

マクロファージでのコレステロールエステルの蓄積過程におけるリン脂質代謝の役割

秋葉 聡

Involvement of Phospholipase A₂ in the Supply of Fatty Acids Required for Cholesterol Esterification Associated with Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages

Satoshi AKIBA

Department of Pathological Biochemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received June 19, 2003)

The formation of foam cells, a critical event in the early stages of atherosclerosis, is associated with the uptake of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) by macrophages and the subsequent accumulation of cholesterol ester formed by the catalytic action of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT). Although free cholesterol, a substrate for ACAT, is supplied from the intracellular cholesterol pool, little is known about the pathways involved in the supply of fatty acids, precursors for fatty acyl-CoA as another substrate for ACAT. Our recent studies were undertaken to examine the possible involvement of phospholipase A₂ (PLA₂) in the supply of fatty acids required for the cholesterol esterification. In mouse peritoneal macrophages and RAW264.7 macrophages, oxLDL induced the liberation of fatty acids from membrane phospholipids to increase cholesterol ester having the fatty acids as an acyl chain. The changes in these lipids were suppressed by the inhibition of cytosolic PLA₂ (cPLA₂). Although oxLDL did not affect the activity or amounts of cPLA₂, preincubation with oxLDL enhanced the release of fatty acids induced by Ca²⁺ ionophore, which accelerates the hydrolytic action of cPLA₂. We further observed that oxLDL induced the generation of ceramide through the *de novo* synthesis. Exogenous ceramide and 13-hydroxyoctadecadienoic acid, an oxidized lipid in oxLDL particles, also stimulated fatty acid release. Based on these findings, we propose that oxLDL activates cPLA₂ to supply fatty acids required for the cholesterol esterification, through the acceleration of the hydrolytic action of cPLA₂ by endogenous ceramide and by oxidized lipids in oxLDL particles in macrophages.

Key words—oxidized LDL; macrophage; phospholipase A₂; foam cell; atherosclerosis

1. はじめに

粥状動脈硬化症は、動脈の肥厚や脂質沈着に伴う血管機能の低下を主徴とする病変であり、狭心症や心筋梗塞などの急性冠症候群を引き起こす主因と考えられている。その発症や増悪化に関与する因子として、高脂血症に伴い血管内皮下で増大する低密度リポタンパク質 (LDL)、特に、その酸化成績体 (酸化 LDL) が知られている。酸化 LDL は、血管内皮細胞、マクロファージ、血管平滑筋細胞などにおいて様々な細胞応答を誘起することで、粥状動脈硬化症の発症や進展に関与しており、その内、マク

ロファージの酸化 LDL の貪食に伴う泡沫化は、初期病変の 1 つである血管内皮下での脂質の沈着を招く。このマクロファージの泡沫化は、細胞内でのコレステロールエステルの生成・蓄積に起因することから、コレステロールエステルの産生経路を解明することは、粥状動脈硬化症の進展過程を理解する上で意義があると考えられる。本稿では、このコレステロールエステルの生成過程に関して、リン脂質代謝、特に、リン脂質代謝酵素であるホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) との関連性に焦点を当て、筆者の研究室で得られた知見を交えて概説したい。

2. 粥状動脈硬化症の発症・進展過程

粥状動脈硬化症は、酸化 LDL が引き起こす様々な細胞応答に伴い発症・進展していくと考えられており、¹⁻⁴⁾ その概略を Fig. 1 に示す。血管内皮下に

京都薬科大学病態生化学教室 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

e-mail: akiba@mb.kyoto-phu.ac.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

