

マクロファージのコレステロール代謝における Pitavastatin の影響

秋里圭恵,^a 石井伊都子,^{*a} 北原真樹,^b 玉木太郎,^c 齋藤 康,^d 北田光一^d

Effect of Pitavastatin on Macrophage Cholesterol Metabolism

Yoshie AKISATO^a, Itsuko ISHII,^{*a} Masaki KITAHARA^b,
Taro TAMAKI^c, Yasushi SAITO^d, Mitsukazu KITADA^d^aDepartment of Clinical Pharmacology, Graduate School of Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan, ^bNissan Chemical Industries, Ltd., 1470 Shiraoka, Minamisaitama City 349-0294, Japan, ^cKowa Company, Ltd., 2-17-43 Noguchicho, Higashimurayama City 189-0022, Japan, and ^dDivision of Pharmacy, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8677, Japan

(Received October 15, 2007)

[Objectives] Pitavastatin is the first totally synthetic HMG-Co A reductase inhibitor in Japan that significantly reduces LDL cholesterol while raising HDL cholesterol. Clinical trial showed that pitavastatin has potent effects for LDL cholesterol lowering and is expected effectively to prevent atherosclerosis. To clarify the mechanism of reduction of atherosclerosis by pitavastatin, we examined the effect of pitavastatin on foam cell formation of RAW264.7 macrophages. [Methods & Results] Macrophages were cultured with pitavastatin for 24 h and exposed to oxidized LDL with pitavastatin for 3 days. Pitavastatin decreased the cellular cholesteryl ester content in a dose-dependent manner, and this effect was not *via* inhibition of HMG-CoA reductase because the 3-30 nM pitavastatin did not inhibit [¹⁴C] cholesterol synthesis from [¹⁴C] acetic acid and the effect was not influenced by addition of mevalonic acid. Pitavastatin increased neutral cholesterol esterase (NCEase) activity and did not affect ACAT activity, and decreased the expression of CD36 and ABCA1 mRNA. The mechanism of the increase of NCEase activity was that pitavastatin directly modified the substrate state, which was cholesterol oleate emulsified with lecithin. [Conclusion] Clinical blood concentrations of pitavastatin prevent foam cell formation of RAW macrophages by oxidized LDL, and this was not *via* inhibition of HMG-CoA reductase, and modify substrate condition.

Key words—macrophages; cholesterol metabolism; statin

1. はじめに

動脈硬化症は動脈壁が肥厚する病気であり、心筋梗塞、脳梗塞、狭心症などの基礎疾患となる生活習慣病の1つである。近年、その原因について分子レベルで研究がなされ、危険因子として高脂血症、高血圧、喫煙などが上げられているが、いまだ不明な点が多い。

動脈硬化症の1つである、粥状動脈硬化の病巣で

はコレステロールを貯めたマクロファージ由来の泡沫細胞が多数存在している。マクロファージの泡沫化には、oxidized low density lipoprotein (OxLDL) が関与しているといわれ、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに活発に取り込まれる。^{1,2,3} 泡沫化したマクロファージは血管壁に沈着し、増殖因子やサイトカインを放出することで平滑筋細胞の内膜への遊走及び増殖を誘導し、動脈硬化病巣の形成、進展に関与している。よって、動脈硬化症ではマクロファージにおけるコレステロール代謝が重要と考えられる。⁴

コレステロールの生合成は、acetyl-CoA から始まり、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)、メバロン酸、geranylgeranyl pyrophosphate などを経てコレステロールとなる。この経路では、HMG-CoA 還元酵素が触媒する HMG-CoA からメ

^a千葉大学大学院薬学研究院病院薬学研究室 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1), ^b日産化学工業株式会社生物科学研究所 (〒349-0294 南埼玉市白岡 1470), ^c興和株式会社創薬第一研究所 (〒189-0022 東村山市野口町 2-17-43), ^d千葉大学医学部附属病院 (〒260-8677 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

*e-mai: iishii@p.chiba-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムSD4で発表したものを中心に記述したものである。

