

(様式第9 別紙2：公開版)

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 高部 稚子

2. 養成カリキュラム名： 動脈硬化の発生機序の解明と新規抗動脈硬化剤の探索

3. 養成カリキュラムの達成状況

本カリキュラムでは、酸化変性を受けた低比重リポタンパク（酸化LDL）に含まれる酸化生成物に着目し、血管を構成する細胞（内皮細胞、平滑筋細胞及び血中から浸潤し貪食細胞に分化したマクロファージ）の遺伝子応答を網羅的に解析し、動脈硬化発症の初期原因の探求とメカニズムの解明を目標として研究者の育成を目指している。

当初の研究計画通り、ヒト血管内皮単培養系における、酸化生成物の影響の網羅的解析は終了し、動脈硬化増悪の一端を担う可能性のある遺伝子・タンパクについて新しい知見を得た。また、同遺伝子の発現メカニズムの解明を行っており、転写因子の同定もあわせて行っている。

パイオインフォマティクスによるクラスター解析についても現在、論文化に向けデータの集積を行っており、今年度においては、ほぼ養成カリキュラムの予定に即した進捗となっている。

4. 成果

動脈硬化は血管壁に脂質や細胞成分等が蓄積し肥厚する現象であり、脳卒中や心筋梗塞などの深刻な疾病を引き起こす。動脈硬化巣の脂質成分が主に酸化変性を受けた低比重リポタンパク（酸化LDL）由来であることから、現在のところ、動脈硬化発症には酸化LDLが深く関わっているとする“酸化LDL仮説”が支持されている。酸化LDLは貪食細胞であるマクロファージに取り込まれ、マクロファージを泡沫化へ導くだけでなく、血管を構成する細胞を刺激し、増殖や接着分子の発現、サイトカインの産生を促すこと等が既に報告されている。

本研究では酸化LDLの構成成分に着目し、各成分によるヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の遺伝子発現に対する影響について解析を行った。コレステロールの酸化生成物であるオキシステロール：7-ketocholesterol, 22(R)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol、酸化LDL表層に含まれる主成分である  $\alpha$ -palmitoyl-lysophosphatidylcholine (LysoPC) 及び脂質過酸化による生成物として生理活性の高いことが知られている 4-hydroxynonenal (4HNE)を添加後1, 4, 24時間でのHUVECの遺伝子変化をオリゴDNAチップにより網羅的に解析した。なお、本解析に用いた試薬濃度は、ヒト末梢血から調製したLDLを銅で酸化して得た酸化LDLに含まれる濃度とほぼ同等であり、後述する“酸化LDL添加による遺伝子変動とのクラ

スタリング比較”が可能であると考えられる。

オリゴDNAチップ解析の結果、オキシステロール類がHUVECの遺伝子発現誘導に殆ど寄与しないのに比べ、4HNE及びLysoPCは添加後4時間において各々11、55遺伝子の発現亢進を示すことが明らかとなった。

本研究では、その中でもLysoPCによって発現亢進がみられるアミノ酸トランスポーター遺伝子；SLC7A5及びSLC3A2に着目した。これらは各々、LAT1及びCD98タンパクとなり、ヘテロダイマーを形成して細胞膜に移行し、増殖に必要な必須アミノ酸を取り込むことが知られている。LAT1は癌細胞で高発現を示すことから、近年、抗癌剤のターゲットとして研究が進められているが、動脈硬化発症との関連についての報告は未だなされていない。

まず、ノーザンブロット法を用いて、LysoPCによるmRNAレベルの上昇を再度確認した。ヒト大動脈血管内皮細胞細胞 (HAEC)を用いて行った解析でも同様の結果が得られており、このことから、LysoPCによるSLC7A5、SLC3A2の発現は、血管内皮細胞において共通の反応である可能性が高いと考えられる。また、リアルタイムPCR法を用いた経時変化の解析結果から、SLC7A5、SLC3A2はいずれもLysoPC添加1時間後から有意な上昇が見られることが明らかとなった。

次に、タンパクであるLAT1及びCD98が発現すると、ヘテロダイマーを形成し細胞膜に移行してアミノ酸トランスポーターとして働くことが考えられる。そこで、LysoPC刺激後のHUVECから膜画分を調製しLAT1抗体を用いたガウエスタンプロットを行った。その結果、LysoPC刺激により有意にLAT1タンパク発現が増強していることが確認された。

また、LAT1及びCD98のヘテロダイマーによって取り込まれるアミノ酸の1つであるロイシンの放射性ラベル体；L-[<sup>14</sup>C]leucineを用いて、LysoPC刺激によるアミノ酸取り込みの亢進について検討したところ、LysoPC刺激6時間において有意な亢進が見られた。更にこのL-[<sup>14</sup>C]leucineの取り込みは、LAT1の特異的インヒビターを用いることにより完全に抑制された。以上の結果から、LysoPC刺激によって、HUVECにおけるアミノ酸トランスポーターの機能が亢進していることが実証された。

オリゴDNAチップの結果において、LysoPC刺激により、炎症に関与するサイトカインinterleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8)のプロモーター部位に結合する転写因子NF-1L6 (CEBPβ)や、単球の血管壁への接着に関与する接着分子ICAM-1が上昇することに着目し、IL-6、IL-8及びICAM-1の定量を行った。その結果、LysoPC刺激により、IL-6、IL-8の培養上清への放出及び細胞表面へのICAM-1タンパクの発現が認められた。IL-6、IL-8に関して、LAT1の拮抗剤を用いた阻害実験を行ったところ、アミノ酸の取り込み及びIL-6、IL-8の発現が一部抑制された。

さらに、LDLレセプター欠損マウスに高脂肪食を与えた動脈硬化モデルにおいて、大動脈の免疫染色を行った。普通食を与えたマウスと比べ、高脂肪食を与え、動脈硬化を発症したマウスでは明らかに血管内皮細胞のLAT1タンパク発現が亢進していることが確認された。

このことから動脈硬化発症時に、血管内皮細胞においてアミノ酸トランスポーターの機能が亢進していることが推測された。

以上の結果から、LysoPCによるアミノ酸トランスポーターの遺伝子発現亢進は、サイトカインを発現することにより、動脈硬化発症部位における炎症反応に寄与する可能性が示唆された。LysoPCは酸化LDL中に多く含まれ、また多様な生理活性を持つことが報告されてきたが、本研究で行った内皮細胞の遺伝子発現に関する網羅的解析により、LysoPCが動脈硬化促進に寄与する新たな機構が見いだされた。

その他、“酸化LDL添加による遺伝子変動との比較”について、経時的な解析結果を基にクラスタリングを行った。同条件での解析を3回行った結果、5つのグループにクラスタリングされることが明らかとなった。上記にて誘導にほとんど寄与しないと述べたオキシステロール類に関しては、むしろ特異的に遺伝子減少を示すクラスターがあることが分かった。

更に非常に興味深いことに、クラスター毎に遺伝子上流に共通の転写因子配列を有していることが明らかになっており、現在も詳細解析を継続している。

## 5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。)

なし

(2) 口頭発表(発表済を対象。)

なし

(3) 特許等の出願件数

なし