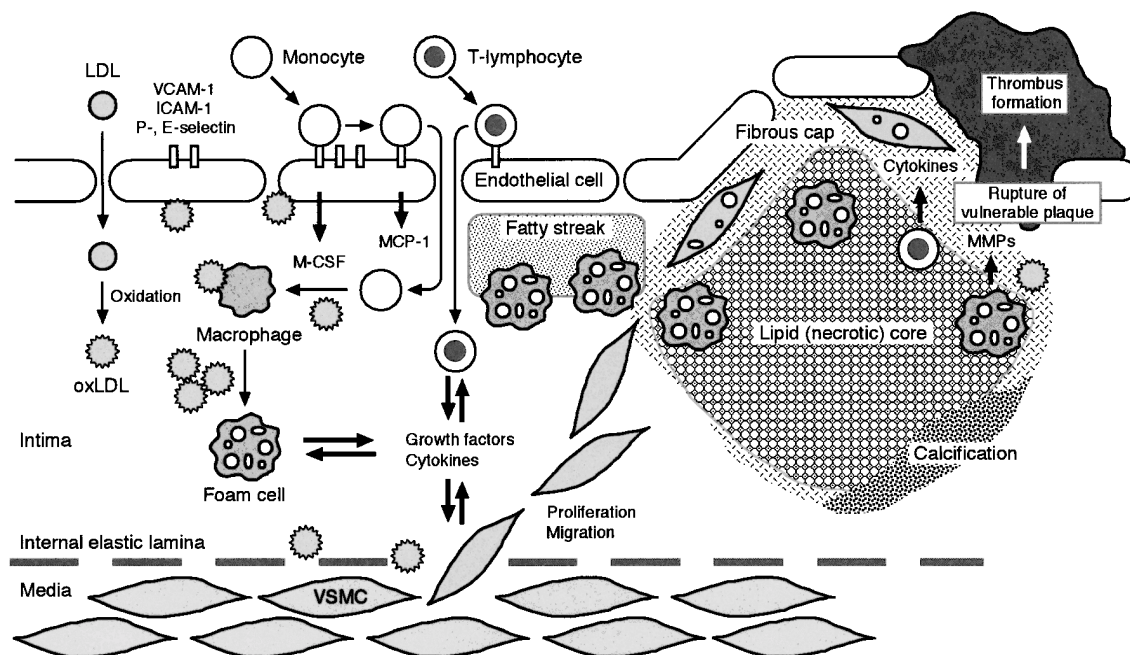


Fig. 1. Oxidized Low-Density Lipoprotein-stimulated Cellular Responses Contributing to the Formation of Atherosclerotic Lesion

Low-density lipoprotein (LDL), an atherogenic lipoprotein, penetrates into the arterial intima where it undergoes oxidative modification. The oxidized LDL (oxLDL) stimulates endothelial cells to induce the synthesis of adhesion molecules (*i.e.* vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), those which mediate the migration of monocytes into the intima and their differentiation into macrophages. T-lymphocytes also transmigrate into the intima. The uptake of oxLDL by macrophages leads to the transformation into lipid-laden foam cells, of which accumulation results in the formation of fatty streak lesions. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) transmigrate from the media in response to oxLDL as well as cytokines and growth factors secreted by macrophages and T-lymphocytes. The intimal VSMCs proliferate and produce extracellular matrix, which forms, together with VSMCs, fibrous caps to cover lipid (necrotic) core composed of lipids and debris derived from necrotic and/or apoptotic foam cells, thus leading to the formation of atherosclerotic plaques. In the advanced stages of atherosclerosis, in addition to an increase in size of lipid core, the production of extracellular matrix decreases as a result of apoptosis of VSMCs in response to cytokines, and extracellular matrix is degraded by matrix metalloproteases (MMPs) secreted by macrophages in response to oxLDL and cytokines, thus forming vulnerable atherosclerotic plaques with a large lipid core and very thin fibrous caps, of which rupture leads to thrombus formation.

において生じた酸化 LDL が、血管内皮細胞の lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) などの酸化 LDL 受容体に作用すると、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) などの接着分子やケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現が促進される。その結果、血流中の単球は血管内皮細胞への接着を介して内皮下へと遊走・浸潤し、さらに、血管内皮細胞から産生された macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) の作用を受け、マクロファージへと分化する。

酸化 LDL がマクロファージの種々のスカベンジャー受容体 (SR-A, CD36, SR-BI, CD68, LOX-1, SR-PSOX など) を介して貪食されると、後述するように、酸化 LDL 由来のコレステロールから産生されたコレステロールエステルが細胞内に蓄積する結果、マクロファージの泡沫化が生じる。この泡沫細胞が増加・集積することで脂肪線条と呼ばれる脂

質の沈着を伴った初期病変が形成される。また、酸化 LDL の刺激を受けたマクロファージでは、炎症性サイトカインや成長因子などの種々の生理活性物質 (tumor necrosis factor- α や interleukin-1 など) の産生が促進される。一方、内皮下に浸潤した T-リンパ球 (T-helper type 1) から interferon- γ (IFN- γ) などのサイトカインが産生される。

血管中膜に存在する血管平滑筋細胞は、本来血管の収縮機能を担う細胞であるが、酸化 LDL のみならず、マクロファージや T-リンパ球から産生されたサイトカインなどの刺激を受けると増殖型へと形質転換 (変換) を起こし、内皮下へ浸潤する。さらに、形質転換した血管平滑筋細胞は、これらの刺激に伴い増殖するとともに、自らも生理活性物質やマトリックスタンパク質を産生するようになり、このことが動脈の肥厚や線維化の一因となる。また、内皮下に浸潤した血管平滑筋細胞の一部も、酸化 LDL を貪食して泡沫化する。

酸化 LDL による細胞応答に伴い病態が進展していく過程において、泡沫細胞の壊死に伴い沈着した脂質をコアとして、これを血管平滑筋細胞やマトリックスタンパク質からなる線維性被膜が覆ったプラークが形成される。また、病態がさらに進展すると形成されたプラークの一部は石灰化を起こす。プラークには、不安定なプラーク (vulnerable plaque) と呼ばれる比較的薄い線維性被膜に覆われた大きな脂質コアを有するものがあり、このプラークは、泡沫細胞の増加に伴う脂質コアの拡大、血管平滑筋細胞でのマトリックスタンパク質の産生低下やそのアポトーシス、及び、マクロファージなどから産生された matrix metalloprotease (MMP) による線維性被膜の分解によって、脆弱化・破綻をきたす。プラークの破綻は、その部位での血栓形成を介した血管内腔の閉塞を引き起こすことになり、このことが急性冠症候群の発症要因となる。

