

シンポジウム (III)

リポ蛋白代謝とその異常

エンドトキシン刺激後のマクロファージによる リポ蛋白リパーゼ産生の低下*

川上正舒** M. D. レーン*** P. H. ペカラ***
アンソニー・セラミ****

I. はじめに

高脂血症の成因には家族性を含めいくつかの疾患があげられる。感染症や癌等の侵襲時にも宿主に高トリグリセリド血症が見られ、それがリポ蛋白リパーゼ (LPL) の低下に起因しているということが知られている¹⁻³⁾。われわれは、これらの疾患におけるトリグリセリド代謝の異常についてエンドトキシン血症をモデルに検討したところ、LPL 活性の調節にこれまで知られていなかった機構のあることを示唆する知見を得たので報告する。

II. エンドトキシンのマウス脂肪組織 LPL に対する作用

Figure 1 に示すように、C3H/HeN 系マウス腹腔内にエンドトキシンを注射すると 12 時間から 24 時間の間に脂肪組織のリポ蛋白リパーゼは著明に低下し、それに対応して血中トリグリセリドは 2 倍以上に上昇する。しかし、同じく C3H/He 系でありながらエンドトキシンに抵抗性の C3H/HeJ 系のマウスでは、脂肪組織 LPL 活性は同量のエンドトキシン注射後に C3H/HeN 系マウスでみられた程の低下を示さなかった⁴⁾。C3H/HeJ マウスにみられるエンドトキシン不応性は、マクロファージやリンパ球等、免疫担当細胞のエン

ドトキシン受容体の欠損によると考えられている^{5,6)}。そこでエンドトキシンに感受性の C3H/HeN マウス腹腔マクロファージをエンドトキシン存在下で培養し、その培養上清をエンドトキシン抵抗性の C3H/HeJ マウスの腹腔に注射したところ、Fig. 2 に示すように脂肪細胞の LPL 活性は著明に低下した。この結果より、エンドトキシンは注射後マクロファージに働き、そのマクロ

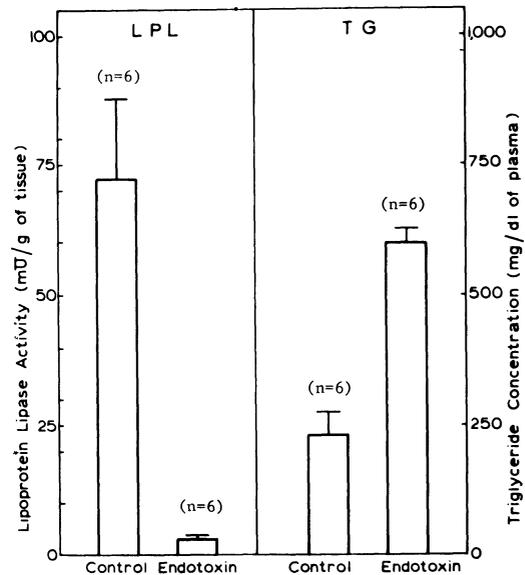


Fig. 1 マウスの血中 T. G. および脂肪組織 LPL に対するエンドトキシンの影響。

C3H/HeN マウスにエンドトキシン (E. Coli 0127: B8) 100 μ g を腹腔内注射し、16 時間後に血中 T. G. およびヘパリン溶液中に抽出される脂肪組織 LPL 活性を測定した。結果はそれぞれ 6 匹の平均 \pm SEM。

* 1983 年 1 月、日本動脈硬化学会 昭和 57 年度冬季大会において発表

** 東京大学医学部第三内科

*** ジョンスホプキンス大学医学部生化学

**** ロックフェラー大学

ファージはエンドトキシンの刺激により LPL の低下をもたらす物質を分泌することが明らかになった。

次に、この物質は、脂肪組織中に混在するマクロファージから分泌されるものが局所的に働くのか、あるいは血液循環を介して全身に働くのかを検討するため、C3H/HeN マウスにエンドトキシンを注射し、その2時間後に採血し、得られた血清をエンドトキシシン抵抗性の C3H/HeJ マウスに注射した。脂肪組織 LPL はエンドトキシシン投与後のマウスから得られた血清を注射した実験群で、食塩水注射後のマウスから得られた血清を注射したコントロール群に比し有意の低下を示した (Fig. 3)。以上から、マクロファージ由来の LPL 活性低下因子はホルモンのように血中に出現し、末梢組織に運ばれて作用すると考えられる。

