

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における
役割に関する研究

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 沢 村 達 也

平成 13 (2001) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における役割-----	1
沢村 達也	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----16

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----20

I. 総括研究報告

酸化LDL受容体LOX-1の動脈硬化における役割

主任研究者 沢村 達也 国立循環器病センター研究所室長

主任研究者が1997年に発見したレクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)の研究を中心に、動脈硬化の病態生理の解明、診断、治療へとつながる基礎的検討を行った。具体的には、構造解析から可溶性のLOX-1の存在を明らかにし、この測定による動脈硬化進行度の診断への可能性を開くとともに、LOX-1リガンドの新たな測定系の開発によりリガンド側からの動脈硬化進行の危険性診断を行える可能性が出てきた。また、LOX-1の発現解析からLOX-1が高血圧や高脂血症で強い発現を示すこと、そしてそれは生体内の酸化ストレスの増大と関連している可能性を明らかにした。さらに、LOX-1自体が酸化ストレスを生み出す元となりうることを示し、老化における重要な因子と考えられてきた酸化ストレスとの強い関係がここに来て明らかとなってきた。また、血小板でのLOX-1の強い発現が明らかとなったことからLOX-1の血栓形成における役割も示唆されており、今後の研究結果が期待される。

A. 研究目的

血管内皮細胞が血液と諸臓器間の単なるバリアーではなく、細胞間、臓器間のインターフェイスとして情報を変換し、アクティブに信号を発するトランスデューサーとして積極的にはたしている細胞である。例えば、エンドセリン、一酸化窒素、プロスタサイクリンのような血管収縮、弛緩因子や種々のケモカイン、白血球接着因子のような他の細胞との相互作用に関わる物質を周囲の状況により様々に変化させながら産生している。そしてこの内皮細胞の性質が生活習慣病を引き起こすような状況下では大きく変化していることがわかっている。特に高脂血症及び動脈硬化症では酸化LDLがこのような内皮細胞の機能変化を引き起こす重要な因子であることがわかってきた。すなわち、酸化LDLは内皮細胞にはたらい、細胞接着因子、白血球遊走因子、細胞増殖因子等の発現誘導、一酸化窒素の放出の抑制などの動脈硬化の成因に重要と考えられる変化を引き起こす。この様な酸化LDLの作用点を明らかにするため、申請者は内皮細胞に発現する酸化LDL受容体をクローニングし、レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)と名付けた。本研究では、LOX-1を同定したことを生かして、動脈硬化症のメカニズムをこの分子を利用してできるだけ多くの側面から明らかにすることを試みる。

これまでの研究でLOX-1が酸化LDLの受容体として、想定されていた機能を果たしているという証拠が集まりつつある。本研究の第1の目的はこれをin vivoのレベルで証明していくことである。第2の目的はLOX-1の酸化LDL受容体活性を利用して生体内の酸化LDLを検出し、これと動脈硬化性疾患の関連を明らかにしていくことである。

一方、脂質代謝とは別のLOX-1の機能が明らかになって来つつあり、単に酸化LDLの受容体にとどまらない多様な機能をLOX-1は持つようである。第3の目的はこの様な機能の解析を進め、動脈硬化で重要とされている炎症的性質、血栓凝固系の異常につ

いての手がかりを得ることである。単一の分子がこの様に動脈硬化の重要な多くの側面に関わっていることは驚くべき事であるが、これまでに得られた予備的な結果はこれを支持している。

本研究により、国民の重要な死亡原因である虚血性心疾患や、脳卒中の基礎的病態である動脈硬化の機構の理解が進み、その予防に向けた新たな対策が可能になることが期待される。

本年度は特にLOX-1そのものの構造、発現調節、LOX-1リガンドを検出する新しい方法の開発についての研究を行い論文発表に至ったので報告する。

B. 研究方法

①可溶型LOX-1の検出

細胞はウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)とウシLOX-1遺伝子をCHO-K1に安定発現させたBLOX-1-CHOを用いた。

immunoblotによって、抗原タンパク質を検出した。細胞を溶かしたものの、及び細胞培養上清を濃縮したものを使ってSDS-PAGEを行い、それをPVDF膜に転写後、各種抗体と反応させた。

sulfo-NHS-LC biotinを使って細胞表面のビオチン化を行い、無血清培地で細胞を24時間培養した後、培養上清を回収してanti-biotin agaroseにて免疫沈降を行った。サンプルは熱変性させてからimmunoblotを行った。

BLOX-1-CHOの培養上清を用いて可溶型LOX-1の精製を行った。培養上清をろ過したものを硫酸アンモニウムで沈殿させ、遠心後沈殿をPBSに溶解した。これをリン酸バッファーで透析し、遠心後上清をQ Sepharose anion exchange columnにかけた。NaClで溶出し、溶出液を濃縮して再度希釈後Mono Q 5/5 ion exchange columnにかけた。NaClのグラジエントで溶出し、可溶型LOX-1を含む分画を得た。これを希釈してMono S 5/5 ion exchange columnにかけて可溶型LOX-1を含む分画を濃縮してから再度希釈して、heparin Sepharose CL-6B columnにかけた。NaClで溶

出し、可溶型 LOX-1 を含む分画を blue Sepharose 6 FF にかけて、NaCl のグラジエントで溶出し精製標品を得た。これをプロテインシーケンサーにかけ N 末端の構造解析を行った。

②遺伝性高脂血症ウサギにおける LOX-1 発現の解析

血清の採取と解析

安楽死前に採血し、血清の総コレステロール量を、酵素法により測定した。

cDNA クローニングと配列解析

出産前の JW ウサギを麻酔し、胎盤を採取した。cDNA 断片を λ gt10 に組み込み、cDNA ライブラリーを構築した。ヒト LOX-1 cDNA の翻訳領域をプローブとしてスクリーニングした。プローブは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP で標識した。ハイブリダイゼーションは 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、1% SDS、1mol/L NaCl、200 μ g/ml yeast RNA で、65°C で 12 時間行った。2 $\times$ SSC、0.1% SDS / 0.1 $\times$ SSC、0.1% SDS で 20 分ずつ洗浄後、-80°C で一晩 X 線フィルムに感光した。open reading frame 全体をカバーする 1.5kb 以上のインサートを含む陽性クローンを pUC18 ベクターと pME18s ベクターにサブクローニングした。塩基配列は dideoxynucleotide chain termination 法で決定した。

酸化 LDL の作製

新鮮ヒト血漿から超遠心により、LDL を得た。7.5 μ M CuSO₄ で 20 時間処理し、LDL の酸化を行った。チオバルビタール酸の反応基質を測定することにより酸化の程度をモニターした。アガロースゲル電気泳動では移動度が増加した。酸化 LDL は DiI で標識した。

ウサギ LOX-1 の一過性発現

ウサギ LOX-1 cDNA を pME18s ベクターにサブクローニングした。リポフェクトアミンを用いて、ウサギ LOX-1 を含むプラスミドと pME18s ベクターをトランスフェクションし、HEK-293 細胞と CHO 細胞に一過性に発現させた。トランスフェクション後 48 時間後に実験に使用した。

DiI 標識酸化 LDL の結合と取り込み

ウサギ LOX-1 をトランスフェクションした HEK-293 細胞、ベクターのみをトランスフェクションした HEK-293 細胞、野生型 HEK-293 細胞を、3 μ g/mL DiI 標識酸化 LDL を含む DMEM/10%FCS で 3 時間処理し、培地で洗浄後、3.7%ホルムアルデヒド/PBS で固定した。蛍光顕微鏡で、DiI 標識酸化 LDL の結合と細胞内取り込みを観察した。