パロン酸が生成する反応が律速段階となっている。この HMG-CoA 還元酵素の阻害剤が、スタチンと総称される薬である。現在スタチンは、高コレステロール血症治療の第一選択薬となっている。スタチンにはコレステロールの生合成阻害のほかに多面的効果があるといわれている。多面的効果としては、抗炎症作用、抗酸化作用、プラーク安定化作用などが知られている。さらに、様々な臨床研究から、スタチンに心血管疾患の発生率を下げる作用があることが示されている。⁵⁻⁸⁾スタチンの1つである pitavastatin は、他のスタチンに比べて水溶性が高く、cytochrome P450 による代謝を受けないという特徴がある。また、pitavastatin によってウサギにおける動脈硬化病巣が減少するという報告もある。⁹⁾

以上のことから、pitavastatin のマクロファージ泡沫化への影響をマウスマクロファージである RAW264.7 細胞を用いて検討することとした。

2. マクロファージのコレステロール代謝

現在知られているマクロファージにおけるコレステロール代謝経路を Fig. 1 に示す。内皮に浸潤したマクロファージは、CD36 などのスカベンジャー受容体を介したエンドサイトーシスによって、OxLDL などの動脈硬化惹起性リポタンパク質を取り込む。取り込まれた CE は酸性コレステロールエステラーゼにより遊離コレステロール (FC) となり、大部分の FC は小胞体においてアシル CoA : コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) で再びエステル化され、一部の FC は細胞外に放出される。cholesteryl ester (CE) は中性コレステロールエステラーゼ (NCEase) により FC に加水分解される。細胞内では、コレステロールサイクルと呼ばれる ACAT によるエステル化と NCEase による加水分解が繰り返され、コレステロール量が制御されている。マクロファージ細胞内に多量の CE が蓄積すると、CE はリン脂質などとともに細胞質に脂質球を形成する。脂質球中の CE は NCEase によって加水分解される。NCEase によって生成した FC は ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) などのトランスポーターを介し、HDL などの細胞外アクセプターに引き抜かれ細胞外に放出される。引き抜かれたコレステロールはレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼによりエステル化

される。HDL 中の CE はコレステリルエステル輸送タンパクによって LDL などのアポタンパク B 含有リポタンパクに移され、肝臓に取り込まれたのち、胆汁酸として排泄される。

3. マクロファージにおけるスタチンの影響

3-1. マクロファージ泡沫化への影響の検討

スタチンによるマクロファージ泡沫化への影響を細胞内 CE の蓄積を指標として検討した。まず RAW264.7 細胞を pitavastatin を含む培地で 24 h 培養し、その後 pitavastatin, OxLDL (100 nm total cholesterol/ml) を含む培地で 72 h 培養し細胞内 CE を測定した。その結果、pitavastatin は他の2つのスタチンより強く CE の蓄積を抑制した (Fig. 2)。Pitavastatin による高脂血症の治療では、1日に1-4 mg を服用し、このときの平均血中濃度は約 10-40 nM となる。臨床用量を服用したときに得られる血中濃度である 30-100 nM においても、pitavastatin によって CE の蓄積が約 50% 抑制された。よって、pitavastatin は臨床用量でも OxLDL によるマクロファージの泡沫化を抑制することが示された。

3-2. コレステロール生合成の阻害 スタチンのメインの作用である、コレステロール生合成の阻害について、pitavastatin と atorvastatin を用いて確認した (Fig. 3)。両スタチンとも濃度依存的にコレステロール合成を阻害した。また、臨床用量では両スタチンに差はなかった。この濃度において CE の蓄積抑制がみられたが、コレステロール生合成経路は約 75% 以上保たれていた。

3-3. 脂質合成への影響 次に、pitavastatin と atorvastatin による脂質合成への影響を検討した (Fig. 4)。3種類の脂質のうち、特に CE の合成が濃度依存的に抑制された。臨床用量においては、atorvastatin に比べて pitavastatin の方が強く CE の合成を抑制した。Diglyceride と triglyceride の合成には両スタチンとも影響はなかった。

以上のことから、pitavastatin は臨床用量において、CE を減少させることでマクロファージ細胞内



秋里圭恵

1983 年生まれ。2005 年千葉大学薬学部卒業後、同大学院医学薬学府修士課程に入学し、2007 年現在修士 2 年に在籍。病院薬学研究室に所属しマクロファージの泡沫化に関する研究に携わる。

