

学位論文
Doctoral Thesis

マクロファージの細胞増殖及び細胞周期進行における AMP キナーゼ
の役割と AMP キナーゼを標的とした動脈硬化症治療の検討

**(AMP-activated protein kinase; its roles in proliferation and cell cycle of
macrophages, and its potential as a therapeutic target for atherosclerosis)**

石井 規夫

Norio Ishii

指導教員

荒木 栄一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻代謝内科学

2009年3月

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名：マクロファージの細胞増殖及び細胞周期進行における AMP キナーゼ
の役割と AMP キナーゼを標的とした動脈硬化症治療の検討
(AMP-activated protein kinase; its roles in proliferation and cell cycle of
macrophages, and its potential as a therapeutic target for atherosclerosis)

著 者 名： 石井 規夫

Norio Ishii

指導教員名：熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻代謝内科学

荒 木 栄 一 教授

審査委員名：

- 1) 細胞病理学分野 竹屋 元裕 教授
- 2) 循環器病態学分野 小川 久雄 教授
- 3) 分子遺伝学分野 尾池 雄一 教授
- 4) 心臓血管外科学分野 川筋 道雄 教授

2009年3月

-目次-

1. 要旨	4
2. 発表論文リスト	8
3. 謝辞	9
4. 略語一覧	10
5. 研究の背景と目的	13
5- (1) 粥状動脈硬化の進展過程	13
5- (2) 粥状動脈硬化病変形成における酸化 LDL の役割	15
5- (3) 動脈硬化病変におけるマクロファージの増殖	18
5- (4) 酸化 LDL によるマクロファージ増殖	19
(I) 酸化 LDL の組成とマクロファージ増殖	
(II) マクロファージ増殖におけるスカベンジャー受容体の役割	
(III) マクロファージ増殖におけるシグナル伝達機構	
(i) マクロファージ増殖における細胞内カルシウムの役割	
(ii) マクロファージ増殖における PKC の役割	
(iii) マクロファージ増殖における GM-CSF の役割	
(iv) マクロファージ増殖における MAPK の役割	
(IV) GM-CSF の発現調節	
5- (5) AMP-activated protein kinase (AMPK) の構造と機能	30
(I) AMPK とは	
(II) AMPK の構造	
(III) AMPK の代謝調節作用	
(IV) AMPK のアポトーシス誘導および抗アポトーシス作用	
5- (6) 細胞周期の制御	35
(I) 細胞周期とは	
(II) サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) による細胞周期の制御	
(III) CDK インヒビター	
(IV) Rb	
(V) p53	
5- (7) 本研究の目的	42
6. 実験方法	43
6- (1) リポタンパクの精製	43
6- (2) 酸化 LDL の調整	43
6- (3) 細胞培養	43
6- (4) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入	44

6- (5) プラスミド及び siRNA の遺伝子導入.....	45
6- (6) マクロファージ増殖	46
(A) 放射性チミジン取り込み法	
(B) 細胞数算定法	
6- (5) ELISA 法を用いたアポトーシスの解析	46
6- (6) フローサイトメトリーを用いたアポトーシス及び細胞周期の解析.....	47
6- (7) ELISA 法を用いた GM-CSF 蛋白の定量.....	47
6- (8) GM-CSF mRNA 発現の検討	48
(A) RNA の抽出	
(B) real-time RT-PCR 法による GM-CSF mRNA 発現量の定量	
6- (9) ウェスタンブロット法による蛋白質リン酸化及び蛋白質発現の検討.....	49
(A) 蛋白精製	
(B) ウェスタンブロット法	
6- (10) 統計学的解析.....	51
7. 実験結果.....	52
7- (1) マクロファージにおける AICAR による AMPK 活性化の検討.....	52
7- (2) 酸化 LDL によるマクロファージ増殖に対する AICAR の効果.....	52
7- (3) AMPK 過剰発現による酸化 LDL 誘導性マクロファージ増殖抑制効果	54
7- (4) AICAR による酸化 LDL 誘導性マクロファージ増殖抑制効果に対する DN-AMPK α 1 遺伝子導入による AMPK 活性化抑制の影響	54
7- (5) AICAR によるマクロファージアポトーシス誘導効果の検討	55
7- (6) 酸化 LDL による ERK1/2 のリン酸化と GM-CSF 発現に対する AICAR の影響..	57
7- (7) AICAR による GM-CSF 誘導性マクロファージ増殖抑制効果の検討	59
7- (8) AICAR による p38MAPK/Akt シグナル経路への影響.....	61
7- (9) マクロファージ増殖における細胞周期への AICAR の影響	61
7- (10) 細胞周期関連因子、細胞周期抑制因子への AICAR の影響.....	63
8. 考察.....	66
8- (1) AMPK 活性化によるマクロファージの細胞増殖とアポトーシスの抑制効果に ついての考察	66
8- (2) 酸化 LDL 誘導性マクロファージ増殖におけるシグナル経路の考察.....	67
8- (3) マクロファージ増殖に関与する細胞周期と細胞周期関連因子の考察.....	68
9. 結語.....	70
10. 参考文献.....	72

1. 要旨

粥状動脈硬化初期病変では、血管内皮細胞下にマクロファージ由来泡沫細胞の集簇が認められ、この泡沫細胞は様々な動脈硬化惹起因子を産生しており、動脈硬化症の発症・進展に寄与している。近年、血管内皮下においてマクロファージやマクロファージ由来泡沫細胞が増殖していることが分かり、動脈硬化症の発症・進展に重要な役割を果たすことが示唆されている。

著者らの教室ではこれまでに、酸化低比重リポタンパク質（酸化 LDL）がマウス腹腔マクロファージを増殖させる事（Sakai et al. 1994）、その機序として酸化 LDL による granulocyte/macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）の発現と分泌が必要である事（Biwa et al. 1998, Senokuchi et al. 2004）、さらに GM-CSF の発現には extracellular-signal regulated kinase 1/2（ERK1/2）の活性化が関与すること（Senokuchi et al. 2004）、を報告した。

本研究では、酸化 LDL によるマクロファージ増殖に対する AMP-activated protein kinase（AMPK）活性化の影響を検討した。

5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside（AICAR）はマクロファージにおいて AMPK α 1 のリン酸化を誘導し、酸化 LDL（20 μ g/ml）によるマクロファージ増殖を濃度依存性に抑制した。また、AMPK α 1 を過剰発現させたマクロファージにおいてもその増殖が抑制された。一方、AICAR によるマクロファージ増殖抑制効果は dominant-negative-AMPK α 1（DN-AMPK α 1）の過剰発現によって解除された事から、AMPK 活性化がマクロファージ増殖を抑制する事が示された。しかし AICAR は既報の酸化 LDL 誘導性マクロファージ増殖経路である ERK1/2 のリン酸化とそれに引き続く GM-CSF の産生を完全には抑制し得なかった。一方、AICAR は GM-CSF（10 pM）によるマクロファージ増殖も抑制

したが、p38MAPK/Akt シグナルの抑制は認めなかった。これらの事から、AICAR によるマクロファージ増殖抑制には既報とは別の機序が存在することが示唆された。そこでマクロファージの細胞周期に対する AMPK の影響を検討したところ、AICAR が G1 期から S 期への進行を阻止する事を見出した。GM-CSF は細胞増殖抑制因子である p53 のリン酸化とタンパク発現及びその下流の細胞周期抑制因子 p21^{cip} の産生を抑制したが、AICAR は GM-CSF によるこれらの効果を解除し、DN-AMPK α 1 過剰発現によりこの効果が消失した。また、AICAR は別の細胞周期抑制因子 p27^{kip} の産生を誘導し、DN-AMPK α 1 過剰発現によりこの効果が消失した。さらに、GM-CSF は、細胞周期が G1 期から S 期に進行する際に重要な細胞周期関連因子である Retinoblastoma protein (Rb) のリン酸化を誘導し、この作用は AICAR により抑制された。また、DN-AMPK α 1 の過剰発現により、AICAR による Rb のリン酸化抑制効果が解除された。一方、p53 の過剰発現や p27^{kip} の過剰発現によっても GM-CSF によるマクロファージ増殖が抑制された。さらに、siRNA により p21^{cip} 及び p27^{kip} 発現を抑制すると、AICAR による増殖抑制効果が減弱した。

以上の結果より、AMPK 活性化は GM-CSF 発現抑制と p53 を介した p21^{cip} 産生誘導効果及び p53 とは独立した p27^{kip} 産生誘導効果の 2 つの機序による細胞周期進行阻止により、酸化 LDL によるマクロファージ増殖を抑制した。この AMPK 活性化によるマクロファージ増殖抑制効果は、動脈硬化症の新たな治療標的となる可能性がある。

Summary

Massive clustering of macrophage-derived foam cells in the subendothelial spaces of arterial walls is one of the characteristic features of the early stages of atherosclerotic lesions. Previous studies have reported that macrophage-derived foam cells produce various cytokines and growth factors, and proliferate in atherosclerotic lesions. Therefore, it is suggested that macrophages and macrophage-derived foam cells play an important role in the development of atherosclerotic lesions.

We previously reported that oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) could induce proliferation of mouse peritoneal macrophages (Sakai et al. 1994), and also suggested several mechanisms of macrophage proliferation as follows. Ox-LDL induces production of granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Biwa et al. 1998, Senokuchi et al. 2004). Furthermore, extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) is involved in the signaling pathway of GM-CSF production (Senokuchi et al. 2004).

In this study, I investigated whether the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) could suppress Ox-LDL induced mice peritoneal macrophage proliferation. In mice peritoneal macrophage, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) phosphorylated AMPK α 1 in dose-dependent manners. Ox-LDL(20 μ g/ml) induced macrophage proliferation was significantly inhibited by AICAR, and restored by dominant-negative AMPK α 1, and expression of wild type-AMPK α 1 suppressed Ox-LDL-induced macrophage proliferation, suggesting that AMPK activation suppressed macrophage proliferation. AICAR partially suppressed Ox-LDL-induced ERK1/2 phosphorylation and GM-CSF expression. AICAR suppressed GM-CSF(10 pM)-induced macrophage proliferation without suppressing

p38 MAPK/Akt signaling. Therefore, it is suggested that another mechanism is also involved in the AICAR-mediated suppression of macrophage proliferation.

AICAR induced G1 arrest on GM-CSF induced macrophage proliferation. GM-CSF suppressed p53 phosphorylation and expression, and induced Retinoblastoma protein (Rb) phosphorylation, which is a regulator of cell cycle progression. Overexpression of p53 increased p21^{cip} expression, and suppressed GM-CSF-induced macrophage proliferation. Overexpression of p27^{kip} also suppressed macrophage proliferation. AICAR induced cell cycle arrest, increased p53 phosphorylation and expression, and suppressed GM-CSF-induced Rb phosphorylation via AMPK activation. Moreover, AICAR induced p21^{cip} and p27^{kip} expression via AMPK activation, and siRNA of p21^{cip} and p27^{kip} restored AICAR-mediated suppression of macrophage proliferation.

In conclusion, AMPK activation suppressed Ox-LDL-induced macrophage proliferation by suppressing GM-CSF expression and inducing cell cycle arrest via p21^{cip} (p53 dependent) and p27^{kip} (p53 independent) expression. These effects of AMPK activation may represent therapeutic targets for atherosclerosis.

2. 発表論文リスト

1. Ishii N, Matsumura T, Kinoshita H, Motoshima H, Kojima K, Tsutsumi A, Kawasaki S, Yano M, Senokuchi T, Asano T, Nishikawa T, Araki E. Activation of AMP-activated protein kinase suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem*. 284:34561-9, 2009
2. Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, Araki E. Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 379:806-11, 2009.
3. Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H, Murata Y, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Itabe H, Takeya M, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *J Biol Chem*. 283:9852-62, 2008.
4. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res*. 100:1442-51, 2007.
5. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Motoshima H, Taguchi T, Matsuo T, Sonoda K, Kukidome D, Sakai M, Kawada T, Nishikawa T, Araki E. Troglitazone inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation: impact of the suppression of nuclear translocation of ERK1/2. *Atherosclerosis*. 191:22-32, 2007.
6. Takahashi T, Ishii N, Itai K, Goto R, Higashi K, Kobori S. HMG-CoA reductase inhibitors suppress the development and progression of carotid artery intimal-medial thickening in hypercholesterolemic type 2 diabetic patients. *J Atheroscler Thromb*. 12:149-53, 2005.

3. 謝辞

本研究は熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻代謝内科学分野で、荒木栄一教授による御指導の下に行いました。研究について多面にわたり御指導を頂き、深く感謝致します。

本研究の施行にあたり、熊本大学大学院医学薬学研究部代謝内科学特任助教松村剛博士には、論文作成及び日頃の研究の中で貴重な御指導、御助言を頂きました。

本研究の施行にあたり、熊本大学大学院医学薬学研究部代謝内科学講師 西川武志博士、熊本大学医学部附属病院代謝・内分泌内科医員 本島寛之博士、熊本大学大学院医学薬学研究部病態生化学助教 瀬ノ口隆文博士には、実験の細部に至るまでの御指導、御助言を頂きました。

さらに熊本大学大学院医学薬学研究部臨床検査技師 一ノ瀬賢司氏にも、御助言を頂きました。

最後に、熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻代謝内科学分野研究室の皆様には日頃から御助言、御協力を頂きました。

皆様に心より感謝致します。

4. 略語一覽

ACC; acetyl Co-A carboxylase

AICAR; 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside

AMDA; 5'-amino-5'-deoxyadenosine

AMP; adenosine 5'-monophosphate

AMPK; AMP-activated protein kinase

AMPKK; AMP-activated protein kinase kinase

ASC; association with the Snf1 kinase complex

ATM; ataxia telangiectasia-mutated

ATR; ATM and Rad3-related

ATP; adenosine 5'-triphosphate

BSA, bovine serum albumin

CBS; cystathione β -synthase

cDNA, complementary deoxyribonucleic acid

CDK; cyclin dependent kinase

CDKI; cyclin dependent kinase inhibitor

Chk2; checkpoint kinase 2

CPT-1; carnitine palmitoyl transferase

DAG, diacylglycerol

DMEM; dulbecco's modified Eagle's medium

DNA; deoxyribonucleic acid
DMSO, dimethyl sulfoxide

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

ER, endoplasmic reticulum

ERK1/2, extracellular-signal regulated kinase 1/2

FCS, fetal calf serum

G protein, guanosine tri phosphate (GTP) binding protein

G6Pase; glucose-6-phosphatase

GFP; green fluorescent protein

GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

HASMC; human aortic smooth muscle cell

HDL, high-density lipoprotein

HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1

IL, interleukin

INK4; inhibitor of cyclin-dependent kinase 4

IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate

JNK/SAPKs, Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases

LDL, low density lipoprotein

LPS, Lipopolysaccharide

Lyso-PC, lysophosphatidylcholine

MAPK, mitogen-activated protein kinase

M-CSF, macrophage colony-stimulating factor

MCP-1, monocyte chemotactic protein 1

MEK, MAP kinase-ERK kinase

NAC, N-acetylcysteine

NF- κ B, nuclear factor κ B

NMPG, *N*- (2-mercapto-procynyl) -glycine
mRNA; messenger RNA (ribonucleic acid)
Ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein
PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1
PBS, phosphate-buffered saline
PC, phosphatidylcholine
PCNA, proliferating cell nuclear antigen
PDGF, platelet derived growth factor
PEPCK; phosphoenolpyruvate carboxykinase
PI-3K, phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC, protein kinase C
PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride
PTX, pertussis toxin
Rb; retinoblastoma protein
ROS, reactive oxygen specie
RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS, Sodium dodecyl sulfate
siRNA; small interfering RNA
SR, scabenger receptor
TNF, tumor necrosis factor
VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1
VSMCs, vascular smooth muscle cells
WHHL rabbit, Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit

5. 研究の背景と目的

本章では本研究の背景と目的について述べる。まず、5- (1) では粥状動脈硬化の形成及び進展過程を、5- (2) では粥状動脈硬化病変進行過程における酸化 LDL の役割について歴史的背景もふまえ述べる。5- (3) ではマクロファージやマクロファージ由来泡沫細胞の増殖機構についてこれまでの知見を述べ、5- (4) では酸化 LDL によるマクロファージ増殖の機序について、当教室からこれまでに報告した詳細を述べる。5- (5) では AMPK の構造とその機能を、5- (6) では細胞周期の制御について述べる。最後に 5- (1) ~ (6) をふまえて 5- (7) では本研究の目的について述べる。

5- (1) 粥状動脈硬化の進展過程

初期の粥状動脈硬化は、動脈内皮表面にごく小さな斑点状の脂肪沈着として認められる脂肪線条 (fatty streak) と呼ばれる病変である。脂肪線条は主としてコレステロールエステルを多量に蓄積したマクロファージ由来泡沫細胞の集簇であることが明らかにされている (Rosenfeld et al. 1990, Spagnoli et al. 1991)。病変の進行に従い、脂肪線条は繊維性硬斑 (fibrous plaque) に移行する。繊維性硬斑は肉眼的には血管内腔に突出する硬性の隆起病変として認められるが、組織細胞学的には平滑筋細胞、マクロファージ、Tリンパ球の浸潤及びそれらの細胞壊死像ならびに脂肪蓄積を結合組織が被覆した状態である。さらに病変が進むと結合組織がより増加し、石灰化や血栓の付着を伴う複合病変へと進展する。この様な粥状動脈硬化病変の発症、進展の機序については、Rossの提唱した傷害反応仮説 (Response to Injury Hypothesis) がある (Ross. 1999)。この仮説は、

まず何らかの刺激（紫外線、酸化ストレス、一酸化窒素、高血糖、高血圧、喫煙等）により内皮細胞に障害が生じ、それに対する反応として液性因子を介した応答が細胞間で繰り返され、結果として病変が進行するとしたものである。当初、血管内皮細胞に接着した血小板に重点がおかれていたが、現在単球及びリンパ球の関与を中心に考えられている。現時点では、以下のような過程を経て粥状動脈硬化症は発症、進展していくと考えられている（図1）。

- (1) 何らかの刺激による内皮細胞の血管恒常性維持機構の破綻と接着分子の発現
- (2) 単球、Tリンパ球の内皮細胞への接着及び内皮細胞下への侵入
- (3) リポ蛋白の内皮細胞下への浸潤及び酸化修飾などによる動脈硬化惹起性リポ蛋白への変化
- (4) 単球から分化・成熟したマクロファージの動脈硬化惹起性リポ蛋白による泡沫化
- (5) 泡沫細胞からの様々なサイトカイン放出
- (6) 中膜平滑筋細胞の内膜への遊走、内膜での増殖、及び泡沫化
- (7) 血管構成細胞による細胞間基質の産生と蓄積

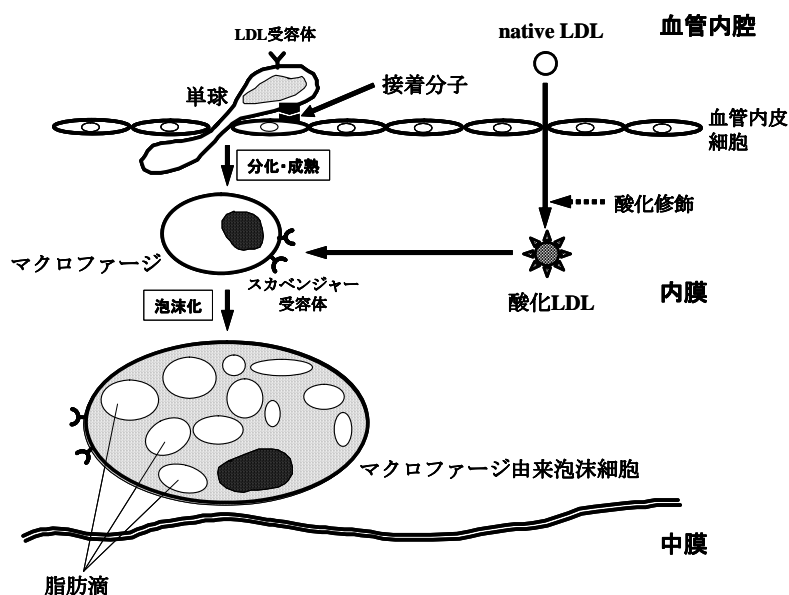


図1：動脈血管壁における泡沫細胞の形成機構

血中単球は、血管内皮細胞表面の接着分子を介し内細胞の間隙を抜けて内皮下へ侵入し分化・成熟してマクロファージになる。このときLDL受容体の消失とマクロファージスカベンジャー受容体の発現が認められる。また血中LDLも血管内皮細胞下へ移行すると内皮細胞などから産生されるフリーラジカル作用により酸化修飾を受け、酸化LDLへと変化する。マクロファージは、スカベンジャー受容体を介して酸化LDLを取り込みコレステロールエステルを多量に蓄積した泡沫細胞へ変換し、動脈硬化初期病変が形成される。