RT-PCR

ウサギ大動脈の組織をホモジナイズし、トリゾール試薬を用いて total RNA を抽出した。ホルムアルデヒド含有 1.0%アガロースゲル電気泳動で確認後、1.0 μ g の total RNA を逆転写し cDNA を合成した。これをウサギ LOX-1 特異的プライマーおよび GAPDH のプライマーを用いて PCR を行い、1.5%アガロースゲルで電気泳動した。バンドの強度は FLA-2000 で読み取り、MacBas V2.5 で解析した。

ウェスタンブロット解析

組織は lysis buffer とともにホモジナイズし、16,000g で 15 分間遠心し分離した。培養細胞は直接

lysis buffer に溶解した。サンプルを 1/6 量の Laemmli buffer に溶解した後、10%SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、polyvinylidene difluoride 膜にプロットし、ブロックエースで一晩処理した。マウス抗 LOX-1 抗体をプローブにし、さらにビオチン化抗マウス IgG 抗体で 1 時間インキュベートし、0.05% Tween/PBS で洗浄した。Vectastain Elite ABC Kit と Immunostain Kit を用いて検出した。

抗ウサギ LOX-1 抗血清

ウサギ LOX-1 の細胞外レクチン様ドメインに一致する cDNA 断片を PCR で増幅し、pQE31 ベクターにサブクローニングし、大腸菌に発現させた。His-tag 融合タンパクを Ni-NTA resin で精製し、モルモットに免疫した。抗血清は 3 度目の注射の 10 日後に回収した。血清の免疫反応性は ELISA で測定した。ウサギ LOX-1 に対する特異性は、ウサギ LOX-1 をトランスフェクションした CHO 細胞の細胞表面に対する結合により確認した。

免疫細胞化学

ウサギ LOX-1 cDNA を CHO 細胞にリポフェクトアミンを用いて一過性にトランスフェクションした。48 時間後細胞を抗ウサギ LOX-1 抗血清で免疫染色した。ベクターのみをトランスフェクションした CHO 細胞、野生型 CHO 細胞も同様に免疫染色した。

免疫組織化学

切開した胸部大動脈弓を冷却 PBS に浸け、外膜を取り除いた。組織を OCT compound で固定し、イソペンタンで急冷した。6 μ m の厚さに連続的に切り取り、オイルレッド O 染色と免疫染色を行った。免疫染色は切片を冷却アセトンで固定後、0.1%BSA/TBS (10%血清) で 30 分間処理し、一次抗体を 4°C で一晩インキュベートした。LOX-1 の発現の検討には、モルモット抗ウサギ LOX-1 抗血清とビオチン化ヤギ抗モルモット IgG 抗体を用いた。内因性のペルオキシダーゼによる影響を防ぐために 0.3%過酸化水素を含むメタノールで処理後、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体を加えた。抗体の結合は 3-amino-9-ethylcarbazole で検出し、切片はヘマトキシリンで対比染色した。内皮細胞への局在は抗 von Willebrand 因子抗体により確認した。RAM11 はマクロファージの染色に用いた。ネガティブコントロールとして、免疫していない動物からの IgG で染色を行った。

③TGF- β による LOX-1 の発現誘導解析

細胞の調製

ウシ大動脈内皮細胞は、ウシ大動脈の内側をかきとることにより単離し、10%(v/v)FBS を含む DMEM で培養した。ウシ大動脈平滑筋細胞は、explant 法により単離し、10%FBS を含む DMEM で培養した。マウスの腹腔マクロファージは、腹腔に 3% thioglycollate broth を 2ml 注射した雌 DDY マウスの腹腔を洗浄して回収した。細胞を、10%FBS を含む DMEM に 3×10^6 cells / mL になるように懸濁し、2 時間インキュベートして接着させた後、PBS で接着していない細胞を洗浄した。その後、一晩インキュベートした。

イムノプロットティング

細胞はPBSで洗浄後、2%SDS、10% glycerol、0.01% bromophenol blueを含む50mM Tris-HCl (pH6.8) bufferで溶解した。等濃度の細胞溶解液を98℃で5分加熱後、10%SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、ニトロセルロース膜にトランスファーした。ブロッッキング試薬(0.1% Tween 20、5% non fat dry milk)に室温で2時間ブレインキュベートした後、ブロットされた膜をマウス抗ウシLOX-1モノクローナル抗体に室温で2時間インキュベートし、ブロッッキング試薬で2回洗浄した。さらに、horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体に室温で1時間インキュベートした後、0.04%Tween / PBSで2回洗浄し、ECL 試薬で検出した。LOX-1 のタンパク量の分析には NIH Image を用いた。

ノザンブロッティング

細胞の total RNA は TRIZOL 試薬で抽出した。等量の total RNA をホルムアルデヒド含有1%アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーを用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP で標識した、ウシ LOX-1 cDNA の XhoI / PstI フラグメントまたはマウス LOX-1 cDNA の XhoI フラグメントで、膜をハイブリダイズした。LOX-1 の mRNA 量の分析には NIH Image を用いた。

④Redox 感受性の LOX-1 発現調節の解析

動物

7週令の雄 SD ラットに Angiotensin II を静脈内持続注入した。ポンプは右頸動脈に挿入したカテーテルと接続した(200ng/kg/min)。対照ラットにも同様の処理を行い、生理食塩水を持続注入した。Angiotensin II を循環する間、一部のラットには AT1 受容体アンタゴニスト TCV116 (10mg/kg/day) を経口投与、また、Tempo(1.5mmol/kg/day)を腹腔内投与した。注入から10日後、収縮期血圧を測定した。その後、ラットを断頭し、大動脈を採取し液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。

スーパーオキシドアニオン産生の測定

スーパーオキシドアニオン産生は、MCLA の化学発光を測定することにより定量した。キサンチンオキシダーゼ(10^{-7} – 10^{-3} U/ml)が、ヒポキサンチン(1mM)を含むフェノールレッドフリーのDMEMに加えられた。1分間ベースラインを記録後、MCLA(終濃度4 μ M)を反応液に加えた。全反応は37℃において行った。チトクロームc還元酵素法をもちいて、既知量のキサンチンオキシダーゼとヒポキサンチンから検量線を作成した。第二鉄チトクロームc(10 μ M)の還元は550nmで測定した。スーパーオキシドアニオンの濃度は還元型第二鉄チトクロームcのモル吸光度係数を用いて算出した。

RNAの単離とノザンブロッティング

大動脈から取り出したRNAは、ホルムアルデヒド含有1%アガロースゲルで分離し、ナイロン膜にトランスファーした。 ^{32}P でラベルした LOX-1 のプローブの50%ホルムアルデヒド溶液に、42℃で膜をハイブリダイズさせ、さらに、 β -actin または GAPDH のプローブでもハイブリダイズさせた。バンドの定量は PhosphorImager SI を用いて行った。

免疫組織化学

大動脈は4%パラホルムアルデヒドで固定した。厚さ8 μ mの凍結切片は抗rat LOX-1抗血清(1:2000)でインキュベートしたあと、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、ペルオキシダーゼ標識アビジン-ビオチン複合体で処理した。

⑤酸化 LDL による LOX-1 を介した活性酸素種産生の解析

LDL の分離と酸化および修飾

12 時間以上絶食した健常者より EDTA 採血(1mg/ml)し、2000rpm、20min、4℃で遠心し NaBr 法による LDL 分離を行った(密度1.019-1.063g/ml)。分離した LDL は PBS に溶解させた状態でもちいた。酸化 LDL は硫酸銅を用いた方法で作製し5 μ M 硫酸銅中 LDL 1.7mg/ml の濃度中18時間37℃でインキュベートした。得られた酸化 LDL はチオバルビツール酸反応によって酸化の度合いを確認した。マロンジアルデヒド修飾 LDL(MDA-LDL)は Fogelman らの方法(1988, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.)による。アセチル化 LDL は LDL に無水酢酸をくわえる方法による。