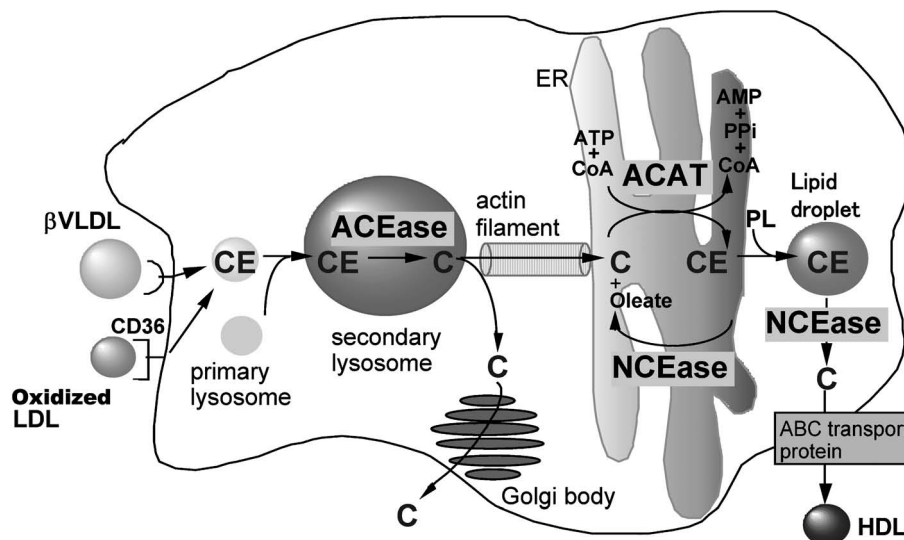


Fig. 1. Cholesterol Metabolism in Macrophage

C: cholesterol, CE: cholesteryl ester, ACEase: acid cholesterol esterase, ACAT: acyl CoA: cholesterol acyltransferase, NCEase: neutral cholesterol esterase, LDL: low density lipoprotein, β VLDL: β -very low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein. Atherogenic lipoproteins containing CE are taken up by endocytosis *via* some receptors. Lipoprotein-associated CE is first hydrolyzed in the lysosomes by ACEase, and the productive FC are out of the lysosome. The most of FC is re-esterified by ACAT, in part of FC is transported from the cells. The CE is also hydrolyzed by NCEase, and FC is produced. The FC content of cells is maintained under the tight control by called cholesterol cycle, which is that esterification of excess FC by ACAT and hydrolysis of CE by NCEase. Excess CE is accumulated in lipid droplets containing phospholipids. CE in lipid droplets is hydrolyzed by NCEase, produced FC is transported from the cells using transporter such as ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) to acceptors like HDL.

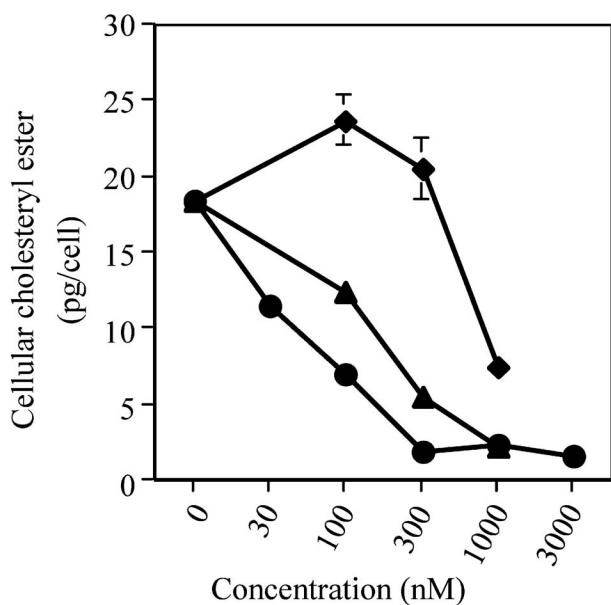


Fig. 2. Effect of Statins on Cholesterol Ester Accumulation in RAW 264.7 Cells Incubated with Oxidized LDL

RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well, 12-well plate) were cultured in 10% FBS/DMEM containing pitavastatin (●), atorvastatin (◆), simvastatin (▲) for 24 h, and the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL (100 ng total cholesterol/ml) and statins for 72 h. Lipids were extracted by hexane: 2-propanol (2 : 1). Total cholesterol (TC) and FC were measured and CE were calculated by subtracting FC from TC. Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

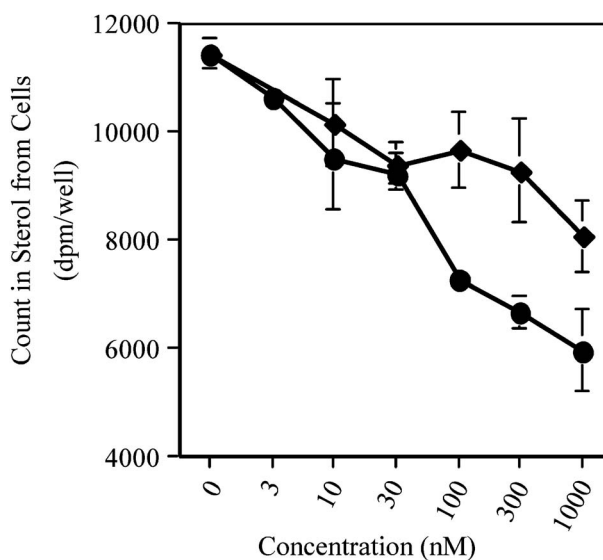


Fig. 3. Effect of Pitavastatin and Atorvastatin on Cholesterol Synthesis in RAW 264.7 Cells

RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well, 12-well plate) were cultured in 10% FBS/DMEM containing pitavastatin (●), atorvastatin (◆) for 24 h, and the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL, statins and [14 C]acetic acid for 72 h. Lipids were extracted by hexane : 2-propanol (2 : 1). The radioactivity was counted with a scintillation counter. Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

への CE の蓄積を抑制し、泡沫化を抑制すると考えられた。さらに、この pitavastatin による CE の減少は、コレステロール生合成経路を介さない作用で

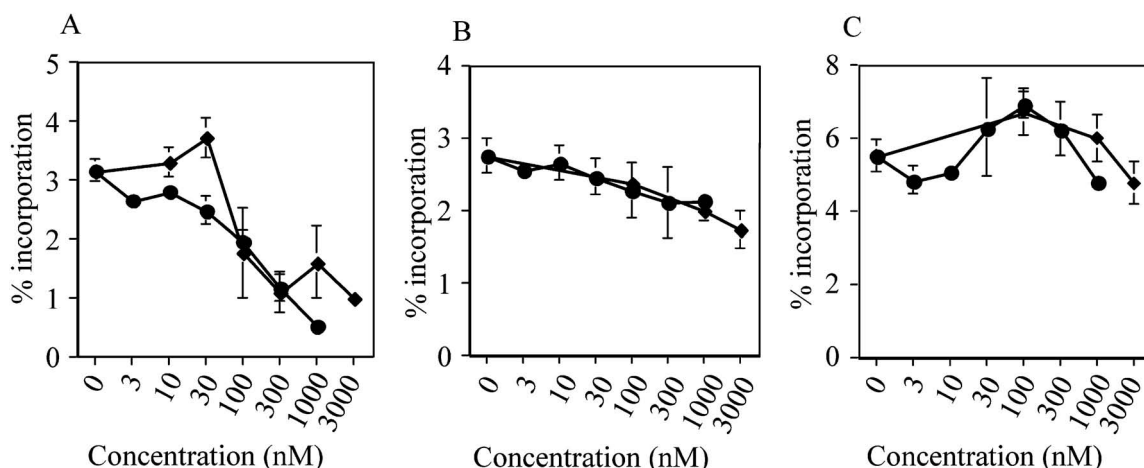


Fig. 4. Effect of Pitavastatin and Atorvastatin on Synthesis of Cholesterol Ester, Diglyceride and Triglyceride in RAW 264.7 Cells
RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well, 12-well plate) were cultured in 10% FBS/DMEM containing pitavastatin (●), atorvastatin (◆) for 24 h, and the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL, statins and [14 C] oleate for 72 h. Lipids were extracted by hexane : 2-propanol (2 : 1). The radioactivity was counted with a scintillation counter. Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

