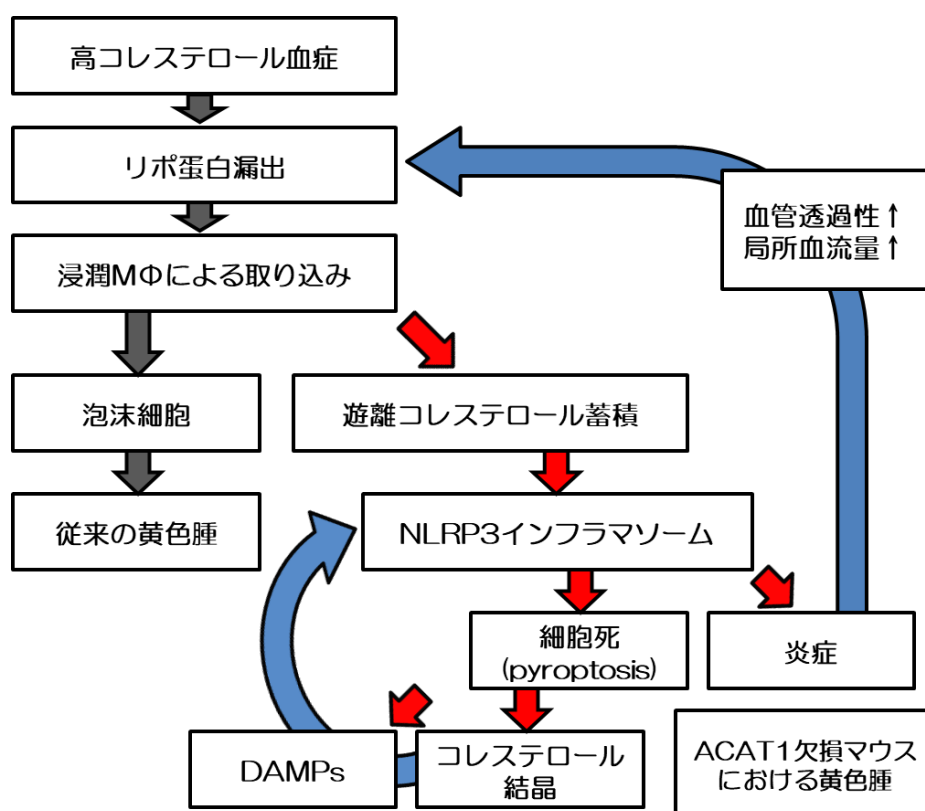
ACAT1KO マウス移植群において、皮膚黄色腫と類似した病理像を呈する皮膚病変が観察された(図 10-12)。この皮膚病変は、全身性 ACAT1KO マウス、骨髓移植法を用いた骨髓細胞特異的 ACAT1 欠損モデル、Cre-LoxP システムを用いた骨髓系細胞特異的 ACAT1 欠損モデル、いずれにおいても出現することから(13)(15)(16)、骨髓系細胞(特にマクロファージ)での ACAT1 欠損に起因した表現型であることが考えられる。

皮膚黄色腫には、腱黄色腫、眼瞼黄色腫、結節状黄色腫、発疹状黄色腫、扁平黄色腫、手掌線状黄色腫など様々な種類が存在し、病因や臨床所見によって分類分けされる(37)。最も頻繁に見られるのは眼瞼黄色腫であるが、腱黄色腫や結節状黄色腫は常染色体優性遺伝家族性高コレステロール血症の患者に特徴的とされる。皮膚黄色腫の発症機構はまだ完全には解明されていないが、一般的には皮膚・腱・筋板などに起きる脂質の沈着およびそれに関連した炎症の結果と捉えられている。血清脂質が持続的に上昇すると、真皮の毛細血管などから LDL を代表とするリポ蛋白が漏出し、酸化変性を来したりリポ蛋白をマクロファージが取り込み、その結果集簇した泡沫細胞が黄色調の隆起性病変を形成する(38)(39)。このように黄色腫の発症は動脈硬化病変形成の初期段階に類似すると考えられる。組織学的所見は黄色腫のタイプによって多少異なるが、ほとんどの黄色腫は泡沫細胞の集簇により特徴づけられ、一部好中球やリンパ球などの軽度の浸潤が観察される。重篤になると、コレステロール結晶や線維芽細胞の増生、コラーゲンの沈着などを来す場合もある(40)(41)。

