信州医誌，41(4)：305～315，1993

スルファチドによる低比重リポタンパク質の修飾とマクロファージ脂質代謝の亢進

溝 上 哲 朗
信州大学医学部第1内科学教室
（主任：関口 守衛教授）

Enhanced Macrophage Degradation of Low-Density Lipoprotein Modified with Sulfatide

Tetsuro MIZOUE
Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine
(Director : Prof. Morie SEKIGUCHI)

The effects of sulfatide (cerebroside sulfate, CS) on low-density lipoprotein (LDL) uptake and degradation by resident mouse peritoneal macrophages were studied. LDL incubated with CS (CSLDL) showed an increase of the negative charge and ^{125}I-labeled CSLDL ([^{125}I] CSLDL) was taken up and degraded by macrophages about 3 times more rapidly than control ^{125}I-labeled LDL. Such effects were not detected when LDL was treated with other glycosphingolipids such as globotetraosylceramide, galactosylceramide or gangliotetraosylceramide. Macrophage degradation of [^{125}I] CSLDL was significantly inhibited by acetylated LDL (AcLDL) but poorly by LDL. Cellular cholesteryl ester content increased marginally after incubation with CSLDL for 24 hours. However, further studies revealed that acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase activity of macrophages after incubation with CSLDL for 5 hours increased 3 times over control with LDL and that the plasma membrane free cholesterol which was converted to cholesteryl ester increased more with CSLDL than with LDL. These results suggest that CSLDL enhances its uptake by macrophages possibly via the AcLDL receptor pathway and consequently stimulates cholesteryl ester synthesis. CSLDL may play a role in the pathological deposition of cholesteryl ester in arterial wall macrophages. *Shinshu Med J 41 : 305—315, 1993*

(Received for publication March 17, 1993)

Key words : low-density lipoprotein (LDL), macrophage, sulfatide, cholesterol, arteriosclerosis
低比重リポタンパク質（LDL），マクロファージ，スルファチド，コレステロール，動脈硬化

I 緒 言

初期のアテローム硬化巣は，血管内膜下への泡沫細胞の浸潤が特徴的といえる[1]。脂質滴を豊富に含んだ泡沫細胞の多くは，単球から分化したマクロファージ（Mφ）由来と考えられており[2]，その泡沫化の機序は，動脈硬化の成因を解明する上で非常に重要なテーマとなっている。細胞に蓄積している脂質は，血清中の低比重リポタンパク質（low-density lipoprotein, LDL）から供給されると考えられてきたが，LDLは，そのままではMφの脂質蓄積をほとんど促さない。最近，LDLを種々の方法で修飾することにより，培養Mφ中のコレステリルエステル（CE）が増加してくることが明らかになり，様々な修飾LDLが数多く

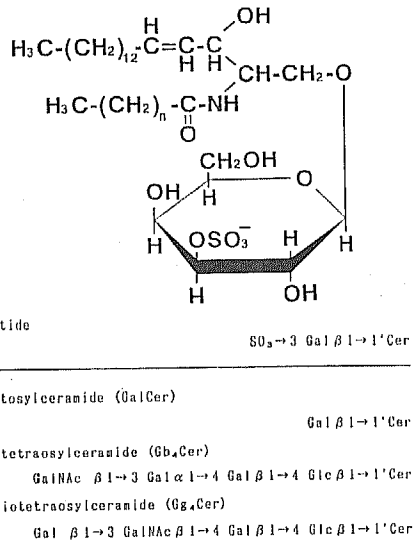

Fig. 1 Structures of sulfatide (cerebroside sulfate, CS) and other glycosphingolipids. Gal, galactose; Cer, ceramide; GalNAc, N-acetyl galactosamine; Glc, glucose.

報告されるようになった。しかし，実際にどのような修飾が生体内で起こっているのかについては不明な点が多い。

今までに報告された修飾LDLにはおもなものだけでも，アセチル化LDL[3] (acetylated LDL, AcLDL) を初め，血管内皮細胞[4]やマロンジアルデヒド[5]を用いた酸化LDL，凝集LDL[6]等がある。その中でも糖鎖構造を持つコンドロイチン硫酸[7]，糖脂質のガングリオシド (GM3)[8]による修飾は，これらが生体内に普遍的に存在する物質である点が注目される。

スルファチド (cerebroside sulfate, CS) は酸性スフィンゴ糖脂質の一つで，ガラクトシルセラミドのガラクトースのC3位に硫酸基がエステル結合した構造を持つ (Fig. 1)。ヒトの組織中に幅広く分布しており，血清中にも0.64nmol/ml存在している[9]。特に目を引くのは，動脈硬化巣への特異的な集積で，正常ウサギの大動脈では検出されないのに対し，動脈硬化ウサギ (Watanabe hereditable hyperlipidemic rabbit) の大動脈には280nmol/g tissueの存在が報告されている[10]。CSは水溶液中では，極性基を外側に向けた形でミセルになっていると考えられること，また硫酸基により陰性に荷電していることから，同じく多数の硫酸基を持つコンドロイチン硫酸との類似性が高いと言える。コンドロイチン硫酸を豊富に含むヒト動脈中のプロテオグリカンはLDLと親和性が高く，かつLDLのMφへの取り込みを増加させるため，より病態生理的な修飾方法として提唱されている[7]が，CSをこのような視点からとらえた報告はない。