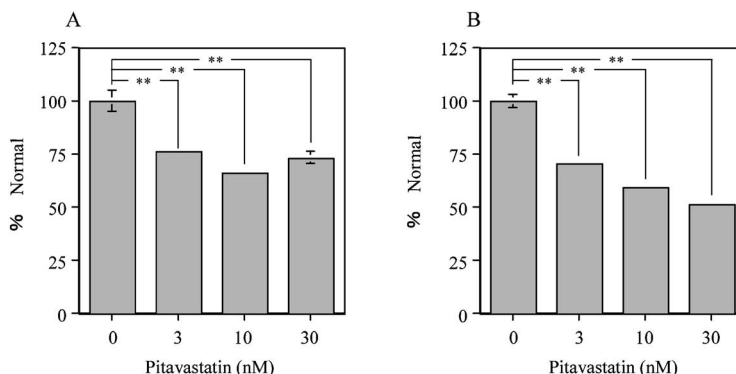


Fig. 5. Effect of Pitavastatin on Expression of CD36 (A) and ABCA1 (B) mRNAs in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells (1.2×10^7 cells/dish) were cultured in 10% FBS/DMEM containing pitavastatin for 24 h, and the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL for 72 h. Total RNA was extracted, CD36 and ABCA1 mRNA were measured by quantitative PCR. Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

ある可能性が示唆された。

そこで次に、pitavastatinによる細胞内CEの減少のメカニズムを検討することとした。

4. 細胞内CE減少のメカニズムの検討

4-1. CD36及びABCA1 mRNA発現量の変化

まず、CEの取り込みに関与するCD36と放出に関与するABCA1のmRNA発現量の変化を検討した (Fig. 5)。その結果、pitavastatinによって、CD36, ABCA1 mRNAは減少した。これらmRNAの減少は、それぞれPPAR及びLXRを介する作用であることが知られている。^{12,13)}

4-2. ACAT及びNCEase活性の変化

次に、細胞内のCE量を制御しているACAT及びNCEaseについて検討した (Fig. 6)。FCのエステル化を触

媒するACAT活性には、pitavastatin, atorvastatinともに影響はなかった [Fig. 6(A)]。CEの加水分解を触媒するNCEase活性においては、atorvastatinが1000 nMで活性を上昇させた。これに対して、pitavastatinは臨床用量でNCEase活性を上昇させた [Fig. 6(B)]。

4-3. メバロン酸及びゲラニルゲラニオールの添加によるNCEase活性の変化 このpitavastatinによるNCEase活性の上昇が、HMG-CoA還元酵素の阻害によるものかを検討するため、スタチンとともにメバロン酸又は、geranylgeraniolを同時にインキュベーションしたときのNCEase活性を測定した (Figs. 7 and 8)。メバロン酸とgeranylgeraniolはコレステロール生合成経路においてHMG-CoA

