

氏 名	おく ひら けいいちろう 奥 平 桂 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 507 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 創 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	Apolipoprotein-Lipid-Cell Interaction and Generation of High Density Lipoproteins, HDL (アポリポ蛋白質、脂質と細胞の相互作用および高密度リポ蛋白質 HDL の新生)
論文調査委員	(主 査) 教 授 半 田 哲 郎 教 授 中 川 照 眞 教 授 加 藤 博 章

論 文 内 容 の 要 旨

血漿リポ蛋白質の新生や代謝過程では物理化学的平衡が重要な役割を担っている。判請者は細胞によるトリグリセライド-rich リポ蛋白モデル粒子（マイクロエマルジョン）の取り込み，また再構成 HDL と細胞の相互作用による HDL 新生反応を解析し，これらの過程における蛋白質-脂質の物理化学的相互作用の役割を研究した。

第一章

コア脂質によるアポリポ蛋白質 E (apoE) を介した脂質粒子細胞取込の制御

生体組織間の脂質キャリアーである血漿リポ蛋白質は，中性脂質（トリグリセライド，コレステロールエステル）のコア表面をリン脂質（レシチンなど）単分子膜が覆った脂質マイクロエマルジョンを基本構造としている。この粒子表面に存在するアポリポ蛋白質がマイクロエマルジョンに生物学的活性を与え，その代謝の方向づけを行う役割を果たしている。申請者は，動物血中で見られるリポ蛋白質のコア脂質の組成変化がアポリポ蛋白質結合やリポ蛋白質粒子の代謝に及ぼす影響を調査するため，トリグリセライド・コレステロールエステル組成が異なるコアとレシチン表面膜から構成される各種マイクロエマルジョンを調製した。すなわち，血中から組織への脂質粒子の移行を担っているアポリポ蛋白質 E (apoE) の結合，マイクロエマルジョン粒子のラット血中から組織への移行，また粒子のヒト肝細胞による取込を評価したところ，組織移行，細胞による取込，ともに apoE の結合量とよく相関した。また，apoE の結合量は，コアのコレステロールエステル組成の増大により低下した。これらの結果から，コア脂質組成が粒子表面構造に影響し，アポリポ蛋白質の脂質結合ドメインと粒子表面の相互作用やレセプター経由細胞取込を制御していることが示唆された。

第二章

アポリポ蛋白質 A-I (apoA-I) による末梢細胞からの HDL 新生機序

血漿リポ蛋白質の中でも高密度リポ蛋白質 HDL は，動脈硬化疾患の「負の危険因子」として知られる。HDL は末梢細胞で異化できない過剰のコレステロールを肝臓に「逆転送」する中心的な役割を担っており，この機能は動脈硬化病変からコレステロールを運び出す際にも有効に働くと考えられる。HDL 上のアポリポ蛋白質 A-I (apoA-I) をはじめ両親媒性ヘリックス型アポ蛋白質は，lipid-free の状態で直接細胞に作用し，新しい HDL 粒子を形成しコレステロール搬出を促すと推定されている。申請者はその脂質搬出機構の詳細なメカニズムを解明するために，まず apoA-I を大腸菌発現系により作成し，細胞からの脂質搬出と細胞に対する結合を評価した。apoA-I の細胞への結合が，細胞からの HDL 新生，コレステロール搬出に平行して出現し，脂質搬出にはこの結合が必須であることが確認された。また，レシチン・コレステロールエステル・apoA-I から再構成脂質蛋白複合体粒子（再構成 HDL）を調製し，その細胞に対する結合を蛋白質と脂質で別々に解析した。血中ではほぼ全ての apoA-I が HDL 上に存在するが，細胞への特異的結合は脂質に対して apoA-I が優位であった。このことは脂質粒子上の apoA-I はより lipid-poor な状態に変化して脂質搬出に寄与していることを示している。また，速度論的解析に基づき，脂質粒子—apoA-I—細胞間の相互作用を物理化学的に評価すると，apoA-I は脂質と強

固に結合し HDL 粒子は血漿中で安定な粒子として存在していることも示された。一方、脂質非結合型 apoA-I のみを認識する抗体は、再構成 HDL による細胞からの HDL 新生を阻害した。これらの実験結果より、安定でありながらも HDL 粒子からの apoA-I の解離と、その apoA-I と細胞の相互作用が新しい HDL の形成には必須であるという仮説を持つに至った。