5- (2) 粥状動脈硬化病変形成における酸化LDLの役割

動脈硬化初期病変である脂肪線条 (fatty streak) の組織学的特徴は、細胞内に大量のコレステロールエステルを蓄積したマクロファージ由来泡沫細胞の集簇を認めることである。多くの疫学的研究により、血中LDLコレステロール高値と狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患の発症頻度が強い相関を示すことは明らかとなってきたが、LDL高値がいかなる機序で粥状動脈硬化の発症、進展に関与するかは、長い間不明であった。家族性高コレステロール血症はLDL受容体の遺伝的欠損であるが、それにも関わらず動脈壁にはコレステロールエステルを大量に蓄積したマクロファージ由来の泡沫細胞が認められることから、マクロファージはLDL受容体を介さない経路でコレステロールを取り込み、泡沫細胞となると考えられた。実際、静脈血から得られたLDLを単球/マクロファージに接触させるだけでは泡沫化は生じない。そこで、GoldsteinらはLDLが生体内

で何らかの修飾を受けることにより化学修飾LDLとなり、マクロファージに認識され取り込まれるという仮説をたて、マクロファージを泡沫化させるリポ蛋白質（動脈硬化惹起性リポ蛋白質）の検索を行った。以前よりマクロファージは陰性荷電を持つ粒子に対する高親和性結合部位の存在が考えられていた。LDLを無水酢酸と反応させてリジン残基の ϵ -アミノ基にアセチル基を選択的に導入したアセチルLDLは陰性荷電が増加することが判明し、またエンドサイトーシス型の受容体を介して迅速かつ活発に取り込まれ、マクロファージの泡沫化を来すことが発見された（Goldstein et al. 1979）。現在そのアセチルLDLに対するマクロファージの膜受容体はマクロファージスカベンジャー受容体と呼ばれ、細胞内コレステロールレベルによる発現調節を受けず活発にアセチルLDLを取り込むという特徴を有する。この受容体は、1990年にKodamaらにより構造が決定されている（Kodama et al. 1990）。この他にも現在までに構造の異なるスカベンジャー受容体が次々に明らかにされている。

さて、アセチルLDLはスカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれることにより実験的な泡沫細胞を形成させることはできるが、無水酢酸などの反応性の高いアセチル基の供与体が生体内に存在することは考えにくい。そのため、生体内で起こり得るLDLの化学修飾が検索された。そこでSteinbergらはLDLを血管内皮細胞と共培養し、そこで得られた化学修飾LDLは、マクロファージに取り込まれて泡沫化を起こす性質を持つことを発見した（Henriksen et al. 1981）。この化学修飾LDLは遷移金属イオンにより酸化された化学修飾LDLと同一のものであることが確認され、酸化LDLと命名された。生体の血液中には多量の抗酸化物質が存在し、また酸化LDLは肝臓において速やかに代謝されることから、LDLの酸化は血液中ではなく主に血管壁内において起こると考えられている。この過程においては血管構成細胞である血管内皮細胞、マクロフ

マクロファージ、あるいは平滑筋細胞などが関与する細胞依存性酸化反応と銅イオンや鉄イオンなどの遷移金属の作用による酸化修飾（化学的酸化反応）の二つの反応が関与していると考えられている。

動脈硬化巣における酸化 LDL の存在は免疫組織学的に証明されており（O'Brien et al. 1991）、現在では酸化 LDL が動脈硬化惹起性リポ蛋白質として動脈硬化病変の進展に中心的役割を果たしていると考えられている（Steinberg et al. 1989）。これまでに数多くの酸化 LDL の生理作用が報告されている。（1）マクロファージの泡沫化、（2）単球の血管内皮への遊走能増強（酸化 LDL 単独でも遊走因子として働き、また血管内皮細胞に対し monocyte chemotactic protein 1（MCP-1）の産生を誘導することにより単球の血管内皮下への遊走を促す。）、（3）マクロファージを病変部位へ留める作用、（4）内皮細胞における接着分子（intracellular adhesion molecule-1 : ICAM-1、vascular cell adhesion molecule-1 : VCAM-1）の発現亢進、（5）内皮細胞でのエンドセリン産生の増加による内皮細胞依存性血管弛緩作用の抑制効果、（6）内皮細胞からの plasminogen activator inhibitor-1（PAI-1）産生の増加による血栓形成の促進、（7）マクロファージの増殖作用、（8）platelet derived growth factor（PDGF）やその受容体を発現させることによる血管平滑筋細胞の遊走や増殖誘導などがあげられる。

なお、ここに示している以外にも様々な酸化 LDL の生理作用が報告されており、酸化 LDL は動脈硬化病変のあらゆる進展過程に深く関わっている。

5- (3) 動脈硬化病変におけるマクロファージの増殖

一般には、マクロファージは最終分化を遂げ増殖能を喪失した細胞であり、末梢組織に存在するマクロファージは骨髓幹細胞から分化した単球が組織に到達し、局所で分化すると考えられている。しかし Gordon らは、ヒトの冠動脈硬化病変において、マクロファージ特異抗体と proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する特異抗体を用いて二重染色を行うと、PCNA 陽性細胞の 27% がマクロファージであることを明らかにした (Gordon et al. 1990)。また Rosenfeld らは、Watanabe 遺伝性高脂血症 (WHHL) ウサギ及びコレステロール食負荷ウサギの大動脈病変部において、放射性チミジンを取り込んだ細胞の約 30 % がマクロファージ特異抗体に対して陽性反応を示すことを報告した (Rosenfeld et al. 1990)。また、正常マウスにおいても、肺や脾臓のマクロファージが増殖しているとの報告もある。これらの結果より、ある条件下で一部のマクロファージは増殖している可能性が考えられ、動脈硬化病巣に認められるマクロファージ由来泡沫細胞は、血中単球由来マクロファージだけでなく局所で増殖しているマクロファージによっても構成されている可能性が示唆される。

5- (4) 酸化 LDL によるマクロファージ増殖

当教室では熊本大学大学院医学薬学研究部病態生化学教室との共同研究により、これまでに *in vitro* の実験系において酸化 LDL がマクロファージ増殖能を有することを明らかにし、酸化 LDL によるマクロファージ増殖機序の解明を行ってきた。これまでに報告された酸化 LDL によるマクロファージ増殖機序について、以下に詳細を述べる (図 2)。

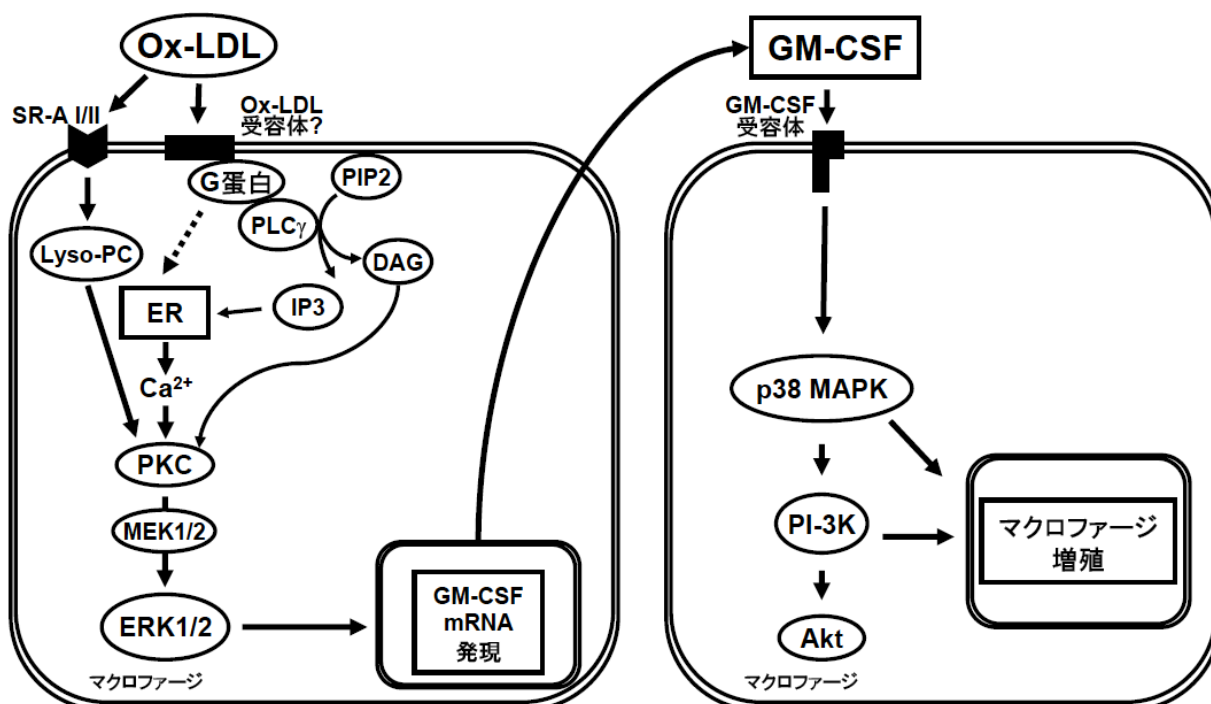


図 2: 酸化 LDL によるマウス腹腔マクロファージ増殖のメカニズム

酸化 LDL によるマクロファージ増殖のシグナル伝達経路に関しこれまでに当教室より報告した内容を略図に示す。(i) 酸化 LDL は百日咳毒素感受性 G 蛋白結合受容体のシグナルを介した小胞体からのカルシウム放出、及び細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導し、PKC の活性化を引き起こす (Matsumura et al. 1997)。スカベンジャー受容体 (SR-AI) を介し取り込まれた Lyso-PC は PKC の活性化を誘導し、マクロファージ増殖のシグナルに関与する。(ii) PKC の活性化により ERK1/2 は活性化が誘導される (Senokuchi et al. 2004)。(iii) PKC の活性化及び ERK1/2 活性化は GM-CSF の発現及び培養液中への GM-CSF 分泌を誘導する (Biwa et al. 1998, Senokuchi et al. 2004)。(iv) 分泌された GM-CSF は p38MAPK 活性化及び PI-3K の活性化を介しマクロファージの増殖を誘導する (Senokuchi et al. 2004, Biwa et al. 2000)。

(I) 酸化 LDL の組成とマクロファージ増殖

まず、Sakai らは酸化 LDL によるマクロファージ増殖の現象を *in vitro* の実験系で検討し、native LDL 刺激ではマクロファージの増殖作用を認めないが、酸化 LDL ではマクロファージに対し有意な増殖作用を認めることを示した (Sakai et al. 1994)。動脈硬化病巣に酸化 LDL が存在し、また酸化 LDL はマクロファージにおいてスカベンジャー受容体を介して取り込まれるという報告があることから、酸化 LDL が動脈硬化巣においてマクロファージ増殖因子として作用している可能性が考えられた。一方、酸化 LDL と同じくスカベンジャー受容体のリガンドであるアセチル LDL やマレイル化ウシアルブミン (マレイル BSA) には増殖能を認めなかったことから、酸化 LDL がスカベンジャー受容体に結合することによってマクロファージ増殖が誘導されるのではなく、LDL の酸化によって生じる酸化 LDL に特有な物質がマクロファージ増殖に重要な役割を果たしている可能性が考えられた (Sakai et al. 1996)。

ところで、高比重リポ蛋白質 (HDL) は様々な抗動脈硬化作用をもつことが知られている。Sakai らは HDL の同時添加で酸化 LDL によるマクロファージ増殖が 70% 抑制されることを示した。しかし、アポ AI 単独ではマクロファージ増殖に影響を示さないことから、HDL によるマクロファージ増殖抑制作用は細胞に対する HDL の直接作用ではなく、酸化 LDL との間の非特異的な脂質交換反応である可能性が示唆された。そこで試験管内において酸化 LDL と HDL を共培養後酸化 LDL を再分離して増殖能を検討したところ、酸化 LDL によるマクロファージ増殖は対照群の 35% に減弱していた。この時、酸化 LDL 中の総 phosphatidylcholine (PC) に占める lysophosphatidylcholine (lyso-PC) の比率は 50% から 20% と有意に減少しており、このことから lyso-PC が酸化 LDL によるマクロファージ増殖促進作用に関与している可能性が示唆された。さらにアセチ

ル LDL をホスホリパーゼ A₂ 処理で酸化 LDL 中 lyso-PC の割合を増加させて増殖能の検討を行ったところ、マクロファージの有意な増殖能が認められた。これらの結果から、マクロファージ増殖には酸化 LDL 中の lyso-PC が重要であることが示唆された (Sakai et al. 1994)。

(II) マクロファージ増殖におけるスカベンジャー受容体の役割

さらに、Sakaiらはマクロファージ増殖におけるスカベンジャー受容体の意義を明らかにするため、スカベンジャー受容体に結合する非リポ蛋白性リガンドであるマレイルBSAを用いて酸化LDLのマクロファージ増殖に対する効果を検討した。その結果、マレイルBSAの添加により酸化LDLによるマクロファージ増殖は約80%抑制を受けた。また放射性ヨードで標識した酸化LDLを用いたマクロファージにおける取り込みの検討では、マレイルBSAにより80%抑制されることを示した。さらに、酸化LDLを¹⁴C]lyso-PCで標識し、マクロファージへの移行を検討すると、酸化LDLからlyso-PCの移行はマレイルBSAにより40%抑制された。この移行量は、同様に¹⁴C]lyso-PCで標識したLDLからの移行量（受容体を介さない非特異的な脂質変換反応による移行量）とほぼ同程度であった。また、スカベンジャー受容体A-I/A-IIノックアウトマウス由来マクロファージの酸化LDLによる増殖は、野生型マウス由来マクロファージの約30%と有意に低いものであった。これらの結果から、スカベンジャー受容体を介する特異的なlyso-PCの取り込みが何らかの増殖シグナルを細胞内に送っている可能性が示唆された (Sakai et al. 1996)。

(Ⅲ) マクロファージ増殖におけるシグナル伝達機構

(i) マクロファージ増殖における細胞内カルシウムの役割

Matsumuraらは酸化LDLをマクロファージに刺激することにより、数分後を一過性の上昇を示す細胞内カルシウムの上昇が認められることを明らかにした。また細胞内カルシウムの上昇は、native LDLあるいは酸化LDLと同様にスカベンジャー受容体のリガンドであるアセチルLDLでは認めず、さらにこの酸化LDLによるカルシウムの上昇は、小胞体へのカルシウム流入を阻害し、小胞体内のカルシウムを枯渇させるthapsigarginの刺激により抑制されたが、カルシウムチャンネル阻害薬やEGTAでは抑制されなかった。以上より、酸化LDLによる細胞内カルシウム上昇は小胞体からのカルシウム放出によるものと考えられた(Matsumura et al. 1997)。

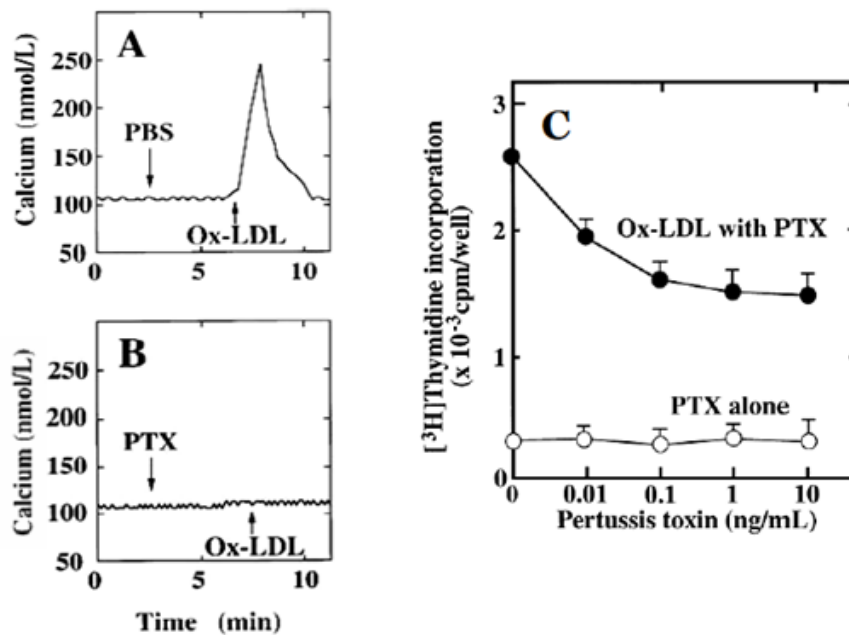


図 3 : マクロファージ増殖におけるカルシウムの関与

A:マクロファージに 50 μ g/ml の酸化 LDL (Ox-LDL) を添加し細胞内カルシウムを測定した。B:マクロファージを 10ng/ml の百日咳毒素(PTX)で前処置したのち、酸化 LDL を添加し細胞内カルシウムを測定した。C:マクロファージに酸化 LDL を添加しチミジン取り込みを測定した。この時同時に百日咳毒素(PTX)を添加してマクロファージ増殖における百日咳毒素の作用を検討した。酸化 LDL により誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇は(A)PTX の前処置により完全に抑制された(B)。PTX は酸化 LDL によるマクロファージ増殖を濃度依存的に抑制した(C)(Matsumura et al. 1997)。

一方Shackelfordらは、酸化LDLがマウスマクロファージにおいてホスホリパーゼCを活性化し、その結果phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂)の加水分解により生じるinositol-triphosphate (IP₃)を介して小胞体からのカルシウム放出を誘導することを報告した (Schackelford et al. 1995)。そこでMatsumuraらは百日咳毒素によるマクロファージ細胞内カルシウム濃度及び増殖に対する効果を検討したところ、百日咳毒素の前処置により、酸化LDLによるカルシウムの上昇は完全に抑制され、さらにマクロファージ増殖も有意に抑制されることを示した。これらの結果は小胞体由来カルシウムがマクロファージ増殖に関与することを示しており、また百日咳毒素感受性G蛋白と結合する酸化LDL受容体の存在をも示唆している (Matsumura et al. 1997) (図3)。

(ii) マクロファージ増殖におけるPKCの役割

さらにマクロファージに酸化LDLを刺激すると、10分をピークとする一過性のPKC活性の上昇を認め、またPKCの選択的阻害薬であるcalphostin CやH-7により酸化LDLによるマクロファージ増殖は有意に抑制されることが判明した (Matsumura et al. 1997) (図4)。このことから、酸化LDLによるマクロファージ増殖においてPKCの活性化が関与することが示唆された。一方、lyso-PCはPKCのカルシウム感受性を増加させることが知られており、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれた酸化LDL中のlyso-PCもPKCの活性化に関与するものと考えられた (Matsumura et al. 1997)。PKCは現在10種類以上のサブタイプが報告されているが、これまでのところマクロファージ増殖に関与するPKCサブタイプは明らかではない。

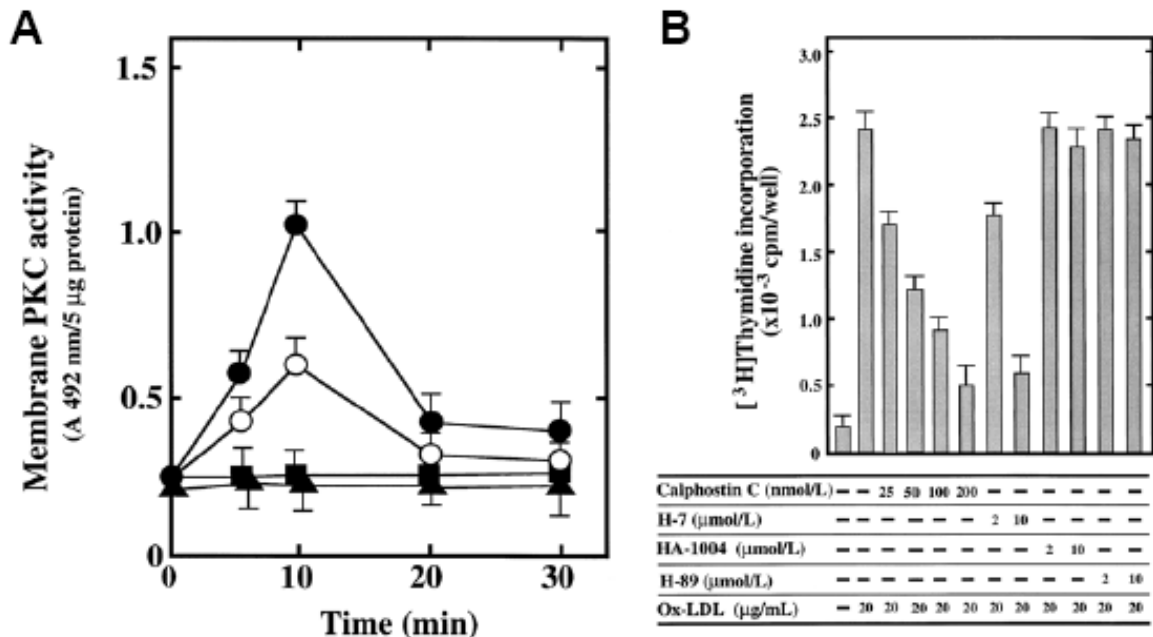


図4：マクロファージ増殖におけるPKCの関与

A: マクロファージにLDL (■)、アセチルLDL (▲)、PLA2処理アセチルLDL (○)、酸化LDL (●)を添加し、膜分画PKC活性を測定した。B: マクロファージに酸化LDLを添加しチミジン取り込みを測定した。このとき同時にcalphostin C、H-7 (PKC阻害薬)、HA-1004 (PKA+PKG阻害剤)、H-89 (PKA阻害剤)を添加して、マクロファージ増殖への効果を検討した。酸化LDL及びPLA2処理アセチルLDLの添加後10分をピークに一過性のPKC活性の上昇を認めた。LDL及びアセチルLDL添加ではPKC活性は上昇しなかった (A)。Calphostin C及びH-7は酸化LDLによるマクロファージ増殖を濃度依存的に抑制した (B) (Matsumura et al. 1997)。