細胞

ウシ血管内皮細胞(BAEC)は牛の大動脈の内側表面をカバーグラスで擦り取り、DMEM-10%非働化FBS中37℃、5%CO₂条件下で培養した。実験には継代2~6回目のものを使用した。BAEC はゼラチンコートしたマルチウェルプレートにまき、三日間培養した。細胞の生存の割合を確認するためヘキサミンダーゼ(細胞を可溶化したとき出される細胞内酵素)を測定した。チャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO-K1)とウシ LOX-1 安定発現型細胞は F-12 培地-10%FBS 中、37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。安定発現型細胞の方の培地にはプラストサイジン(5 μ g/ml)を加えた。

DCFH-DA を使った細胞内活性酸素種(ROS)産生物の検出

DCFH-DA をダイとして用いることで細胞内の ROS 産生をフローサイトメトリーをもちいてモニタリングした。これは ROS による DCFH-DA の酸化によって蛍光物質 2', 7'-ジクロロフルオレセイン (DCF) が形成されることに基づく。DCFH-DA は細胞内エステラーゼにより非蛍光物である DCFH に分解され、細胞内に蓄積する。ROS が存在するときは DCF へと酸化される。BAEC を 24 ウェルプレート中 DMEM-10%FBS-10 μ M DCFH-DA で 45 分間インキュベートする。酸化 LDL, LDL, アセチル LDL, MDA-LDL を培地中に加え 37℃、5 分置く。PBS で洗った後に細胞を 0.01%トリプシン/EDTA ではがし DMEM-2%FBS 2ml を加え、氷上に置く。サンプルは BSA を加えた PBS で 2 回洗浄した後フローサイトメトリーで 7000 細胞/サンプルを解析した。DCFH の酸化が ROS 産生によるものであること確認するため数種のラジカールスカベンジャーを用いて調べた。

過酸化水素およびスーパーオキシドアニオンの検出

BAEC について過酸化水素およびスーパーオキシドアニオンの産性量を調べた。培地中への過酸化水素の放出は蛍光を用いた方法で検出し、スーパーオキシドアニオンはシトクロム C の減少による光

度測定により検出した。

BAEC および BLOX-1-CHO と酸化 LDL の特異的結合

酸化 LDL を蛍光物質 di-15-ASP でラベルしたものをもちいた。酸化 LDL (1.2mg/ml) 900 μ l を 4℃ で di-15ASP (7.5 $\times$ 10⁻⁵M) とオーバーナイトでインキュベートした。PD-10 セファデックス G-25M カラムでフリーの di-15-ASP を除いた。BAEC または BLOX-1-CHO とラベルした酸化 LDL (2-128 μ g) を 2 時間、4℃ でインキュベートした。非特異的な結合は 100 倍量の非標識酸化 LDL を入れることによって測定した。2 時間のインキュベートの後細胞を PBS で洗浄し、0.01% トリプシン/EDTA ではがし DMEM-2%FBS 2ml を加え、氷上に置く。サンプルは BSA を加えた PBS で 2 回洗浄した後フローサイトメトリーで 10,000 細胞/サンプルを解析した。

BAEC および BLOX-1-CHO との di-15-ASP の結合阻害

BAEC および BLOX-1-CHO を 24 ウェルプレート中 6.25 μ g の di-15-ASP ラベル酸化 LDL と 2 時間、4℃ で数種の阻害剤とともにインキュベートした。100 倍量の酸化 LDL, MDA-LDL, アセチル化 LDL, LDL, poly I(250 μ g/ml), フコイジン(250 μ g/ml)などをもちいた。2 時間のインキュベートの後、di-15-ASP ラベル酸化 LDL を上記のようにして測定した。抗 LOX-1 抗体(30 μ g/ml)またはコントロールの IgG も培地に加えても実験した。

ゲルシフトアッセイ

2 重鎖 NF- κ B オリゴヌクレオチドを T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてラベルした。核抽出液(7 μ g)をバッファー (4 μ g poly(dI-dC)、2 μ g サケ精子 DNA、17mM Tris-HCl(pH7.5)、7mM KCl、0.1% NP-40、1mM EDTA、1mM DTT、4% グリセロール) 中で ³²P-NF- κ B オリゴヌクレオチド (~400,000cpm) と加えた (18 μ l)。DNA-たんぱく質複合体を 5% ポリアクリルアミドゲルで 13V/cm、75 分間、バッファー (45mM Tris bolate, 1mM EDTA(pH8.0)) 中で泳動した。ゲル乾したのち Kodak BioMax MS-1 フィルムに感光させた。特異的 NF- κ B 活性を見るためには 50 または 100 倍量の非標識オリゴヌクレオチドを標識オリゴと反応させる前に 45 分間反応させておいた。また 2-4 μ g の NF- κ B p50 と NF- κ B p65(C-20 タイプ)抗体を標識オリゴを加える 1 時間前に反応させておいた。

⑥酸化 LDL による血管内皮細胞内 NO 濃度低下メカニズムの解析

LDL の分離と酸化および修飾

12 時間以上絶食した健常者より EDTA 採血 (1mg/ml) し、2000rpm、20min、4℃ で遠心し NaBr 法による LDL 分離を行った (密度 1.019-1.063g/ml)。分離した LDL は PBS に溶解させた状態でもちいた。酸化 LDL は硫酸銅を用いた方法で作製し 5 μ M 硫酸銅中 LDL 1.7mg/ml の濃度中 18 時間 37℃ でインキュベートした。得られた酸化 LDL はチオバルビツール酸反応によって酸化の度合いを確認した。マロンジアルデヒド修飾 LDL(MDA-LDL)は Fogelman らの方法 (1988, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.) による。アセチル

化 LDL は LDL に無水酢酸をくわえる方法による。細胞

ウシ血管内皮細胞 (BAEC) は牛の大動脈の内側表面をカバーガラスで擦り取り、DMEM-10%非働化 FBS 中 37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。実験にはパッセージ 2~6 回目のものを使用した。BAEC はゼラチンコートしたマルチウェルプレートにまき、三日間培養した。細胞の生存の割合を確認するためヘキサミンダーゼ (細胞を可溶化したとき出される細胞内酵素) を測定した。チャイニーズハムスターの卵巣細胞 (CHO-K1) とウシ LOX-1 安定発現型細胞は F-12 培地-10%FBS 中、37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。安定発現型細胞の方の培地にはプラストサイジン (5 μ g/ml) を加えた。

細胞内活性酸素種 (ROS) 産生物およびスーパーオキシドアニオンの検出

細胞内 ROS 産生は DCFH-DA の酸化をフローサイトメトリーでモニターする Royall の方法 (1993, Arch. Biochem. Biophys.) でおこなった。細胞内のスーパーオキシドアニオンの検出はスーパーオキシドアニオンの酸化による hydroethidine(HE)のエチジウムへの変換をフローサイトメトリーで検出した。培地への過酸化水素の流出は蛍光を用いた方法で、スーパーオキシドアニオンの量はシトクロム C の減少による光度測定により検出した。

BAEC を 24 ウェルプレートに DMEM-10%FBS 中、10 μ M DCFH-DA または 1 μ M HE とともに 20 分間インキュベートする。50-150 μ g/ml の酸化 LDL, LDL, アセチル化 LDL, MDA-LDL をそれぞれ 5 分間、5mM アルギニンおよび 3 μ M tetrahydrobiopterin(TB4)とともに加える。BSA 入り PBS で 2 回洗浄後に 7000 細胞/サンプルをフローサイトメトリーで解析した。反応特異性を見るために 5 μ M ビタミン C、trolox、プロブコール、LOX-抗体とそのコントロールとして正常マウス抗体を BAEC, CHO-K1, BLOX-1-CHO とインキュベートした。酸化 LDL を加えた後、スーパーオキシドアニオンの産生にかかわる経路を調べるために、BAEC を L-N-monomethyl arginine(L-NMMA)200 μ M および L-N-arginine methyl ester (L-NAME) 200 μ M、アロプリノール 500 μ M、アスピリン 100 μ M、ジフェニレンイオジウム (DPI) 5 μ M とそれぞれ 30 分間、37℃ で 5mM アルギニンと 3 μ M TB4 とインキュベートした。酸化 LDL, LDL, アセチル化 LDL, MDA-LDL とインキュベートしたときの細胞の生存率は 95% 以上であった。