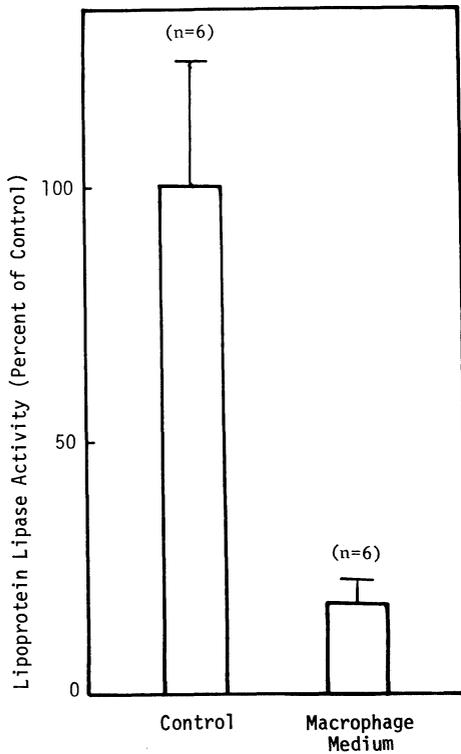


Fig. 2 エンドトキシシン抵抗性マウスの脂肪組織 LPL 活性に対するマクロファージ培養上清の影響。エンドトキシシン存在下 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に培養したマクロファージの培養上清 1 ml を C3H/HeJ マウス腹腔内に注射し、16時間後に脂肪組織 LPL 活性を測定した。結果は 6 匹の平均 \pm SEM。

III. マクロファージ由来 LPL 低下因子の 3T3-L₁ 細胞に対する影響

このマクロファージ由来のホルモン様因子について、3T3-L₁ 細胞を用いた *in vitro* の系でさらに検討を加えた⁷⁾。3T3-L₁ 細胞は、マウスの線維芽細胞からクローン化されたもので、インスリンや糖質コルチコイド等の刺激により著明な脂肪蓄積を持つ細胞に分化する。分化後の細胞は、生化学的、酵素学的にも動物の脂肪細胞と非常に良く似た性質を持ち、LPL 活性の調節も脂肪細胞のそれときわめてよく似ていることが知られている。この細胞にエンドトキシシン刺激後のマクロファージの培養上清を加えると、Fig. 4 にみら

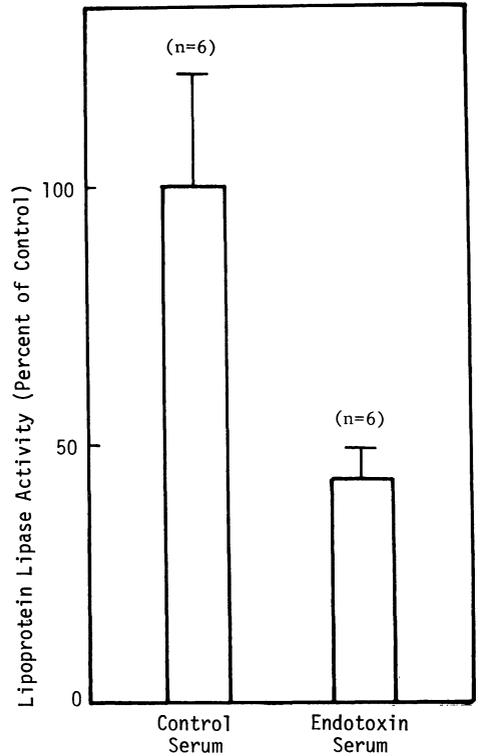


Fig. 3 エンドトキシシン注射後に得られた C3H/HeN マウス血清の C3H/HeJ マウスの脂肪組織 LPL に及ぼす影響。C3H/HeN マウスに 2 μg のエンドトキシシンを腹腔内注射し、2時間後に得られた血清 0.5 ml を C3H/HeJ マウスに注射し、16時間後に LPL 活性を測定した。結果はおのおの 6 匹の平均 \pm SEM。