本研究では上記の問題をふまえて，CSによるLDLの修飾が生じるかどうかを実験的に試みた。さらに，CS修飾LDLのMφへの取り込みや，Mφのコレステロール代謝を調べることで，動脈硬化巣の成立に対するCSの関与について検討したところ，有意義な結果を得たので報告する。

II 材料と方法

A 糖脂質

CSはブタ (LWD種) 脊髄から[11]，ガラクトシルセラミド (GalCer) はヒト剖検脳から[12]，グロボテトラオシルセラミド (Gb4Cer) は正常ヒト保存血のA型赤血球から[13]それぞれ精製した。ガングリオテトラオシルセラミド (Gg4Cer) はウサギ (日本白色種) 脳のGM1ガングリオシドを脱シアル化して精製した[12] (Fig. 1)。

B リポタンパク質

LDL (d=1.019−1.063g/ml) はヒト新鮮血清から超遠心により調製した[14]。AcLDLはBasuら[15]の方法によって調製した。CS修飾LDL (CSLDL) は以下のように調製した。ガラス試験管中で，CS (10−40 nmol) をDulbecco's MEM (DMEM, Flow Lab.) に溶解し，これにLDLを500μg加え総量500μlとした。37°C，95% air-5% CO_2下で24時間インキュベート後，10% lipoprotein deficient serum (LPDS)，penicillin (100units/ml, Flow Lab.), streptomycin (100μg/ml, Flow Lab.) を含むDMEM (medium A) 4.5mlを加え10倍に希釈後実験に用いた。LPDS (d>1.215) は超遠心により調製した。調製後のLDLは4°Cで保存し，4週間以内に使用した。また，LPDSは−20°Cで保存した。

Iodine-125 (585MBq/μg), [1-^{14}C]oleic acid (1.96 GBq/mmol) はAmersham社から，[7-^{3}H(N)]-cholesterol (806.6GBq/mmol), [4-^{14}C]cholesterol (1.9GBq/mmol) はDu Pont社から購入した。

C マウス腹腔Mφ

マウス腹腔Mφは，ICRマウス (雌，5週齢，日本SLC株式会社) の腹腔常在Mφを用いた。マウス (10〜20匹) をエーテル麻酔後，頸椎脱臼により屠殺し，リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 5mlを腹腔内注射

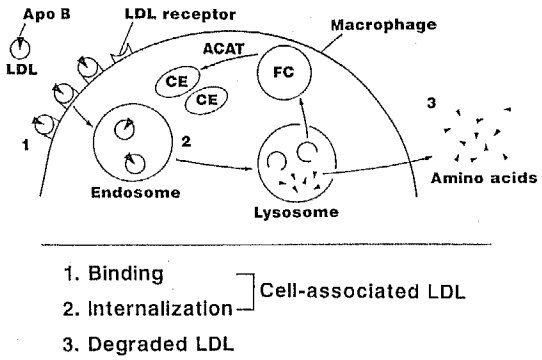

Fig. 2 Metabolism of LDL by macrophages. ACAT, acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase ; Apo B, apolipoprotein B ; CE, cholesteryl ester ; FC, free cholesterol.

した後，洗浄液を回収した。100×gで10分間遠心し，さらにDMEM 30mlに浮遊させ，その一部をニグロシン染色して血球計算板でMφ数を測定した。これにより2−3×10^6/匹のMφを得た。再度遠心後，20%ウシ胎児血清（Flow Lab.）を含むDMEMに浮遊させ実験に応じプラスチック培養ディッシュ（35×10 mm；Nunc社），マイクロプレート（24孔，径16mm；Nunc社）または培養フラスコ（25cm^2；Nunc社）に分注した。37°C，95% air-5% CO_2下で2時間静置した後，浮遊細胞を除去するためにDMEMで3回洗い，medium Aに培地交換し実験に用いた。培養は全て37°C，95% air-5% CO_2下で行った。実験終了後には培地を除き，付着細胞を0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）含有DMEMで3回，DMEMで2回，PBSで1回洗った後 1N NaOHに溶解しLowry法[16]にてBSAを標準としタンパク質を定量した。全ての測定値は細胞タンパク質量で除し，補正した。

MφによるLDLの取り込み量（正確には結合量＋取り込み量，cell-associated LDL）および分解量（degraded LDL）は，Goldsteinら[17]の方法を用い，修飾または未修飾の^{125}I標識LDL（100μg/ml，100 cpm/ng）と細胞（1×10^6/径16mmウェル）をmedium A 300μl中個々の実験条件で5時間インキュベートして得た。

分解量（Fig. 2の3）は，実験培地250μl中のトリクロロ酢酸可溶画分をガンマスペクトロメーターで測定した値から算出した。細胞を入れずに行った対照では，分解量はわずかだったが，この値を差し引いたものを細胞による分解量とした。

取り込み量（Fig. 2の1＋2）は，培地を除き細胞を洗った後 0.1N NaOH 300μlに溶解し，150μlをカウントすることで求めた。さらに100μlを用いタンパク質を定量した。

LDLとAcLDLの^{125}Iによる標識は一塩化ヨウ素法にて行った[17]。比活性は200〜600cpm/ngで，それぞれ100cpm/ngに調製後，実験に用いた。

D [^{14}C]cholesterol標識LDL

LDLの[4-^{14}C]cholesterolによる標識は，XuとTabas[18]の方法で行った。LDL（2mg protein）を185 kBq（5μCi, 94nmol）の[^{14}C]cholesterolを含む非動化LPDS 5mlと37°C，2時間インキュベートした後，超遠心によりLDL画分を回収した。