(iii) マクロファージ増殖におけるGM-CSFの役割

Biwaらは酸化LDLによるマクロファージ増殖におけるサイトカインの関与について、マクロファージの増殖誘導能を持つ各種サイトカインの中和抗体を用いてマクロファージ増殖に対する効果を検討した。その結果、酸化LDLによるマクロファージ増殖はGM-CSFのモノクローナル抗体のみで有意に抑制され、macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)、Interleukin-3 (IL-3)、Interleukin-5 (IL-5)のモノクローナル抗体では抑制されなかったことが示された (図5)。

さらに酸化LDLはGM-CSF mRNA及び蛋白の発現を誘導し、M-CSF、IL-3及びIL-5は誘導しなかったことから、酸化LDLによるマクロファージ増殖にはM-CSF、IL-3、IL-5は関与せず、発現が誘導されるGM-CSFがautocrineあるいはparacrine的にマクロファージに作用し、マクロファージ増殖を誘導している可能性が示

唆された。また、酸化LDLによるGM-CSFの発現はcalphostin Cにより有意に抑制されることから、GM-CSFの発現にはPKCの活性化が関与していることが示唆された (Biwa et al. 1998)。

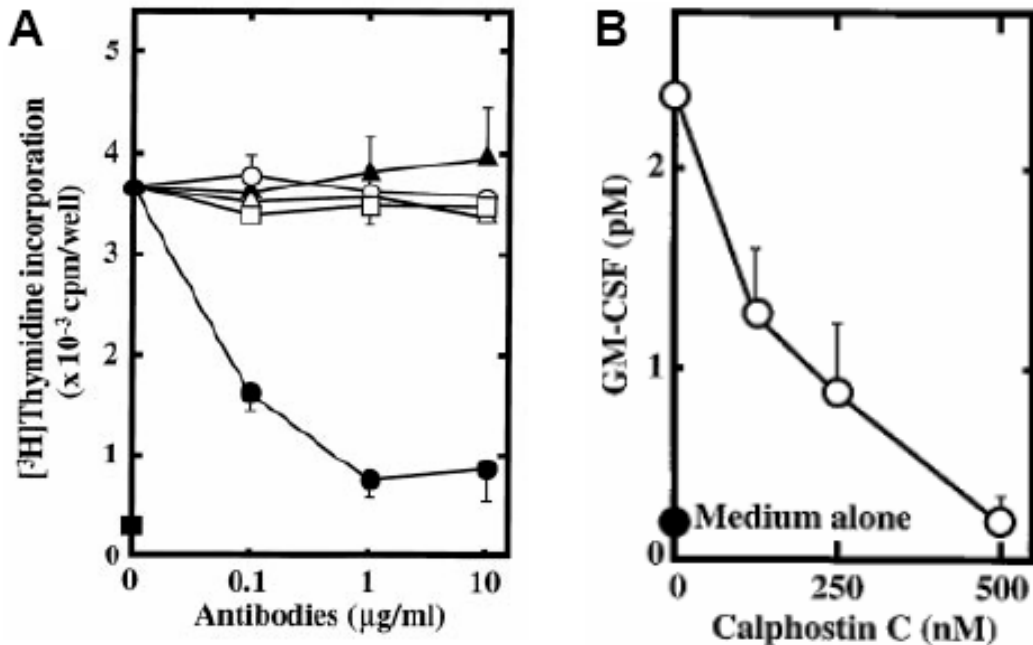


図5：酸化LDLによるマクロファージ増殖に対するサイトカイン、増殖因子の影響

A: マクロファージを抗GM-CSF抗体 (●)、抗M-CSF抗体 (○)、抗IL-3抗体 (□)、抗IL-5抗体 (△)、非特異的抗体(▲)で前処置したのち、酸化LDLを添加しチミジン取り込みを測定した。B: Calphostin C (PKC阻害剤) で前処置したのち、酸化LDLを添加しELISAにて測定した。抗GM-CSF抗体は酸化LDLによるマクロファージ増殖を濃度依存的に抑制した。抗M-CSF抗体、抗IL-3抗体、抗IL-5抗体はマクロファージ増殖を抑制しなかった (A) Calphostin Cの濃度依存的に酸化LDLによるGM-CSF産生を抑制した (B) (Biwa et al. 1998)。

近年、Martensらは酸化LDLによるマクロファージ増殖にphosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) が関与することが報告した (Martens et al. 1998)。そこで、Biwaらは酸化LDLによるGM-CSF発現及びマクロファージ増殖に対するPI-3K阻害薬 (wortmanninとLY294002) の効果を検討したところ、酸化LDLあるいはGM-CSFによるマクロファージ増殖は有意に抑制されたが、酸化LDLによるGM-CSF発現は影響されなかった。これらの結果から、PI-3KはGM-CSFの発現以降のシグナルに関与していると考えられた (Biwa et al. 2000)。

(iv) マクロファージ増殖におけるmitogen-activated protein kinase (MAPK) の役割

MAPKは、細胞外からのシグナルを核へと伝えるセリン/スレオニンキナーゼとして知られており、様々な刺激に反応し細胞増殖や分化、遺伝子発現などを調節する重要な役割を果たしていると考えられている (Inagaki et al. 1994)。これまで酸化LDLによりMAPKの活性化が誘導されることは報告されている

(Deigner et al. 1996, Kusahara et al. 1997)。そこでSenokuchiらは、酸化LDLによるマクロファージ増殖におけるMAPK活性化の関与を検討した。

酸化LDLの刺激により、extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 及びp38 MAPKは活性化し、MEK阻害剤であるPD98059及びU0126、p38 MAPK阻害剤であるSB203580及びSB202190は酸化LDLによるマクロファージ増殖を抑制した(図6)。またPD98059及びU0126は酸化LDLによるGM-CSF産生を阻害したが、SB203580及びSB202190は変化しなかった(図6)。またGM-CSFによるマクロファージ増殖をSB203580及びSB202190は阻害したが、PD98059及びU0126はむしろ増強した(図6)。これらの結果より、ERK1/2はGM-CSFより上流のシグナル、またp38 MAPKは下流のシグナルに関与することが示唆された (Senokuchi et al. 2004)。

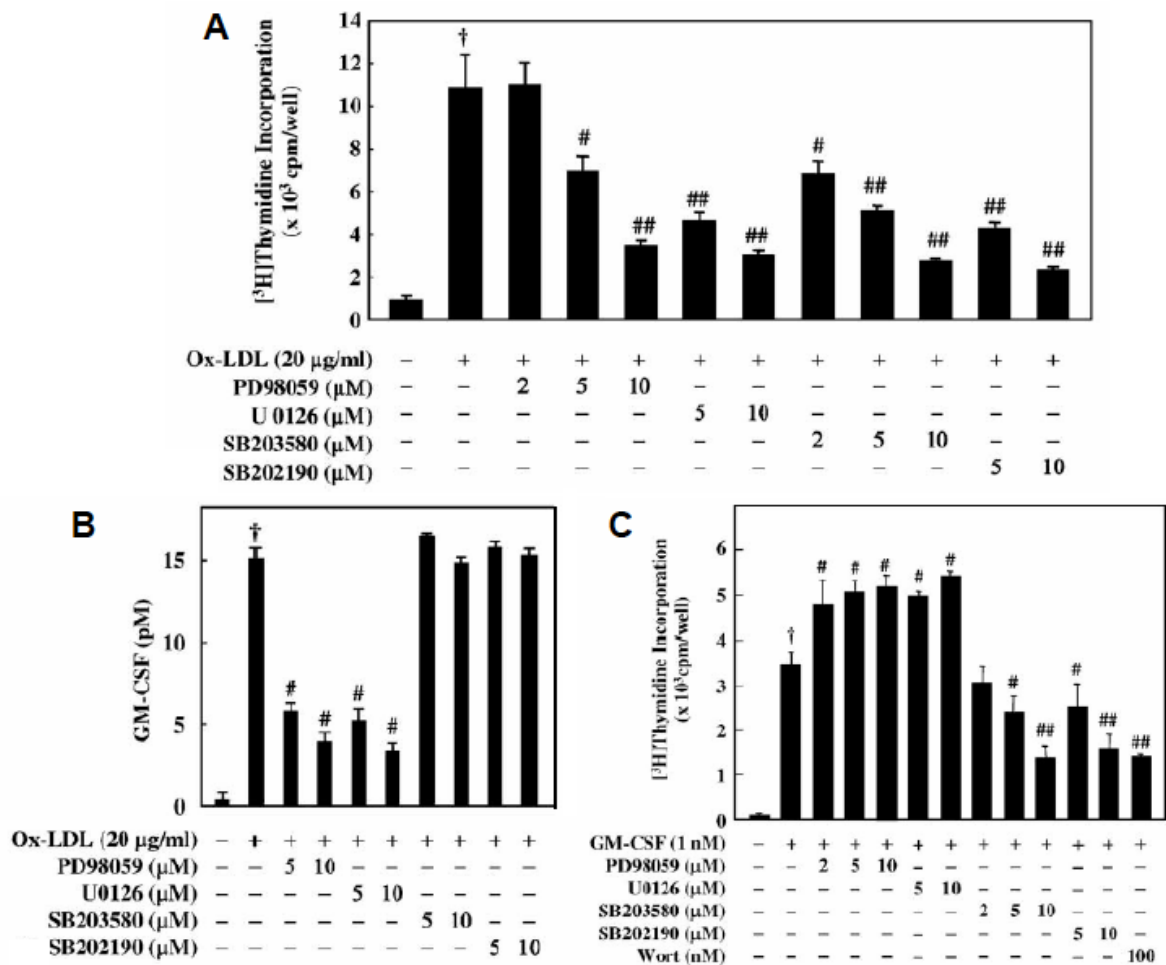


図6：酸化LDL及びGM-CSFによるマクロファージ増殖、またGM-CSF産生に対するMAPKの関与
A: マクロファージをMEK阻害剤 (PD98059、U0126)、p38 MAPK阻害剤 (SB203580、SB202190) で前処置したのち、酸化LDLを添加しチミジン取り込みを測定した。B: MEK阻害剤、p38 MAPK阻害剤で前処置したのち、酸化LDLを添加しGM-CSF発現をELISAにて測定した。C: MEK阻害剤、p38MAPK阻害剤で前処置したのち、GM-CSFを添加しチミジン取り込みを測定した。酸化LDLによるマクロファージ増殖はMEK阻害剤及びp38 MAPK阻害剤どちらも抑制された (A)。酸化LDLによるGM-CSFの産生はMEK阻害剤では抑制されたが、p38MAPK阻害剤では変化しなかった (B)。GM-CSFによるマクロファージ増殖はp38 MAPK阻害剤により抑制されたが、MEK阻害剤では増強した (C)。(Senokuchi et al. 2004)

(IV) GM-CSFの発現調節

次に、酸化LDLによるGM-CSF遺伝子転写調節機構を検討するため、種々の長さのGM-CSF遺伝子5'端上流を含むluciferase reporter plasmidを作成し、これらのplasmidをRAW264.7 cell（マウスマクロファージ系細胞株）にトランスフェクションし、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定した。非刺激状態において、5'端上流域の-97 bpまで欠失させることによりルシフェラーゼ活性は増加したが、更に-59 bpまで欠失させるとルシフェラーゼ活性は減少した。この結果から酸化LDL非刺激状態では-120 bpから-97 bpの領域が転写を負に、-97 bpから-59 bpの領域が転写を正に調節していることが示唆された。

次に酸化LDL刺激を行うと、非刺激状態と比較して-225bpではルシフェラーゼ活性が増加し、-97 bpではルシフェラーゼ活性が減少した。これらの結果よりGM-CSF遺伝子5'端上流の-225 bpから-120 bpまでの領域に酸化LDL刺激により転写を正に、-97 bpから-59 bpまでの領域に転写を負に調節する領域が存在することを明らかにした（図7）。さらに、GM-CSF遺伝子5'端上流の-169 bpから-160 bpの領域に存在するAP-2の結合推定領域に変異を加えたplasmid及び同領域を3回繰り返した配列を持つplasmidを用いた検討から、この領域が酸化LDL刺激による転写活性上昇に関与する可能性を示した（Matsumura et al. 1999）。

calphostin Cによる効果を検討し、酸化LDL刺激による転写活性の上昇及びAP-2結合領域への結合蛋白の増加を有意に抑制した。以上の結果から、酸化LDLによるマウスGM-CSF遺伝子発現増加にはAP-2結合領域が重要な役割を果たし、またその活性調節にはPKCが関与する可能性が示唆された (Matsumura et al. 1999)。

5- (5) AMP-activated protein kinase (AMPK) の構造と機能

(I) AMPK とは

AMPK は AMP によって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼで、運動に伴う骨格筋の収縮により ATP が AMP に分解された時に活性化される。AMPK の活性化は糖取込み、脂肪酸酸化を亢進させることで ATP 産生系を促進させ、消費したエネルギーを補填する。このように AMPK は、細胞内の代謝状態、エネルギー状態を感知してそのバランスを維持する方向に働く、「燃料センサー=fuel gauge」と考えることができる (Hardie et al. 2003, Carling et al. 2004, Kahn et al. 2005)。

(II) AMPK の構造

AMPK は α, β, γ の 3 つのサブユニットから構成されるヘテロ三量体であり、哺乳類 AMP キナーゼの各サブユニットには異なった遺伝子にコードされる 2~3 個のアイソフォーム ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$) が存在する。3 つのサブユニットのうち β サブユニットは α および γ サブユニットと結合する 2 つのドメイン、kinase interacting sequence (KIS) ドメイン、association with the Snf1 kinase complex (ASC) ドメインを有し、2 つのサブユニットの足場のような構造をとる (図 8)。 α サブユニットの N 端側に酵素活性を有するキナーゼドメインが存在し、その C 端側

は調節領域にあたり、AMP が存在しない状態では自己のキナーゼドメインを阻害するように働く。 γ サブユニットは cystathione β -synthase (CBS) と呼ばれるドメインを 4 つ繰り返す構造を有する。CBS ドメインの名前の由来である酵素 cystathione β -synthase 内の CBS ドメインは酵素のアロステリック活性化に関与することから、AMP キナーゼ γ サブユニットの CBS ドメインも同様の機序で AMP キナーゼ酵素活性化に関与していると推察される。すなわち AMP が γ サブユニットに結合することによって、 α サブユニットの立体構造の変化をもたらし、調節領域によるキナーゼ活性の自己阻害を解除するのではないかと考えられている (図 8)。

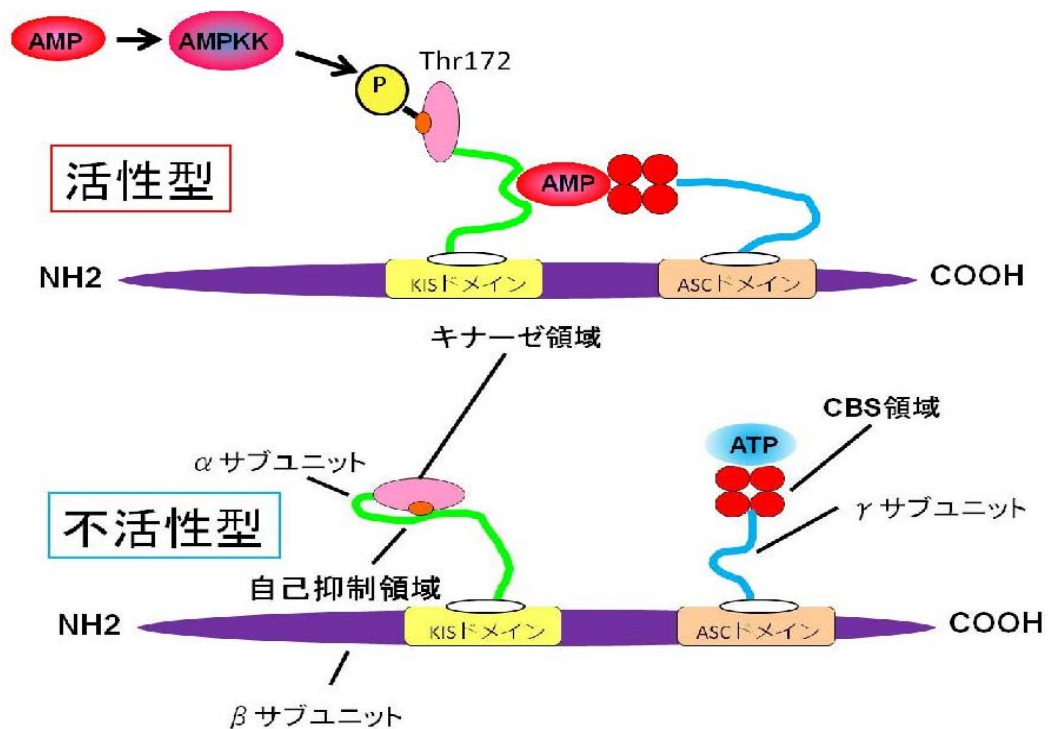


図 8 : AMPK の構造と活性化制御

β サブユニットは α と γ サブユニットと結合する2つのドメイン(KIS ドメイン、ASC ドメイン)を有し、2つのサブユニットの足場の様な構造をとる。 α サブユニットのNH₂末側に酵素活性を有するキナーゼドメインが存在し、AMPが γ サブユニットに結合することによって、 α サブユニットの立体構造の変化をもたらし、調節領域によるキナーゼ活性の自己阻害を解除するのではないかと考えられている。

kinase interacting sequence(KIS), association with the Snf1 kinase complex(ASC), cystathione β -synthase(CBS), AMPKK(AMPK kinase)

さらに AMP は、このアロステリック調節以外のメカニズムでも AMPK 活性を制御する。AMPK 活性は α サブユニットキナーゼドメイン上のスレオニン残基 (172 Thr) がリン酸化されることにより 50~100 倍に上昇するが、AMP は、①172 Thr をリン酸化する酵素 AMP-activated protein kinase kinase (AMPKK) を活性化すること、②AMPK に結合し AMPKK の作用を受けやすい構造に変化させること、③リン酸化した 172 Thr の脱リン酸化を阻害すること、により AMPK 活性を上昇させる。

(Ⅲ) AMPK の代謝調節作用

筋肉運動が骨格筋での糖の取込みと脂肪酸酸化を促進することは以前から知られているが、近年、AMPK 活性化が運動による糖取込みと脂肪酸酸化を調節していることが示唆されている。AMPK による脂肪酸の β 酸化への調節作用は、直接の下流分子である acetyl Co-A carboxylase (ACC) を介して発揮される。ACC はアセチル CoA をマロニル CoA へと変換する。マロニル CoA は、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に取込むミトコンドリア酵素 carnitine palmitoyl transferase (CPT-1) に対して強い阻害作用を有する。運動によって AMPK が活性化されると、ACC をリン酸化しこれを不活化する。その結果、マロニル CoA 量が減少し、CPT-1 活性が上昇、長鎖脂肪酸がミトコンドリア内に取込まれ、 β 酸化が亢進する (図 10)。また同時にインスリン非依存性に GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションを促進することによって糖取込みを促進する。

近年このような AMPK の代謝調節作用は運動だけでなく、ホルモンによっても制御されていることが明らかとなった。レプチン (Minokoshi et al. 2002) やアディポネクチン (Yamauchi et al. 2002) などのアディポサイトカインが、骨格筋や脂肪細胞で AMPK を活性化することにより、これらの組織における脂肪酸の

β 酸化、糖取込みを促進する。また、メトホルミンおよびアディポネクチンは、肝臓において AMPK を活性化し、その結果、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) や glucose-6-phosphatase (G6Pase) などの糖新生に関わる酵素の発現を抑制、また肝臓での脂肪合成を低下させる。さらに AMPK は膵 β 細胞のインスリン分泌 (Salt et al. 1998) や遺伝子発現 (da Silva Xavier et al. 2000) にも関与することが報告されている (図 9)。