家族性高コレステロール血症のモデルマウスである LDLrKO マウスにおいて、皮膚黄色腫が出現するのは高コレステロール食負荷 7~8 か月後とされるが(42)、ACAT1 欠損を導入された LDLrKO マウスでは、同じ高コレステロール食でも 2~3 か月の負荷で出現しており、また組織学的にも炎症細胞浸潤の程度が著しいことから、通常の皮膚黄色腫よりも重篤な皮膚病変と考えられた。今回の研究で、ACAT1 欠損と同時に NLRP3 欠損が導入されると、皮膚病変が形成されなくなることから(図 10-12)、ACAT1 欠損マウスモデルに出現する黄色腫様皮膚病変は、NLRP3 インフラマソームの活性化を起点とした炎症が非常に重要であることが分かった。

インフラマソーム活性化を来した細胞は IL-1 β ・IL-18 といったサイトカインを活性化・分泌を来す一方で、pyroptosis と呼ばれる細胞死に至る(43)。サイ

トカインによって誘導された単球/マクロファージが、死細胞由来の DAMPs を貪食し、さらなるインフラマソームの活性化を来す結果、炎症が持続し慢性化すると考えられる。また、ACAT1KO マウス移植群の皮膚組織においてのみ(遊離)コレステロール含有量の上昇を認め、DKO マウス移植群の皮膚組織ではコレステロール含有量の上昇を認めなかったことから (図 13)、炎症自体がコレステロールの定着を招いていることが推察された。その機序としては、炎症に伴う局所の血流量の増大や血管壁の障害が血中からのリポ蛋白の供給を増大させている可能性があり、また NLRP3 インフラマソームないし IL-1 β が ABCA1 の発現低下を来すことが報告されており⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾、これによる引き抜き能の低下もコレステロール定着に寄与しているのかもしれない。さらに、蓄積したコレステロールが結晶化することで除去されづらくなり、またこのコレステロール結晶自体もまたインフラマソームの活性化を助長するという悪循環を招いている可能性も考えられた(図 20)。



(図 20)ACAT1 欠損マウスにおける皮膚病変形成の機序

NLRP3 インフラマソームを起因とした炎症や細胞死によって病変でのコレステロール定着を来し、死細胞由来の DAMPs およびコレステロール結晶によりさらにインフラマソームが活性化するという悪循環が起こると考えられた。

②動脈硬化病変の解釈

動脈硬化の形成初期は、血管内皮下に浸潤したマクロファージが変性したりリポ蛋白を取り込み、泡沫化することから始まる。

マクロファージのコレステロールエステル合成に主に関わるのが ACAT1 であり、ACAT1 欠損マウスから回収した腹腔マクロファージで、アセチル化 LDL を添加した際のコレステロールエステル蓄積がほとんど検出されないことから (図 17)、マクロファージの泡沫化には ACAT1 が必須であることが分かる。

しかし、今回の研究結果では、骨髄移植法によるマクロファージでの ACAT1 欠損モデルを作成しても、動脈硬化病変面積の改善は認めなかった (図 7)。これは Fazio らが過去に報告した結果と合致する⁽¹⁴⁾。動脈硬化病変における Oil Red O 染色では、ACAT1KO マウス移植群で染色性の乏しい病変を呈していたことから (図 7)、マクロファージの泡沫化抑制には成功していたものと思われる。このことから、動脈硬化病変におけるマクロファージでの ACAT1 欠損は、泡沫化抑制による改善効果を帳消しにするような増悪因子があることが示唆され、蓄積した遊離コレステロールの細胞毒性がその主因と考えられる。