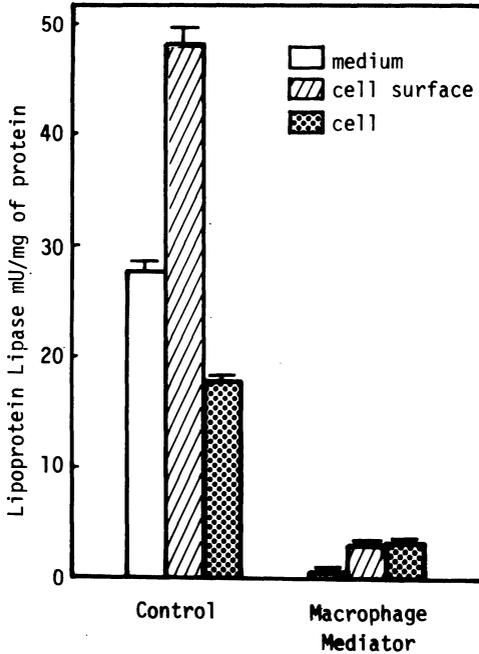


Fig. 4 3T3-L₁ 細胞の LPL に対するマクロファージ培養上清の影響.

3T3-L₁ 細胞の培養液 3.5 ml にマクロファージの培養上清を 1 ml 加え、20 時間培養後、培養液中(白ぬき棒)細胞表面(斜線棒)細胞内(点打ち棒)の LPL 活性を測定した。コントロール群には RPMI-1640 培養液 1 ml をマクロファージ培養上清の代わりに加えた。結果は平均 ± SEM (n=4)。

れるように、LPL はコントロールに比べて著明な低下が見られた。エンドトキシンを加えずに培養したマクロファージの培養上清はほとんど効果が無く、またエンドトキシンそのものを直接 3T3-L₁ 細胞に加えてもほとんど影響はみられなかった。

3T3-L₁ 細胞におけるこのマクロファージ因子による LPL 活性の低下は、「因子」の添加後 1 時間で明らかとなり、約 5 時間でほぼ最大の効果がみられ、少なくとも 20 時間は持続した。また加えたマクロファージ因子と LPL の活性低下の間には Dose-Response の関係がみられた。

IV. マクロファージ由来 LPL 低下因子による LPL 活性低下の機序について

Figure 5 は、マクロファージ因子が直接酵素に働き活性を阻害するかどうかについて検討した結

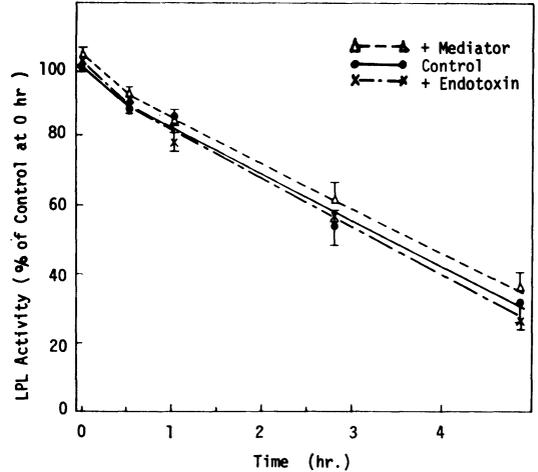


Fig. 5 マクロファージ因子の LPL に対する直接効果. 1 ml の LPL 溶液に 0.2 ml のマクロファージ培養上清を加え、37°C, 5% CO₂ 下でインキュベーション後、LPL 活性を測定した。

コントロール群には同量の RPMI-1640 培養液または 5 μg/ml のエンドトキシンを、マクロファージ培養上清の代わりに加えた。結果は平均 ± SEM (n=6)。