以上、脂質-アポリポ蛋白-細胞間の物理化学的平衡がリポ蛋白質の代謝や HDL 新生で重要な役割を果たしていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、血漿リポ蛋白質の新生や代謝過程における物理化学的平衡を解明することを目的として、細胞によるリポ蛋白モデル粒子（マイクロエマルジョン）の取り込み、また再構成 HDL と細胞の相互作用による HDL 新生反応を解析し、これらの過程における蛋白質-脂質の相互作用の役割を研究したものである。

まず、コア脂質によるアポリポ蛋白質 E (apoE) を介した脂質粒子細胞取込の制御を検討した。生体組織間の脂質キャリアーである血漿リポ蛋白質は、中性脂質（トリグリセライド、コレステロールエステル）コア表面をリン脂質（レシチンなど）単分子膜が覆ったマイクロエマルジョンを基本構造としている。この粒子表面に存在するアポリポ蛋白質がマイクロエマルジョンに生物学的活性を与え、その代謝の方向づけを行う役割を果たしている。動物血中で見られるリポ蛋白質のコア脂質の組成変化がアポリポ蛋白質結合やリポ蛋白質粒子の代謝に及ぼす影響を調査するため、トリグリセライド・コレステロールエステル組成が異なるコアとレシチン表面膜から構成される各種マイクロエマルジョンを調製した。すなわち、血中から組織への脂質粒子の移行を担っているアポリポ蛋白質 E (apoE) の結合、マイクロエマルジョン粒子のラット血中から組織への移行、また粒子のヒト肝細胞による取込を評価したところ、組織移行、細胞による取込、ともに apoE の結合量とよく相関した。また、apoE の結合量は、コアのコレステロールエステル組成の増大により低下した。これらの結果から、動脈硬化疾患の「危険因子」LDL のコア脂質組成が粒子表面構造に影響し、アポリポ蛋白質の脂質結合ドメインと粒子表面の相互作用やレセプター経由細胞取込を制御していることが示された。

次に、アポリポ蛋白質 A-I (apoA-I) による末梢細胞からの HDL 新生における蛋白質-脂質の物理化学的相互作用の役割を検討した。血漿リポ蛋白質の中でも高密度リポ蛋白質 HDL は、動脈硬化疾患の「負の危険因子」として知られる。HDL は末梢細胞で異化できない過剰のコレステロールを肝臓に「逆転送」する中心的な役割を担っており、この機能は動脈硬化病変からコレステロールを運び出す際にも有効に働くと考えられる。HDL 上のアポリポ蛋白質 A-I (apoA-I) をはじめ両親媒性ヘリックス型アポ蛋白質は、lipid-free の状態で直接細胞に作用し、新しい HDL 粒子を形成しコレステロール搬出を促すと推定されている。申請者はその脂質搬出機構の詳細なメカニズムを解明するために、まず apoA-I を大腸菌発現系により作成し、細胞からの脂質搬出と細胞に対する結合を評価した。apoA-I の細胞への結合が、細胞からの HDL 新生、コレステロール搬出に平行して出現し、脂質搬出にはこの結合が必須であることが確認された。また、レシチン・コレステロールエステル・apoA-I から再構成脂質蛋白複合体粒子（再構成 HDL）を調製し、その細胞に対する結合を蛋白質と脂質で別々に解析した。血中ではほぼ全ての apoA-I が HDL 上に存在するが、細胞への特異的結合は脂質に対して apoA-I が優位であった。このことは脂質粒子上の apoA-I はより lipid-poor な状態に変化して脂質搬出に寄与していることを示している。また、速度論的解析に基づき、脂質粒子-apoA-I-細胞間の相互作用を評価すると、apoA-I は脂質と強固に結合し HDL 粒子は血漿中で安定な粒子として存在していることも示された。一方、脂質非結合型 apoA-I のみを認識する抗体は、再構成 HDL による細胞からの HDL 新生を阻害した。これらの実験結果より、安定でありながらも HDL 粒子からの apoA-I の解離と、その apoA-I と細胞の相互作用が新しい HDL の形成には必須であるという仮説を持つに至った。

以上、脂質-アポリポ蛋白-細胞間の物理化学的平衡が動脈硬化疾患の「正の危険因子」（LDL の代謝）でも「負の危険因子」（HDL 新生）でも重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの研究結果は動脈硬化疾患の予防と治療薬開発に大きく貢献するといえる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成15年2月26日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。