NO の測定

DAF-2 DA はフローサイトメトリーによって、生理的条件下で NO を直接検出する蛍光試薬である。BAEC を 24 ウェルプレート中、KRP(NaCl 120mM, KCl 4.8mM, CaCl₂ 0.54mM, MgSO₄ 1.2mM, グルコース 11mM, Na₃PO₄ 15.9mM, pH7.2)に 10 μ M DAF-2 DA をくわえて 37 度、10 分間インキュベートした。そのとき細胞を 100nM プラジキニン、150mM トロンビンで 5 分間 5mM アルギニン、3 μ M TB4 とともにインキュベートした。DAF-2DA を加えた後、NO に依存して蛍光が得られていることを確認するため L-, D-NMMA 200 μ M を DAF-2DA と NO のアゴニストを加える 30 分前に BAEC とプレインキュベ

トとした。BSA 入り PBS で 2 回洗浄後に 7000 細胞/サンプルをフローサイトメトリーで解析した。酸化 LDL の細胞内 NO 濃度にあたえる影響についてみるため 50-150 $\mu\text{g/ml}$ の酸化 LDL, LDL, アセチル化 LDL, MDA-LDL を BAEC に 0.5-15 分間、5mM アルギニン、3 μM TB4 を加えた後インキュベートした。酸化 LDL の細胞内 NO 濃度にあたえる影響が ROS 産生に依存しているのかについてしらべるためビタミン C、LOX-1 抗体とそのコントロール抗体を上記条件で用いた。

eNOS 活性の測定

BAEC の可溶液を氷冷した可溶化バッファー (0.3M シュウクロース、10mM HEPES, 1% NP-40, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 10 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、2 $\mu\text{g/ml}$ アプロチニン、10 $\mu\text{g/ml}$ トリプシンインヒビター、50 μM PMSF, pH7.4) に溶かしボルテックスをかけた。細胞溶解液 (150-250 μg) を NADPH (2mM), CaCl_2 (230 μM), TB4 (3 μM) と ^3H -アルギニン (0.2 μCi , 10 μM) に混合して 20 分間 37°C でおいた。アッセイの容量は 100 μl にしている。酸化 LDL が iNOS 活性に影響を与えるか見るために、アッセイバッファー中のカルシウムを EDTA (1.7mM) に置き換えたものについてアッセイした。

⑦ LOX-1 を利用した血漿中 LOX-1 リガンドの定量、および動脈硬化巣内の LOX-1 リガンドの検出

リポ蛋白質の調整

ヒトおよびウサギの LDL ($d=1.019-1.063$) は超遠心法により血漿から分離した。LDL の酸化は 37 度で 16 時間 7.5 μM の CuSO_4 と 3mg protein/ml の濃度で incubate する事により行った。調整した酸化 LDL の TBARS 値はヒトで 10.7nmol/mg protein、ウサギで 5.8 nmol/mg protein。LDL と比較した REM 値はヒトで 3.25、ウサギで 2.25 であった。

酸化の程度を変えた酸化 LDL は 200 μg protein/ml の LDL 濃度で 5 μM の CuSO_4 と 1、3、6、12、24 時間 37 度で incubate することにより行った。

アガロース電気泳動と Western blot 解析

2 μg のリポ蛋白質を 0.45% のアガロースゲルにて 40V で 3 時間、50mM のバルビツール酸バッファー (pH8.6) 中で分離した。さらに同じバッファー中で 140mA で 1 時間電気泳動的にナイロン膜上に転写した。分離、転写されたリポ蛋白は Fat Red7B、抗 apoB 抗体、LOX-Fc により検出した。

LOX-1 リガンド活性検出のための enzyme immunoassay (EIA)

0.5 $\mu\text{g/ml}$ の LOX-Fc あるいはヒト IgG を 96-well プレートに固相化し、25%(v/v) のブロックエースでブロッキングを行った。サンプルか酸化 LDL の標準液を 0.1ml 加え 4 度で overnight の incubation を行った。PBS でプレートを洗浄後、peroxidase 結合抗 apoB 抗体を加えて 2 時間室温で incubate した。PBS でさらに洗浄し、o-phenyldiamine を発色剤として peroxidase の反応を起こさせ、2M の硫酸で反応を停止した後、490nm の吸光度を測定した。LOX-Fc へのサンプルの特異的結合は、LOX-Fc を用いたときの値からヒト IgG を用いた時の値をひくことにより算出した。

ヒト apoB に対する Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

リポ蛋白質を 96-well プレートに固相化し、ブロックエースでブロッキングを行った後、peroxidase 結合抗 apoB 抗体を加えて 2 時間室温で incubate した。PBS でさらに洗浄し、o-phenyldiamine を発色剤として peroxidase の反応を起こさせ、2M の硫酸で反応を停止した後、490nm の吸光度を測定した。

LOX-Fc を用いた免疫組織化学

12 週令のワタナベウサギと対照の日本白色種のウサギの大動脈を取り出し、凍結、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色、Oil Red O による染色を行った。また、ビオチン化した LOX-Fc および抗ヒト apoB 抗体、抗マクロファージモノクローナル抗体 RAM11、抗平滑筋モノクローナル抗体 1A4 をもちいてアビジン-ビオチン複合体形成を利用した horseradish peroxidase による染色を行った。

⑧ 活性化に伴う LOX-1 のヒト血小板表面上への発現

酸化 LDL の調製

ヒト血漿を超遠心分離機にかけヒトの LDL (密度は 1.019-1.063) を分離し、 Cu^{2+} により LDL を酸化した。酸化の度合いはチオバルビツール酸化法により定量した。調製した酸化 LDL の TBARS 値は約 10 nmol malondialdehyde 当量/mg protein であった。酸化 LDL の蛍光標識には Dil を用いた。

ヒト血小板の調製

健常者から 3.8%(w/v) クエン酸採血を行いこれより調製した。platelet-rich plasma (PRP) は常温で 200g、10 分の遠心分離にかけることにより調製した。これを 10% ACD 緩衝液 (0.8% citric acid, 2.2% sodium citrate, 2.4% dextrose) 中 1000g、15 分間遠心分離し血小板の沈殿させた。ペレットを Tyrodo's 緩衝液 (Ca^{2+} -free) で 2 回洗い再懸濁した。残りの血小板は PGE_1 (5.6 $\mu\text{mol/L}$) を加えて調製した。活性化の実験時には PGE_1 を使用せずに行い、0.1U/ml のトロンビンと Tyrodo's 緩衝液 (1mmol/L CaCl_2 含) 中 15 分間室温でインキュベートさせた。血小板の凝集を防ぐために抗ヒト CD41a モノクローナル抗体 HIP8 (Pharmingen) を 1 $\mu\text{g/ml}$ を加えた。インキュベーション後血小板は 1% の paraformaldehyde で 10 分間固定後、洗浄し 0.2% の BSA を含む PBS で再懸濁した。

ヒトの単球、リンパ球、好中球の単離

ヒト末梢血単核細胞 (単球、リンパ球) は Ficoll-Paque (Pharmacia 社) により分離した。赤血球 1.2%(w/v) のデキストラン 500 で沈殿させ取り除いたのち、Ficoll-Paque により好中球を単離した。

細胞培養

ヒト巨核球細胞系 HEL, MEG-01, MEG-01s, は RPMI 1640-10% FCS で培養した。HEL 細胞は 48 時間 1.25%(v/v) の dimethyl sulfoxide (DMSO) で刺激し分化させた。