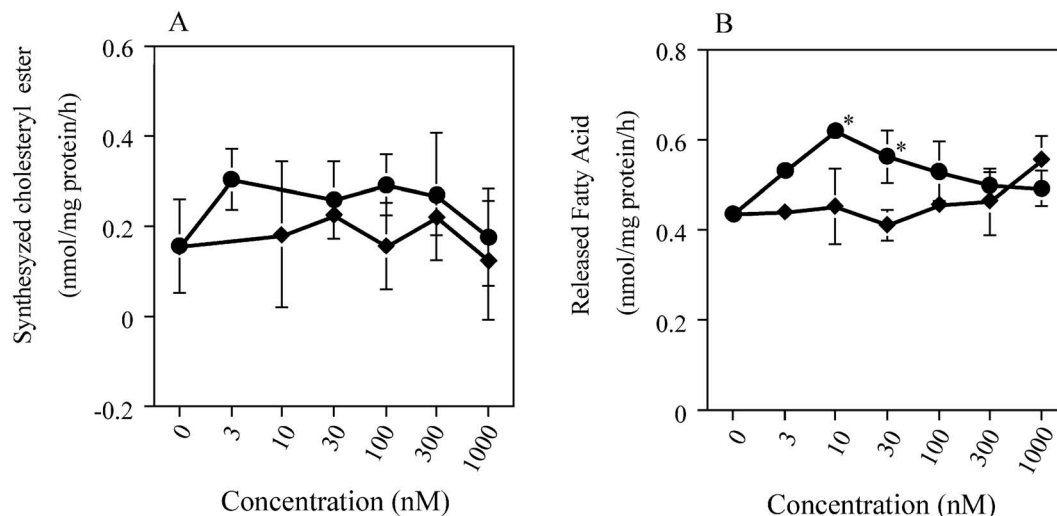


Fig. 6. Effect of Pitavastatin and Atorvastatin on ACAT Activity (A) and NCEase Activity (B) in RAW 264.7 Cells

RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well, 12-well plate) were cultured in 10% FBS/DMEM containing pitavastatin (●), atorvastatin (◆) for 24 h, and the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL for 72 h. Cells were collected by cell scraper and rinsed with PBS twice. ACAT assay and NCEase assay are described in methods^{10,11} Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations. * $p < 0.05$.

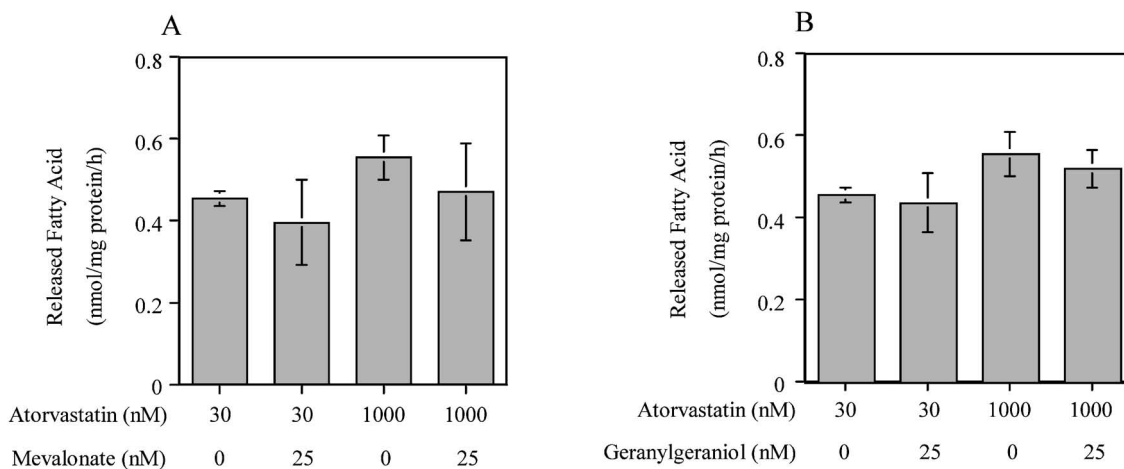


Fig. 7. Effect of Mevalonate (A) and Geranylgeraniol (B) on Neutral Cholesterol Esterase Activity in RAW 264.7 Cells Treated with Atorvastatin

RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well, 12-well plate) were incubated with 10% FBS/DMEM containing atorvastatin for 24 h, the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL and mevalonate or geranylgeraniol for 72 h. Cells were collected by cell scraper and rinsed with PBS twice. NCEase assay are described in methods¹¹ Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

以降に生成するが, atorvastatin 処理を行った細胞では, これらを添加しても NCEase 活性は変化しなかった (Fig. 7). また, NCEase 活性が上昇した pitavastatin を処理した細胞でもメバロン酸又は geranylgeraniol の添加による NCEase 活性の変化はみられなかった (Fig. 8). したがって, pitavastatin による NCEase 活性の上昇は, HMG-CoA 還元酵素の阻害によるものではないことが示された.

また, pitavastatin は NCEase 活性の本体と考えられる carboxylesterase の mRNA 発現量も変化さ

せなかった (data not shown). よって, pitavastatin は NCEase の発現やタンパクの修飾には関与しないと考えられた.