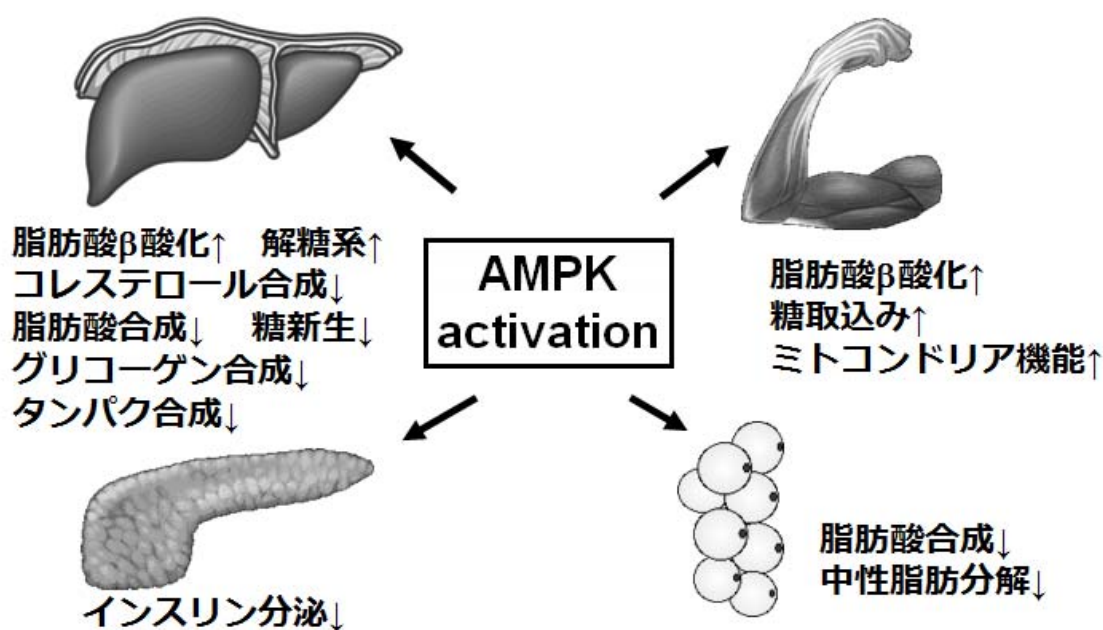


図 9：肝、骨格筋、脂肪組織、膵における AMPK の多彩な作用

AMPK の活性化は、肝臓では脂肪酸酸化促進・糖新生抑制・脂肪酸やコレステロール合成抑制、骨格筋では糖取込み・脂肪酸酸化促進、脂肪組織では脂肪酸合成、中性脂肪分解の抑制、膵β細胞ではインスリン分泌抑制などの作用が報告されています。このように各組織における AMPK 活性化は ATP 産生を促進し、ATP 消費を抑制する方向に作用している。

(IV) AMPK のアポトーシス誘導および抗アポトーシス作用

AMPK の活性化は、心筋虚血による傷害、アポトーシスからの保護作用

(Russell et al. 2004, Nishino et al. 2004) や、代謝ストレスによるアポトーシスからの保護作用がある (Blazquez et al. 2001, Ido et al. 2002) との報告がある。このことから AMPK は抗アポトーシス分子であることが示唆される。一方、薬物を用いた実験や AMPK を過剰発現させた実験で、AMPK 活性化は、抗増殖作用、

アポトーシス誘導作用をもつ可能性があり、ヒト胃癌細胞 (Saitoh et al. 2004)、肺癌細胞 (Li et al. 2003)、前立腺癌 (Xiang et al. 2004)、膵細胞 (Kefas et al. 2003)、肝癌細胞 (Meisse D et al. 2002) でアポトーシスを誘導し、マウス神経芽腫細胞では酸化ストレスによるアポトーシスを増大させるという報告がある (Jung et al. 2004)。このように AMPK の活性化はその細胞の種類に応じて、アポトーシス誘導、または抗アポトーシス作用という全く逆の作用を合せ持っている (Rattan R et al. 2005)。

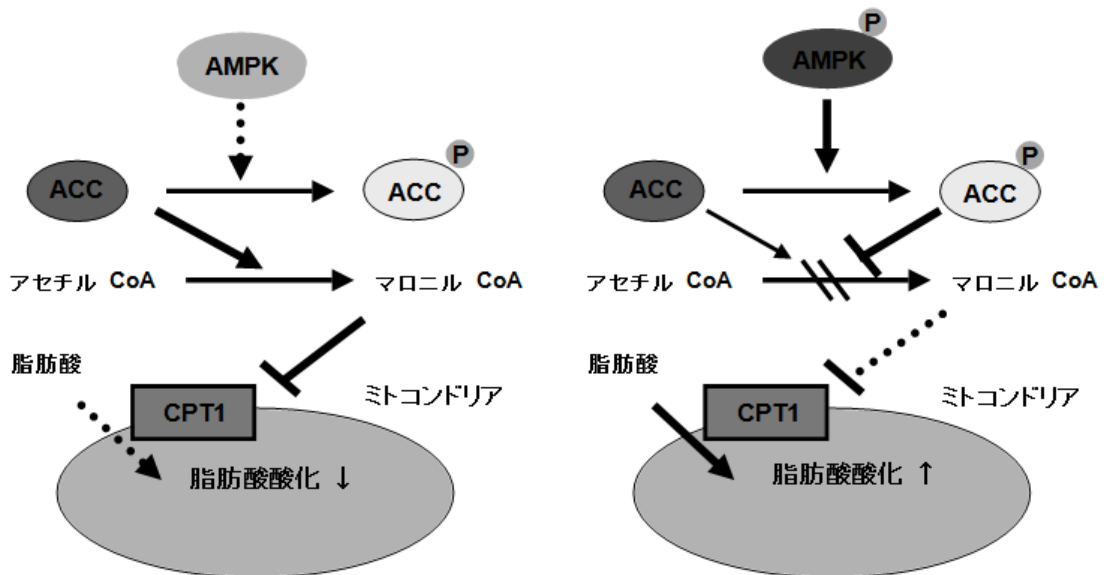


図 10 : AMPK 活性化は脂肪酸酸化を促進する

AMPK による脂肪酸β酸化亢進作用の機序を示す。ACC はアセチル CoA をマロニル CoA へと変換する。マロニル CoA は、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に取り込む CPT-1 に対して強い阻害作用を有する。AMPK が活性化すると ACC が不活性化され、マロニル CoA 量が減少し、CPT-1 の活性の抑制が解除され CPT-1 活性が上昇する。その結果、ミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の流入が促進され、脂肪酸を燃焼させるβ酸化が亢進する。

5- (6) 細胞周期の制御

(I) 細胞周期とは

細胞構成成分の増大と分裂、さらに娘細胞の成長と分裂と続くサイクルを「細胞周期」という。細胞周期は、細胞分裂の前に起こる核 DNA の合成期 (S 期) と、細胞分裂のプロセス、有糸分裂期 (M 期)、および M 期と S 期の間の G1 期、S 期と次の M 期との間の G2 期から構成されている (図 11)。細胞周期の進行は、通常は DNA の損傷など内的な要因と、増殖因子の有無など外的な要因によって厳密に制御されている。

(II) サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (CDK : cyclin dependent kinase) による細胞周期の制御

サイクリンは CDK と複合体を形成して細胞周期進行における CDK 活性を調節するタンパクである (Sherr et al. 1993)。現在までにサイクリンは 14 種類、CDK は 9 種類が知られている (表 1)。サイクリンの主要な役割は、CDK の標的タンパク質に選択的に結合・識別すること、及びその結合と分解を介して CDK 活性に周期性を与えることである。CDK 単独では活性がなく、サイクリンの結合によってはじめて CDK は活性化する。そしてユビキチン-プロテアソーム系を介したサイクリンの選択的分解によって CDK は活性を失う。活性化した CDK は転写調節、DNA 複製、中心体複製、染色体凝縮、微小管形成、細胞質分裂など、細胞周期制御に関わる種々のタンパク質をリン酸化し、細胞周期の継続的な進行を促す。動物細胞では、G1 期でサイクリン D-CDK4/6 複合体が、G1/S 期ではサイクリン E-CDK2 複合体が、S 期から M 期にかけてはサイクリン A とサイクリン B が重要な役割を果たすことが知られている (図 11)。

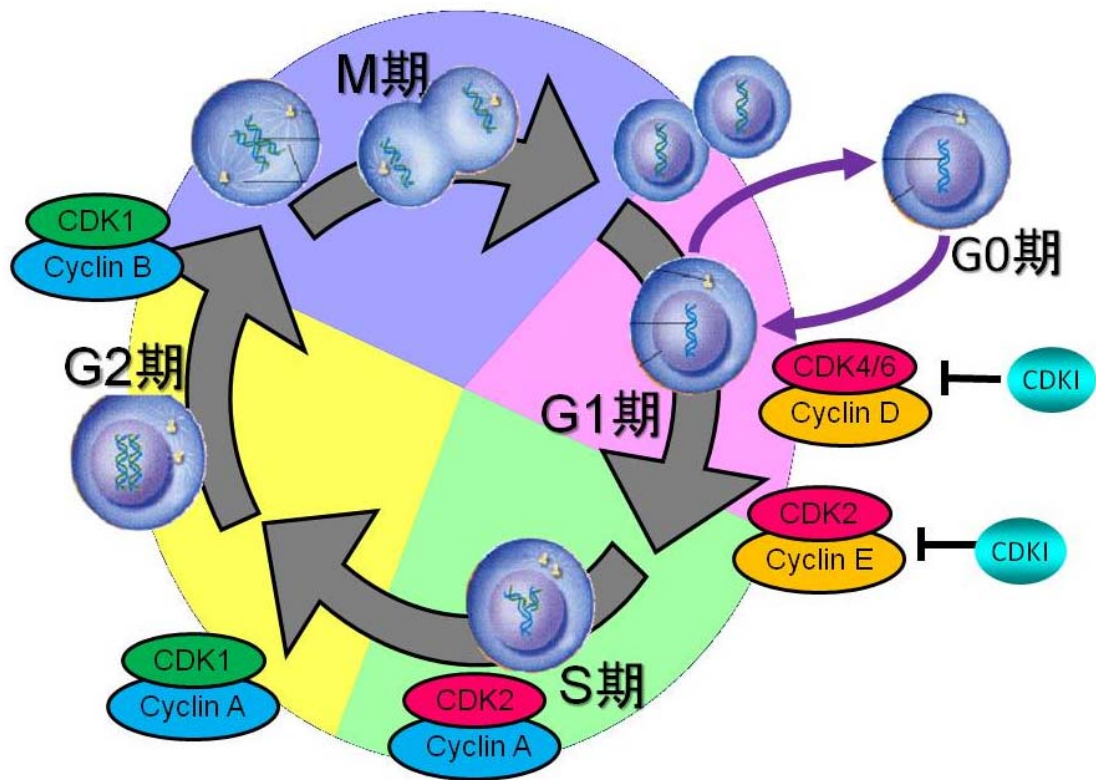


図 11 : サイクリンの周期的発現と細胞周期

細胞周期の進行は、多様なサイクリン依存性キナーゼ（CDK）とサイクリンおよび CDK インヒビター（CDKI）により制御されている。CDK が活性化されるためにはサイクリンとの結合が必要となる。細胞周期の各時期でそれぞれ異なるサイクリン-CDK 複合体がはたらく。それに対し、CDKI は、DNA 損傷や DNA 複製や紡錘体形成などが不完全な場合に細胞周期の進行を抑制するという、異常対応型の負のフィードバック機構として存在する。これら各種分子の発現が周期的に変化することによって細胞周期進行が制御されている。

（Ⅲ） CDK インヒビター

哺乳類における CDK インヒビター（CDKI）は現在までに 7 種類知られており、その構造と標的となる CDK によって 2 つのファミリーに分類されている。第 1 のグループは inhibitors of CDK4 (INK4) ファミリーであり、p16, p15, p18, p19 の 4 つが含まれ、これらは CDK4/6 とサイクリン D に競合的に結合し、その活性を阻害する。第 2 のグループは Cip/Kip ファミリーで、p21^{cip}, p27^{kip}, p57 の 3 種からなる。これらはいずれも CDK 阻害ドメインと呼ばれる共通した構造を持

ち、このドメインでサイクリン-CDK 複合体に結合する。このグループは全種類の CDK を *in vitro* では阻害するが、*in vivo* では主に CDK2 複合体に作用し、CDK4 に対しては複合体の安定性に寄与していると考えられている。この 7 種の蛋白は、いずれも過剰発現させると G1 期で細胞周期を停止させ、Rb のリン酸化を阻害するが、生物学的には重複する機能と固有の機能とが徐々に明らかになってきている。最近では CDKI の発現調節機構が注目されるようになり、p21^{cip} の転写調節では p53 ばかりでなく様々な分化誘導因子の関与が、p27^{kip} の分解にはリン酸化とそれを引き金とするユビキチン化の機構が明らかとなった。

サイクリン	CDK	機能、特徴
サイクリン A	CDK2, Cdc2	細胞周期 (S-M 期) : S 期開始 (DNA 複製、中心体複製)、再 S 期抑制 (E2F 転写抑制、DNA 複製開始抑制)、M 期開始、生殖細胞で発現
サイクリン B	Cdc2	細胞周期 (M 期) : M 期開始 (MPF)、ゴルジ体/ER 局在
サイクリン C	CDK8	転写 : Pol II/CTD キナーゼ
サイクリン D	CDK4, 6	細胞周期 (G1 期) : 増殖刺激で誘導、RB/E2F 解離
サイクリン E	CDK2, 3	細胞周期 (G1-S 期) : S 期開始 (DNA 複製開始、中心体複製)、RB/E2F 活性化
サイクリン F	-	細胞周期 (S-G2 期) : F-box タンパク質
サイクリン G	(CDK5)	p53 で誘導、GAK キナーゼと結合
サイクリン H	CDK7	細胞周期 : CAK、転写 : Pol II/CTD キナーゼ
サイクリン I	-	サイクリン G 類似
サイクリン J	(CDK2)	初期胚 (ハエ卵割)
サイクリン K	CDK6 CDK9	ウイルス、サイクリン D 類似 転写 : CTD キナーゼ
サイクリン M	CDK2	ウイルス、サイクリン D 類似
サイクリン T	CDK9	転写 : (転写因子 TAT 結合) サイクリン C 類似
サイクリン V	CDK6	ウイルス、サイクリン D 類似

表 1 サイクリンの種類と特徴

(IV) Rb (Retinoblastoma protein)

Rb 遺伝子は 1986 年に網膜芽細胞腫の原因遺伝子として同定された。1989 年に、CDK によって Rb は細胞周期特異的リン酸化を受けて増殖抑制能を失うらしいことが示され、1991 年には、転写因子 E2F が Rb と結合することによってその活性を抑えられることが発見され、Rb がもつ増殖抑制能の分子の実体が明らかとなりつつある。

Rb タンパク質は細胞の S 期への進行に重要な転写因子 E2F と複合体を形成し、その活性を抑えることで細胞を静止状態にとどめる (Nevins et al. 1997, Weinberg et al. 1995)。増殖刺激が入ると、サイクリン D-CDK4/6、続いてサイクリン E-CDK2 が活性化し、Rb をリン酸化する。リン酸化された Rb は E2F より解離し、活性型となった E2F は細胞を S 期へと進行させる (図 12)。これが現在まで考えられてきた通常モデルであるが、近年 p107、p130 といった Rb ファミリー分子の存在が明らかになり、これらの分子間の機能相補といった相互関係も注目されている (Classon et al. 2000, Sage et al. 2000)。また 2004 年には、サイクリン C と CDK3 が、新規のサイクリン-CDK 複合体として同定され、G0-G1 移行期の最初期に Rb をリン酸化していることが報告された (Ren et al. 2004)。

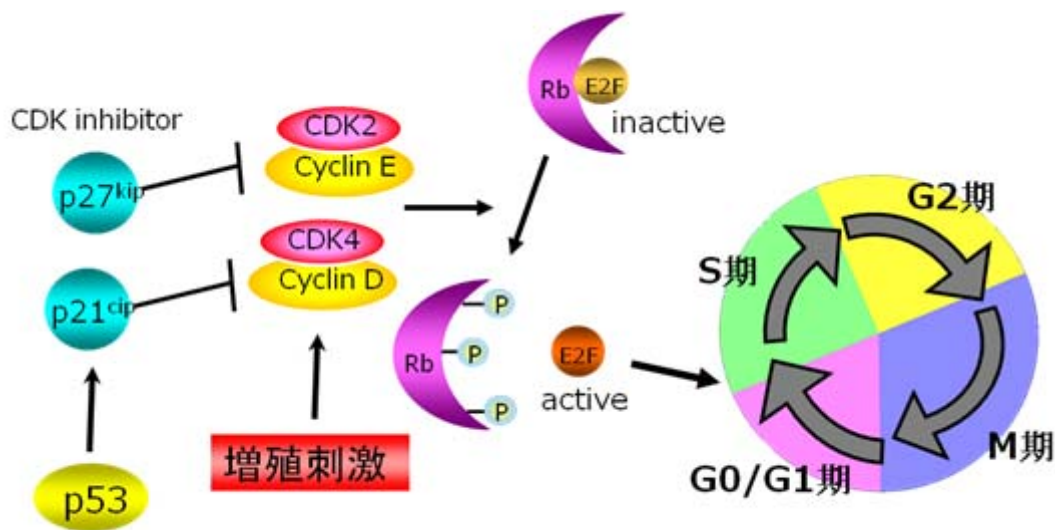


図 12 : CDKI による細胞周期の制御

CDK インヒビターは、サイクリン-CDK 複合体活性を阻害することで、Rb タンパクのリン酸化を抑制する。転写因子 E2F は活性化されると、細胞増殖に必要なさまざまな遺伝子の発現を誘導するが、リン酸化されない Rb タンパクは転写因子 E2F を不活性な状態で保ち、細胞周期の進行を抑制する。

(V) p53

ヒトにおける癌で高頻度に変異が認められる癌抑制遺伝子 p53 は、標的遺伝子の DNA 配列特異的に結合しその転写活性を制御する転写因子であり、複数の標的遺伝子の発現制御を通してその生理機能を発揮する。通常、細胞内に存在する p53 の量はごく微量であるが、 γ 線や紫外線、アドリアマイシンなどの抗癌剤のように細胞の DNA に傷害を与えるようなものを作用させると安定化されて核内に蓄積し、転写因子として活性化される。そして G1 期停止またはアポトーシスを誘導する (Shieh et al. 1997, Canman et al.1998)。安定化・活性化される前の p53 には、murine double minute 2 (MDM2) が結合して p53 の分解を促進するといわれている。inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a (INK4a) 遺伝子領域にコードされている p19^{ARF} は、MDM2 に結合してその活性を阻害する。よって p19^{ARF} は p53 の活性を上昇させて増殖抑制能を発揮させることになる (図 13)。

一方、DNA に損傷が生じた後、p53 の安定化、活性化が起きるまでの経路に

は ataxia telangiectasia-mutated (ATM) ファミリーの関与が知られている。γ線や様々な抗癌剤などで DNA に傷害が起こったときには ATM キナーゼが活性化されて、p53 の Ser15 を直接リン酸化する。また ATM キナーゼは checkpoint kinase 2 (Chk2) をリン酸化して活性化させ、これは p53 の Ser20 をリン酸化する。Ser15 と Ser20 のリン酸化は両方とも、p53 が MDM2 から解離して安定化するために必要といわれている。紫外線で DNA が傷害された場合には、ATM ではなくそのファミリーである ATM and Rad3-related (ATR) が活性化されて、ATM と同様に p53 のリン酸化、活性化を起こす。

p53 はある場合には G1 期停止を誘導するが、別の場合にはアポトーシスを誘導する。この二つの経路がどのようにして選択されるか長く不明であったが、最近 p53 の Ser46 がアポトーシス誘導を制御するということがわかった。DNA に傷害が起こった際、まず Ser15 や Ser20 のリン酸化が起きて p53 は安定化、活性化され、p21 のような G1 期停止を誘導する遺伝子 (Hunter et al. 1994)、あるいはリボヌクレオチドリダクターゼの構成成分をコードしている p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 homolog (p53R2) 遺伝子のような DNA 修復に関係する遺伝子のプロモーターに結合してそれらの発現を誘導する。しかし、重度の DNA 損傷が起こり、G1 期停止や DNA 修復が不可能になると Ser46 がリン酸化され、p53-regulated apoptosis-inducing protein 1 (p53AIP1) 遺伝子のプロモーターへのアフィニティーが高まり、p53AIP1 が発現して細胞はアポトーシスを起こす (図 13)。