ただし、全身性 ACAT1 欠損マウスモデルでは動脈硬化が改善することを我々は過去に報告しており⁽¹³⁾、これらの結果は骨髄由来以外の細胞における ACAT1 欠損が動脈硬化保護的に働いた可能性を示唆する。動脈硬化が進展してくると、本来血管中膜に存在する平滑筋細胞が形質転換の上、内膜に遊走して増殖するとされ、マクロファージ同様の変性リポ蛋白取り込み能を獲得し、病巣形成の中心的役割の一端を担うと考えられている⁽⁴⁶⁾。平滑筋細胞は、遊離コレステロール蓄積による毒性に強いという報告があり⁽⁴⁷⁾、全身性 ACAT1 欠損マウスモデルで動脈硬化が改善した理由としては、ACAT1 が欠損した平滑筋細胞での泡沫化が抑制されたことによる効果が指摘されている⁽⁴⁸⁾。実際、骨髄由来細胞以外での ACAT1 欠損を導入したモデルを作成すると、動脈硬化が改善することが示された (図 9)。

ACAT1KO マウス移植群の動脈硬化病変では、Moma-2 染色陽性領域が減少し、またモバットペンタクローム染色では無細胞領域が多かった (図 8)。恐らく、ACAT1KO マウス移植群の動脈硬化病変では、遊離コレステロール毒性に弱いマクロファージは細胞死を起こし、代わりに平滑筋細胞の領域が増えているのではないかと推察された。動脈硬化病変において、平滑筋細胞は一部マクロファージ様細胞にも形質転換するとされるが、その貪食能は通常 of 活性型マクロファージよりは劣ると考えられており⁽⁴⁹⁾、コレステロールや死細胞、壊死組織などの除去が円滑に行われなくなった結果、無細胞領域が増大している可能性が考えられた。

しかし、Cre-LoxP システムを用いて作成された骨髄系細胞特異的な ACAT1 欠損モデルでは動脈硬化が改善したという結果が報告されており、骨髄移植モデルとの動脈硬化における表現型の違いが見られている。Huang らは、同モデルでの ACAT1 欠損マクロファージでの integrin(CD29)発現低下による接着能の減弱を動脈硬化改善の理由の一つとして挙げており⁽¹⁵⁾、その点について骨髄移植モデルとの相違がある可能性があり、今後の検討課題と考えている。

当初、DKO 移植群では ACAT1KO による泡沫化の抑制と NLRP3KO による炎症の抑制という 2 つの効果から、最も顕著に動脈硬化病変が改善することを期待していたが、実際は皮膚病変と比較すると NLRP3KO による改善は限定的であった。このことは、皮膚黄色腫と動脈硬化病変の発症機構が必ずしも同一ではない可能性を示唆した。その差異について以下の可能性を挙げる。

動脈硬化病変は血管病変であり、皮膚よりも強く高コレステロール(リポ蛋白)環境下に暴露されている状況にあり、より病変が進展しやすい状況にあると考えられる。事実、動脈硬化病変は Western-type Diet 2 か月間の負荷で十分な病変形成が確認できたが、皮膚黄色腫が出現するにはよりコレステロール含有量の多い Paigen Diet を 3 か月間負荷することを要した。皮膚黄色腫が動脈硬化の早期の段階を反映した病変と捉えれば、変性リポ蛋白を取り込んだマクロファージの集簇が病変形成の主体と考えられ、インフラマソームの寄与する影響が大きいことが示唆される。反対に、進展し過ぎた病変では、マクロファージ以外の細胞や因子が複雑に絡み合ってくるため、インフラマソームを介した炎症反応を阻害するだけでは十分な病変抑制には至らないのかもしれない。実際、強い高コレステロール食負荷をかけたモデルの場合、インフラマソームを欠損させても動脈硬化が抑制されなかったという報告もある⁽⁵⁰⁾。