4-4. Pitavastatin 含有リポソームを用いた NCEase 活性の変化 これまでに NCEase 活性はその活性本体の量だけでなく, 基質となる CE を含むリポソームの状態によって酵素活性が変化すると報告されている.¹⁴⁾ そこで, pitavastatin がマクロファージの脂質球に直接作用すると考え, pitavastatin を含む基質を作成し, RAW264.7 細胞のホモジネー

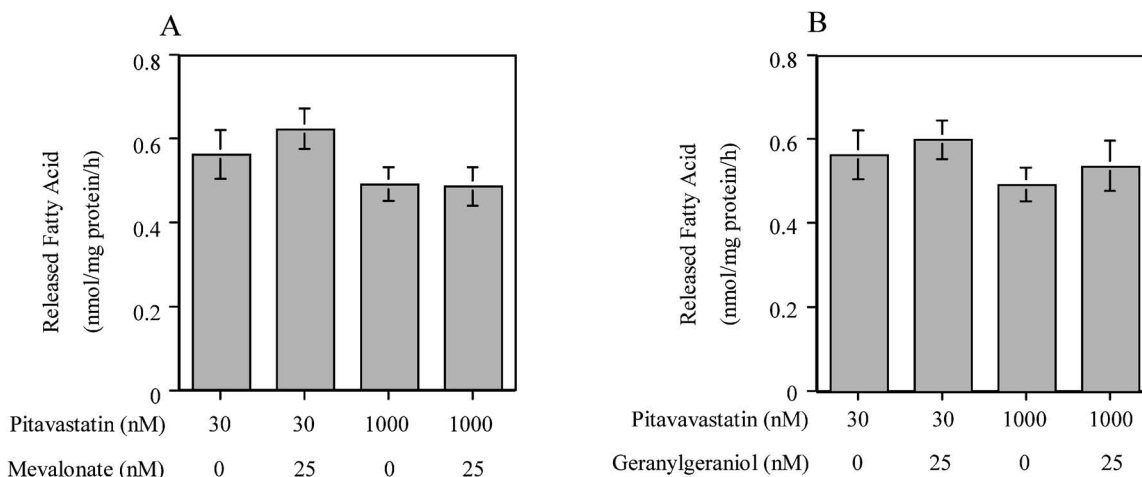


Fig. 8. Effect of Mevalonate (A) and Geranylgeraniol (B) on Neutral Cholesterol Esterase Activity in RAW 264.7 Cells Treated with Pitavastatin

RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/well, 12-well plate) were incubated with 10% FBS/DMEM containing pitavastatin for 24 h, the medium was changed to 10% FBS/DMEM containing oxidized LDL and mevalonate or geranylgeraniol for 72 h. Cells were collected by cell scraper and rinsed with PBS twice. NCEase assay are described in methods¹¹⁾ Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

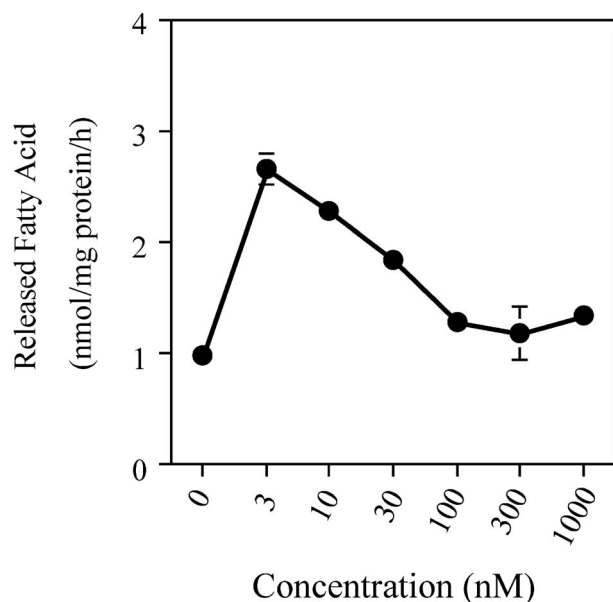


Fig. 9. Effect of Pitavastatin on NCEase Activity Using Substrate Containing Pitavastatin