E [^{3}H]cholesterol標識Mφ

Mφの[7-^{3}H(N)]cholesterolによる標識は，Shinoharaら[19]の方法で行った。細胞を37ng（74 kBq)/mlの[^{3}H]cholesterolとmedium A中で16時間pulseした後，DMEMで3回洗い，medium Aに培地交換し2時間平衡化した。その後DMEMで3回洗い，修飾または未修飾のLDL（100mg/ml）存在下で5時間chaseした。実験終了後，培地を回収し液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。細胞は，後述のように脂質抽出後，コレステロール，CEを分離して放射活性を測定した。

F 脂質の分析

Mφと修飾または未修飾LDL（100μg/ml）をインキュベート後，培地を除き細胞を0.2% BSA含有DMEMで3回，DMEMで2回，PBSで1回洗ってからヘキサン／イソプロパノール（3：2，v/v）で2回抽出した（室温 30分間）[20]。抽出液は窒素気流下で乾固してから薄層クロマトグラフィー（TLC）で

分析した。HP-TLCプレート（Merck社）にて既知量のコレステロール，CEとともに試料を展開した。展開溶媒には，ヘキサン／エーテル／酢酸（80：20：2，v/v/v）を用いた。酢酸銅リン酸試薬を噴霧し150°C，15分加熱して得た炭化スポットをデンシトメーター（CS9000, Shimadzu）で定量した。また，標識実験ではヨード蒸気で着色したコレステロール，CEのスポットを削り取り，液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。脂質抽出後1N NaOHを加えて可溶化し，細胞タンパク質を定量した。

G Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) 活性の測定

Sodium [^{14}C]oleate-albumin complex (10mM sodium [^{14}C]oleate, albumin 120mg/ml, 比活性 8,880dpm/nmol) を調製し[17]，修飾または未修飾LDL（100μg/ml）を含むmedium A 500μlに，それぞれ5μlずつ加えた。この培地でMϕを5時間培養後，細胞の脂質を抽出しCE中の放射活性を測定した。

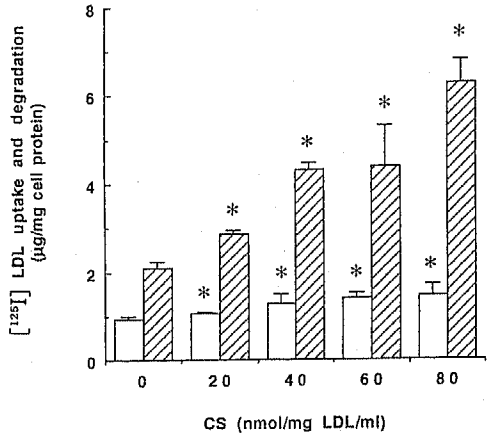

Fig. 3 Effect of sulfatide (CS) interaction with low-density lipoprotein (LDL) on the cell association and degradation of LDL by macrophages. Macrophage monolayers (1×10^6/16mm well) were incubated in 300μl of medium A containing 100μg/ml of ^{125}I-labeled LDL ([^{125}I] LDL) which was preincubated with indicated concentrations of CS. After 5 hr at 37°C, cell association (open bars) and degradation (hatched bars) of [^{125}I] LDL were assayed as described under "Materials and Methods". Each bar represents the mean of triplicate determinations. The error bar represents SD. *$p<0.05$ as compared to control.

H CSとLDLの結合

CSのエタノール溶液をプラスチックウェル（Removawell™, Dynatech Lab.）に分注し，37°Cに2～3時間置き，CSを乾固させた。非特異的結合をブロックするために1％ゼラチン含有PBS 100μlを加え，室温に2時間置いた。1％ゼラチン含有PBSで2回洗い，^{125}I標識LDL（265cpm/ng, 11μg/ml 0.1％ゼラチン含有PBS）50μlを加え，37°Cに1時間置いた。その後，1％ゼラチン含有PBSで5回洗い，ウェルを切離しガンマスペクトロメーターで結合量を測定した。

III 結　　果

A CSLDLのMϕへの取り込み

LDLのMϕへの取り込み量は，LDLをCSとプレインキュベートすることにより有意に増加し，その増

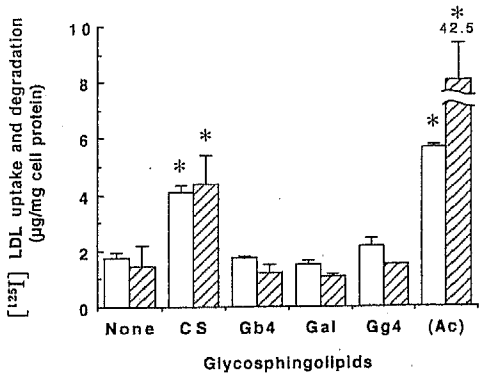

Fig. 4 Effect of glycosphingolipids on the cell association and degradation of LDL by macrophages. Macrophage monolayers (1×10^6/16mm well) were incubated in 300μl of medium A containing 100μg/ml of ^{125}I-labeled acetylated LDL (Ac) or ^{125}I-labeled LDL ([^{125}I] LDL) which was preincubated with or without (None) indicated glycosphingolipids (Gb4=Gb4Cer, globotetraosylceramide; Gal=GalCer, galactosylceramide; Gg4=Gg4Cer, gangliotetraosylceramide). Each glycolipid was preincubated at a concentration of 80nmol/mg LDL /ml. After 5 hr at 37°C, cell association (open bars) and degradation (hatched bars) of [^{125}I] LDL were assayed as described under "Materials and Methods". Each bar represents the mean of triplicate determinations. The error bar represents SD. *$p<0.05$ as compared to native LDL (None).