上述した粥状動脈硬化症の発症・進展に関わる細胞応答の発現には、酸化 LDL の受容体を介した機構に加えて、酸化 LDL 中の脂質酸化物 (コレステロール及びリン脂質の酸化物) やその水解産物 (脂肪酸酸化物及びリゾリン脂質) の作用による機構も関与している。また、MCP-1, M-CSF, サイトカインなどの生理活性物質は、Fig. 1 中には示していないが、病変部位に存在する種々の細胞から産生されることから、実際には細胞間のクロストークに伴い種々の細胞応答が互いに増幅しあう結果、病態は複雑に進展していくと考えられる。

3. マクロファージでの酸化 LDL の貪食に伴うコレステロールエステルの蓄積

酸化 LDL を貪食したマクロファージは、細胞内にコレステロールエステルを蓄積することで泡沫化するが、この過程の概略を Fig. 2 に示す。貪食された酸化 LDL はライソゾーム内で種々の酵素により分解されるが、酸化 LDL 中のコレステロールエステルは酸性リパーゼの作用により加水分解されていったん遊離コレステロールとなり、その一部は形質膜などでプールされる。この遊離コレステロールが一定量を超えると、小胞体膜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 (ACAT) の作用により再度コレステロールエステルへと変換されるが、この反応は ACAT の 2 種の分子種の内、ACAT-1 により担われている。^{5,6)} これ

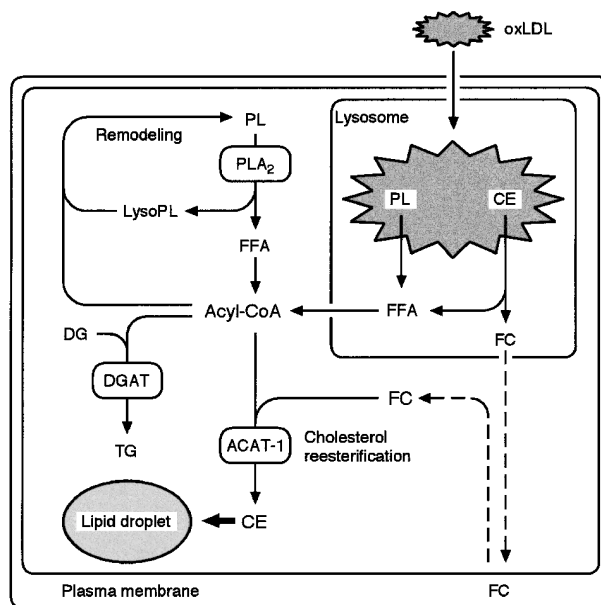


Fig. 2. Cholesterol Reesterification Associated with the Uptake of oxLDL in Macrophages

Particles of oxLDL taken up by macrophages are delivered to lysosomes, where their contents including cholesterol ester (CE) undergo the degradation catalyzed by lysosomal enzymes. The hydrolysis of cholesterol ester results in the liberation of free cholesterol (FC), which moves to the cholesterol pool in the plasma membrane. The excessive free cholesterol is reesterified with acyl-CoA by the catalytic action of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) at the endoplasmic reticulum to form cholesterol ester, which accumulates as cytoplasmic lipid droplets, thus leading to foam cell formation. It is possible that free fatty acids (FFA), precursors for acyl-CoA utilized for the cholesterol reesterification, are supplied from endogenous membrane phospholipids (PL) by the hydrolytic action of phospholipase A₂ (PLA₂) in addition to oxLDL-derived phospholipids and cholesterol ester. Acyl-CoA is also utilized for the remodeling of phospholipids and for the generation of triacylglycerol (TG) catalyzed by acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT). DG: diacylglycerol, LysoPL: lysophospholipids.

らの過程を経て生成されたコレステロールエステルが細胞質において油滴として蓄積されることで、マクロファージが泡沫化する。また、遊離コレステロールはコレステロールエステルから中性コレステロールエステラーゼの作用によっても生成されるが、細胞内の遊離コレステロールの一部は ATP binding cassette transporter A-1 などの輸送経路を介して細胞外へと排出される。

このコレステロールエステルの生成反応において、ACAT-1 の基質となる遊離コレステロールはその細胞内プールから供給されると考えられるが、もう一方の基質であるアシル CoA 及びその前駆体である遊離脂肪酸の供給経路については明確ではない。ヒト LDL 中のコレステロールエステルの分子種としては、cholesteryl linoleate が主であり (50%)、

