

氏名	若林徹治
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 556 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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と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
論文審査委員	（委員長） 教授 新保昌久 （委員） 教授 今井靖 講師 木村博昭

論文内容の要旨

1 研究目的

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り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。

そこで本研究では、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。

2 研究方法

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

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。

3 研究成果

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($\times 104\mu\text{m}^2$)；Wild BMT : 25.0 ± 8.2 、NLRP3KO BMT : 15.6 ± 8.6 、ACAT1KO BMT : 36.7 ± 4.9 、DKO BMT : 27.4 ± 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 BM 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。

4 考察

骨髓由来細胞特異的 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。

5 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。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、動脈硬化の発症進展および皮膚黄色腫の形成におけるインフラマソームの役割を明らかにするため、マクロファージのコレステロール代謝に関わるアシル-CoA コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT1) の骨髄細胞特異的欠損マウスを用いて行った研究である。動脈硬化の抑制が期待される ACAT1 の阻害が、必ずしも動脈硬化を改善せず、また皮膚黄色腫が誘導されるとの先行研究の結果を踏まえ、ACAT1 阻害によって生じる遊離コレステロール蓄積に伴う細胞毒性に、NLRP3 インフラマソームが関与するとの仮説を立て、その詳細な機序を解析している。

まず、骨髄細胞特異的 ACAT1 欠損モデルで皮膚黄色腫に類似する皮膚病変が形成され、その病変は 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の惹起が皮膚黄色腫の形成を促進することを明らかにした。一方、動脈硬化病変では NLRP3 インフラマソームの関与は限定的であることを示した。次に、皮膚病変における炎症細胞浸潤やサイトカインの発現を解析し、インフラマソームが分泌に関与する IL-1 β の発現亢進を確認した。さらに、腹腔マクロファージを用いた *in vitro* 実験において、遊離コレステロール蓄積は NLRP3 インフラマソームを直接活性化するのではなく、小胞体ストレスなどから導かれた細胞死により、間接的に活性化する機序を明らかにした。

上記の結果は、動脈硬化や皮膚黄色腫におけるインフラマソームの役割に関する新しい知見を提供しており、学問的価値の高い研究である。過去の報告から仮説を立て、骨髄移植モデルによる病態解析を行う高度かつ難易度の高い手法を用いて丹念にメカニズムを検討し、論文は明確に記載されている。審査委員からは、今回関与が限定的とされた動脈硬化形成について、バルーン傷害モデル等で動脈硬化のより初期段階での関与を検討すると、さらに発展性が期待できるので

はとの意見も出された。

一部の統計解析と軽微な記載内容の修正、および図表のタイトル・説明の加筆を指示し、いずれも速やかにかつ適切に対応された。

最終試験の結果の要旨

最終審査会に際しては、論文の内容について明快にプレゼンテーションがなされ、審査委員からの質問にも適切に答えていた。関連する過去の知見にも精通し、研究者として十分な資質・能力を有していることは明らかであった。

以上の観点から、本論文は学位論文として相応しく、申請者は学位に値する学識が備わっていると審査委員全員が判断し、最終試験に合格とした。