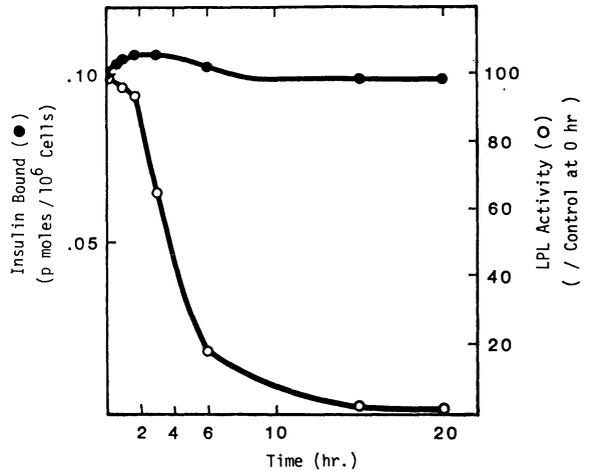


Fig. 6 3T3-L₁ 細胞のインスリン結合能に対するマクロファージ因子の影響.

3T3-L₁ 細胞の培養液 3.5 ml にマクロファージ培養上清 300 μl を加え培養後、3T3-L₁ 細胞表面のインスリン結合能および LPL 活性を測定した。結果は 2 回の実験の平均。

果である。LPL 溶液にマクロファージ因子を加え酵素の活性を測定した。この酵素は比較的不安定で、*in vitro* の溶液中 37°C では、短時間で不活化するが、コントロール群とマクロファージ因子を加えた群の間に活性の差は全く認められず、マクロファージ因子による LPL 活性の低下は、活性の阻害あるいは酵素の崩壊の亢進によるもので無いことが明らかである。前述のごとく、LPL 活性低下のみられるまでには時間単位のインキュベーションを要し、このことを考え合せると、マクロファージ因子は、脂肪細胞における合成また

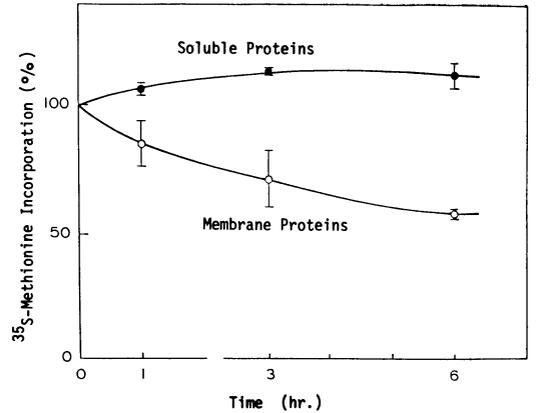


Fig. 7 3T3-L1細胞の蛋白合成に対するマクロファージ因子の影響。

3T3-L1細胞の培養液 3.5 ml にマクロファージ培養上清 300 μl を加え培養後、細胞蛋白を 0.5 mCi の ³⁵S-メチオニンで 1 時間標識した。可溶性蛋白はジギトニン処理にて回収し、膜性蛋白は NP-40 で抽出した。各分画の ³⁵S-メチオニンの蛋白への取り込みは、TCA 沈殿物として測定された(9)。結果は 2 回の実験の平均および範囲。

Table 1 マクロファージ因子による 3T3-L1 細胞の LPL 活性低下に対するインスリンの影響

インスリン	マクロファージ因子*	LPL 活性** mU/mg蛋白		
		培養液	細胞表面	細胞内
50 ng	+	0.3±0.2	1.0±0.2	1.3±0.2
	-	25.2±2.9	68.5±5.4	8.8±0.3
50 μg	+	0.3±0.2	0.9±0.2	0.8±0.1
	-	34.0±5.9	68.2±9.5	11.2±1.2