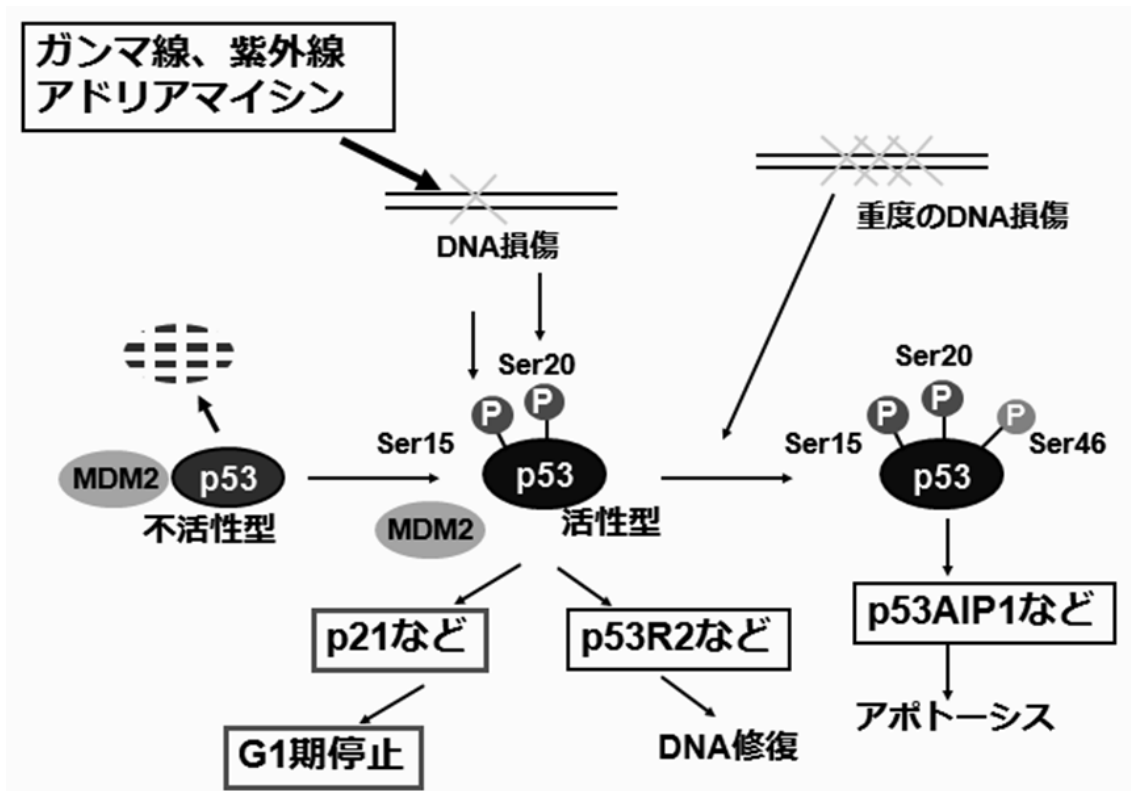


図 13 : p53 ターゲット遺伝子選択のモデル

p53 は、標的遺伝子の DNA 配列特異的に結合しその転写活性を制御する転写因子であり、複数の標的遺伝子の発現制御を通してその生理機能を発揮する。安定化・活性化される前の p53 には、murine double minute 2 (MDM2) というタンパクと結合していて p53 の分解を促進している。DNA に傷害が起こった際、まず Ser15 や Ser20 のリン酸化が起きて p53 は安定化、活性化され、p21 のような G1 期停止を誘導する遺伝子、あるいはリボヌクレオチドリダクターゼの構成成分をコードしている p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 homolog (p53R2) 遺伝子のような DNA 修復に関する遺伝子のプロモーターに結合してそれらの発現を誘導する。しかし、損傷が重度で、G1 期停止や DNA 修復が不可能な場合、Ser46 がリン酸化され、p53-regulated apoptosis-inducing protein 1 (p53AIP1) 遺伝子のプロモーターへのアフィニティーが高まり、p53AIP1 が発現され細胞はアポトーシスを起こす。

5- (7) 本研究の目的

前述のように、これまで当教室では動脈硬化初期病変における酸化LDLによるマクロファージ増殖の機序を明らかにしてきた。また、AMPKは、骨格筋では糖取込み促進や脂肪酸酸化亢進、肝臓では糖新生抑制、脂肪酸酸化亢進やコレステロール・脂肪合成抑制、脂肪組織では脂肪合成・脂肪分解抑制、といった多彩な作用を持ち、糖・脂質代謝調節において重要な分子であることが広く認識されている (図9)。しかし血管組織、特にマクロファージにおけるAMPKの役割はまだあまり知られていない。

そこで本研究では、AMPK 活性化がマクロファージ増殖を抑制するメカニズムの詳細を解明することを目的とした。

6. 材料と実験方法

6- (1) リポタンパクの精製

LDL ($d=1.019\sim 1.063$ g/ml) は、本研究に対し同意を得た正脂血症健常人より、空腹時に採血し得られた血漿から超遠心法を用いて調整した (Hakamata et al. 1994)。LDLは1 mM EDTA生理食塩水で透析し、4°Cで保存した。LDLはアガロースゲル電気泳動及びSDS-PAGEを用いて電気泳動度及びアポ蛋白組成を確認した。

6- (2) 酸化LDLの調整

LDLをPBSで0.1 mg/mlに希釈し、最終濃度5 μ Mの硫酸銅を加えた。37 °Cで20時間放置した後、最終濃度1 mMのEDTAを添加し、氷中で冷却した。濃縮の後、1 mM EDTA生理食塩水で透析し、4°Cで保存した。マウス腹腔常在マクロファージを使った本実験系において、エンドトキシンは1 ng/ml未満の濃度では細胞毒性はなく、増殖にも影響がないことを確認しており、本実験で使用した酸化LDL中のエンドトキシン濃度は1 pg/mg protein未満であった。

6- (3) 細胞培養

雄性 DDY マウス (6~8 週齢) をジエチルエーテル麻酔し頸動脈及び鎖骨下動脈を切断、流水下に失血死させた後、腹部を 70%エタノールで消毒し表皮を切開した。氷冷した PBS を 10 ml 注射器で腹腔内へ注入し、腹腔洗浄により腹腔

細胞を回収した。回収した細胞は 4°C で 1000 rpm、5 分間遠心して上清を吸引破棄後 RPMI 1640-10% FCS に再懸濁し、血球計算板を用いて細胞数を算定しプレートへ分配した。CO₂ 培養器 (37°C、5% CO₂) 内で 2 時間孵置した後、浮遊細胞を PBS で洗浄除去し、プレートに付着した腹腔マクロファージを実験に使用した。

溶液の組成 : RPMI 1640-10% FCS

RPMI 1640 (Gibco BRL 社)	10.4 g
NaHCO ₃	1.2 g
HEPES	2.38 g
ペニシリン	100,000 U
ストレプトマイシン	100 mg

以上を蒸留水に溶解し、pH 7.2 に滴定後、900 ml とし 100 ml のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum: FCS, INTERGEN 社) を加えフィルター滅菌し、細胞培養液として使用した。

6- (4) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入

Adenoviruses expressing LacZ (Ad-LacZ)、wild-type (WT) -AMPK α 1 (Ad-AMPK α 1)、dominant-negative-AMPK α 1 (Ad-DN-AMPK α 1)、WT-p53 (Ad-p53) のそれぞれの遺伝子を有する複製能の欠失したアデノウイルスを、感染多重度 (multiplicity of infection: MOI) を約 100 に調整し、1 穴あたり 2×10^6 個の腹腔マクロファージを付着させた 6 穴プレート (直径 34 mm) に感染させた (Deguchi et al. 1999, Ryu et al. 2002, Zhan et al. 2003)。2 時間の感染操作後、細胞培養液を交換し、48 時間培養ののち細胞を実験に用いた。Ad-DN-AMPK α 1

は、AMPK α サブユニットのスレオニン 172 をアラニンに変異させリン酸化されにくくした dominant negative-AMPK α 1(DN-AMPK α 1)を用いた。Ad-AMPK α 1 と Ad-DN-AMPK α 1 は Dr. Tomoichiro Asano (Department of Medical Chemistry, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University) より供与頂いた。Ad-p53 は、Dr. Shinji Ishikawa (Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University) より供与頂いた。

6- (5) プラスミド及び small interfering RNA (siRNA) の遺伝子導入

1 穴あたり 2×10^6 個の腹腔マクロファージを付着させた 6 穴プレート (直径 34 mm) に human p27kip (pcDNA3Flag-hp27) の発現プラスミドまたはコントロールとして LacZ (Ad-LacZ) 及び、p21^{cip} と p27^{kip} の siRNA またはコントロールとして無関係な 21 塩基の siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて遺伝子導入し、4 時間培養後、細胞培養液を交換し、24 時間培養ののち細胞を実験に用いた。

pcDNA3Flag-hp27 の発現プラスミドは Dr. Masaki Matsumoto (Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University) より供与頂いた。p21^{cip} と p27^{kip} の siRNA とコントロール siRNA は Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。

6- (6) マクロファージ増殖

(A) 放射性チミジン取り込み法

1 穴あたり 5×10^4 個の腹腔マクロファージを付着させた 24 穴プレート (直径 15.5 mm) に各種薬剤を添加し、1 ml の培養液で培養した。培養終了の 18 時間前に 20 μ l の 50 μ Ci/ml [3 H]thymidine を添加した。培養液吸引破棄後 1 ml の phosphate-buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し、0.5 ml の 0.5 M NaOH で培養細胞を融解し、氷上で 10 分間放置した。0.25 ml の 1 M HCl 及び 0.25 ml の 40% trichloroacetic acid (TCA) を加え、20 分間氷上に放置し沈殿させた。不溶性の沈殿物をフィルター (PVDF filter; 0.45 μ m in pore size) で回収し、1 ml の 99.5% エタノールで 3 回洗い、乾燥の後 liquid scintillation spectrophotometer で放射活性を測定した。

(B) 細胞数算定法

1 穴あたり 5×10^4 個の腹腔マクロファージを付着させた 24 穴プレート (直径 15.5 mm) に各種薬剤を添加し、1 ml の培養液で培養した。1% (w/v) Triton X-100 で細胞を融解し、naphthol blue-black 染色陽性核を hemocytometer にて算定した。

6- (7) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いたアポトーシスの解析

Cell Death Detection ELISA plus キット (Roche 社) を使用した。細胞質分画におけるモノおよびオリゴヌクレオソームを定量する方法である。1 穴あたり 5×10^4 個の腹腔マクロファージを付着させた 24 穴プレート (直径 15.5 mm) に各

種薬剤を添加し、1 ml の培養液で培養した。24 時間後にプレートを遠心し、細胞溶解液上清をストレプトアビジンでコートしたマイクロプレートのウェルに移し、ビオチン標識抗ヒストン抗体及び Peroxidase 標識抗 DNA 抗体も加えインキュベート。その後 Peroxidase 基質を加え吸光度を測定した。

6- (8) フローサイトメトリーによるアポトーシス及び細胞周期の解析

1 穴あたり 2×10^6 個の腹腔マクロファージを付着させた 6 穴プレート（直径 34 mm）に各種刺激を行い、2 ml の培養液で培養した。培養後トリプシンで細胞を剥離し、PBS で遠心洗浄し回収。1 mL PBS/0.2% Triton X/0.02% RNase 溶液でペレットを溶解し、37°C、1 時間インキュベート。Propidium Iodide 溶液を最終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え 4°C 30 分暗所に置いた後、60 mm ナイロンメッシュを通し、フローサイトメトリー装置 fluorescent activated cell sorter (FACS calibur、BD biosciences 社) にて細胞あたりの DNA 量とその細胞数を測定し、Cell QuestTM software (BD biosciences 社) で細胞の細胞周期とアポトーシス細胞の分布を解析した。

6- (9) ELISA 法を用いた GM-CSF 蛋白の定量

1 穴あたり 2×10^6 個の細胞を付着させた 6 穴プレート（直径 34 mm）に各種薬剤を添加し、2 ml の培養液で培養した。4 時間培養後 300 μl の培養液を回収し、マウス GM-CSF 特異的 ELISA キット (Amersham Biosciences Corp 社) を用い、培養液中の GM-CSF 蛋白質濃度を測定した。

6- (10) GM-CSF mRNA発現の検討

(A) RNA の抽出

1 穴あたり 2×10^6 個の細胞を付着させた 6 穴プレート (直径 34 mm) に各種薬剤を添加し、2 ml の培養液で培養した。4°C に冷やした PBS (phosphate-buffered saline) で洗浄した後、1 ml の TRIzol 試薬 (Invitrogen 社) を加え、細胞をスクレイパーにてプレートより剥離し、1.5 ml チューブに移した。室温にて 5 分間静置後、クロロホルムを 200 μ l 加え、30 秒間よく攪拌し、さらに 2 分間室温に静置。次に、15,000 回転、4°C で 15 分間遠心し、上清 400 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移した。400 μ l のイソプロパノールを加え、室温にて 10 分間静置後、15,000 回転、4°C で 10 分間遠心した。上清を取り除き、1 ml の 70%エタノールを加え、軽く攪拌した後、15,000 回転、4°C で 5 分間遠心した。上清を取り除き、ペレットを軽く空乾した後、RNA 分解酵素を含まない水に溶解し、分光測光法で濃度を測定した。1 μ g の total RNA から ReverTraAce-alpha (TOYOBO 社) を用いて first strand cDNA を合成した。

(B) real-time RT-PCR 法による GM-CSF mRNA 発現量の定量

以下に示すプライマー及び条件で、Light Cycler システム SYBER Green I (Roche Molecular Biochemicals 社) を使用し、GM-CSF の発現量を定量した (Bendriss-Vermare et al. 2001)。

<PCRプライマー>

GM-CSF:

forward primer, 5'-TGTGGTCTACAGCCTCTCAGCAC-3'

(64 to 86 of murine GM-CSF coding sequence)

reverse primer, 5'-CAAAGGGGATATCAGTCAGAAAGGT-3'

(407 to 431 of murine GM-CSF coding sequence)

β -actin:

forward primer, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'

(25 to 45 of murine β -actin coding sequence)

reverse primer, 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC-3'

(541 to 564 of murine β -actin coding sequence)

<条件>

Annealing 55°C、denature 95°C、enlongation 72°C 40 cycles

内部コントロールとして β -actinを同様の方法で定量し、GM-CSF mRNA 発現量を補正した。Light Cycler ソフトウェアによって得られたデータを解析し、それぞれの mRNA 濃度を定量した。最後の増幅サイクルの後、PCR 産物の特異性を評価するために Melting curve 分析を実行した。

6- (11) ウェスタンブロット法による蛋白質リン酸化及び蛋白質発現の検討

(A) 蛋白精製

1 穴あたり 2×10^6 個の細胞を付着させた 6 穴プレート (直径 34 mm) に各種薬剤を添加し 2 ml の培養液で培養した。4°C に冷やした PBS で洗浄した後、300 μ l の蛋白抽出用溶液を加え、細胞をスクレイパーにてプレートより剥離し、1.5 ml チューブに移した。4°C、20,000 回転、10 分間の遠心分離を施行し、上清を試料として使用した。蛋白抽出液は Coomassie brilliant blue (CBB) G250 を用いた Bradford 色素結合法 (Bio-Rad 社) にて、吸光度計で蛋白濃度を測定した。蛋白抽出用溶液の組成を下記に示す。

< 蛋白抽出用溶液 >

30 mM Tris (pH 7.4)

150 mM NaCl

10 mM EDTA

1 mM Na₃VO₄

20 mM Na₄P₂O₇

50 mM NaF

1% NP-40

1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

10 µg/ml aprotinin

1 µM leupeptin

(B) ウェスタンブロット法

精製した各蛋白を50 µgずつ分注し、試料溶解用溶液を加え95 °C 5分間煮沸し sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE終了後、セミドライ転写器を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell社) に電氣的に転写した。目的とする蛋白の検出方法はChemiluminescence Western Blottingキット (BOEHRINGER MANNHEIM社) に付属の使用法に従い行った。まず、ブロッキング液中で膜をブロッキング。次に一次抗体反応 (室温2時間)、二次抗体反応 (ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体、室温30分) を行ったあと、発光基質を加え、発光をX線フィルムに感光した。定量はフィルムをスキャナーで画像として取り込みNIH Image analyserにて解析を行った。蛋白のリン酸化の強度は、非リン酸化抗体で検出した蛋白発現量で補正した後、4回の実験を平均化した。また非刺激対照群のリン酸化強度を1とした時の±標準

偏差で表した。以下に一次抗体反応で用いた抗体を示す。

抗 ERK1/2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)

抗 phospho-ERK1/2 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 p27cip1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)

抗 p21 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)

抗 phospho-p53 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 p53 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 phospho-Rb 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)

抗 phospho-AMPK α 1 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 AMPK 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 phospho-ACC 抗体 (Cell Signaling 社)

抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)

6- (12) 統計学的解析

数値は平均値 \pm 標準誤差で表記した。数群間の差に関しては一元配置分散分析法 (one-factor analysis of variance: one-factor ANOVA) にて検定し、 $p < 0.01$ の際に、統計学的に有意と判断した。

7. 実験結果

7- (1) マクロファージにおけるAICARによるAMPK活性化の検討

まず、マウス腹腔マクロファージにおいてAICARがAMPKを活性化し得るかを検討するために、AMPK α 1サブユニットのリン酸化（Thr172）抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。さらにAMPKの活性化を確認するために、AMPKの主要な下流分子の一つであるACCのリン酸化（Ser79）抗体も用い検討した。10 μ M以上のAICARは、腹腔マクロファージにおいても濃度依存性にAMPK α 1及びACCのリン酸化を誘導した（図14:A）。また、AMPK α 1及びACCのリン酸化はAICAR刺激後1時間から誘導され7日間まで持続する事が確認できた（図14:B,C）。以上より腹腔マクロファージにおいても、AICARがAMPK α 1を活性化することが示された。

7- (2) 酸化LDLによるマクロファージ増殖に対するAICARの効果

次に、酸化LDLによるマクロファージ増殖に対するAICARの影響を検討した。20 μ g/mlの酸化LDL刺激によりマクロファージへの $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みは対象の8.8倍に増加した。50 μ M以上のAICARを同時刺激すると、この酸化LDLによる $[^3\text{H}]$ thymidine取り込みの増加が濃度依存的に抑制された（図14:D）。

同様に細胞数算定法を行ったところ、酸化LDL刺激により細胞数は対照群に比べ197%に増加し、50 μ M以上のAICARで同時刺激すると、この酸化LDLによる細胞数増加が濃度依存的に抑制された（図14:D,E）。以上よりAICARは、酸化LDLによるマクロファージ増殖を抑制することが示された。