他に cholesteryl oleate (25%) や cholesteryl arachidonate (5%) が存在しているが、一方、脂肪線条中の泡沫細胞では、cholesteryl oleate (50%) が主たる分子種であり、cholesteryl linoleate (15%) や cholesteryl arachidonate (3%) は少ない。⁷⁾ さらに、cholesteryl linoleate を含有するアセチル化 LDL でマウス腹腔マクロファージを刺激すると、cholesteryl linoleate の水解とともに cholesteryl oleate の増大が見られる。⁸⁾ これらのことから、マクロファージでのコレステロールエステルの生成過程において、酸化 LDL 中のコレステロールエステルのアシル鎖に由来する脂肪酸・アシル CoA が遊離コレステロールの再エステル化に利用される程度は低く、この再エステル化には他の経路から供給されたアシル CoA が利用されることが推察される。その経路を示唆する知見として、放射性的脂肪酸（オレイン酸など）で細胞膜リン脂質を標識したマウスやラットの腹腔マクロファージにコレステロールを含むリポソームやアセチル化 LDL を取り込ませると、ホスファチジルコリンが減少するとともに放射性的脂肪酸をアシル鎖とするコレステロールエステルが増大すること、また、コレステロールと放射性的脂肪酸で標識されたホスファチジルコリンを含むリポソームを取り込ませると、放射性的コレステロールエステルが増大することが報告されている。^{9,10)} これらの知見を踏まえると、酸化 LDL を貪食したマクロファージにおいても、細胞膜又は外因性（酸化 LDL）のグリセロリン脂質に由来する脂肪酸がアシル CoA として遊離コレステロールの再エステル化に利用される可能性が考えられる（Fig. 2）。

アシル CoA はコレステロールエステルの生成に加えて、リン脂質のリモデリングやトリグリセリドの生成にも利用されており、後者の反応はアシル CoA : ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) により担われている¹¹⁾ (Fig. 2)。上述の放射性的脂肪酸で標識したマクロファージでは、オレオイル CoA はトリグリセリドの生成よりも遊離コレステロールの再エステル化によく利用され、リノレオイル CoA やアラキドノイル CoA の利用は低いことが示唆されており、⁹⁾ この一因として ACAT-1 (ヒト単球系 THP-1 細胞由来) がオレオイル CoA に対して基質特異性を示すこと¹²⁾ が考

えられる。泡沫細胞において cholesteryl linoleate や cholesteryl arachidonate よりも cholesteryl oleate が多く蓄積していること⁶⁾ は、アシル鎖となる各脂肪酸の供給量の差に起因するとも考えられるが、その一因として ACAT-1 の基質特異性も関与するかもしれない。しかしながら、ヒト ACAT-1 の強発現の実験系では、リノレオイル CoA やアラキドノイル CoA に対する基質特異性とオレオイル CoA に対するそれとの差はわずかであるとの報告もある。^{11,13)}

4. コレステロールエステルの生成過程におけるホスホリパーゼ A₂ の役割

上述したコレステロールの再エステル化に必須となる遊離脂肪酸がグリセロリン脂質から供給される経路について、筆者らは、^[3H] オレイン酸で標識したマウス腹腔マクロファージやマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を酸化 LDL で刺激する実験系にて検索した結果、経時的な cholesteryl oleate の増大及びホスファチジルコリンの減少が見られることに加えて、遊離オレイン酸も増大することを確認した。このような細胞に由来した脂質の変動から、コレステロールエステルのアシル鎖となる脂肪酸の供給を担う酵素として、グリセロリン脂質水解酵素である PLA₂ を想定し、後述するように、本酵素のコレステロールエステル生成への関与を示唆する知見を得た。^{14,15)}

PLA₂ は、グリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を水解することで脂肪酸及びリゾリン脂質を遊離・生成する酵素であり、特に炎症性細胞では細胞膜リン脂質からのアラキドン酸の遊離反応を担っており、脂質性生理活性物質であるエイコサノイド類の産生過程の初発酵素として知られている。PLA₂ には 10 数種の分子種が存在しており、^{16,17)} それらの内、生体内の PLA₂ は、細胞質に存在する Ca²⁺ 依存性の PLA₂ (cPLA₂) と Ca²⁺ 非依存性の PLA₂ (iPLA₂)、及び分泌性の PLA₂ (sPLA₂) の 3 つに大別される。刺激応答細胞での受容体刺激に伴うアラキドン酸の遊離反応は、cPLA₂, sPLA₂ 又は両者により担われている場合が多いが、筆者らは、マウスマクロファージ様 P388D₁ 細胞においてザイモザンの貪食に伴うアラキドン酸の遊離反応には、cPLA₂ に加えて iPLA₂ も寄与することを示した。^{18,19)} 一方、酸化 LDL を貪食したマクロファ

ジでのアラキドン酸遊離反応にも同様な PLA₂ 分子種の関与が予想されるが、マウス腹腔マクロファージでの酸化 LDL によるアラキドン酸遊離の一部は cPLA₂ の分子種の 1 つである cPLA₂α により担われており、iPLA₂ は関与していないとされる。²⁰⁾ このことを踏まえ、筆者らは、^[3H] アラキドン酸で標識した RAW264.7 細胞において酸化 LDL 刺激に伴い cholesteryl arachidonate が増大することを確認し、この増大が cPLA₂ の阻害剤 (methyl arachidonyl fluorophosphonate, MAFP) により抑制されることを示した。¹⁵⁾ このことから、酸化 LDL 刺激下に cPLA₂ により遊離されたアラキドン酸は、エイコサノイド類の産生に加えてコレステロールエステルのアシル鎖としても利用されることが示唆される。