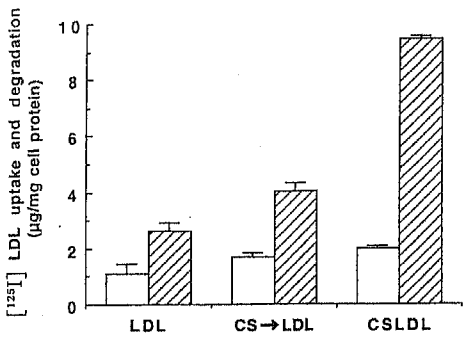

Fig. 5 Effect of CS interaction with macrophages on the cell association and degradation of LDL by macrophages. Macrophage monolayers (1×10^6/16mm well) were preincubated in 300μl of medium A containing 8nmol/ml of CS for 5 hr at 37°C. After 3 washes with DMEM, medium was changed to 300μl of medium A containing 100μg/ml of ^{125}I-labeled LDL ([^{125}I] LDL) followed by subsequent incubation for 5hr at 37°C (CS → LDL). The monolayers were preincubated in medium without CS followed by incubation with 100μg/ml of [^{125}I] LDL (LDL) or ^{125}I-labeled CSLDL (CSLDL) as controls. Cell association (open bars) and degradation (hatched bars) of [^{125}I] LDL were assayed as described under "Materials and Methods". Each bar represents the mean of triplicate determinations. The error bar represents SD.

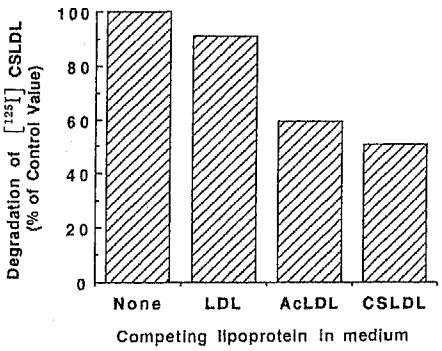

Fig. 6 The ability of nonradioactive LDL, acetylated LDL (AcLDL) and CS modified LDL (CSLDL) to compete for the degradation of ^{125}I-labeled CSLDL ([^{125}I] CSLDL). Each macrophage monolayer (1×10^6/16mm well) received 300μl of medium A containing 10μg/ml of [^{125}I] CSLDL in the presence of medium alone (None), 200μg/ml of LDL, AcLDL or CSLDL. After incubation for 5 hr at 37°C, the amount of ^{125}I-label recovered as trichloroacetic acid-soluble material in the medium was determined. 100% equals 0.45μg of [^{125}I] CSLDL degraded/mg cell protein/5 hr. The data are the mean of triplicate experiments.

加量はCS濃度に依存していた（Fig. 3）。CS 80 nmol/mg LDLでは未修飾LDLと比べcell-associated LDLで約2倍（未修飾LDL 0.92±0.06, CSLDL 1.45±0.26μg/mg；値は平均値±標準偏差, n=3), degraded LDLで約3倍（未修飾LDL 2.08±0.14, CSLDL 6.27±0.51μg/mg）と明らかな増加を示した。CS濃度が80nmol/mlをこえると次第に難溶性になってきたため，以下の実験ではCS 80nmol/mg LDL/mlでプレインキュベートし，CSLDLとして用いた。

LDLを同濃度の糖脂質（Gb4Cer, GalCer, Gg4Cer）とプレインキュベートした実験（Fig. 4）では，いずれも未修飾LDL（None）との間に有意差を認めなかった。一方，Mϕに著明な泡沫化を起こすAcLDLでは，cell-associated LDL 5.63±0.11, degraded LDL 42.5±1.30μg/mgと，特にdegraded LDLの著しい増加を認めた。

LDLの取り込みの増加が，LDLとCSの結合より，むしろCS単独でのMϕ活性化による可能性も考えられたので，予め，MϕとCS 8nmol/mlを5時間インキュベートし，DMEMで3回洗った後，LDL含有培地に交換しさらに5時間培養した（Fig. 5）。結果は，cell-associated LDL 1.69±0.14, degraded LDL 4.04±0.29μg/mgと対照に比べわずかに増加がみられたものの，CSLDLの1.98±0.09, 9.47±0.07μg/mgには及ばなかった。

未修飾LDLは，MϕのLDLレセプター経路を介して取り込まれるが，LDLが修飾を受けるとその修飾に応じ，アセチルLDLレセプターに代表されるいわゆるスカベンジャーレセプター経路を介して取り込まれる場合がある。そこで，CSLDLのレセプターを推定するために，^{125}I標識CSLDL 10μg/mlに，非標識LDL, AcLDL, あるいはCSLDL 200μg/mlを加えた培地でMϕをインキュベートし，競合阻害実験を行った（Fig. 6）。阻害率はそれぞれ9.0%, 40.9%, 49.4%であり，過剰の非標識LDLでは^{125}I標識CSLDLのdegradationがほとんど阻害されない（対照と有意差なし）のに対し，非標識AcLDLとCSLDLは，ともに同程度の著明な阻害を示した。こ

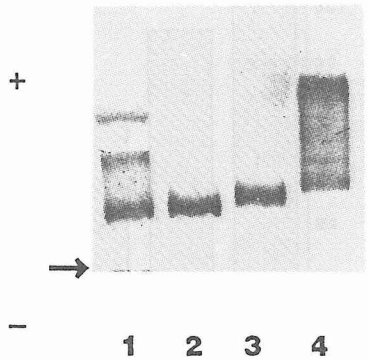

Fig. 7 Agarose-gel electrophoresis of LDL, CSLDL and AcLDL. The arrow indicates the position of sample application. Lane 1, control serum ; lane 2, LDL ; lane 3, CSLDL ; lane 4, AcLDL (Fat Red 7B staining).