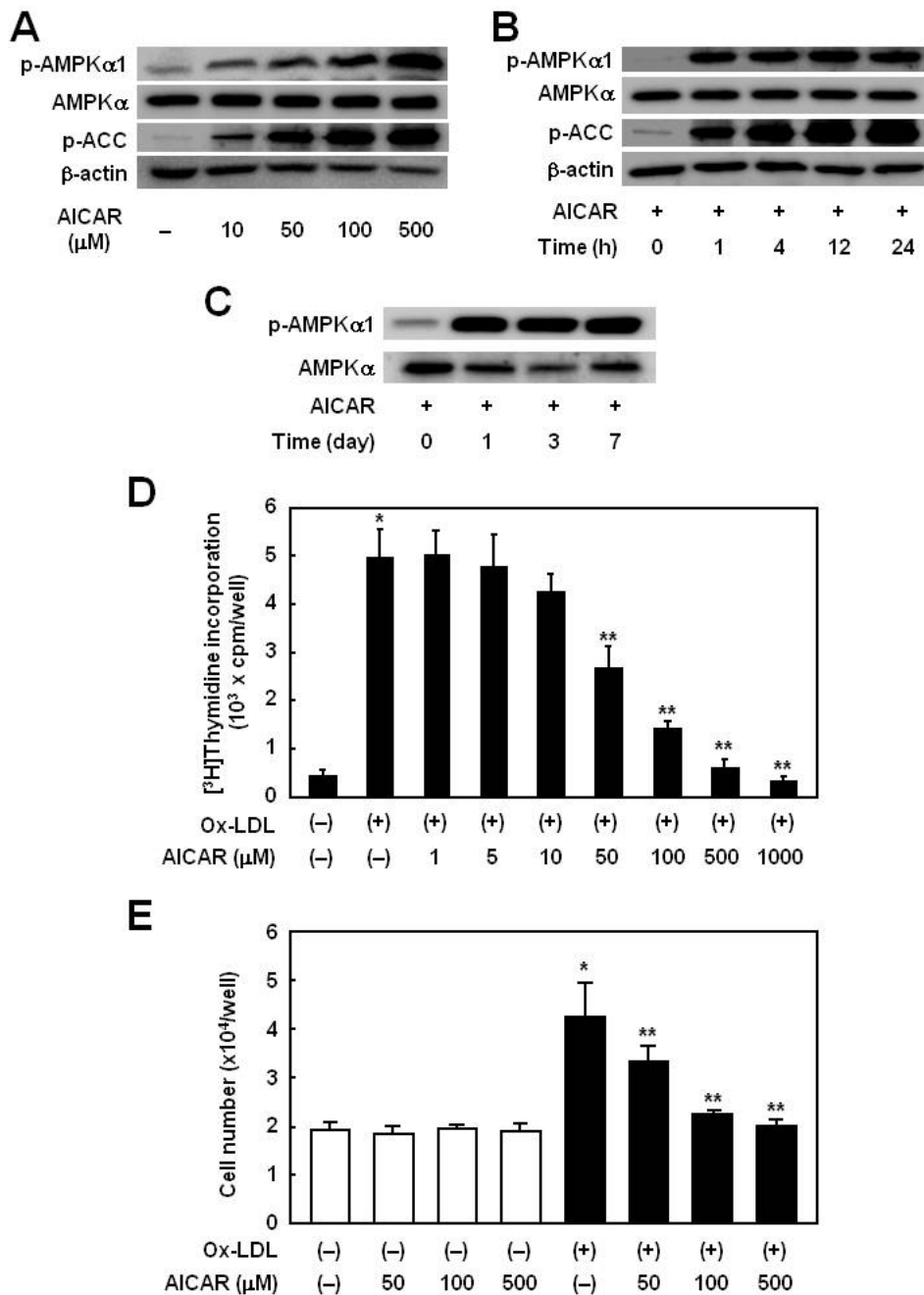


図14：酸化LDLによるマクロファージ増殖に対するAICARの効果

A：マクロファージに対し、AICARにて記載の濃度で1時間刺激後、各抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。B,C：マクロファージを100 μM AICARで刺激し各時間培養後、抗 phospho-AMPKα1 抗体、抗 AMPKα 抗体、抗 phospho-ACC 抗体、抗 β-actin 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。D,E：各濃度の AICAR で1時間の前処理後、20 μg/ml の Ox-LDL を添加し6日間培養した。“材料と実験方法”に示したようにマクロファージへの[³H]thymidine 取り込み (D) 及び、細胞数算定法 (E) を用いて解析した。結果は4回の実験を平均化し、平均値±標準誤差を表した。*,*p*<0.01, 対 対象、**, *p*<0.01, 対 酸化 LDL のみの細胞。

7- (3) AMPK過剰発現による酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果

次に、AMPKの活性化が酸化LDLによるマクロファージ増殖を抑制するかを検討するために、アデノウイルスを用いAMPK α 1を過剰発現させたマクロファージにおいて、酸化LDLによる増殖能を検討した。

AMPK α 1を過剰発現させた細胞において、コントロールとしてAd-LacZを感染させた細胞に比べAMPK α の過剰発現とAMPK α 1のリン酸化が増強していた(図15:A)。このAMPK α 1を過剰発現させた細胞では、酸化LDLによる細胞増殖誘導効果が、コントロールに比べ有意に減弱していた(図15:B)。このことから、AMPK活性化が酸化LDLによるマクロファージ増殖を抑制する事が示唆された。

7- (4) AICARによる酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果に対するDN-AMPK α 1遺伝子導入によるAMPK活性抑制の影響

次に、AICARの酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果がAMPK活性化とは別の機序で起こっている可能性も否定できないため、アデノウイルスを用いDN-AMPK α 1を過剰発現させた細胞で、AICARによるマクロファージ増殖抑制効果が阻害されるかを検討した。まず、DN-AMPK α 1を過剰発現させた細胞では、AICARによるAMPK α 1、ACCのリン酸化効果が減弱する事を確認した(図15:C)。AICARによる酸化LDL誘導性細胞増殖抑制効果は、コントロールとしてAd-LacZを感染させた細胞に比べ、DN-AMPK α 1を過剰発現させた細胞では減弱した(図15:D)。以上の結果より、AICARによるマクロファージ増殖抑制効果はAMPK活性化を介していることが示唆された。

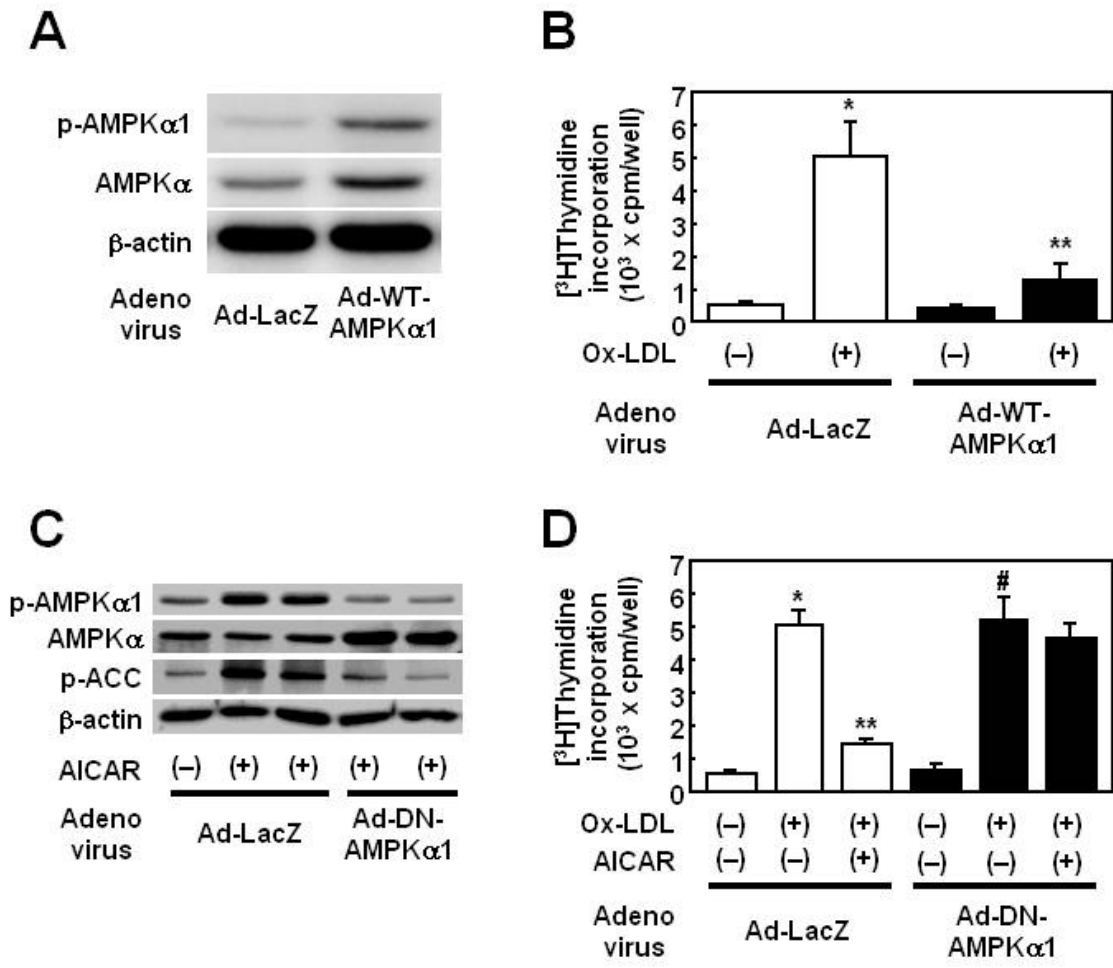


図15 : AICAR の酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果のAMPK活性化の関与
A-D : LacZ (Ad-LacZ)、wild-type AMPK α 1 (Ad-AMPK α 1) (A、B)、dominant-negative AMPK α 1(Ad-DN-AMPK α 1) (C、D) を含むアデノウイルスベクターを感染させ 48 時間培養後、1 時間 100 μ M AICAR で刺激したマクロファージから抽出した蛋白を抗 phospho-AMPK α 1 抗体、抗 AMPK α 抗体、抗 β -actin 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った (A、C)。また、同マクロファージを 20 μ g/mL の酸化 LDL で刺激し 6 日間培養後に“材料と実験方法”に示したように [³H]thymidine 取り込み法でその増殖能を解析した (B、D)。結果は 4 回の実験を平均化し、平均値 \pm 標準誤差を表した。
*, $p < 0.01$, 対 対象, **, $p < 0.01$, 対酸化 LDL 刺激のみの Ad-LacZ 感染細胞。#, $p < 0.01$. 対未刺激の Ad-DN-AMPK α 1 感染細胞

7- (5) AICARによるマクロファージアポトーシス誘導効果の検討

AICARが慢性リンパ性白血病のBリンパ球などの血球系細胞でアポトーシスを誘導する事が報告されている (Campàs et al 2003, Garcia-Gil et al. 2003)。そこ

でAICARがマクロファージにおいてもアポトーシスを誘導するかを検討した。まずCell Death ELISA法を用いてアポトーシスを定量化して検討した。1000 μM のAICARはマクロファージのアポトーシスを誘導したが、500 μM 以下の濃度ではアポトーシスの誘導は認めなかった (図16:A)。

次にPropidium Iodide染色細胞でのフローサイトメトリーを用いた細胞周期解

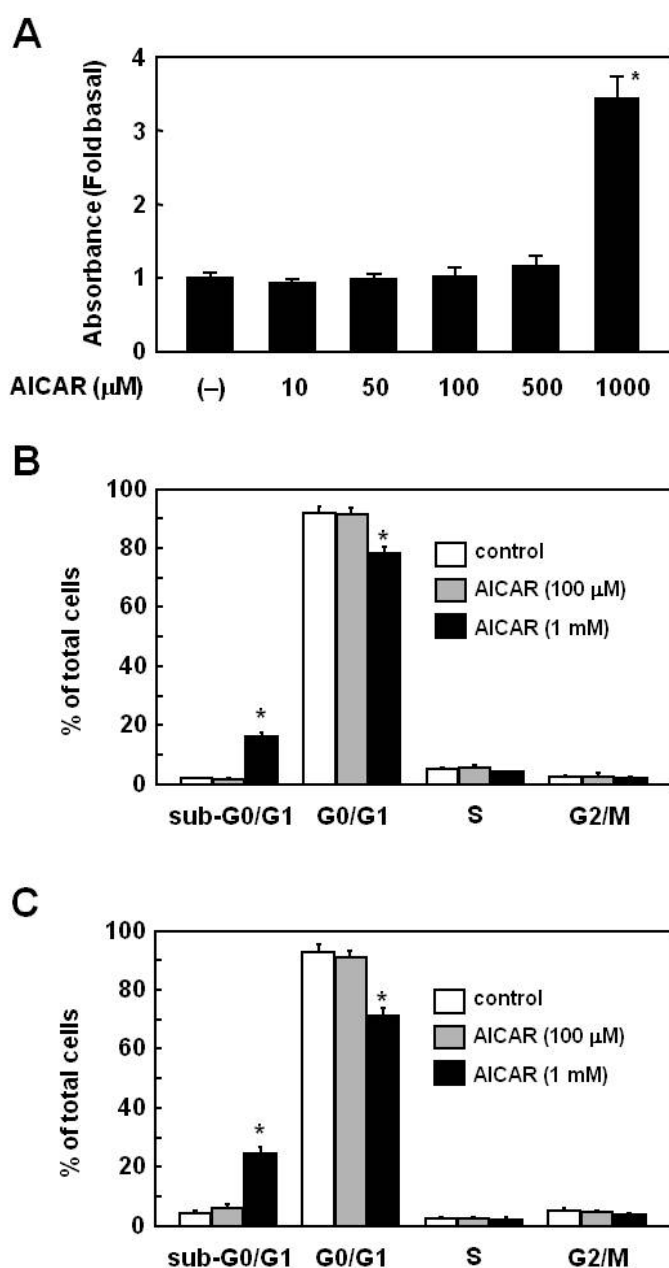


図16 : マクロファージのアポトーシスにおけるAICARの影響

A-C : マクロファージを各濃度の AICAR で刺激し 48 時間 (A, B) または 7 日間 (C) 培養後 “材料と実験方法” に示したように cell death detection ELISA 法 (A) または flowcytometry を用いた sub-G0/G1 期の細胞の割合 (B, C) でアポトーシスを定量化し解析した。結果は 4 回の実験を平均化し、平均値 \pm 標準誤差を表した。*, $p < 0.01$, 対 対象

析を行ったところ、1000 μM のAICAR刺激48時間後において細胞のアポトーシスを表すsub-G0/G1期の増加とG0/G1期の減少を認めた。しかし、明らかな増殖抑制効果を示す100 μM のAICAR刺激48時間後においてはアポトーシス誘導を表す変化を認めなかった (図16:B)。これらの効果は、AICAR刺激7日後の細胞でも同様の効果を示した (図16:C)。以上の結果より、高濃度のAICARはマクロファージにおいてもアポトーシスを誘導したが、500 μM 以下のAICARによる細胞増殖抑制効果は、アポトーシス以外の効果が関与する可能性が示唆された。

7- (6) 酸化LDLによるERK1/2のリン酸化とGM-CSF発現に対するAICARの影響

著者らの教室ではこれまでに酸化LDLによるマクロファージ増殖にはERK1/2活性化を介したGM-CSF産生が関与することを報告している。そこで、AICARによる酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果が、ERK1/2活性化抑制と、その結果としてのGM-CSF発現抑制効果が関与しているのかを検討した。100 μM のAICARは、酸化LDLによるGM-CSFの発現を蛋白レベルで29% (図17:A)、mRNAレベルで25%抑制した (図17:B)。さらに、同濃度のAICARは、ERK1/2のリン酸化を22%抑制した (図17:C)。以上より、AICARによる酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果の機序には、ERK1/2活性とGM-CSF産生抑制が部分的に関与することが示唆された。しかし、AICARの細胞増殖抑制効果を説明する為には十分ではなく、この効果以外の主要な機序の存在が示唆された。

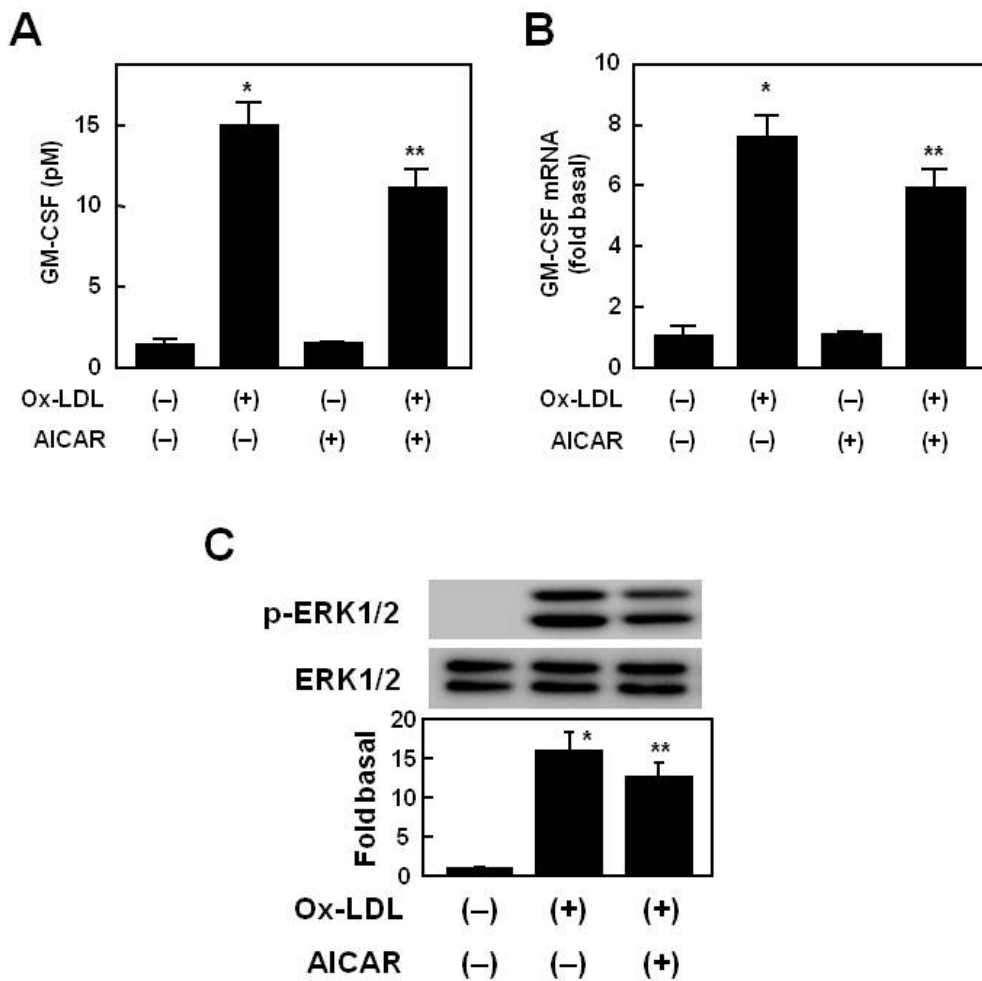


図17：酸化LDL誘導性GM-CSF産生及びERK活性化に対するAICARの影響。

A：100 μ M の AICAR で 1 時間の前処理後、20 μ g/ml の酸化 LDL で 4 時間刺激後のマクロファージ培養液中に分泌された GM-CSF 蛋白量を“材料と実験方法”に示したように ELISA 法を用いて解析した。B：100 μ M の AICAR で 1 時間の前処理後、20 μ g/ml の酸化 LDL で 1 時間刺激後の、マクロファージから mRNA を抽出し、real-time RT-PCR 法にて GM-CSF mRNA 発現量を解析した。GM-CSF mRNA 発現量は同検体を用いて測定した β -actin 発現量で補正した。C：100 μ M の AICAR で 1 時間の前処理後、20 μ g/ml の酸化 LDL で 30 分刺激後のマクロファージから蛋白を抽出し、抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 ERK1/2 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。結果は 4 回の実験を平均化し、平均値 \pm 標準誤差を表した。*, $p < 0.01$, 対 対象、**, $p < 0.01$, 対 酸化 LDL 刺激のみの細胞。

7- (7) AICARによるGM-CSF誘導性マクロファージ増殖抑制効果の検討

次に、GM-CSFによるマクロファージ増殖に対するAICARの影響を検討した。GM-CSF刺激によりマクロファージへの $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みは対象の7.6倍に増加した(図18:A)。50 μM 以上のAICARは、 $[^3\text{H}]$ thymidine取り込みの増加を濃度依存的に有意に抑制した。同様に細胞数算定法を行ったところ、GM-CSF刺激により細胞数は対照群に比べ197%に増加し、50 μM 以上のAICARで同時刺激すると、このGM-CSFによる細胞数増加が濃度依存的に抑制された(図18:B)。

さらに、このAICARによるGM-CSF誘導性マクロファージ増殖抑制効果がAMPK活性化を介しているかを検討するために、アデノウイルスを用いてWT-AMPK α 1及びDN-AMPK α 1を過剰発現させた細胞で検討した。

コントロールとしてAd-LacZを感染させた細胞と比べ、AMPK α 1を過剰発現させた細胞ではGM-CSFによるマクロファージ増殖の誘導効果が減弱しており(図18C)、AMPKの活性化はGM-CSFによるマクロファージ増殖を抑制することが示唆された。また、AICARによるGM-CSF誘導性細胞増殖抑制効果は、コントロールとしてAd-LacZを感染させた細胞に比べ、DN-AMPK α 1を過剰発現させた細胞では減弱した(図18:D)。このことから、AICARはAMPK活性化を介してGM-CSF誘導性マクロファージ増殖を抑制することが示唆された。