泡沫細胞では cholesteryl arachidonate よりも cholesteryl oleate が多く蓄積していること⁶⁾ から、^[3H] オレイン酸で標識したマウス腹腔マクロファージ及び RAW264.7 細胞を用いて同様な検討を行った結果、¹⁵⁾ 酸化 LDL により誘起された cholesteryl oleate の生成、オレイン酸遊離、及びホスファチジルコリンの減少のいずれも MAFP により著しく抑制された (Fig. 3)。この条件下では cPLA₂ 活性のみならず iPLA₂ 活性も阻害されたが、iPLA₂ の阻害剤 (bromo-enol lactone) は、iPLA₂

活性を抑制するものの酸化 LDL によるオレイン酸遊離及び cholesteryl oleate の増大にはほとんど影響しなかった。また、MAFP は ACAT 及びアシル CoA 合成酵素の活性や酸化 LDL の取り込みには影響しない。このような放射性脂肪酸で標識した細胞の実験系では、細胞膜リン脂質に由来する脂肪酸の挙動のみを検討することになり、他 (酸化 LDL) に由来する脂肪酸をアシル鎖とするコレステロールエステルの生成は反映されないことになる。しかしながら、^[3H] コレステロールの存在下に酸化 LDL で刺激する実験系にてアシル鎖としての脂肪酸の由来を特定しない系においても、酸化 LDL 刺激に伴うコレステロールエステルの増大は MAFP により抑制され、その効果はオレイン酸の添加により消失した (Fig. 4)。また、コレステロールオキシダーゼにて細胞中の遊離コレステロール (コレステロールエステル) 含量を測定する系においても、同様な MAFP の抑制効果が見られる (未発表データ)。これらの結果から、コレステロールエステルのアシル鎖となる脂肪酸の供給の少なくとも一部は cPLA₂ により担われていると推察される。

cPLA₂ にはその分子種として cPLA₂α や cPLA₂γ が存在しており、両分子種の活性はいずれも MAFP により阻害される。cPLA₂α は Ca²⁺ 依存的に細胞質から核膜・小胞体膜へと移行し、アラキド

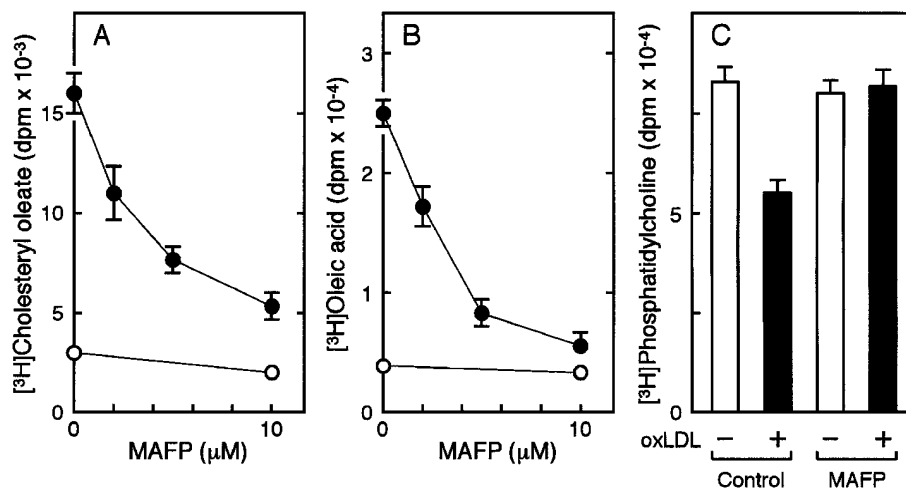


Fig. 3. Inhibitory Effects of Cytosolic PLA₂ Inhibitor on Cholesteryl Oleate Formation (A), Oleic Acid Release (B), and Hydrolysis of Phosphatidylcholine (C) in oxLDL-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages

(A, B) ^[3H] Oleic acid-labeled cells were treated with various concentrations of methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP), a cytosolic PLA₂ inhibitor, for 1 h, and then stimulated with (closed symbols) or without (open symbols) oxLDL (50 μg/ml) for 12 h. (C) ^[3H] Oleic acid-labeled cells were treated with or without (Control) MAFP (10 μM) for 1 h, and then stimulated with or without oxLDL (50 μg/ml) for 12 h. After lipids were extracted and separated by TLC, the radioactivity of cholesteryl oleate (A), free oleic acid (B), and phosphatidylcholine (C) was measured.

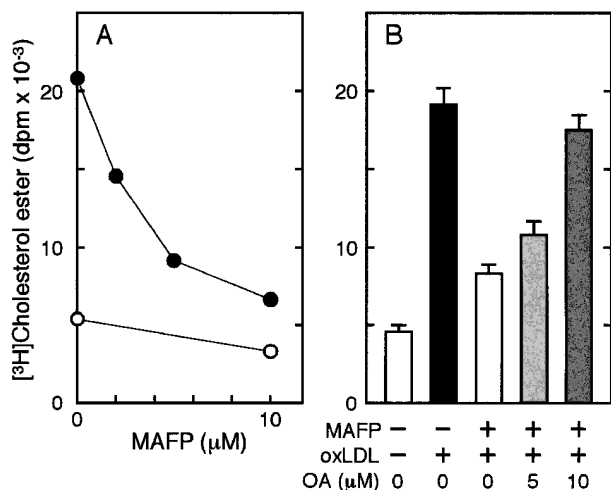


Fig. 4. Effects of Cytosolic PLA₂ Inhibitor on Cholesterol Ester Formation in Mouse Peritoneal Macrophages Stimulated with oxLDL in the Presence of [³H] Cholesterol

(A) Mouse peritoneal macrophages were treated with various concentrations of MAFP for 1 h, and then stimulated with (closed symbols) or without (open symbols) oxLDL (50 μg/ml) for 12 h in the presence of [³H] cholesterol (10 μM). (B) Mouse peritoneal macrophages were treated with or without MAFP (10 μM) for 1 h, and then stimulated with or without oxLDL (50 μg/ml) for 12 h in the presence of oleic acid (OA, 5 or 10 μM) and [³H] cholesterol (10 μM). After lipids were extracted and separated by TLC, the radioactivity of cholesterol ester was measured.