他にも、皮膚と血管の環境の違いも影響している可能性がある。組織を構成する細胞の違いや、取り巻く毛細血管やリンパ管の分布あるいは透過性の違い、血圧や体動などによる物理的刺激的の違い、酸素濃度の違い、これら様々な因子が局所へのリポ蛋白の供給や変性のさせ方、コレステロール引き抜き能、炎症細胞の浸潤の程度、あるいはサイトカインへの反応性、などの差異を規定しているかもしれない。これらも今後検証していく必要があると考えている。

③ACAT1 欠損が NLRP3 インフラマソームを活性化させた機序

少なくとも皮膚病変に関しては、ACAT1 を欠損した骨髄細胞が、コレステロールを負荷されることで、NLRP3 インフラマソーム活性化を誘導したと考えられたため、その具体的な機序について検証した。まず、ACAT1 欠損マクロファージが、コレステロール結晶や ATP といった既知の DAMPs による NLRP3 イ

ンフラマソーム活性化をより起こさせやすいという事象は指摘できなかつた(図 15)。また、細胞内の遊離コレステロールが直接 NLRP3 インフラマソームを活性化させていることも証明できなかつた(図 17-18)。対して、ACAT 阻害薬を用いた過去の既報と同様に⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾、ACAT1 欠損マクロファージにおいても、遊離コレステロールの蓄積が CHOP や TNF α の遺伝子発現を亢進させていることが確認された(図 19)。TNF α は CD47 の発現を低下させることで正常なエフェロサイトシス(貪食細胞によるアポトーシスを起こした細胞の除去)を低下させることが報告されており⁽⁵¹⁾、遊離コレステロールを蓄積したマクロファージは、小胞体ストレスなどでアポトーシスを起こした後に正常に処理されず、死細胞が周囲に DAMPs を供給してしまうことで、それらが間接的に NLRP3 インフラマソームを活性化させている可能性が考えられた。前述の通り、NLRP3 インフラマソームが活性化される状況に至ると、サイトカインの放出によってさらなる炎症細胞が誘導されると同時に、pyroptosis と呼ばれる細胞死によって DAMPs がさらに放出され、局所でのインフラマソーム活性化が持続する。感染を契機としたインフラマソーム活性化機構の場合、pyroptosis はマクロファージ自身が感染の足場とならないようにするための生理的な反応であり、呼び寄せられた好中球などによって感染が除去されることで炎症は収束していくが、今回のように、コレステロールのようなマクロファージ以外の機構での局所からの除去が難しいものが病因になっている場合には、病変への定着が起こってしまい、炎症が持続し慢性化するものと考えられた。

7. 結語

骨髄由来細胞における ACAT1 欠損は、主に NLRP3 インフラマソームを介して高コレステロール血症に随伴する皮膚黄色腫の形成を惹起する。一方、ACAT1 欠損による動脈硬化形成には NLRP3 インフラマソームの関与は限定的である。ACAT1 欠損による細胞内遊離コレステロールの蓄積は小胞体ストレスなどで細胞死を招き、死細胞からの危険シグナルによって間接的に NLRP3 インフラマソームを活性化させている可能性が示唆された。

8. 謝辞

本研究全般のご指導を賜りました自治医科大学 内科学講座 内分泌代謝学部門 教授 石橋 俊先生ならびに自治医科大学 内科学講座 内分泌代謝学部門 学内講師 高橋 学先生に深く感謝致します。さらに、実験について多くのご指導・ご助言を賜りました自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 高橋 将文先生に心より感謝致します。

ならびに、本研究を行うにあたり、多大なご協力を頂きました当研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