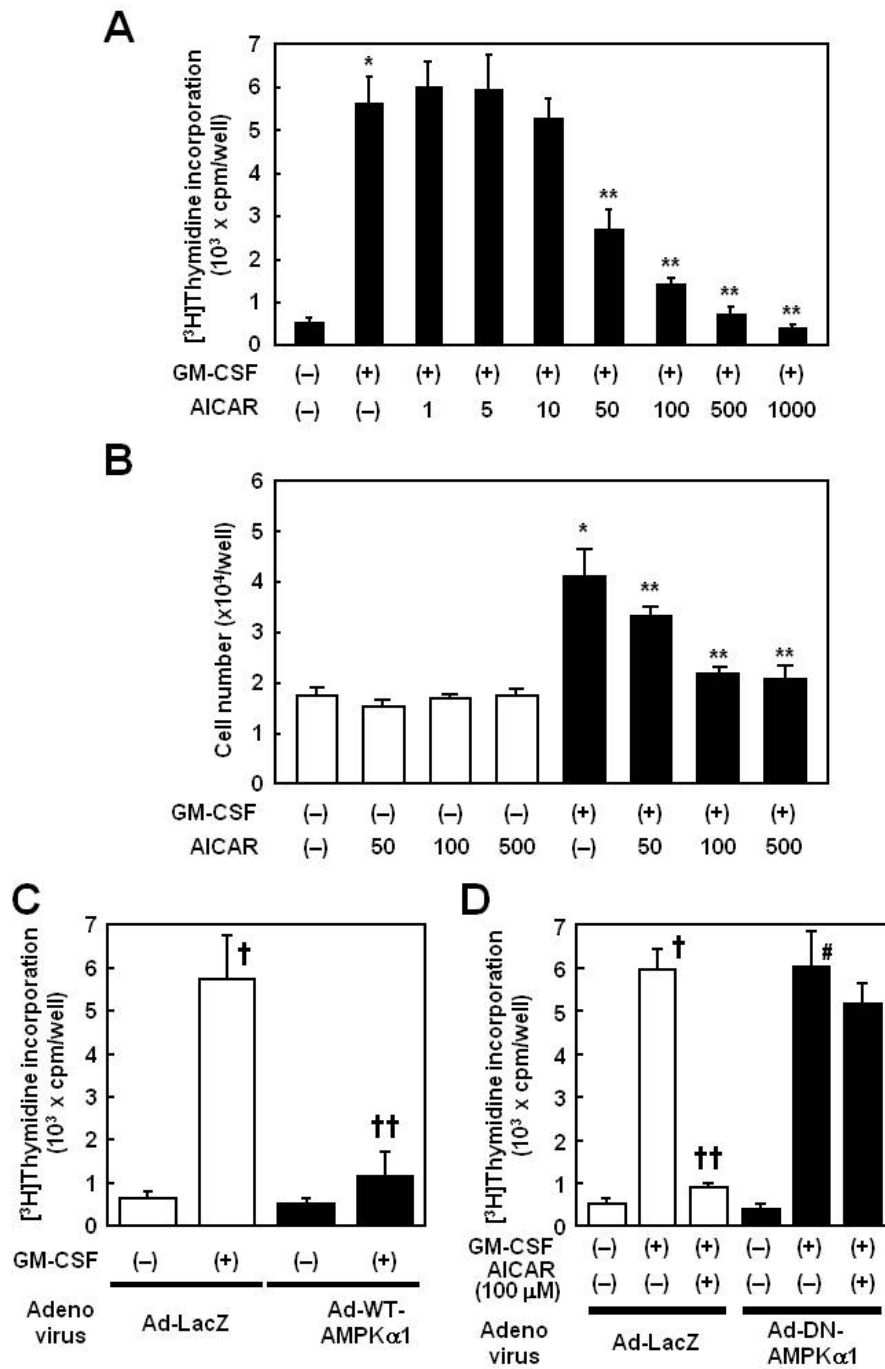


図18 : AICAR によるGM-CSF誘導性マクロファージ増殖抑制効果の検討

A、B : マクロファージを各濃度の AICAR で 1 時間の前処理後、10 pM GM-CSF を添加し 5 日間培養した。“材料と実験方法” に示したようにマクロファージへの [³H]thymidine 取り込み法 (A) 及び、細胞数算定法 (B) を用いて解析した。C、D : LacZ (Ad-LacZ)、wild-type AMPKα1 (Ad-AMPKα1) (C)、dominant-negative AMPKα1 (Ad-DN-AMPKα1) (D) を含むアデノウイルスベクターを感染させ 48 時間培養後 100 μM の AICAR で 1 時間前処理したマクロファージに 10 pM の GM-CSF を添加し 5 日間培養した。“材料と実験方法” に示したようにマクロファージへの [³H]thymidine 取り込み法を用いて解析した。結果は 4 回の実験を平均化し、平均値±標準誤差を表した。*, *p*<0.01, 対 対象、**, *p*<0.01, 対 GM-CSF のみの細胞、†, *p*<0.01, 対 未刺激の Ad-LacZ 感染細胞、††, *p*<0.01, 対 GM-CSF 刺激のみの対象 Ad-LacZ 感染細胞、#, *p*<0.01, 対 未刺激の Ad-DN-AMPKα1 感染細胞。

7- (8) AICARによるp38MAPK/Aktシグナル経路への影響

著者らの教室ではこれまでに、Ox-LDLによるマクロファージ増殖にはGM-CSFの発現が関与し (Biwa et al. 1998)、このGM-CSFによるマクロファージ増殖にはp38MAPK/PI-3K/Aktシグナル経路が重要な役割を果たしている事を報告してきた (Senokuchi et al. 2004)。そこで、GM-CSFによるp38MAPKとAktの活性化に対するAICARの効果を検討した。GM-CSFは、p38MAPKとAktのリン酸化を誘導したが、AICARは単独でp38MAPKとAktのリン酸化を誘導し、さらにGM-CSFによるp38MAPKとAktのリン酸化を増強した (図19:A)。この結果からAICARによる細胞増殖抑制効果には、少なくともp38 MAPK/Aktのシグナル経路阻害以外の他の機序の存在が示唆された。

7- (9) マクロファージ増殖における細胞周期へのAICARの影響

AICARのマクロファージ増殖における細胞周期への影響を検討するために、Propidium Iodide染色細胞でのフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行った。100 μ MのAICAR刺激によりG0/G1期の細胞増加と (80.3 \pm 1.5% \rightarrow 93.4 \pm 1.8%)、S期 (13.2 \pm 0.9% \rightarrow 6.1 \pm 0.5%) とG2/M期 (7.2 \pm 0.7% \rightarrow 2.5 \pm 0.3%) の細胞の減少を認めた (図19B)。このことから、AICARはマクロファージの細胞周期において、G1期からS期への進行を阻止している可能性が示唆された。

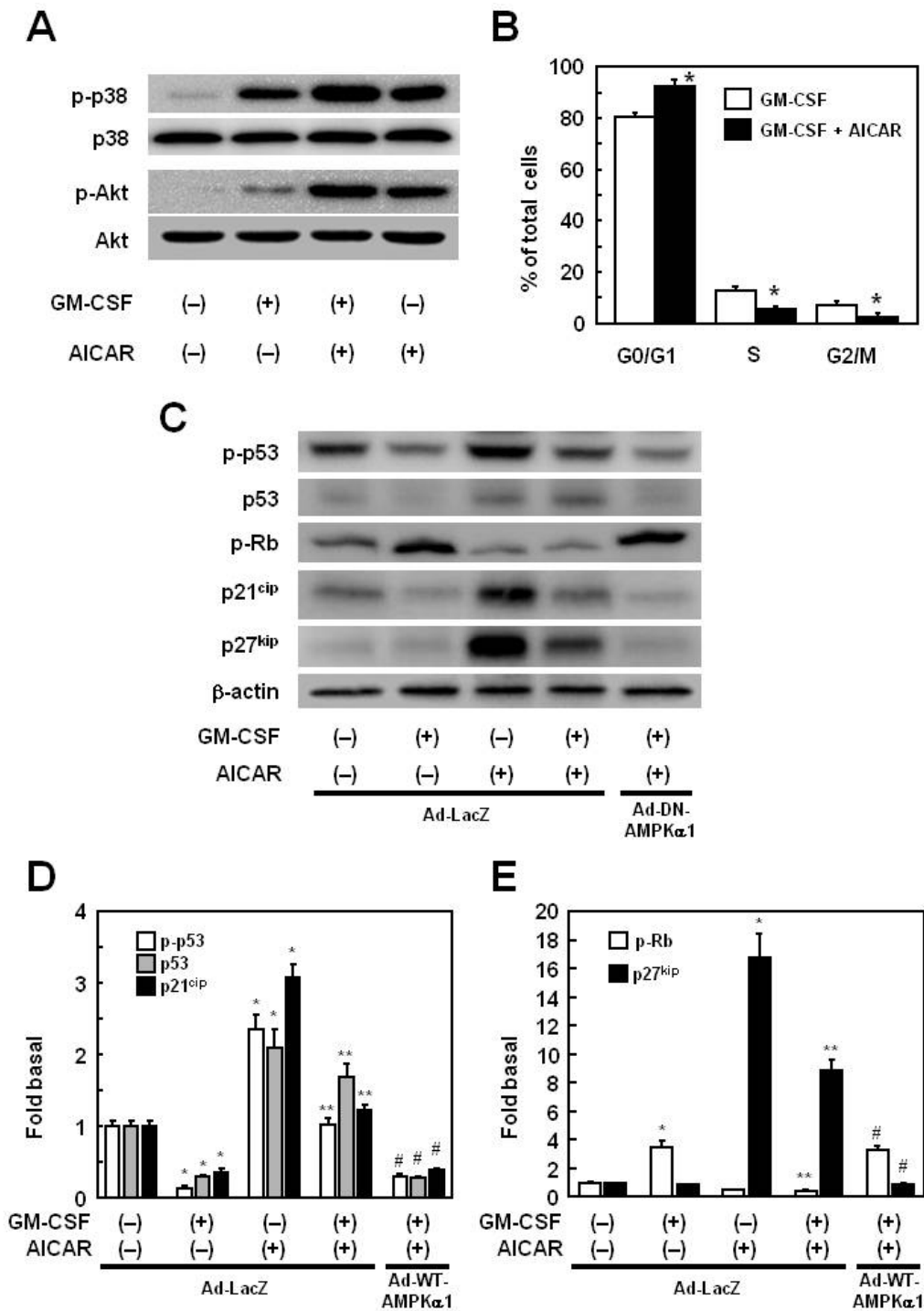


図19 : GM-CSFによるマクロファージ増殖と細胞周期進行のシグナル解析とそれに及ぼすAMPKの影響
A-E : 無処置のマクロファージ (A,B) もしくは LacZ (Ad-LacZ) 、wild-type AMPKα1 (Ad-AMPKα1) (C) 、dominant-negative AMPKα1(Ad-DN-AMPKα1) (D) を含むアデノウイルスベクターを感染させ 48 時間培養したマクロファージに、100 μM の AICAR で 1 時間刺激後、10 pM の GM-CSF で 30 分(A)、24 時間(C)、4 日間(B)刺激後に抽出した蛋白を抗 phospho-p38(p-p38)抗体、抗 p38 抗体、抗 phospho-Akt(p-Akt) 抗体、抗 Akt 抗体、抗 phospho-p53(p-p53)抗体、抗 p53 抗体、抗 phospho-Rb(p-Rb)抗体、抗 p21^{cip}抗体、抗 p27^{kip}抗体、抗β-actin 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った(A,C)。また、phosphorylated p53、total p53、p21^{cip}(D)、phosphorylated Rb と p27^{kip}(E)を β-actin で補正し定量化した。細胞周期解析は、flow cytometry を用いて行った(B)。結果は 4 回の実験を平均化し、平均値±標準誤差を表した。*,*p*<0.01, 対 無刺激の Ad-LacZ 感染細胞、**,*p*<0.01, 対 GM-CSF 刺激のみした Ad-LacZ 感染細胞。#,*p*<0.01, 対 GM-CSF と AICAR 刺激をした Ad-LacZ 感染細胞。

7- (10) 細胞周期関連因子、細胞周期抑制因子へのAICARの影響

次に、細胞周期抑制因子であるp53について、その発現とリン酸化を検討した。10 pMのGM-CSF刺激では、p53の発現とリン酸化の抑制が認められた(図19:C,D)。一方、100 μ MのAICARで同時刺激すると、このGM-CSFによるp53の発現とリン酸化の抑制は解除された(図19:C,D)。さらに、DN-AMPK α 1の過剰発現細胞ではAICARのp53発現抑制効果及びリン酸化抑制効果の解除が認められた(図19:C,D)。また、AICAR単独刺激でもp53の発現とリン酸化は増強された(図19:C,D)。さらにGM-CSFは、Rbのリン酸化を誘導し、この効果はAICAR同時刺激をすると抑制された(図19:C,E)。

さらに、細胞周期抑制因子であるp21^{cip}、p27^{kip}について検討を行った。GM-CSF刺激にてp21^{cip}の発現は抑制され、AICAR同時刺激をすると解除された(図19:C,D)。さらに、この効果はDN-AMPK α 1の過剰発現によって消失した。一方、無刺激状態のマクロファージではp27^{kip}の発現はほとんど認めず、GM-CSFはp27^{kip}の発現に影響を与えなかった(図19:C,E)。また、AICAR同時刺激をすると、p27^{kip}の発現が増強され、さらにDN-AMPK α 1の過剰発現をすると、このAICARの効果が抑制された(図19:C,E)。またAICAR単独刺激でもp21^{cip}とp27^{kip}の発現が増強した(図19:C,D,E)。

次にp53とp27^{kip}の過剰発現がマクロファージ増殖に及ぼす影響を検討した。Ad-p53を用いたp53蛋白の過剰発現細胞では、同時にp53のリン酸化の増強を認め、さらにp21^{cip}の発現の増強も認められた(図20:A)。さらにこのp53過剰発現細胞では、細胞増殖の有意な抑制が認められた(図20:B)。一方、pcDNA3Flag-hp27を用いたp27^{kip}の過剰発現細胞においても同様にGM-CSFによる細胞増殖の有意な抑制が認められた(図20:C,D)。さらに、siRNAを用いてp21^{cip}とp27^{kip}をノック

クダウンした細胞では、AICARによるp21^{cip}、p27^{kip}の発現増強効果が抑制され(図20:E,F)、AICARによる細胞増殖抑制効果がそれぞれ部分的に解除された(図20:G)。また、p21^{cip}とp27^{kip}を同時にノックダウンした細胞では、細胞増殖抑制効果の解除に相加効果を認めた(図20G)。

以上の結果から、AICARによるマクロファージ増殖抑制効果にはp53-p21^{cip}シグナル抑制解除効果とp27^{kip}発現増強効果の2つのシグナルが関与することが示唆された。

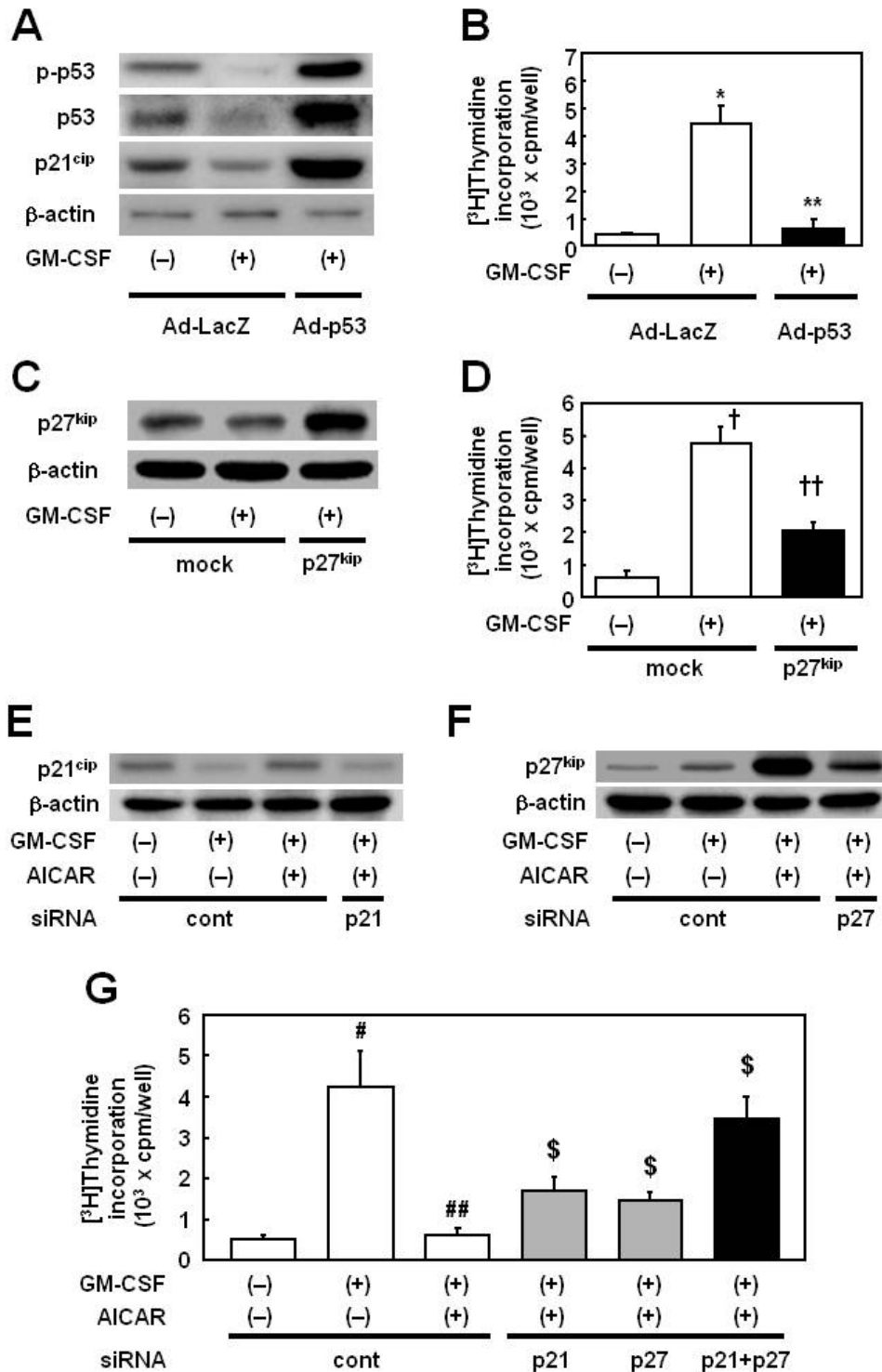


図20 : AICARによるマクロファージ増殖抑制効果におけるp21^{cip}、p27^{kip}発現の関与
マクロファージをLacZ (Ad-LacZ)、wild-type p53 (Ad-p53)を含むアデノウイルスベクターを感染させ (A,B)、もしくは空のプラスミド (mock)、p27^{kip}を含むプラスミド (C,D)、コントロール、p21^{cip}、p27^{kip}のsiRNAを遺伝子導入し (E,F,G)、24時間 (C-G) か48時間 (A,B) 培養後に100 μMのAICARで1時間刺激後、10 pMのGM-CSFで刺激し、さらに24時間 (A,C,E,F) か5日間 (B,D,G) 培養した。A,C,E,F; 抗phospho-p53抗体、抗p53抗体、抗p21^{cip}抗体、抗p27^{kip}抗体、抗β-actin抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。B,D,G: “材料と実験方法” に示したようにマクロファージへの[³H]thymidine取り込み法で解析を行った。マクロファージを100 μMのAICARで処理し各時間培養後、各抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。結果は4回の実験を平均化し、平均値±標準誤差を表した。*, p<0.01, 対未刺激のAd-LacZ感染細胞、**, p<0.01, 対 GM-CSF刺激のみのAd-LacZ感染細胞、†, p<0.01, 対未刺激のmock遺伝子導入細胞、††, p<0.01, 対 GM-CSF刺激のみのmock遺伝子導入細胞、#, p<0.01, 対未刺激のcontrol siRNA遺伝子導入細胞、##, p<0.01, 対 GM-CSF刺激のみのcontrol siRNA遺伝子導入細胞、\$, p<0.01, AICARとGM-CSF刺激したcontrol siRNA遺伝子導入細胞。

8. 考察

8- (1) AMPK活性化によるマクロファージの細胞増殖とアポトーシスの抑制効果についての考察

AMPKはエネルギーセンサーとして全ての真核細胞に存在するセリン/スレオニンキナーゼである。これまでに、AICARによるAMPKの活性化がhepatoma HepG2細胞やmouse embryonic fibroblast細胞に対し、細胞増殖を強く抑制する事が示されている (Imamura et al. 2001, Jones et al. 2005)。さらに、著者らの教室では最近AMPK活性化がhuman aortic smooth muscle cell (HSMC) とrabbit aortic stripsで増殖を抑制することを報告している (Igata et al. 2005)。今回、本研究では、AICARによるAMPK活性化が酸化LDLによるマクロファージ増殖を抑制する事を示した。AMPK活性化は、ヒトB細胞、慢性リンパ性白血病細胞、ヒト神経芽細胞腫細胞においてアポトーシスを誘導する事が報告されていることから (Campàs et al. 2003, Garcia-Gil et al. 2003)、AMPKのマクロファージ増殖抑制効果にはアポトーシスを介する機序の存在が推測された。実際に、1000 μM のAICARはマクロファージのアポトーシスを誘導したが、マクロファージ増殖抑制効果は、1000 μM 以下の低濃度のAICARでも認めたことから、マクロファージ増殖抑制効果にはアポトーシス以外の機序が存在する可能性が考えられた。