ン酸含有グリセロリン脂質に対して基質特異性を示すが、一方、cPLA₂γは小胞体膜などに局在し、グリセロリン脂質の脂肪酸鎖に対する基質特異性を示さない。²¹⁾ また、cPLA₂γはホスファチジルエタノールアミンのリモデリング及び活性酸素種で誘起されるアラキドン酸遊離に関与している。²²⁾ 上述の遊離オレイン酸の供給に関与するcPLA₂がcPLA₂αであると考えれば、cPLA₂αがアラキドン酸含有リン脂質に対して基質特異性を示すことと一致しないとも思えるが、筆者らは、RAW264.7細胞をCa²⁺イオノフォアで刺激すると遊離アラキドン酸に加えて遊離オレイン酸が増大すること、¹⁵⁾ 及び、この遊離反応や酸化LDLによるcholesteryl oleateの増大がcPLA₂αに選択的な阻害剤(pyrrolidine-1)²³⁾で抑制されること(未発表データ)から、cPLA₂αは細胞内ではオレイン酸含有グリセロリン脂質をいくらかは水解し得ると考える。現時点では、コレステロールエステルの生成過程にcPLA₂αが関与すると推察されるもののcPLA₂γの関与は不明であり、当然ながら酵素タンパク質の発現量の修飾による検討から、両分子種の役割をヒト由来のマクロファージにおいて解明することが必要となる。

5. cPLA₂の膜リン脂質水解過程に対する酸化LDLの促進作用

刺激応答細胞において、cPLA₂αは刺激に伴いmitogen-activated protein kinaseなどの種々のキナーゼによりリン酸化されることで、その活性が上昇し、一方で、細胞質でのCa²⁺濃度の上昇に伴い分子内のC2ドメインを介して小胞体膜・核膜へと移行する。その結果、cPLA₂αは基質である膜リン脂質を水解し、脂肪酸及びリゾリン脂質を遊離・生成する。ヒトのプラークではcPLA₂αの発現が増大しており、その部位はマクロファージや血管平滑筋細胞の局在と一致すること²⁴⁾が示されているが、ヒト単球由来マクロファージを酸化LDLで刺激してもcPLA₂α mRNAの発現量は変動しない。²⁵⁾ また、筆者らも酸化LDL刺激下でのRAW264.7細胞¹⁵⁾及びマウス腹腔マクロファージにおいてcPLA₂αのタンパク質量及び活性に変動が見られないことを確認している。しかしながら、酸化LDLであらかじめ刺激しておいたRAW264.7細胞を洗浄した後、さらにCa²⁺イオノフォアで刺激すると、イオノフォア単独で誘起されるアラキドン酸及びオレイン酸の遊離反応が促進されることを見出ししている。¹⁵⁾ したがって、酸化LDLの脂肪酸遊離促進作用はcPLA₂αそれ自身の変化ではなくcPLA₂αの膜リン脂質水解作用の亢進に起因すると考えられる。

筆者らは、血小板においてスフィンゴ脂質の1つであるセラミドがcPLA₂αの膜画分への移行を促進することを示している。²⁶⁾ そこで、RAW264.7細胞での酸化LDLの脂肪酸遊離促進作用にセラミドが関与する可能性を検討した結果、酸化LDL刺激(1–12時間)よりセラミドの経時的な増大が見られ、この増大は中性スフィンゴミエリナーゼの作用ではなくde novo合成に起因すること、及び、この増大を抑制した条件下ではcholesteryl oleateの増大は部分的ではあるが減少すること、さらに、外因性のセラミドによりオレイン酸の遊離が誘起されることを見出した。¹⁴⁾ このセラミドの作用がcPLA₂αの膜への移行の促進に起因するかどうかは不明であるが、de novo合成にて増大したセラミドはcPLA₂αが担う脂肪酸遊離を促進することで部分的にコレステロールエステルの生成に関与すると推察している。酸化LDL刺激に伴うセラミドの量的

変動は細胞種により様々であり、血管平滑筋細胞では刺激によりスフィンゴミエリナーゼの活性化を介して一過的（—2時間）なセラミドの増大が見られる²⁷⁾が、マウス腹腔マクロファージでは酸化 LDL で刺激（—1時間）してもセラミドは変動しないこと²⁸⁾や、ヒト単球由来マクロファージでは刺激下に増大するセラミドは酸化 LDL 中のスフィンゴミエリンにも由来すること²⁹⁾が示されている。