RNA の調整、RT-PCR 法、Southern blot 法による解析

細胞から分離した total RNA を 50 μL 反応溶液中で cDNA へ逆転写反応を行った。次に LA-Taq

DNA-polymerase (Takara) によりヒト LOX-1 cDNA 特異的プライマーを用いて反応させ、ヒト LOX-1 の mRNA を検出した。PCR は 94℃ で 40 秒間、56℃ で 1 分間、68℃ で 1 分間、35 サイクル行った。PCR 産物をナイロンメンブレン (Biodyne) にトランスファーし [α - 32 P]dCTP 標識ヒト LOX-1 cDNA プローブとハイブリダイズさせた。

Western blot 法と ligand blot 法

血小板および他の細胞を lysis buffer (10mmol/L Hepes, 137mmol/L NaCl, 2.9mmol/L KCl, 12mmol/L NaHCO₃, 25mmol/L deoxycholic acid (1%), 7mmol/L SDS (0.2%), protease inhibitors cocktail tablets (Boehringer), 1% Nonidet P-40) に溶かした。この溶液を 16000g で 4℃、30 分間遠心分離し、上清をそれぞれ等量ずつ 10% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動を行い、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon, Millipore) にブロッティングした。この膜をウス抗ヒト LOX-1 モノクローナル抗体またはマウス抗ヒト CD36 抗体 (MCA1214, Serotec) により LOX-1 および CD36 を検出した。Ligand blot 法を行うにあたってはメンブレンは酸化 LDL (10 μ g/ml) を加えたものと加えないものとで、室温にて 3 時間 binding buffer (50mM Tris/HCL, 5% BSA, 50mM NaCl, 1mM KI, 2mM CaCl₂, pH 8.0)、10% newborn calf serum (NBCS, Gibco) 中でインキュベーションした。メンブレンを 2 回同緩衝液で洗い、結合した ligand をペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト ApoB (The binding site, UK)、Konica Immunostain Kit (Konica, Japan) で検出した。

ヒト LOX-1 に対するブロッキング抗体の作製

ヒト LOX-1 安定発現 CHO 細胞 (HLOX-1-CHO) を抗原としてヒトイムノグロブリン遺伝子トランスジェニックマウスに免疫した。ハイブリドーマを調製し、HLOX-1-CHO 細胞との抗原抗体反応によりスクリーニングした。さらに抗体によりヒト LOX-1 を発現した細胞での DiI で標識された酸化 LDL の取りこみがブロックされることを確認した。得られたクローン、JTX68 は LOX-1 の活性を調べるのに使った。

フローサイトメトリー

血小板を pH 7.2 の 1% paraformaldehyde-PBS 溶液で固定し 0.2% BSA を含む PBS で 2 回洗った。fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD41 抗体 (HIP8, Pharmingen) で染色し血小板の検出に用いた。血小板懸濁液をマウス 抗ヒト LOX-モノクローナル抗体 (JM-90, humanized IgG) 10 μ g/ml で 4℃、1 時間インキュベートした。Cy3 標識ヤギ抗ヒト IgG (Amarsham) を二次抗体として 1/400、4℃で 30 分間反応させた。同様にしてマウス抗ヒト CD62P 抗体 (CLB-Thromb/6, Immunotech) および FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes) でインキュベーションした。染色血小板は 2 回 PBS で洗浄し、1% の paraformaldehyde で固定し FACSscan (Becton-Dickinson) で解析をおこなった。

酸化 LDL のヒト血小板への結合

活性化および非活性化ヒト血小板 (細胞数 5×10^6 個) を 10% の NBCS を加えた Tyrode's 緩衝液中 10 μ g/ml DiI 標識酸化 LDL で室温にて 3 時間インキュベーションした。PBS-0.2% BSA で 2 回洗浄した後、

3000rpm で 10 分の間遠心分離し血小板を回収した。結合した酸化 LDL の定量は DiI 標識酸化 LDL の蛍光活性を測定した。CD36 ブロッキング抗体 (FA6-152, 2 μ g/ml) および LOX-1 ブロッキング抗体 (JM-90, 10 μ g/ml)、コントロール IgG それぞれは DiI 標識酸化 LDL を反応させる前に添加した。非特異的結合は 100 倍過剰量の標識されていない酸化 LDL を加えることによって調べた。

免疫組織染色

不安定型狭心症患者の冠動脈から動脈内膜切除術によりヒト組織試料を得て凍結し、6 μ m の厚さの切片を作製した。抗 LOX-1 モノクローナル抗体 (JTX68)、抗 GP IIb モノクローナル抗体 (5B12, DAKO) により免疫染色した切片を streptavidin-biotin complex および horseradish peroxidase を用いた染色をおこなう。horseradish peroxidase は 3-amino-9-ethylcarbazole により発色させ、ヘマトキシリンによる対比染色を行った。また biotinylated 抗 LOX-1 抗体と抗 GP IIb による二重染色法ではアルカリホスファターゼは fast blue BB (blue) によりペルオキシダーゼは 3-amino-9-ethylcarbazole (red) により発色させた。

C. 研究結果

①可溶型 LOX-1 の検出

immunoblot によって、培養上清中の可溶型 LOX-1 の検出を行った。TNF- α で刺激した BAEC の培養上清中には、分子量 35kDa の可溶型 LOX-1 が検出された。しかし、TNF- α で刺激しない場合には検出できなかった。また、この可溶型 LOX-1 の産生量は、TNF- α の濃度、及び TNF- α 存在下での培養時間に依存的に増加した。一方、BLOX-1-CHO の培養上清中にも分子量 35kDa の可溶型 LOX-1 が検出され、TNF- α で刺激した BAEC よりも産生量が多かった。

次にこの可溶型 LOX-1 がどのようにして作られるのかについて検討した。BLOX-1-CHO の細胞表面をビオチン化してから培養上清を anti-biotin agarose で免疫沈降させ、Western blotting によって解析した。この結果、LOX-1 抗体を用いた場合でも、HRP 標識した streptavidin を用いた場合でも、35kDa のバンドが検出された。これにより、培養上清中の可溶型 LOX-1 は細胞表面にある LOX-1 から切り出されて出来たものであることが判明した。また、BLOX-1-CHO の培養上清中の可溶型 LOX-1 の産生は、セリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF によって抑制されるため、細胞表面からの可溶型 LOX-1 の切り出しはプロテアーゼによるものだと考えられた。

最後に可溶型 LOX-1 の精製と構造解析を試みた。精製は産生量が多い BLOX-1-CHO の培養上清を用いて行った。培養上清中のタンパク質を硫酸アンモニウムで沈殿させて濃縮し、リン酸バッファーで透析を行ってから Q Sepharose anion exchange column にかけて、NaCl で溶出した。さらにその溶出液を Mono S 5/5 ion exchange column、heparin Sepharose CL-6B column、blue Sepharose 6 FF の順にかけて精製した。それぞれのカラムの溶出液をサンプルとして SDS-PAGE を行ったところ、最後の blue Sepharose 6 FF の溶出液では単一のバンドが検出でき、可溶型 LOX-1

を精製することが出来た。これを使って可溶性 LOX-1 の N 末端の構造解析を行った。プロテインシーケンサーにかけたところ、N 末端のアミノ酸として SAQES、SEKSA の 2 種類が得られ、これはそれぞれ、LOX-1 の 87 から 91 番目と 90 から 94 番目に相当した。この結果、培養上清から精製した可溶性 LOX-1 は、86 番目の Arg と 87 番目の Ser の間で切れるものと、89 番目の Lys と 90 番目の Ser の間で切れるものの 2 種類が存在することがわかった。