の結果は，CSLDL の取り込みが LDL と競合せずに，AcLDL と競合することを示し，CSLDL が LDL レセプターよりむしろアセチル LDL レセプターによって認識され，取り込まれる可能性を示す。

B CS と LDL の結合

Fig. 7 に CSLDL のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。CS を含まない培地中でプレインキュベートを行った LDL の泳動度は，コントロール血清中の LDL のそれと変わらなかったが，CSLDL はより陽極側に泳動された。この事実は LDL の負の電荷が CS とのインキュベートによって増加することを示す。CS は硫酸基を持つことから，LDL の電荷の変化は CS と LDL の結合によると考えられる。AcLDL は CSLDL よりさらに陽極側に泳動された。

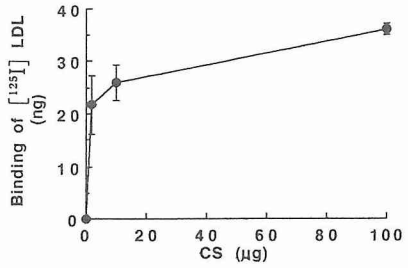

Fig. 8 Binding of LDL to CS. The indicated amounts of CS were fixed on the bottom of plastic wells. To block nonspecific binding, each well was incubated with 100μl of phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% gelatin (1% gelatin-PBS) for 2 hr at room temperature. After 2 washes with 1% gelatin-PBS, 50μl of 0.1% gelatin-PBS containing 11μg/ml of ^{125}I-labeled LDL ([^{125}I] LDL, 265cpm/ng) was added and incubated for lhr at 37°C. Wells were washed 5 times with 1% gelatin-PBS, and the amount of [^{125}I] LDL bound to each well was determined. Each point represents the mean of triplicate determinations. The error bar represents SD.

CS と LDL の結合を確認するために Fig. 8 の実験を行った。CS (0,1,10,100μg) を乾固させたプラスチックウェルに ^{125}I 標識 LDL を加えたところ，結合 LDL 量は CS 量に依存して増加していた。

C CSLDL の取り込みによる細胞コレステロール量の変化

CSLDL は，AcLDL のように Mϕ の CE の蓄積

Table 1 Cellular contents of free cholesterol and cholesteryl ester after incubation with lipoproteins (μg/mg cell protein)

Lipoprotein	FC	CE
LDL	20.8±2.1	2.2±0.5
CSLDL	22.1±2.4	4.1±1.2*
AcLDL	45.4±2.9*	224.8±9.5*

Macrophages (3.5×10^6/35mm dish) were incubated in 1 ml of medium A containing 100μg/ml of LDL, CSLDL, or AcLDL for 24 hr at 37°C. After 6 washes, the cellular lipid was extracted and developed on HP-TLC plate with the standard samples of free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE). The FC and CE spots were visualized by spraying cupric-phosphoric acid reagent and heating at 150°C for 15 min. The amounts of FC and CE were then determined by densitometer. Values are the means±SD of triplicate experiments. (*$p<0.05$ as compared to LDL)

Table 2 Effect of lipoproteins on acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase stimulation (nmol/mg cell protein)

Lipoprotein	Cholesteryl[^{14}C]oleate
None	0.57±0.02
LDL	0.81±0.01
CSLDL	2.57±0.04*
AcLDL	11.67±0.10*

Macrophages (1×10^6/16mm well) were incubated in 500μl of medium A containing 0.1mM [^{14}C]oleate-albumin and 100μg/ml of LDL, CSLDL or AcLDL. A parallel incubation was also performed without lipoprotein as a control (None). After 5 hr at 37°C, the cellular content of cholesteryl-[^{14}C]oleate was determined as described under "Materials and Methods". Values are the means±SD of triplicate experiments. (*$p<0.05$ as compared to LDL)

Table 3 Distribution of radioactivity after incubation of macrophages with [^{14}C]-cholesterol-labeled LDL or CSLDL (cpm$\times10^{-3}$/mg cell protein)

	FC	CE	Total radioactivity
LDL	82.5 (99.8)	0.1 (0.2)	82.6 (100)
CSLDL	192.6 (99.4)	1.2 (0.6)	193.8 (100)

Macrophages (6×10^6/25cm^2 flask) were incubated in 3 ml of medium A containing 100μg/ml of [^{14}C]cholesterol-labeled LDL or [^{14}C]cholesterol-labeled CSLDL for 5 hr at 37°C. After 6 washes, the cellular lipid was extracted and developed on HP-TLC plate. Free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE) spots were visualized under iodine vapor and scraped to determine the amount of [^{14}C]cholesterol as described under "Materials and Methods". Each value in parentheses is a percentage of total radioactivity.