一方、酸化 LDL 中には、13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE), 7-ketocholesterol (7-KC), 25-hydroxycholesterol (25-HC) などの種々の脂質酸化物が含まれており、これらが酸化 LDL により誘起される細胞応答の発現に関与すると考えられている。これらの脂質酸化物の内、25-HC が cPLA₂α を介したアラキドン酸遊離を誘起することがヒト単球系 THP-1 細胞由来マクロファージにおいて示されている。²⁰⁾ 筆者らは、RAW264.7 細胞に 25-HC (未発表データ) やリノール酸の酸化体である 13-HODE を作用させると、Ca²⁺ イオノフォア刺激によるオレイン酸遊離が促進され、一方、7-KC はこのような促進作用を示さないことを見出している¹⁵⁾ (Fig. 5)。また、native LDL で細胞を処理した場合は、酸化 LDL とは異なり Ca²⁺ イオノフォア刺激によるオレイン酸の遊離反応は促進されない。さらに、マウス腹腔マクロファージでは、13-

HODE はリノール酸とは異なりアシル CoA 合成酵素に影響することなくアラキドン酸及びオレイン酸の遊離反応を誘起し、この反応は MAFP により阻害される (未発表データ)。これらの知見から、cPLA₂α の膜リン脂質の水解に対する酸化 LDL の促進作用には、セラミドに加えて酸化 LDL 中の脂質酸化物が関与することが示唆される。

6. マクロファージの泡沫化における sPLA₂ 及び Lipoprotein-associated PLA₂ の役割

ヒト及び動物モデルにおけるプラークでは sPLA₂ に分類される IIA 型や X 型の PLA₂ の発現が増大しており、^{24,30)} 病態の進展との関連性が検討されている。病巣部位では、IIA 型 PLA₂ は主として IFN-γ などのサイトカインの刺激に伴い血管平滑筋細胞から発現・放出され、粥状動脈硬化症の発症・進展に関わる様々な作用を示す。IIA 型及び X 型 PLA₂ の作用の 1 つとして、これらの sPLA₂ により LDL のグリセロリン脂質が水解されると、その修飾された LDL は酸化変性を受けやすくなることや、マクロファージに取り込まれることになり、結果的に泡沫化を助長することが示されている。^{30,31)} また、酸化 LDL 自身もヒト単球由来マクロファージにおいて IIA 型 PLA₂ の発現を亢進させることが示されており、³²⁾ このこともマクロファージの泡沫化の促進につながると思われる。

Platelet-activating factor acetylhydrolase は PLA₂ の 1 つであり、血中では lipoprotein-associated PLA₂ として LDL に結合して存在する。本酵素は LDL の酸化の過程で生成したグリセロリン脂質の酸化物を水解することで、脂肪酸の酸化物及びリゾリン脂質を生成すること³³⁾ が示されている。この PLA₂ の作用により生成した脂肪酸の酸化物が酸化 LDL とともにマクロファージに取り込まれ、上述の酸化 LDL の脂肪酸遊離促進作用に関与している可能性が考えられる。

7. おわりに

本稿では、マクロファージの泡沫化の原因となるコレステロールエステル生成反応において、そのアシル鎖となる脂肪酸の供給を cPLA₂ が担う可能性について記した。ACAT の阻害薬が臨床応用されようとしているが、ACAT の阻害と同様、cPLA₂ の阻害もマクロファージの泡沫化の抑制につながると予想される。さらに、エイコサノイドや

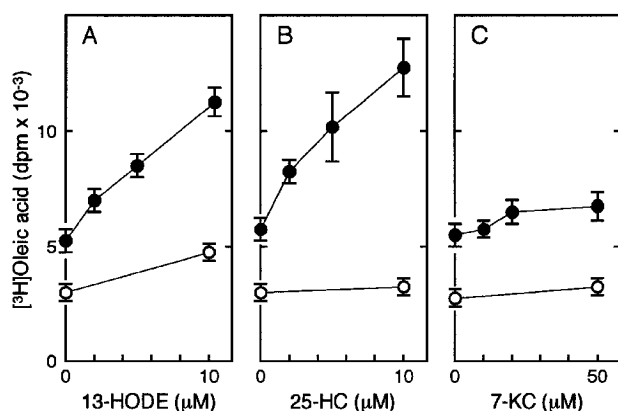


Fig. 5. Effects of 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (A), 25-Hydroxycholesterol (B), and 7-Ketocholesterol (C) on Ionomycin-induced Oleic Acid Release in RAW264.7 Macrophages

[³H] Oleic acid-labeled cells were treated with various concentrations of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (A, 13-HODE), 25-hydroxycholesterol (B, 25-HC), or 7-ketocholesterol (C, 7-KC) for 3 h, and then stimulated with (closed symbols) or without (open symbols) ionomycin (2 μM) for 30 min. After lipids were extracted and separated by TLC, the radioactivity of free oleic acid was measured.