RAW 264.7 cells (1.2×10^7 cells/dish) were cultured in 10% FBS/DMEM and were collected by cell scraper and rinsed with PBS twice. The substrate containing pitavastatin were produced by sonication of cholesteryl oleate and PC in 0.9% NaCl with pitavastatin. NCEase activity was measured using the substrate. Values are the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

トを酵素源としてNCEase活性測定を行った (Fig. 9). その結果, pitavastatin の添加により NCEase 活性が上昇した. これは, pitavastatin が基質の存在状態を変化させたためであると考えられた. Pitavastatin 濃度をさらに上昇させると基質である

コレステリルエステルを含まりポソームが形成され難くなっていた (data not shown). よって, 高濃度の pitavastatin を添加した基質を用いると NCEase 活性が低下したと考えられた.

これまでの結果から, pitavastatin 処理によって CD36, ABCA1 mRNA は減少し, NCEase 活性が上昇した. この NCEase 活性の上昇は, NCEase の基質である CE の存在状態を変化させたためであると考えられた.

5. まとめ

Pitavastatin は臨床用量においてマクロファージに直接作用し, CD36 の発現を減少させ, CE の取り込みを抑制していると考えられた. また, 細胞内 CE の存在状態を変化させ, NCEase 活性を上昇させることが示された. よって, pitavastatin は ABCA1 の発現を減少させコレステロールの放出を抑制していると考えられるものの, CE の取り込みを抑制し, 加水分解を促進させることで細胞内 CE を減少させ, 泡沫化を抑制することが示唆された.

謝辞 本研究を行うに当たりまして, 御指導, 御助言頂きました千葉大学医学薬学府病院薬学研究室 研究生福地準一薬学博士に心から御礼申し上げます. また, 千葉大学医学薬学府病院薬学研究室の皆様へ感謝いたします.

REFERENCES

- 1) Sparrow C. P., Parthasarathy S., Steinberg D., *J. Biol. Chem.*, **264** (5), 2599–2604 (1989).
- 2) Endemann G., Stanton L. W., Madden K. S., Bryant C. M., White R. T., Protter A. A., *J. Biol. Chem.*, **268** (16), 11811–11816. (1993).
- 3) de Villiers W. J., Smart E. J., *J. Leukoc. Biol.*, **66** (5), 740–746 (1999).
- 4) Pennings M., Meurs I., Ye D., Out R., Hoekstra M., Van Berkel T. J., Van Eck M., *FEBS Lett.*, **580**(23), 5588–96 (2006).
- 5) Stancu C., Sima A., *J. Cell. Mol. Med.*, **5** (4), 378–387 (2001).
- 6) Koh K. K., *Cardiovasc. Res.*, **47** (4), 648–657 (2000).
- 7) Briel M., Studer M., Glass T. R., Bucher H. C., *Am. J. Med.*, **117**(8), 596–606 (2004).
- 8) Schwartz G. G., Olsson A. G., *Am. J. Cardiol.*, **96**(5A), 45F–53F (2005).
- 9) Suzuki H., Yamazaki H., Aoki T., Kojima J., Tamaki T., Sato F., Kitahara M., Saito Y., *Arzneimittelforschung*, **50** (11), 995–1003 (2000).
- 10) Gillies P. J., Rathgeb K. A., Perri M. A., Robinson C. S., *Exp. Mol. Pathol.*, **44** (3), 329–339 (1986).
- 11) Ishii I., Oka M., Katto N., Shirai K., Saito Y., Hirose S., *Arterioscler. Thromb.*, **12** (10), 1139–1145 (1992).
- 12) Han J., Zhou X., Yokoyama T., Hajjar D. P., Gotto Jr. A. M., Nicholson A. C., *Circulation*, **109** (6), 790–796 (2004).
- 13) Sone H., Shimano H., Shu M., Nakakuki M., Takahashi A., Sakai M., Sakamoto Y., Yokoo T., Matsuzaka K., Okazaki H., Nakagawa Y., Iida K. T., Suzuki H., Toyoshima H., Horiuchi S., Yamada N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316** (3), 790–794 (2004).
- 14) Ishii I., Onozaki R., Takahashi E., Takahashi S., Fujio N., Harada T., Morisaki N., Shirai K., Saito Y., Hirose S., *J. Lipid Res.*, **36** (11), 2303–2310 (1995).