②遺伝性高脂血症ウサギにおける LOX-1 発現の解析

ウサギ LOX-1

ウサギ胎盤の cDNA ライブラリーからヒト LOX-1 の翻訳領域をプローブに用いてスクリーニングを行った。得られた陽性クローンを解析し、配列を決定した。今までに得られた種のものと比較するとウサギ LOX-1 はヒトのものとかかなり高いホモロジーが見られる(76%、ウシとは 72%)。その構造は N 末端から順に細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、頸部ドメイン、レクチン様ドメインの 4 つのドメインからなっている。

次にウサギ LOX-1 を組み込んだプラスミドをトランスフェクションした HEK-293 細胞を用いてウェスタンブロット解析を行なったところおよそ 45kDa のバンドが確認され、アミノ酸配列から予想された分子量より大きいことから糖鎖による修飾をうけていると考えられる。また Dil-OxLDL の取り込みをみるとウサギ LOX-1 をトランスフェクションした HEK-293 細胞は高い取り込み活性を示したことから、酸化 LDL 受容体の機能が確認された。

WHHL ウサギの大動脈での LOX-1 の発現

はじめに 8 週令の WHHL ウサギと同じ 8 週令の JW ウサギの血清中の総コレステロール量を測定したところそれぞれ $24.2 \pm 1.1 \text{ mmol/L}$ 、 $1.2 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$ であり WHHL ウサギのほうが顕著に高かった。次にそれらの大動脈を取り出して RT-PCR およびウェスタンブロット解析により LOX-1 の発現を解析した。RT-PCR の結果 JW ウサギに比べ WHHL ウサギの大動脈では LOX-1 の発現が亢進していることがわかった。ウェスタンブロット解析においても同様の結果が得られ、遺伝子ならびタンパク質両方において WHHL ウサギの大動脈のほうが LOX-1 の発現が亢進していた。しかし大動脈から内皮細胞を除いたものについて同様の解析を行なうと LOX-1 の発現量は減少してしまった。

WHHL ウサギの初期病変における LOX-1 の局在

抗ウサギ LOX-1 抗血清による免疫染色によって大動脈における LOX-1 の局在を調べてみた。用いた抗血清によりウサギ LOX-1 をトランスフェクションした CHO 細胞を免疫染色してその特異性を確認した。動脈硬化に至らない JW ウサギでは LOX-1 の発現を検出できなかったのに対し、WHHL ウサギでは動脈硬化初期病変部位の内膜において LOX-1 の強い発現が見られた。しかも WHHL ウサギにおいて、内皮細胞とマクロファージともに LOX-1 を発現しているが、内皮細胞のほうが抗 LOX-1 抗血清で比較的強い染色がみられた。また Oil Red O による染色やマクロファ

ージの沈着の見られないような動脈硬化病変に至らない部位での内皮細胞でも LOX-1 の発現が検出された。これらのことから LOX-1 は動脈硬化初期病変に局在することおよび病変に至る前に高脂血症の状態で LOX-1 の発現が亢進することが示唆された。

③TGF- β による LOX-1 の発現誘導解析

血管内皮細胞および血管平滑筋細胞における TGF- β_1 による LOX-1 発現誘導

TGF- β_1 がタンパク質レベルで LOX-1 の発現を誘導するかどうかを調べるために、ウシ大動脈内皮細胞とウシ大動脈平滑筋細胞で、イムノブロッティングを行った。両細胞において TGF- β_1 処理により LOX-1 タンパク質の発現が亢進し、TGF- β_1 濃度 1 ng/mL でピークに達することが示された(ウシ大動脈内皮細胞では 4.2 倍、ウシ大動脈平滑筋細胞では 2.8 倍)。TGF- β_1 による LOX-1 タンパク質の発現は 4 時間以内に検出でき、20 時間後も増加したままであった。TGF- β_1 による LOX-1 タンパク質の発現誘導は LOX-1 mRNA によるかどうか検討するために、ノザンブロッティングを行った。TGF- β_1 処理により LOX-1 mRNA 量が増加した(TGF- β_1 濃度 1 ng/mL において、ウシ大動脈内皮細胞では 4.9 倍、ウシ大動脈平滑筋細胞では 3.0 倍)。LOX-1 mRNA レベルの増加は 2 時間以内に検出でき、12 時間後も増加したままであった。

RNA の de novo 合成を介した TGF- β_1 による LOX-1 発現誘導

TGF- β_1 による LOX-1 の発現誘導は、LOX-1 遺伝子の転写亢進によるものかどうかを調べるために、RNA の de novo 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を TGF- β_1 処理の 30 分前にウシ大動脈内皮細胞とウシ大動脈平滑筋細胞に加えた。アクチノマイシン D の前処理は TGF- β_1 による LOX-1 mRNA の発現誘導を完全に阻害した。これらの結果から、TGF- β_1 は LOX-1 遺伝子の転写を亢進するのではないかと示唆される。

マウス腹膜マクロファージにおける TGF- β_1 による LOX-1 mRNA 発現誘導

TGF- β_1 がマクロファージにおいても LOX-1 の発現を誘導するかどうかを調べるために、ノザンブロッティングが行われた。TGF- β_1 はマウスの腹腔マクロファージにおいて用量および時間依存的に LOX-1 mRNA レベルを亢進させる。 10 ng/mL TGF- β_1 で 4 時間処理することにより、LOX-1 mRNA レベルが 4.7 倍に上昇した。これらの結果よりマクロファージにおける LOX-1 の発現もまた TGF- β_1 により誘導されることが示された。

④Redox 感受性の LOX-1 発現調節の解析

培養血管内皮細胞における LOX-1 遺伝子発現への活性酸素種の影響

我々はまずスーパーオキシドによる LOX-1 遺伝子の調節を検討した。ヒポキサンチンの存在下、キサンチンオキシダーゼがフリーラジカルを産生することが知られている。予備実験において、MCLA の化学発光による方法でヒポキサンチン(1 mM)とキサンチンオキシダーゼ($10^{-7} - 10^{-3} \text{ U/ml}$)から発生するスーパーオキシド量を測

定した。10⁻⁴U/ml 以上のキサンチンオキシダーゼから発生するスーパーオキシド量は検出可能であった。ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼで培養血管内皮細胞を6時間処理すると、スーパーオキシド発生と平行して、LOX-1 mRNA の発現が用量依存的に増加した。この増加は一時的であり、刺激後3時間でピークに達する。スーパーオキシドそのものが LOX-1 の発現を亢進させるのかどうかを確かめるために、膜透過性 SOD 様物質である Tempo(1mM)を刺激12時間前に加えた。ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼによるβ-actin mRNA と比較した LOX-1 mRNA の増加は、Tempo が存在しないとき 138±16%であるのに対し、Tempo が存在するとき 4±7%に抑えられた。ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼに誘導される LOX-1/β-actin 比は、10mM NAC の前処理でも抑えられた。また、培養血管内皮細胞を H₂O₂ (10⁻⁷–10⁻⁴M) で6時間前処理することにより、濃度依存的な LOX-1 mRNA の増加が引き起こされた。

培養血管内皮細胞の LOX-1 発現におけるホモシステインの影響

培養血管内皮細胞をホモシステインで6時間前処理すると、濃度依存的に LOX-1 mRNA 発現が亢進した。このホモシステインによるアップレギュレーションは時間依存的で、3時間がピークであった。酸化ストレスの影響を調べるために、NAC の存在下において細胞をホモシステインで刺激した。ホモシステインにより引き起こされる LOX-1 mRNA/β-actin mRNA 比の増加は、12時間の NAC 前処理により抑えられた。