(泡沫化)を起こすか否かを検討した(Table 1)。マウスMφをLDL, CSLDL, AcLDL存在下で24時間培養後,細胞中の脂質を抽出し,薄層クロマトグラフィーとデンシトメトリーにより遊離コレステロール(free cholesterol, FC)とCEを定量した。AcLDLと培養したMφでは,FC 45.4±2.9μg/mg, CE 224.8±9.5μg/mgとLDLと比べ著しい増加がみられたが,CSLDLではそれぞれ22.1±2.4, 4.1±1.2μg/mgとわずかな増加に留まった。Mφは,CSLDLをLDLの約3倍取り込むが(Fig. 3—5),取り込み量の増加に見合うだけのFC, CEの蓄積はみられなかった。

D Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)の活性

MφのCE合成をさらに詳しく調べるため,修飾または未修飾LDLとともに[^{14}C]oleateを加えた培地でMφを培養し,細胞中のCEの放射活性を測定したところ,CSLDLによりCE合成が増加,すなわちACAT活性が亢進していることがわかった(Table 2)。CSLDLを加えるとACAT活性はLDLを加えた場合の約3倍に亢進していたが,AcLDLを加えた場合の約1/5であった。

E Mφによるコレステロール代謝

前述したように,CSLDLの取り込みの増加とCEの細胞内蓄積は必ずしも並行しないが,この点を検討する上で^{125}Iによるアポタンパクの標識では不十分と考えた。LDL中のFC, CE (exogenous cholesterol)はMφに取り込まれると,ライソゾーム中で大部分がFCに分解され,細胞膜上に移動する(endogenous cholesterol)と考えられている[18)21)]。この仮説をふまえて,標識コレステロールを用いた実験を行った。

まず[^{14}C]cholesterol標識LDLを用いてexogenous cholesterolの代謝を調べた(Table 3)。

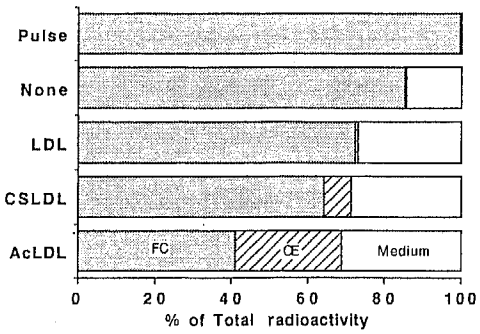

Fig. 9 Labeling of macrohages with [^{3}H]cholesterol and subsequent chases with LDL, CSLDL or AcLDL. Macrophages were labeled with 37 ng/ml of [^{3}H]cholesterol for 16 hr, washed 3 times with DMEM, and incubated for 2 hr in medium A for equilibration (Pulse). The cells were chased for 5 hr in 500μl of medium A containing 100μg/ml of LDL, CSLDL or AcLDL. The chase was also performed without lipoprotein as a control (None). An aliquot of the culture medium was saved to determine the [^{3}H]cholesterol release. After 6 washes, the cellular lipid was extracted and developed on HP-TLC plate. Free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE) spots were visualized under iodine vapor and scraped to determine the amount of [^{3}H]cholesterol as described under "Materials and Methods". Total radioactivity of Pulse, None, LDL, CSLDL and AcLDL was 2456, 2611, 2598, 2737 and 2610cpm$\times 10^3$/mg cell protein, respectively. The data are the mean of triplicate experiments.

Total radioactivity を比較すると，Mφ の cholesterol の取り込みが CSLDL で LDL の 2 倍強に増えていることがわかり，これは ^{125}I 標識 LDL による実験結果と一致した。その内訳を見ると LDL, CSLDL でそれぞれ0.2%，0.6%が CE 合成に利用されるだけで，大部分が FC として存在していた。

次に [^{3}H]cholesterol 標識 Mφ を使って endogenous cholesterol の代謝を調べた (Fig. 9)。実験開始後 5 時間のうちに LDL, CSLDL, AcLDL では，それぞれ0.8%，6.9%，28.1%が CE 合成に利用されていた。また，いずれも約30%が培地中に移行していた。以上から，LDL から取り込まれたコレステロールの全てが CE 合成に用いられるわけではなく，細胞中（細胞膜上）に FC として移行したもののうち，約30%は LDL の修飾と無関係に培地中に移行し，残りの70%のさらに一部が，LDL の修飾に応じた割合で，CE 合成に利用されることが確認された。また，CSLDL は LDL に比べ細胞内の CE 量を有意に増加させ得ることが明らかになった。

Ⅳ 考　　察

動脈硬化巣に蓄積する脂質は，コレステロール，CE を中心に数多く研究されてきた。その中には動脈硬化巣中のスフィンゴ糖脂質についての報告もあり，特に GM3, CS の蓄積は特徴的とされる[10)22)23)]。今回の実験でプレインキュベーションに用いた CS の80 nmol/ml という濃度は，病変部の CS が280nmol/g tissue という報告[10)]からみて *in vivo* でも実在し得る濃度といえる。CS を含む血清中のスフィンゴ糖脂質の大部分は，生理的環境下でリポタンパク質上に存在している[10)24)]が，LDL を高濃度の CS とインキュベートすることで LDL の CS 結合量を増加させ，さらに化学的性質を変化させ得る (Fig. 7) と考えられる。

CSLDL の Mφ への取り込みは未修飾 LDL に比べ著明に増加し，増加量は CS 濃度に依存していた (Fig. 3)。しかし，このように取り込みを増加させる性質はスフィンゴ糖脂質に共通するものではない (Fig. 4)。Gg4Cer は LDL に存在するアポ B に強い親和性を示すという報告がある[25)]が，LDL に対する親和性と取り込み量には必ずしも関係がないと考えられる。また，GalCer の化学構造は，硫酸基がないことを除けば CS と同じであるが，Fig.4 でみるように LDL の取り込みには影響しなかった。これは，取り込みの増加に硫酸基の存在が関わっていることを示唆しており，同じく，LDL と結合して Mφ への取り込みを増加させる動脈由来のプロテオグリカン[7)]などが硫酸基を持つことと合わせ興味深い。CSLDL の陰性荷電の増大 (Fig. 7) は CS の硫酸基によると思われるが，この陰性荷電は Mφ に取り込まれやすい修飾 LDL のアセチル化 LDL，酸化 LDL などに共通してみられる[26)]。