9. 引用文献

- (1) Cochain C, Zerneck A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Arch.* 469:485-499,2017
- (2) Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 424:245-252,2013.
- (3) Chang TY, Li BL, Chang CC, Urano Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E1-9,2009
- (4) Bocan TM, Krause BR, Rosebury WS, Mueller SB, Lu X, Dagle C, Major T, Lathia C, Lee H. The ACAT inhibitor avasimibe reduces macrophages and matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic lesions of hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:70-79,2000
- (5) Kusunoki J, Hansoty DK, Aragane K, Fallon JT, Badimon JJ, Fisher EA. Acyl-coA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 103:2604-2609,2001
- (6) Delsing DJ, Offerman EH, van Duyvenvoorde W, van Der Boom H, de Wit EC, Gijbels MJ, van Der Laarse A, Jukema JW, Havekes LM, Princen HM. Acyl-coA:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe reduces atherosclerosis in addition to its cholesterol-lowering effect in ApoE*3-leiden mice. *Circulation.* 103:1778-1786,2001
- (7) Namatame I, Tomoda H, Ishibashi S, Omura S. Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:737-742,2004
- (8) Terasaka N, Miyazaki A, Kasanuki N, Ito K, Ubukata N, Koieyama T, Kitayama K, Tanimoto T, Maeda N, Inaba T. ACAT inhibitor pactimibe sulfate (CS-505) reduces and stabilizes atherosclerotic lesions by cholesterol-lowering and direct effects in apolipoprotein e-deficient mice. *Atherosclerosis.* 190:239-247,2007
- (9) Ikenoya M, Yoshinaka Y, Kobayashi H, Kawamine K, Shibuya K, Sato F, Sawanobori K, Watanabe T, Miyazaki A. A selective ACAT-1 inhibitor, K-604, suppresses fatty streak lesions in fat-fed hamsters without affecting plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis.* 191:290-297,2007
- (10) Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, Anderson TJ, Bertrand O, Reeves F, Title LM, Alfonso F, Schampaert E, Hassan A, McLain R, Pressler ML, Ibrahim R, Lesperance J, Blue J, Heinonen T, Rodes-Cabau J, Avasimibe,

- Progression of Lesions on UltraSound I. Effects of the acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions. *Circulation*. 110:3372-3377,2004
- (11)Nissen SE, Tuzcu EM, Brewer HB, Sipahi I, Nicholls SJ, Ganz P, Schoenhagen P, Waters DD, Pepine CJ, Crowe TD, Davidson MH, Deanfield JE, Wisniewski LM, Hanyok JJ, Kassalow LM, Investigators AIATE. Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 354:1253-1263,2006
- (12)Meuwese MC, de Groot E, Duivenvoorden R, Trip MD, Ose L, Maritz FJ, Basart DC, Kastelein JJ, Habib R, Davidson MH, Zwinderman AH, Schwocho LR, Stein EA, Investigators C. ACAT inhibition and progression of carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: The captivate randomized trial. *JAMA*. 301:1131-1139,2009
- (13)Yagy H, Kitamine T, Osuga J, Tozawa R, Chen Z, Kaji Y, Oka T, Perrey S, Tamura Y, Ohashi K, Okazaki H, Yahagi N, Shionoiri F, Iizuka Y, Harada K, Shimano H, Yamashita H, Gotoda T, Yamada N, Ishibashi S. Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem*. 275:21324-21330,2000
- (14)Fazio S, Major AS, Swift LL, Gleaves LA, Accad M, Linton MF, Farese RV, Jr. Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. *J Clin Invest*. 107:163-171,2001
- (15)Huang LH, Melton EM, Li H, Sohn P, Rogers MA, Mulligan-Kehoe MJ, Fiering SN, Hickey WF, Chang CC, Chang TY. Myeloid acyl-coA:cholesterol acyltransferase 1 deficiency reduces lesion macrophage content and suppresses atherosclerosis progression. *J Biol Chem*. 291:6232-6244,2016
- (16)Accad M, Smith SJ, Newland DL, Sanan DA, King LE, Jr., Linton MF, Fazio S, Farese RV, Jr. Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl coA:cholesterol acyltransferase 1. *J Clin Invest*. 105:711-719,2000
- (17)Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*. 5:781-792,2003