Angiotensin II -高血圧ラット大動脈における LOX-1 の発現と阻害剤の影響

我々は Angiotensin II -高血圧ラットを作製し、大動脈における LOX-1 の発現を調べた。Angiotensin II を環流したラットの一部分には、AT1 受容体アンタゴニストまたは抗酸化剤を投与した。対照ラットに比べ、Angiotensin II を環流したラットでは収縮期血圧が著しく上昇した。TCV116 は Angiotensin II を環流したラットの血圧を正常化した。Tempo では Angiotensin II による高血圧を抑える傾向がみられた。対照ラットの大動脈では LOX-1 mRNA の発現レベルがかなり低かったが、Angiotensin II -高血圧ラットでは顕著な増加が見られた。この LOX-1 mRNA 発現の増加は TCV116 により完全に抑えられた。Tempo でも Angiotensin II による LOX-1 mRNA のアップレギュレーションを明らかに抑制した。

大動脈における LOX-1 の局在

対照ラットの大動脈における免疫染色では、LOX-1 は検出されなかった。一方、Angiotensin II 環流したラットの大動脈では内皮細胞の大部分に強いシグナルがみられた。preimmune 血清で行った実験ではごくわずかなバックグラウンドしかみられなかった。

⑤酸化 LDL による LOX-1 を介した活性酸素種産生の解析

BAEC を用いて LDL, アセチル化 LDL, MDA-LDL および酸化 LDL による DCFH-DA から DCF への変化を調べた。BAEC を DCFH-DA と 37℃、45 分間ブレインキュベートした。150 μg/ml LDL, アセチル化 LDL, MDA-LDL および 50-150 μg/ml 酸化 LDL を 5 分間インキュベートし、これをフローサイトメトリーのサンプルとして細胞内の ROS の産生をモニター

したところ、酸化 LDL について他の LDL よりも、また量依存的に DCF 産生が増加していることが確認された。これは酸化 LDL のインキュベートの時間を長くすることによっても増加することが確認できた。つぎにラジカルスカベンジャーの効果について調べた。BAEC を DCFH-DA と 37℃、45 分間ブレインキュベートした。ビタミン C およびプロブコール、トロロックス (5 μM) を 30 分間ブレインキュベートさせ 50 μg/ml 酸化 LDL を 5 分間インキュベートし、先と同様にモニターしたところ顕著に DCF 産生が抑えられた。次に BAEC と BLOX-1-CHO をもちいて di-15-ASP 標識酸化 LDL (6.25 μg/ml) を 2 時間、4℃インキュベートさせ、同時に 100 倍量の酸化 LDL、LOX-1 抗体 (30 μg/ml)、poly I (250 μg/ml) を阻害剤として加えた。サンプルをフローサイトメトリーで解析したところ BAEC と BLOX-1-CHO とともに 3 種の阻害剤で顕著に di-15-ASP 標識酸化 LDL の結合が抑制されていたことから先の BAEC における酸化 LDL の効果は LOX-1 を介しているものであることを考えた。そこではじめに行った実験の要領で BAEC を DCFH-DA と 37℃、45 分間ブレインキュベートし、LOX-1 抗体およびコントロール IgG (30 μg/ml) を 37℃、40 分間ブレインキュベートした後 50 μg/ml 酸化 LDL を 5 分間インキュベートし、先と同様にモニターしたところ、LOX-1 抗体によって DCF 産生が顕著に抑制された。これは BLOX-1-CHO を用いても同様の結果が確認された。BLOX-1-CHO と CHO-K1 細胞を用いて酸化 LDL の量を変えて (50-150 μg/ml) DCF 産生をフローサイトメトリーでモニターしたところ BLOX-1-CHO については酸化 LDL の量依存的に DCF の産生量が増加した。また酸化 LDL とのインキュベートの時間を長くしてやることで増加が見られたが CHO-K1 についてはいずれも変化は見られなかった。BAEC より得た核抽出液をもちいてゲルシフト解析を行ったところ、酸化 LDL (1 分および 5 分インキュベート) をくわえた細胞のサンプルについては、TNF-α (2ng/ml、5 分間インキュベート) と同様に NF-κB プロブへの特異的結合が見られるが、LOX-1 抗体とインキュベートしたものについてはその抑制が見られた。

⑥酸化 LDL による血管内皮細胞内 NO 濃度低下メカニズムの解析

BAEC をブラジキニンおよびトロンビンで 5 分間刺激後、10 μM DAF-2DA で 10 分 37℃インキュベートしたところ強い蛍光強度の増加が見られた。これは NO 合成阻害剤 L-NMMA によって濃度依存的に抑制された。また酸化 LDL 50-200 μg を加えて 5 分間インキュベートすると濃度依存的にブラジキニン、トロンビンによる細胞内 NO の誘導が抑制された。これはアセチル化 LDL や MDA-LDL では見られなかった。この酸化 LDL による NO 産生の抑制はインキュベートから 60 秒以内に起こっている。次にラジカルスカベンジャーによる影響をしらべてみたところ、BAEC において trolox、プロブコール、ビタミン C のいずれも酸化 LDL による ROS およびスーパーオキサイドアニオンの産生を顕著に抑制した。また BAEC, BLOX-1-CHO, CHO-K1 細胞について LOX-1

抗体をブレインキュベートしてやると BAEC, BLOX-1-CHO でのスーパーオキシドアニオン濃度を顕著に低下させた。次に BAEC をビタミン C および LOX-1 抗体とブレインキュベートして酸化 LDL による細胞内 NO 濃度への影響を見たところビタミン C と LOX-1 抗体には酸化 LDL の NO 抑制から回復させる効果があることがわかった。また酸化 LDL の影響による BAEC からのスーパーオキシドアニオンの放出について調べた結果、L-NAME および L-NMMA は放出を亢進し、DPI は劇的に放出抑制に働いた。

⑦ LOX-1 を利用した血漿中 LOX-1 リガンドの定量、および動脈硬化巣内の LOX-1 リガンドの検出

LOX-Fc の特異性

LOX-1 は酸化 LDL を認識するが LDL は認識しない。この特異性が遺伝子組み換えにより作成した可溶性の LOX-Fc でも保たれていることをまず確認した。電気泳動後、膜に転写した酸化 LDL と LDL に対する反応を見たところ、抗 apoB 抗体が両方に反応を示したのに対し、LOX-Fc は酸化 LDL のみに反応し、元の受容体の性質を保っていることがわかった。

LOX-1 リガンド定量のための EIA

LOX-Fc と抗 apoB 抗体を用いて、修飾 LDL に対する EIA の系を樹立した。人工的に修飾した LDL への親和性結合順位は酸化 LDL>アセチル LDL>MDA-LDL>>native LDL であり、細胞を用いた以前の結果と整合性のあるものであった。また、酸化の程度を変えて調整した酸化 LDL がこの EIA の系でどのように反応するかを見たところ、TBARS 値が 4.87 の 6 時間の酸化を行った酸化 LDL が最もよく反応し、これよりも強く酸化したものも、弱くしか酸化していないものも反応は弱かった。抗 apoB 抗体を用いた ELISA ではこれらの酸化 LDL の間での反応性が変化していなかったため、これらの違いは LOX-1 に対する反応性によるものだと考えられる。この系を用いて遺伝性高脂血症を示し、動脈硬化を自然発症するワタナベウサギと正常ウサギの血漿中 LOX-1 リガンド活性を測定したところ、正常ウサギでは検出感度以下であったが、ワタナベウサギでは 4.0 µg/ml であった。

LOX-1 リガンド活性の免疫組織科学的手法による検出

次に LOX-Fc をもちいて、組織のその場での LOX-1 リガンドの活性の検出を試みた。正常ウサギでは全くリガンド活性は検出されなかったが、ワタナベウサギでは Oil Red O で染色される内膜肥厚部に LOX-1 リガンド活性が検出された、また、内膜肥厚を示していない部分にも Oil Red O 染色陽性かつ LOX-1 リガンド陽性部分が散見された。抗マクロファージ抗体を用いた免疫二重染色により LOX-1 リガンド活性は内皮細胞およびマクロファージに局在していることが示された。また、抗 apoB 抗体によっても同様の染色像が得られたことから LOX-Fc により検出される活性は apoB を含むリポ蛋白質に由来することが示唆された。