リゾリン脂質は粥状動脈硬化症の増悪化に関与する因子であり、cPLA₂はこれらの産生を担っていることも考え合わせると、cPLA₂の阻害が粥状動脈硬化症の進展制御につながる可能性があり、cPLA₂が治療薬の標的となることが期待される。

謝辞 本研究は京都薬科大学病態生化学教室において行われたものであり、本研究に着手する機会を与えていただき、終始、御懇切な御指導を賜りました同教室佐藤隆司教授に厚く感謝の意を表します。また、本研究は、同教室羽山美佐子助手を始め大学院生、学部学生諸君の御協力のもと遂行することができたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費の助成によって行われたことを付記して感謝致します。

REFERENCES

- 1) Ross R., *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115–126 (1999).
- 2) Lusis A. J., *Nature*, **407**, 233–241 (2000).
- 3) Li A. C., Glass C. K., *Nat. Med.*, **8**, 1235–1242 (2002).
- 4) Fan J., Watanabe T., *J. Atheroscler. Thromb.*, **10**, 63–71 (2003).
- 5) Chang T. Y., Chang C. C. Y., Cheng D., *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 613–638 (1997).
- 6) Buhman K. K., Accad M., Farese R. V. Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **1529**, 142–154 (2000).
- 7) Smith E. B., *Adv. Lipid Res.*, **12**, 1–49 (1974).
- 8) Brown M. S., Goldstein J. L., *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 223–261 (1983).
- 9) Nishikawa K., Sato Y., Arai H., Inoue K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1169**, 257–263 (1993).
- 10) Pollaud C., Krause S., Lepert J. C., Orfila C., Seguelas M., Festal D., Decerprit J., Pipy B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1259**, 211–219 (1995).
- 11) Buhman K. K., Chen H. C., Farese R. V. Jr., *J. Biol. Chem.*, **276**, 40369–40372 (2001).
- 12) Seo T., Oelkers P. M., Giattina M. R., Worgall T. S., Sturley S. L., Deckelbaum R. J., *Biochemistry*, **40**, 4756–4762 (2001).
- 13) Yang H., Cromley D., Wang H., Billheimer J. T., Sturley S. L., *J. Biol. Chem.*, **272**, 3980–3985 (1997).
- 14) Kitatani K., Nemoto M., Akiba S., Sato T., *Cell. Signal.*, **14**, 695–701 (2002).
- 15) Akiba S., Yoneda Y., Ohno S., Nemoto M., Sato T., *J. Lipid Res.* (in press).
- 16) Six D. A., Dennis E. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**, 1–19 (2000).
- 17) Murakami M., Kudo I., *J. Biochem.*, **131**, 285–292 (2002).
- 18) Akiba S., Mizunaga S., Kume K., Hayama M., Sato T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 19906–19912 (1999).
- 19) Akiba S., Ohno S., Chiba M., Kume K., Hayama M., Sato T., *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 1969–1977 (2002).
- 20) Panini S. R., Yang L., Rusinol A. E., Sinen-sky M. S., Bonventre J. V., Leslie C. C., *J. Lipid Res.*, **42**, 1678–1686 (2001).
- 21) Stewart A., Ghosh M., Spencer D. M., Leslie C. C., *J. Biol. Chem.*, **277**, 29526–29536 (2002).
- 22) Asai K., Hirabayashi T., Houjou T., Uozumi N., Taguchi R., Shimizu T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 8809–8814 (2003).
- 23) Ghomashchi F., Stewart A., Hefner Y., Ramanadham S., Turk J., Leslie C. C., Gelb M. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1513**, 160–166 (2001).
- 24) Elinder L. S., Dumitrescu A., Larsson P., Hedin U., Frostegård J., Claesson H. E., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 2257–2263 (1997).
- 25) Anthonsen M. W., Stengel D., Hourton D., Ninio E., Johansen B., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1276–1282 (2000).
- 26) Kitatani K., Oka T., Murata T., Hayama M., Akiba S., Sato T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **382**, 296–302 (2000).
- 27) Augé N., Escargueil-Blanc I., Lajoie-Mazenc I., Suc I., Andrieu-Abadie N., Pieraggi M.-T., Chatelut M., Thiers J.-C., Jaffrézou J.-P., Laurent G., Levade T., Nègre-Salvayre A., Salvayre R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 12893–12900 (1998).
- 28) Gómez-Munoz A., Martens J. S., Steinbrecher U. P., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 135–143 (2000).
- 29) Kinscherf R., Claus R., Deigner H. P., Nauen

- O., Gehrke C., Hermetter A., Rußwurm S., Daniel V., Hack V., Metz J., *FEBS Lett.*, **405**, 55–59 (1997).
- 30) Hanasaki K., Yamada K., Yamamoto S., Ishimoto Y., Saiga A., Ono T., Ikeda M., Notoya M., Kamitani S., Arita H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 29116–29124 (2002).
- 31) Hurt-Camejo E., Camejo G., Peilot H., Öörni K., Kovanen P., *Circ. Res.*, **89**, 298–304 (2001).
- 32) Anthonen M. W., Stengel D., Hourton D., Ninio E., Johansen B., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1276–1282 (2000).
- 33) Carpenter K. L., Dennis I. F., Challis I. R., Osborn D. P., Macphee C. H., Leake D. S., Arends M. J., Mitchinson M. J., *FEBS Lett.*, **505**, 357–363 (2001).