* 3T3-L1 細胞の培養液 1.5 ml に 100 μl のマクロファージ培養上清 100 μl を加え、表中に示したインスリン濃度下で培養した。

**マクロファージ因子添加 20 時間後に LPL 活性を測定した。結果は平均 ±SEM (n=6)。

Table 2 インスリン結合に対するマクロファージ因子の影響

添加物	インスリン結合/10 ⁶ 細胞 (p moles)
無添加	0.12±0.02
マクロファージ因子 (a)	0.13±0.02
マクロファージ因子 (b)	0.12±0.03

(a) 3T3-L1 細胞の培養液 3.5 ml にマクロファージ培養上清 350 μl を ¹²⁵I-インスリンと同時に加えた。

(b) マクロファージ因子を ¹²⁵I-インスリン添加 30 分前に加えた。

Table 3 3T3-L1 細胞の 2-デオキシブドウ糖摂取に対するマクロファージ因子の影響

インスリン	マクロファージ因子	2-デオキシブドウ糖摂取 (n moles/分/10 ⁶ 細胞)
-	-	0.42±0.03
+	-	0.85±0.06
-	+	0.45±0.02
+	+	0.90±0.03

は分泌機構を阻害することにより LPL の低下をもたらすと考えられる。

さて脂肪細胞におけるリポ蛋白リパーゼ活性にはインスリンとブドウ糖が非常に重要であるので、このマクロファージ因子が LPL の合成を低下するのは、インスリンの作用と競合することによるという可能性が考えられた。そこで 3 T3-L1 細胞に通常の 1,000 倍量に相当する 50 μg/ml のインスリンを加え、マクロファージ因子の効果をみたところ、LPL 活性は高濃度のインスリンの存在下にもかかわらず、著明に低下した (Table 1)。さらに 3T3-L1 細胞のインスリン結合を検討したところ、マクロファージ因子の存在下においても (Table 2)、また因子と数時間のインキュベーション後においても変化がみられず (Fig. 6)⁸⁾、この因子はインスリンのインスリン受容体への結合の阻害も、また受容体の数の減少も起さないことが明らかとなった。3T3-L1 細胞のブドウ糖摂取もこのマクロファージ添加による影響はみられなかった (Table 3)⁸⁾。

以上より、このマクロファージ因子による LPL 活性低下はインスリンのインスリン受容体への結

合,あるいはその後のブドウ糖の取り込みの障害によるもので無いことが示唆された。

V. マクロファージ因子の 3T3-L₁ 細胞における蛋白合成に対する影響

LPL 合成障害の機序をさらに検討するため,脂肪細胞の蛋白合成に対するマクロファージ因子の影響を観察した⁹⁾。Fig. 7 示すように,可溶性蛋白の合成(●—●)はマクロファージ因子添加後むしろ増加するが,細胞膜やミトコンドリア等の膜蛋白の合成は約 50% 低下した。オートラジオグラフィ上,この両分画の蛋白において,ともに 2~3 の蛋白バンドのみに特異的な変化が見られた。このことからリポ蛋白リパーゼの合成低下は,このような選択的な蛋白合成の低下とかわりがあると推測される。

このマクロファージ因子については,なお現在検討中であるが,分子量約 60,000 の蛋白として単離されている。

VI. おわりに

これまで,主に免疫学的な立場からみられていたリンパ球,マクロファージ等の細胞が感染症等,侵襲時において,脂質代謝の調整に重要な役割を演ずるということについて,われわれの得た最近の知見をリポ蛋白リパーゼを中心に述べた。

文 献

1) Gallin, J. I., Kaye, D. and O'Leary, W. M.: Serum

lipids in infection. *N. Engl. J. Med.*, **281**: 1081-1086 (1969).