- (18) Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, Tall AR, Davis RJ, Flavell R, Brenner DA, Tabas I. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor- α and interleukin-6: Model of nf-kappab- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem.* 280:21763-21772,2005
- (19) Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 9:73-102,2014
- (20) Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 13:397-411,2013.
- (21) Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 464:1357-1361,2010
- (22) Rajamaki K, Lappalainen J, Orni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: A novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One.* 5:e11765,2010
- (23) Karasawa T, Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 24:443-451,2017
- (24) Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in western diet-fed apolipoprotein e-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 425:162-168,2012
- (25) Duran-Struuck R, Dysko RC. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 48:11-22,2009
- (26) Usui S, Hara Y, Hosaki S, Okazaki M. A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J Lipid Res.* 43:805-814,2002
- (27) Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 68:231-240,1987

- (28) Andrés-Manzano MJ, Andrés V, Dorado B. Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root. *Methods Mol Biol.* 1339:85-99,2015
- (29) Movat HZ. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol.* 60:289-295,1955
- (30) Russell HK, Jr. A modification of movat's pentachrome stain. *Arch Pathol.* 94:187-191,1972
- (31) Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 34:1345-1353,1955
- (32) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:333-337,1979
- (33) Yoshida H, Nakamura H. Modified low-density lipoprotein. *Nihon Rinsho.* 52:3090-3095,1994
- (34) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37:911-917,1959
- (35) Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem.* 255:9344-9352,1980
- (36) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159,1987
- (37) Zak A, Zeman M, Slaby A, Vecka M. Xanthomas: clinical and pathophysiological relations. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 158:181-188,2014.
- (38) Parker F. Normocholesterolemic xanthomatosis. *Arch Dermatol.* 122:1253-257,1986
- (39) Parker F, Bagdade JD, Odland GF, Bierman EL. Evidence for the chylomicron origin of lipids accumulating in diabetic eruptive xanthomas: a correlative lipid biochemical, histochemical, and electron microscopic study. *J Clin Invest.* 49:2172-2187,1970.
- (40) Lindberg MR. Xanthomas. *Diagnostic Pathology:Soft Tissue Tumors.* 280-283,2010.

- (41) Katona T, Smoller BR. Dyslipidemia (Hyperlipidemia). *Clinical and Pathological Aspects of Skin Diseases in Endocrine, Metabolic, Nutritional and Deposition Disease*. 55-61, 2010.
- (42) Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 92:883-893, 1993.
- (43) Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 7:99-109, 2009
- (44) Yin K, Liao DF, Tang CK. ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport. *Mol Med*. 16:438-449, 2010
- (45) Chen L, Yao Q, Xu S, Wang H, Qu P. Inhibition of the NLRP3 inflammasome attenuates foam cell formation of THP-1 macrophages by suppressing ox-LDL uptake and promoting cholesterol efflux. *Biochem Biophys Res Commun*. 495:382-387, 2018
- (46) Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res*. 118:692-702, 2016.
- (47) Rong JX, Kusunoki J, Oelkers P, Sturley SL, Fisher EA. Acyl-coenzyme A (CoA):cholesterol acyltransferase inhibition in rat and human aortic smooth muscle cells is nontoxic and retards foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:122-27, 2005.
- (48) Fazio S, Dove DE, Linton MF. ACAT inhibition: bad for macrophages, good for smooth muscle cells? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:7-9, 2005.
- (49) Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:1256-1261, 2005.
- (50) Menu P, Pellegrin M, Aubert JF, Bouzourene K, Tardivel A, Mazzolai L, Tschopp J. Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis*. 2:e137, 2011
- (51) Kojima Y, Volkmer JP, McKenna K, Civelek M, Luscis AJ, Miller CL, Direnzo D, Nanda V, Ye J, Connolly AJ, Schadt EE, Quertermous T, Betancur P, Maegdefessel L, Matic LP, Hedin U, Weissman IL, Leeper NJ. CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature*. 536:86-90, 2016