CS やガングリオシドは，Mφ に直接作用して貪食能やある種のレセプターの発現を制御することができる[27)28)]ため Fig. 5 の実験を行ったが，これでみる限り Mφ による LDL の取り込みの増加には，CS の細胞への作用よりも CS による LDL の修飾がより大きく影響していると考えられた。CS と Mφ を予めインキュベートした系でも取り込みが若干増えているのは，洗いきれなかった CS が LDL を修飾したためかもし

れない。

競合阻害実験の結果（Fig. 6）はCSLDLが，アセチルLDLレセプターで認識される可能性を明らかにした。未修飾LDLはMφのLDLレセプターで認識されるが，このレセプターは，細胞コレステロールの蓄積によってダウンレギュレーションを受けることが知られており[29]，未修飾LDLがMφの泡沫化を起こさない一因とされている。一方，アセチルLDLレセプターは，ダウンレギュレーションを受けない[30]ために，細胞中の脂質は無制限に増加し得る。

CSとプロテオグリカンの類似性については前述したが，プロテオグリカン修飾LDLはLDLレセプターにより認識される[7]点が異なっている。CSLDLの取り込みにはアセチルLDLレセプターの関与が推定されるが，レセプターの特定にはさらに詳しい検討が必要だろう。

ここで，今まで見てきたCSLDLのMφへの取り込みを，LDL中のコレステロールに注目して再検討してみたい。Fig. 1—3からCSLDLのdegradation量の平均は約7μg LDL protein/mg cell protein/5hrで，これをLDLのタンパク質／コレステロール重量比約1：2として単純計算すると，約14μg/mg/5hrのコレステロールがMφに取り込まれることになる。したがって計算上は24時間で約70μg/mgがFCまたはCEとして細胞中に蓄積するように思われる。ところが，この予想に反してCSLDLとMφの24時間のインキュベートではFC，CEの増加は少なかった（Table 1）。この理由を明らかにするため，Mφのコレステロール代謝を検討した。

まず，Table 2ではCSLDLによりMφのACAT活性がLDLの約3倍に増加していることが解った。これはAcLDLには及ばないものの，CE合成が亢進していることを示す。

Exogenous cholesterol（LDL中のコレステロール）は，LDL, CSLDLともそのほとんどが細胞中にFCとして存在していた。また，CSLDL群の標識コレステロールはLDL群の2倍強であり，前述の取り込み量の増加に見合っていた（Table 3）。一方，endogenous cholesterol（細胞膜上のコレステロール）の代謝（Fig. 9）を見ると，LDL, CSLDL, AcLDL群の全てで，約30%のコレステロールが培地中に移行しているのが解る。この数字はShinoharaら[19]の報告とほぼ一致しているが，彼らは培地中へのコレステロールの移行がリポタンパク質を介して起こると考えている。さらに，CEへの利用率を比較すると，それぞれ0.8，6.9，28.1%と著明な違いが認められた。この結果からTable 1の結果を説明できる。つまり，5時間のインキュベートによりCSLDL中のコレステロールの全てが細胞に蓄えられたとしても，次の5時間では14μg/mgのうち4μg/mgが培地中に移行し，エステル化されるのはおよそ1μg/mgに過ぎないことになる。これに対してAcLDLでは取り込み量，利用率とも大きいため速やかに泡沫化すると考えられる。もっとも実際のendogenous cholesterol量は流動的と思われるため，さらに詳細な検討が必要であろう。いずれにせよ，CSLDLによりMφのCE合成が増加することは間違いない。今回の実験で用いたマウス腹腔Mφでは長期間の培養が不可能であったが，CE合成が亢進することから考えて，長期培養により泡沫化が起こってくる可能性が示唆される。

AcLDLの生体内での存在が否定的なのに対し，CSはもともとLDL上に存在している物質であり，CSLDLの*in vivo*での存在は充分に現実性があるといえる。また，家族性高コレステロール血症の動物モデルであるWatanabe hereditable hyperlipidemic（WHHL）rabbitでは血清リポタンパク質のCS含量が特異的に増加することが知られている[31]。この高脂血症においてCSを多量に含むLDLが生成されていることと，CSLDLがMφに急速に取り込まれCE合成を亢進させることを考え合わせると，CSを多量に含むLDLはatherogenicということができ，高脂血症に続く動脈硬化巣形成のプロセスにCSLDLが関与していることが充分考えられる。

したがって今後，ヒト動脈硬化巣の検討も含め，動脈硬化とCSの関係をさらに明らかにしていく必要があると思われる。

V 結　語

動脈硬化巣形成におけるスルファチドの関与の有無を明らかにするため，スルファチドによる低比重リポタンパク質（LDL）の修飾を試み，スルファチドで修飾したLDLがマウス腹腔マクロファージのコレステロール代謝に与える影響を調べた。その結果，以下の知見を得た。