- 2) Rouzer, C. A. and Cerami, A.: Hypertriglyceridemia associated with *Trypanosoma brucei brucei* infection in rabbits: role of defective triglyceride removal. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2**: 31-38 (1980).
- 3) Sakaguchi, O. and Sakaguchi, S.: Alterations of lipid metabolism in mice injected with endotoxin. *Microbiol. Immunol.*, **23**: 71-85 (1979).
- 4) Kawakami, M. and Cerami, A.: Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J. Exp. Med.*, **154**: 631-639 (1981).
- 5) Ryan, J. L., Glode, L. M. and Rosenstreich, D. L.: Lack of responsiveness of C3H/HeJ macrophages to lipopolysaccharide: the cellular basis of LPS-stimulated metabolism. *J. Immunol.*, **122**: 932-935 (1979).
- 6) Skidmore, B. J., Morrison, D. C., Chiller, J. M. and Weigle, W. O.: Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS). II. The unresponsiveness of C3H/HeJ mouse spleen cells to LPS-induced mitogenesis is dependent on the method used to extract LPS. *J. Exp. Med.*, **142**: 1488-1508 (1975).
- 7) Kawakami, M., Pekala, P. H., Lane, M. D. and Cerami, A.: Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L₁ cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 912-916 (1982).
- 8) Pekala, P. H., Kawakami, M., Vine, W., Lane, M.D. and Cerami, A.: Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator. *J. Exp. Med.*, **157**: 1360-1365, (1983).
- 9) Pekala, P. H., Kawakami, M., Angus, C. W., Lane, M. D. and Cerami, A.: Selective inhibition of the synthesis of the enzymes for de novo fatty acid biosynthesis by an endotoxin-induced, mediator from exudate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2743-2747, (1983).

Summary

Lipoprotein Lipase Suppression in 3T3-L1 Cells by an Endotoxin-induced Mediator from Exudate Cells

Masanobu KAWAKAMI*, Phillip H. PEKALA**,
M. Daniel LANE** and Anthony CERAMI***

*The Third Department of Internal Medicine, University of Tokyo, Hongo Tokyo Japan

**The Rockefeller University, New York, NY USA

***Department of Physiological Chemistry, The Johns Hopkins University School of Medicine,
Baltimore, MD, USA

A variety of invasive stimuli such as bacterial, parasitic infections, tumor and endotoxemia have been shown to induce a suppression of lipoprotein lipase (LPL) resulting in hypertriglyceridemia. In endotoxin-responsive C3H/HeN mice, the LPL activity in adipose tissue was markedly suppressed 16 h after endotoxin administration. In endotoxin-resistant C3H/HeJ mice, the LPL activity was suppressed to a much lesser extent than in C3H/HeN mice. In a remarkable contrast, the blood from C3H/HeN mice obtained 2 h after the injection with endotoxin suppressed LPL activity in adipose tissues for both of C3H/HeJ mice and C3H/HeN mice. Accordingly, a transferable factor capable of suppressing LPL would be secreted into the blood of C3H/HeN mice treated with endotoxin. Conditioned medium from peritoneal macrophages of endotoxin-responsive mice cultured in the presence of endotoxin suppressed adipose tissue LPL in C3H/HeJ mice also. The transferable factor which appeared in blood and suppressed LPL activity, therefore, appeared to be secreted by macrophages in response to endotoxin. In addition, the factor did not directly inhibit LPL activity nor accelerate the rate of decay of LPL. These results have indicated that the factor suppresses LPL activity by inhibiting its synthesis or

processing in the cells.

Employing 3T3-L1 cell culture, the mechanism by which the factor suppresses LPL activity has been studied. The factor suppressed LPL activity in 3T3-L1 adipocyte in culture. In view of the known requirement of insulin and glucose for the maximal expression of LPL activity, the effect of the factor on insulin receptor interaction, the glucose uptake and protein synthesis were studied. Neither insulin binding to insulin receptor nor glucose transport was affected by the factor. However, the incorporation of ³⁵S-methionine into protein in particulate fraction of 3T3-L1 cells decreased by 50% after the cells were exposed to the factor; little change was observed in the incorporation into the soluble fraction. Comparison of the proteins obtained from cells with or without endotoxin treatment on SDS polyacrylamide gel electrophoresis has demonstrated that the factor modulates the synthesis of proteins in both of soluble and particulate fractions in a selective manner.

On the basis of these results, one of the primary effects of the factor seems most likely to be exerted on protein synthesis.

Key words: Hypertriglyceridemia, Infection, Macrophages, Lipoprotein lipase.