

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	松 田 明 大
論文題目	(24S)-Hydroxycholesterol efflux from neuronal cells by ABC proteins (神経細胞の ABC タンパク質による 24-ヒドロキシコレステロール排出)		
(論文内容の要旨)			
<p>脳の重量は体重の2%を占めるにすぎないが、体内の全コレステロールの25%を含んでいる。脳内コレステロールは、P450酵素によって24位が水酸化された(24S)-ヒドロキシコレステロール (24-OHC) に変換され、活発に代謝回転している。この脳特異的なコレステロール代謝は、記憶をはじめとする脳機能の維持に重要であると報告されている。24-OHC はコレステロールと比べて膜を通過しやすいため、神経細胞で生成した24-OHC は単純拡散によって神経細胞から排除される、と考えられてきた。しかし、24-OHCは神経細胞にとって毒性が高く、高濃度ではアポトーシスを引き起こすことから、その蓄積を防ぐ排出機構が神経細胞に存在する、と申請者は仮説をたてた。</p> <p>近年、末梢細胞においては、ABCA1とABCG1が、余剰コレステロールを細胞外のアポリポタンパク質(apoA-I)や高密度リポタンパク質 (HDL)などを脂質アクセプターとして排出することが明らかとなり、コレステロールの恒常性維持に関与することが示された。ABCA1とABCG1は神経細胞においても発現が認められることから、申請者はABCA1とABCG1が24-OHCの神経細胞からの積極的な排出を担っていると考えた。そこで、本研究では、神経細胞においてABCA1とABCG1が24-OHC排出に関与しているかどうかを明らかにするとともに、それらABCタンパク質が24-OHCによって引き起こされる神経細胞死にどのような影響を与えるか検討した。</p> <p>第一章では、神経モデル細胞である神経芽細胞株SH-SY5Yを用いて24-OHCの細胞からの排出機構を解析した。まずSH-SY5Y細胞において、ABCA1とABCG1の発現が24-OHCによって濃度依存的に誘導されることを明らかにした。10 μM 24-OHC処理によって誘導されたABCA1とABCG1の発現量は、24-OHCを内在性リガンドとする核内レセプターであるliver X receptor (LXR)を合成リガンドで刺激したときと同程度であった。次に、細胞を3H] 24-OHCで標識した後、ABCA1とABCG1の脂質アクセプターとして作用するapoA-IあるいはHDLを培地に添加し、24-OHC排出を検討した。その結果、24-OHCはHDL存在下において培地中に排出され、その排出量はLXR及びRetinoid X receptor (RXR)のリガンド処置によって有意に増加した。しかし、apoA-I存在下では排出は起こらなかった。さらに、ABCA1の発現をsiRNAを用いて抑制すると、24-OHC排出は有意に減少した。以上の結果から、24-OHCは神経細胞からHDLを脂質アクセプターとして排出され、それには少なくともABCA1が関与していることが示唆された。しかし、ABCG1の発現をsiRNAを用いて抑制するとABCA1の発現が上昇したため、ABCG1の関与の有無を明らかにすることはできなかった。</p>			

第二章では、ABCA1とABCG1が24-OHCの細胞外排出を担っているかどうかを明らかにするために、ABCA1およびABCG1を安定発現させたHEK293細胞からの24-OHCの排出を解析した。まずABCA1発現HEK293細胞(HEK/ABCA1)を用いて、コレステロールおよび24-OHC排出の脂質アクセプター依存性を検討した。その結果、HEK/ABCA1細胞からのコレステロール排出はapoA-I存在下のみで起こり、HDL存在下では起こらないことが確認できた。また、ATP加水分解活性を欠損させたABCA1MM変異体発現HEK293細胞(HEK/ABCA1MM)からはいずれの条件でも排出されないことから、apoA-I依存的なコレステロール排出がABCA1によって起こることが確認できた。それに対して、HEK/ABCA1からの24-OHC排出はHDL存在下でのみ起こり、apoA-I存在下ではほとんど起こらないことが明らかになった。この場合も、HEK/ABCA1MM細胞からはいずれの条件でも排出されないことから、HDL依存的な24-OHC排出がABCA1によって起こることが確認できた。

次に、ABCG1発現HEK293細胞(HEK/ABCG1)を用いて、ABCG1がHDL存在下に、コレステロールと同様に24-OHCを排出するかどうかを検討した。その結果、HEK/ABCG1細胞において、HDLを脂質アクセプターとしたコレステロール排出と24-OHC排出のどちらもが起こることが観察された。さらに、ABCG1のATP加水分解活性を欠損させたABCG1KM変異体発現HEK293細胞(HEK/ABCG1KM)からはどちらも排出されなかった。以上の結果から、ABCG1はコレステロールと同様に、24-OHCをHDLを脂質アクセプターとして排出することが明らかとなった。

24-OHCは神経細胞にとって毒性を示し、アポトーシスを引き起こすことが知られている。ABCA1とABCG1が24-OHCを能動的に排出するという第一章、第二章の結果は、ABCA1とABCG1の発現上昇が24-OHCの細胞毒性を抑制する可能性を示唆した。そこで、第三章では、ラット初代培養神経細胞を用いて、ABCA1とABCG1が神経細胞死を抑制するかどうかを検討した。24-OHC (40 μ M) 存在下で培養すると、ラット初代培養神経細胞は24時間で約30%が死滅した。一方、LXR合成リガンド存在下で16時間前培養し、ABCA1とABCG1の発現をあらかじめ誘導しておくと、細胞生存率が有意に上昇した。以上の結果から、神経細胞ではLXRを介して発現上昇したABCA1とABCG1が24-OHCを細胞外へ排出し、24-OHCの細胞毒性を抑制することが示唆された。

本研究では、ABCA1とABCG1が神経細胞からの24-OHCの排出に関与することを初めて明らかにした。またABCA1とABCG1は、24-OHCを神経細胞外へ能動輸送することによって、24-OHCが引き起こす神経細胞死を抑制し、神経細胞を保護している可能性を示した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

神経細胞において、コレステロールは脳特異的代謝物である(24S)-ヒドロキシコレステロール(24-OHC)へ活発に変換されており、その変換は学習などの脳機能にとって重要である。一方、24-OHC は高濃度で細胞毒性を示すことから、速やかに神経細胞から除去されなければならない。これまで、24-OHC の神経細胞からの排出機構は単純拡散によってのみ行われ、積極的な排出機構の存在は予想されていなかった。本研究では、24-OHC の神経細胞からの排出に ABC タンパク質による能動輸送が関与していることを世界で初めて明らかにしたものであり、本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 24-OHC は神経細胞から HDL を脂質アクセプターとして排出され、その排出量は LXR および RXR のリガンドで刺激することによって上昇することを明らかにした。
2. 24-OHC の HDL への排出には、ABCA1 及び ABCG1 が関与していることを明らかにした。
3. ABCA1 と ABCG1 は 24-OHC を細胞外へ能動輸送することによって、24-OHC が引き起こす神経細胞死を抑制していることを示唆した。

以上の通り、本論文はヒトのコレステロール恒常性にかかわる ABCA1 と ABCG1 が神経細胞において 24-OHC を排出すること、さらにその排出によって 24-OHC が引き起こす神経細胞死を抑制していることを初めて明らかにしたものである。この研究は細胞生化学、細胞生物学、および基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年12月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)