1　スルファチドで修飾したLDLのマクロファージへの取り込みは，未修飾LDLの約3倍に増加していた。

2　この取り込みにはアセチルLDLレセプターが関

与していると考えられた。

3　スルファチドで修飾したLDLによりマクロファージのコレステリルエステル合成能が亢進した。

4　生体内のLDLのスルファチドによる修飾の可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました信州大学医学部心脈管病研究施設脂質生化学部門，武富　保教授，ならびに恩師である第1内科学教室，関口守衛教授に深謝いたします。また本研究に際し適切な御教授，御助力をいただきました脂質生化学教室上村敬一助教授，原　厚講師をはじめ教室の皆様，また，附属病院中央検査部，日高宏哉博士に併せて感謝いたします。

なお，本論文の要旨は，第35回日本脂質生化学研究会（1993年6月，東京）において発表した。

文　献

1) Ross R : The pathogenesis of atherosclerosis-an update. N Engl J Med 314 : 488-500, 1986

2) Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS : Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. Arteriosclerosis 3 : 87-101, 1983

3) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS : Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci U S A 76 : 333-337, 1979

4) Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D : Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells : Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A 78 : 6499-6503, 1981

5) Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA : Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 77 : 2214-2218, 1980

6) Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D : Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. Arteriosclerosis 8 : 348-358, 1988

7) Hurt E, Bondjers G, Camejo G : Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. J Lipid Res 31 : 443-454, 1990

8) Prokazova NV, Mikhailenko IA, Bergelson LD : Ganglioside GM3 stimulates the uptake and processing of low density lipoproteins by macrophages. Biochem Biophys Res Commun 177 : 582-587, 1991

9) Zhu X, Hara A, Taketomi T : The existence of galactosylceramide I^3-sulfate in serums of various mammals and its anticoagulant activity. J Biochem (Tokyo) 110 : 241-245, 1991

10) Hara A, Taketomi T : Characterization and changes of glycosphingolipids in the aorta of the Watanabe hereditable hyperlipidemic rabbit. J Biochem (Tokyo) 109 : 904-908, 1991

11) Hara A, Radin NS : Simple procedures for the rapid cleavage of ester lipids and for the large-scale isolation from brain of cerebroside sulfate. Anal Biochem 100 : 364-370, 1979

12) Uemura K, Kitazawa N, Taketomi T : Antibody response of rabbits to nerve ending gangliosides. Analysis of antibody specificity by liposome lysis and lysis inhibition assays. J Neuroimmunol 9 : 269-280, 1985

13) Uemura K, Hattori H, Kitazawa N, Taketomi T : Immunochemical determination of Forssman and blood group A-active glycolipids in human gastric mucosa by inhibition assay of liposome lysis. J Immunol Methods 53 : 221-232, 1982

14) Hatch FT, Lees RS : Practical methods of plasma lipoprotein analysis. In : Paoletti R, Kritchevsky D (eds), Advances in lipid research, vol 6, pp 1-68, Academic Press, New York, 1968

15) Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS : Degradation of cationized low density lipoprotein

and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 73 : 3178-3182, 1976

16) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951

17) Goldstein JL, Basu SK, Brown MS : Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. Methods Enzymol 98 : 241-260, 1983

18) Xu.XX, Tabas I : Lipoproteins activate acyl-coenzyme A : cholesterol aclytransferase in macrophages only after cellular cholesterol pools are expanded to a critical threshold level. J Biol Chem 266 : 17040-17048, 1991

19) Shinohara M, Miyazaki A, Shichiri M, Morino Y, Horiuchi S : Exposure of rat peritoneal macrophages to acetylated low density lipoprotein results in release of plasma membrane cholesterol. J Biol Chem 267 : 1603-1608, 1992

20) Hara A, Radin NS : Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Anal Biochem 90 : 420-426, 1978

21) DeGrella RF, Simoni RD : Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. J Biol Chem 257 : 14256-14262, 1982

22) Prokazova NV, Orekhov AN, Mukhin DN, Mikhailenko IA, Kogtev LS, Sandovskaya VL, Golovanova NK, Bergelson LD : The gangliosides of adult human aorta : intima, media and plaque. Eur J Biochem 167 : 349-352, 1987

23) Mukhin DN, Prokazova NV, Bergelson LD, Orekhov AN : Ganglioside content and composition of cells from normal and atherosclerotic human aorta. Atherosclerosis 78 : 39-45, 1989

24) Senn HJ, Orth M, Fitzke E, Wieland H, Gerok W : Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. Eur J Biochem 181 : 657-662, 1989

25) Ledvinova J, Iwamori M, Nagai Y : Characteristic binding of human plasma apolipoprotein B to gangliotetraosylceramide and gangliotriaosylceramide. Eur J Biochem 194 : 507-511, 1990

26) Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL : Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 320 : 915-924, 1989

27) Hoon DSB, Jung T, Naungayan J, Cochran AJ, Morton DL, McBride WH : Modulation of human macrophage functions by gangliosides. Immunol Lett 20 : 269-276, 1989

28) Wassef NM, Matyas GR, Alving CR : Complement-dependent phagocytosis of liposomes by macrophages : suppressive effects of "stealth " lipids. Biochem Biophys Res Commun 176 : 866-874, 1991

29) Goldstein JL, Brown MS : Low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Annu Rev Biochem 46 : 897-930, 1977

30) Brown MS, Goldstein JL : Lipoprotein metabolism in the macrophage : Implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem 52 : 223-261, 1983

31) Hara A, Taketomi T : Occurrence of sulfatide as a major glycosphingolipid in WHHL rabbit serum lipoproteins. J Biochem (Tokyo) 102 : 83-92, 1987

(5. 3. 17 受稿)