8- (2) 酸化LDL誘導性マクロファージ増殖におけるシグナル経路の考察

著者らの教室では、以前に酸化LDLによるマクロファージ増殖において酸化LDLによるGM-CSF産生が主に関係していると報告していることから (Biwa et al. 1998, Senokuchi et al. 2004) 、酸化LDLによるマクロファージ増殖の機序には、①GM-CSF産生を誘導する細胞内シグナル経路と②GM-CSFレセプターを介した増殖シグナル経路、の2つの機序が存在すると言える。さらに当教室ではこれまでに、酸化LDLがERK1/2の活性化を誘導し、その結果GM-CSF発現を誘導する事を報している (Senokuchi et al. 2004) 。ERK1/2を介したGM-CSF発現は酸化LDLによるマクロファージ増殖の重要な現象の一つである。AMPK活性化は、HSMCにおいてアンギオテンシン II によるERK1/2活性化を抑制することが報告されているが (Nagata et al. 2004) 、一方で、マクロファージの腫瘍細胞株であるRaw264.7細胞においてLipopolysaccharide (LPS) によるERK1/2活性化は抑制しない事が報告されている (Jhun et al. 2004) 。以上の事から、AMPK活性化のERK1/2に対する効果は、細胞の種類やその誘導物質に依存している可能性がある。本研究では、マウス腹腔マクロファージにおいて、AMPK活性化が酸化LDL誘導性のERK1/2の活性化を22%抑制し、GM-CSFの蛋白発現とmRNA発現をそれぞれ、29%と25%抑制することを示した。これらの結果は、AICARのマクロファージ増殖抑制効果においてGM-CSF発現経路の抑制は部分的な関与にとどまっておき、GM-CSF分泌以後の細胞増殖シグナル経路への影響が存在する事を示唆している。

AMPK活性化はGM-CSFによるマクロファージ増殖も抑制し、このことはAMPK活性化による酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制が、GM-CSF分泌以降の増殖シグナルの抑制に応じて起こっている可能性を示唆している。さらに

本研究では、AMPK活性化はGM-CSFによるマクロファージ増殖に関係しているp38MAPK/Aktシグナル経路を抑制しない事を見出した。

8- (3) マクロファージ増殖に関与する細胞周期と細胞周期関連因子の考察

そこで、本研究ではAMPK活性化による酸化LDL誘導性マクロファージ増殖抑制効果の機序には細胞周期進行阻止効果が存在する可能性を考え、フローサイトメトリーによる細胞周期の検討を行ったところ、AICARがG0/G1期の細胞の割合を著明に増やしS期とG2/M期の細胞の割合を減らす事を見出した。このことから、AMPK活性化による細胞周期進行阻止効果がマクロファージ増殖抑制効果の主因であると考えられた。

哺乳類の細胞増殖は細胞周期でコントロールされている。細胞周期進行は、CDKとそれらのcyclin-regulatory subunitで正に制御され (Sherr et al. 1996)、CDKIと腫瘍抑制因子により負に調整されている (Grana et al. 1995)。有糸分裂惹起因子は、そのレセプターに結合する事で、CDKの活性化と細胞周期進行、DNA合成、DNA複製、有糸分裂が開始される。G0-G1/S期への転換に繋がる最終的な主要経路はCDKにより誘導されるRbのリン酸化であるが、実際、GM-CSFはマクロファージに対しRbのリン酸化を誘導し、この効果はAICARにて抑制される事を見出した。

p21^{cip}とp27^{kip}といったCDKIはcyclin/CDK活性とRbリン酸化の抑制により細胞周期を負に調節しており、その結果G1 arrestを誘導する (Hunter et al. 1994)。一方、がん抑制遺伝子であるp53の発現およびその機能はp53自身のリン酸化により厳密に調整されている (Shieh et al. 1995, Jones et al. 2005)。γ線や低血糖などの細胞ストレスによりp53のser15がリン酸化されると、p53はp21^{cip}や

p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1 (p53 AIP1) などのp53反応遺伝子の転写調節を介して細胞成長停止やアポトーシスを誘導する (Bode et al. 2004)。これまでに、*in vivo*や*in vitro*の癌細胞株を用いた研究で、AICARによるAMPK活性化が、p21^{cip}、p27^{kip}、p53の発現増加を介して発がん抑制効果を有する可能性が報告されている (Rattan et al. 2005)。著者らの教室でもこれまでにAMPK活性化がp53のリン酸化とその結果のp21^{cip}発現増加によりHSMCの増殖を抑制する事を報告している (Igata et al. 2003)。今回、本研究では、マクロファージにおいてGM-CSFがp53のリン酸化とその結果としてp21^{cip}発現を抑制している事、さらにAICARがこれらの効果を解除する事を見出した。興味深い事に、p27^{kip}は未刺激のマクロファージではタンパク発現が少なく、GM-CSFによっても大きな影響は認めなかった。しかし、AICARはp27^{kip}発現を著明に増加させた。さらにAICAR単独でもp53のリン酸化とタンパク発現及びp21^{cip}、p27^{kip}の発現を誘導する事を見出した。さらに、p53-p21^{cip}経路の増加とp27^{kip}発現増加は、GM-CSFによるマクロファージ増殖を抑制し、p21^{cip}とp27^{kip}の産生抑制はAICARによるマクロファージ増殖抑制効果を減弱した。これらの結果は、AMPK活性化によるマクロファージ増殖抑制効果には、GM-CSFを介する細胞内シグナル経路の抑制のみではなく、p53のリン酸化、p21^{cip}、p27^{kip}の発現を介した直接的な細胞周期進行阻止効果によるものが関与している事を示唆している。

今回、本研究ではAMPK活性化がGM-CSF発現の抑制と細胞周期進行阻止を介して酸化LDL誘導性マクロファージ増殖を抑制している事を初めて明らかにした。マクロファージを含む動脈硬化関連細胞の増殖は、動脈硬化症の発症・進展に重要な役割をもつことから、AMPK活性化による細胞増殖抑制効果は、動脈硬化症治療の新しいターゲットとなる可能性が考えられる。

9. 結語

当教室ではこれまでに、酸化LDLによるマクロファージ増殖のシグナル伝達経路に関し、(i) 酸化LDLは百日咳毒素感受性G蛋白のシグナルを介した小胞体からのカルシウム放出、及び細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導し、PKCの活性化を引き起こすこと (Matsumura et al. 1997) (ii) PKCの活性化を介してERK1/2の活性化を誘導し、このERK1/2の活性化を介しGM-CSFの発現及び培養液中へのGM-CSF分泌を誘導すること (Biwa et al. 1998, Senokuchi et al. 2004) (iii) 分泌されたGM-CSFはp38 MAPK/PI-3K経路を介しマクロファージ増殖を誘導すること (Biwa et al. 2000, Senokuchi et al. 2004) を報告した。

本研究においてAMPK活性化が酸化LDLによるマクロファージ増殖に対し抑制効果を有することに関して、(i) AMPKの活性化は、酸化LDL誘導性のERK1/2リン酸化とGM-CSF発現を部分的に抑制する事、(ii) GM-CSFはp53のリン酸化と発現を抑制し、p21^{cip}の発現を抑制し、Rbのリン酸化を誘導する事で細胞周期を進行させ細胞増殖を誘導している事、(iii) AMPKの活性化は、GM-CSF誘導性のp53のリン酸化抑制とそれに引き続くp21^{cip}の発現抑制効果を解除し、p27^{kip}の発現増加を誘導し、最終的にRbのリン酸化を抑制する事で細胞周期をG1期で停止させ細胞増殖を抑制する事、を明らかにした (図21)。

マクロファージを含む血管系細胞の増殖は動脈硬化性疾患の発症・進展に重要であり、AMPK活性化を介した細胞増殖抑制効果をターゲットとした動脈硬化症の治療法の開発は、今後の動脈硬化性疾患の診療に大きく貢献する可能性がある。本研究の成果は動脈硬化発症・進展のメカニズムの一部を明らかにし、動脈硬化症に対する新たな治療法の概念を提唱し得るものと考えられる。

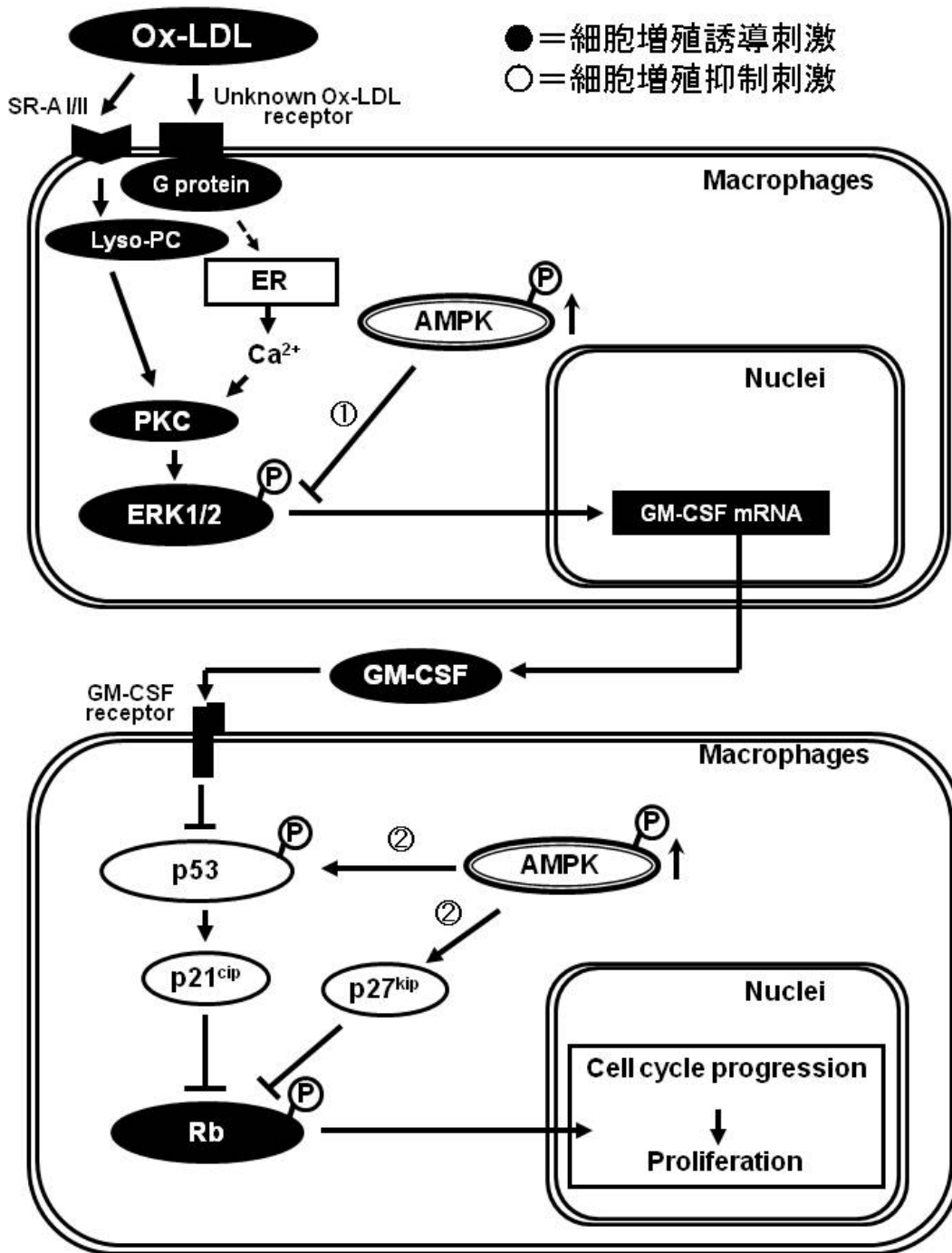


図 21 : AMPK 活性化による酸化 LDL 誘導性マクロファージ増殖抑制機序

酸化 LDL によるマクロファージ増殖のシグナル伝達経路及び AICAR の増殖抑制機序を略図に示す。酸化 LDL は百日咳毒素感受性 G 蛋白結合受容体のシグナルを介した小胞体 (ER, endoplasmic reticulum) からのカルシウム放出を介し、PKC の活性化を引き起こす。またスカベンジャー受容体 (SR-AI) を介し取り込まれた Lyso-PC も PKC の活性化を誘導する。活性化された PKC により ERK1/2 はリン酸化され GM-CSF 産生を誘導する。GM-CSF はオートクラインあるいはパラクライン的に GM-CSF 受容体に作用し、p53 の発現とリン酸化抑制及び p21^{cip} の発現抑制を介し Rb のリン酸化を誘導、細胞周期を進行させマクロファージ増殖を誘導する。AMPK の活性化は、①ERK1/2 のリン酸化と GM-CSF 産生を部分的に抑制し、②GM-CSF 誘導性の p53 のリン酸化抑制とそれに引き続く p21^{cip} の発現抑制効果を解除し、p27^{kip} の発現増加を誘導し、最終的に Rb のリン酸化を抑制する事で細胞周期を G1 期で停止させ、酸化 LDL によるマクロファージ増殖を阻害する。

10. 参考文献

Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, Berrih-Aknin S, Caux C, Trinchieri G and Briere F. 2001; Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c (-) , myeloid CD11c (+) , and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107:835-44

Biwa T, Hakamata H, Sakai M, Miyazaki A, Suzuki H, Kodama T, Shichiri M and Horiuchi S. 1998; Induction of murine macrophage growth by oxidized low density lipoprotein is mediated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 273:28305-13

Biwa T, Sakai M, Matsumura T, Kobori S, Kaneko K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S and Shichiri M. 2000; Sites of action of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase are distinct in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem* 275:5810-6

Blazquez C, Geelen MJ, Velasco G, Guzman M. 2001; The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett.*;489:149-153.

Bode, A. M., and Dong, Z. 2004; Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 793-805

Campas, C., Lopez, J. M., Santidrian, A. F., Barragan, M., Bellosillo, B., Colomer, D., and Gil, J. 2003; Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood.* 101, 3674-3680

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. 1998; Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 281:1677-1679.

Carling D. 2004; The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 29:18-24.

Chodakewitz, J. A., Kupper, T. S., and Coleman, D. L. 1988; Keratinocyte-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces DNA synthesis by peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 140, 832-836

Classon M.et al. 2000; Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:10820-10825

da Silva Xavier G, Leclerc I, Salt IP, et al. 2000; AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 97:4023

Deigner HP, Claus R. 1996;Stimulation of mitogen activated protein kinase by LDL and oxLDL in human U-937 macrophage-like cells.*FEBS Lett* 385:149-53

Garcia-Gil, M., Pesi, R., Perna, S., Allegrini, S., Giannecchini, M., Camici, M., and Tozzi, M. G. 2003; 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience.* 117, 811-820

Goetze S, Xi XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. 1999; TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension* 33:183-9

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK and Brown MS. 1979; 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* 76:333-7

Gordon D, Reidy MA, Benditt EP and Schwartz SM. 1990; Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4600-4

Grana, X., and Reddy, E. P. 1995; Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 11, 211-219

Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, Suginohara Y, Sakamoto Y and Horiuchi S. 1994; Species difference in cholesteryl ester cycle and HDL-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb* 14:1860-5

Hamilton, J. A., Myers, D., Jessup, W., Cochrane, F., Byrne, R., Whitty, G., and Moss, S. 1999; Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 98-105

Hardie DG. Mini review: 2003; The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 144:5179-5183.

Henriksen T, Mahoney EM. and Steinberg D. 1981; 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* 78:6499-503

Hunter, T., and Pines, J. 1994; Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* 79, 573-582

Ido Y, Carling D, Ruderman N. 2002; Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes.*51:159-167.

Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. 2001; Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 562-567

Inagaki N, Ito M, Nakano T and Inagaki M. 1994; Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends Biochem Sci* 19:448-52

Jhun, B. S., Jin, Q., Oh, Y. T., Kim, S. S., Kong, Y., Cho, Y. H., Ha, J., Baik, H. H., and Kang, I. 2004; 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 372-380

Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzal, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J., and Thompson, C. B. 2005; AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell.* 18, 283-293

Kahn BB, Alquier T, Carling D, and Hardie DG. 2005; AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism.* 1:15-25.

Kefas BA, Cai Y, Ling Z, Heimberg H, Hue L, Pipeleers D, Van de Castele M. 2003; AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. *J Mol Endocrinol.* 30:151-161

Kemp, B. E., Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Michell, B. J., Chen, Z. P., and Witters, L. A. 1999; Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends. Biochem. Sci.* 24, 22-25

Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P and Krieger M. 1990; Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343:531-5

Kusuhara M, Chait A, Cader A, Berk BC. 1997; Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:141-8

Li J, Jiang P, Robinson M, Lawrence TS, Sun Y. 2003; AMPK-beta1 subunit is a p53-independent stress responsive protein that inhibits tumor cell growth upon forced expression. *Carcinogenesis.* 24:827-834

Long, Y. C., and Zierath, J. R. 2006; AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* 116, 1776-1783

Martens JS, Reiner NE, Herrera-Velit P and Steinbrecher UP. 1998; Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 273:4915-20

Matsumura T, Sakai M, Kobori S, Biwa T, Takemura T, Matsuda H, Hakamata H, Horiuchi S and Shichiri M. 1997; Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3013-20

Matsumura T, Sakai M, Matsuda K, Furukawa N, Kaneko K and Shichiri M. 1999; Cis-acting DNA elements of mouse granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene responsive to oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 274:37665-72

Meisse D, Van de Castele M, Beauloye C, Hainault I, Kefas BA, Rider MH, Foufelle F, Hue L. 2002; Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS lett.* 526:38-42

Merrill, G. F., Kurth, E. J., Hardie, D. G., and Winder, W. W. 1997; AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol.* 273, E1107-E1112

Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., and Koeffler, H. P. 1986; Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature.* 323, 79-82

Nagata, D., Takeda, R., Sata, M., Satonaka, H., Suzuki, E., Nagano, T., and Hirata, Y. 2004; AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 110, 444-451

Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L. 1997; Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J. Cell Physiol.* 173:233-236.

O'Brien K, Nagano Y, Gown A, Kita T and Chait A. 1991; Probucol treatment affects the cellular composition but not anti-oxidized low density lipoprotein immunoreactivity of plaques from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 11:751-9

Osawa M, Itoh S, Ohta S, Huang Q, Berk BC, Marmarosh NL, Che W, Ding B, Yan C, Abe J. 2004; ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation. *J Biol Chem* 279:29691-9

Ouchi, N., Kobayashi, H., Kihara, S., Kumada, M., Sato, K., Inoue, T., Funahashi, T., and Walsh, K. 2004; Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 1304-1309

Rattan, R., Giri, S., Singh, A. K., and Singh, I. 2005; 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 39582-39593

Ren S, Rollins BJ. 2004; Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell.* 239-251

Rosenfeld ME and Ross R. 1990; Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10:680-7

Ross R. 1999; Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26

Sage J. et al. 2000; Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes dev.* 14:3037-3050

Saitoh M, Nagai K, Nakagawa K, Yamamura T, Yamamoto S, Nishizaki T. 2004; Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol.* 67:2005-2011.

Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sasaki T, Yui S, Yamazaki M, Shichiri M and Horiuchi S. 1994; Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem* 269:31430-5

Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sato Y, Matsumura T, Kobori S, Shichiri M and Horiuchi S. 1996; Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:600-5

Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Fujishiro, M., Ono, H., Onishi, Y., Katagiri, H., Abe, M., Fukushima, Y., Shojima, N., Inukai, K., Kikuchi, M., Oka, Y., and Asano, T. 2002; Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E1239-E1244

Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJH, et al. 1998; AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic β cells, and may regulate insulinsecretion. *Biochem J.* 335:533

Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., and Carling, D. 2007; Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem. J.* 403, 139-148

Schackelford RE, Misra UK, Florine-Casteel K, Thai SF, Pizzo SV and Adams DO. 1995; Oxidized low density lipoprotein suppresses activation of NF kappa B in macrophages via a pertussis toxin-sensitive signaling mechanism. *J Biol Chem* 270:3475-8

Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, Matsuo T, Yano M, Kiritoshi S, Sonoda K, Kukidome D, Nishikawa T, Araki E. 2004; Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase mediate macrophage proliferation induced by oxidized low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 176:233-45.

Sherr CJ. 1993; Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 73:1059-1065.

Sherr CJ. 1996; Cancer cell cycles. *Science.* 274, 1672-1677

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. 1997; DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 91:325-334.

Spagnoli LG, Orlandi A and Santeusanio G. 1991; Foam cells of the rabbit atherosclerotic plaque arrested in metaphase by colchicine show a macrophage phenotype. *Atherosclerosis* 88:87-92

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL. 1989; Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-24

Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E. 2004;Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem (Tokyo)* 136:557-61

Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. 2004;Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7:33-44

Weinberg RA. 1995; The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.

Xiang X, Saha AK, Wen R, Ruderman NB, Luo Z. 2004; AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 321:161-167

Young, M. E., Radda, G. K., and Leighton, B. 1996; Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR--an activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS. Lett.* 382, 43-47