⑧ 活性化に伴う LOX-1 のヒト血小板表面上への発現

RT-PCR 法による血小板 mRNA の解析から LOX-1 の mRNA の存在を認めた。この条件では LOX-1 の mRNA は単球、リンパ球、好中球からは同定されなかったが、血小板からは強い LOX-1 のシグナルが得られている。巨核球のうち 3 種、HEL、MEG-01、MEG-01s から LOX-1 の発現を確認できた。HEL 細胞においては DMSO の添加で巨核球への分化による LOX-1 の発現の増大がみられた。Western blot 法により血小板と 3 種の巨核球において LOX-1 は mRNA からタンパクへの転写が起こっていることが確かめられた。ヒトの血小板と巨核球の LOX-1 は 45kDa のタンパクであるとわかった。これは遺伝子導入細胞や、大動脈内皮細胞での結果と一致した。

ヒト血小板上で、酸化 LDL と結合するタンパクを ligand blot 法により解析した。主要な 2 つのバンドをみることができ、その 1 つは Western blot 法の LOX-1 の位置と同じ場所にあり、もう 1 つは Western blot 法の CD36 の位置と同じ場所にある。この結果から CD36 とともに LOX-1 はヒトの血小板における酸化 LDL の主要な結合タンパクであると結論づけられる。

血管内皮細胞においては炎症性サイトカイン、酸化 LDL により LOX-1 の発現は著しく誘導される。ここでは血小板において LOX-1 の活性がどのように調節されているのかの検討を行った。血小板内のいくつかのタンパク質は、血小板の刺激により細胞内の顆粒から細胞膜への移動により活性発現が調節されている。このことから刺激の前後での LOX-1 の局在を調べてみた。トロンビンによる刺激後、血小板細胞膜上への抗 LOX-1 抗体の結合をみることができたが、刺激していない血小板ではわずかしき見られなかった。血小板の刺激により細胞膜上へ移動することでよく知られている CD62P(p-selectin) による実験によっても同様の結果が得られた。このことは細胞内顆粒の細胞膜への融合が起こっており、LOX-1 がトロンビンの刺激により細胞膜上へ移動し発現していることを示している。

非刺激の血小板と活性化血小板への酸化 LDL の結合を見たところ、非刺激の血小板では抗 CD36 抗体は酸化 LDL の結合を明らかに抑制したが抗 LOX-1 抗体では結合の抑制が見られない。活性化された血小板では抗 LOX-1 抗体も抗 CD36 抗体も明らかに結合を妨げた。活性化に依存して結合が増大する部分の大部分を抗 LOX-1 抗体は抑制した。これらの結果より CD36 は非活性化血小板において主に機能する酸化 LDL 受容体であるが、LOX-1 は活性化された血小板において主に機能するという違いがあることがわかる。

血栓を伴ったアテロームにおいて LOX-1 の発現を免疫組織化学により調べると活性化血小板の集積した血栓部に LOX-1 が局在して発現していることが確認された。

D. 考察

① 可溶性 LOX-1 の検出

1つの膜貫通領域を持つ細胞増殖因子の受容体や細胞接着因子の中には、細胞膜に結合するものとは別に、可溶型と呼ばれるものを持つものがあることが知られている。LOX-1も1つの膜貫通領域を持つ膜タンパク質であることから、その可溶型が存在するのではないかという仮説のもとに研究を進めた結果、TNF- α で刺激したBAEC、及びLOX-1遺伝子を過剰発現させたCHO-K1の培養上清中に可溶型LOX-1が存在することが明らかとなった。

一般的に、可溶型受容体の産生には2つの方法がある。すなわち、膜貫通領域をコードする領域のスプライシングの違いによって生じるものと、細胞膜に結合している受容体全長からタンパク質分解的に切り出されて生じるものである。可溶型LOX-1は細胞膜上に存在するLOX-1からプロテアーゼによって切り出されることが判明した。この結果は、TNF- α で刺激したBAECを使ってRT-PCRを行っても、膜ドメインが欠如したmRNAが検出できなかったことから裏付けられる。また、可溶型LOX-1はその切断部位によって2種類のアイソフォームが存在することもわかった。これは従来の酸化LDL受容体にはない性質であり、LOX-1の特異性を表しているとも考えられる。

LOX-1は炎症性物質や機械的刺激によって発現誘導がかかりやすく、また動脈硬化巣でも高発現している。従って、動脈硬化患者では高発現したLOX-1が切り出されて血液中の可溶型LOX-1の濃度が上昇しているのではないかと考えられる。ゆえに、血液中の可溶型LOX-1の濃度を測定することは患者の病気の状態を反映し、動脈硬化の進行を予測するのに役立つのではないかとわれ、臨床応用を含めて今後の研究の進展が期待される。

②遺伝性高脂血症ウサギにおけるLOX-1発現の解析

今回ウサギLOX-1をクローニングしたところ、それがヒトLOX-1と非常に類似することがわかった。またレクチン様ドメインはすべての種の間で高い相同性を保つことから、ウサギLOX-1も他の種で知られるようなアポトーシス細胞などのリガンド取りこみ能を持つと考えられる。頸部ドメインはマウス、ラットLOX-1では3つの繰り返し配列が見られるがウサギのものについてはヒト、ウシと同様に繰り返しの配列は持たない。頸部ドメインの長さや機能がどのような関連を持つかは不明であるが、繰り返し配列を持たないLOX-1を発現する3種は動脈硬化を発症しやすい種であることは興味もたれる。

動脈硬化の危険因子として高脂血症が挙げられ、WHHLウサギはヒトの動脈硬化初期病変と似た経過をたどる動脈硬化症モデルとして使われてきた。WHHLウサギは8週令には動脈硬化病変を呈し始める事が知られている。そこで初期動脈硬化病変に対するLOX-1の役割を調べるため、8週令のWHHLウサギを用いて検討を行なった結果、WHHLウサギの大動脈に普通のウサギに比べてLOX-1が多く発現することがわかった。またそのほとんどは内皮細胞に存在していることが確認された。すなわち高脂血症条件下でLOX-1が過剰に分布することと動脈硬化病

変成因子と結びつくことが示唆される。その一方でLOX-1の発現亢進が病変部位に限定されたものでなくほぼ正常と考えられる部位での発現も亢進していたことから、LOX-1の増加は動脈硬化のきわめて初期に起きていると考えられる。炎症性サイトカインや高血圧などの動脈硬化を促進する因子によってLOX-1の誘導がかかることなどから考え合わせると、動脈硬化成因子の過程においてLOX-1が重要な役割を担うことが示唆される。

LOX-1の発現増加が動脈硬化を促進する方向に働き、高脂血症や高血圧などの病態とも関連していることが次第にわかってきた。しかし初期の動脈硬化病変部位における内皮細胞の機能変化は可逆的であることから、LOX-1の発現および活性を制御することができれば新たな治療手段になることが期待できる。

③TGF- β によるLOX-1の発現誘導解析

酸化LDLの受容体を介したエンドサイトーシスは、アテローム性動脈硬化症の病因の鍵であるようだ。アテロームの酸化LDLに対する多数の受容体が同定されているが、C末端側にCタイプレクチン様ドメインを持つII型糖タンパク質、LOX-1もこの過程に関わるかもしれない。LOX-1は、内皮細胞だけでなくマクロファージや平滑筋細胞においても発現することが明らかになっている。さらにヒト動脈硬化プラークにおいて、内皮細胞だけでなくマクロファージや平滑筋細胞でも発現が亢進している。これらのデータから、LOX-1が動脈硬化症の病因に重要な役割を担うのではないかと示唆される。今回の研究において初めて、培養血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージにおいて、TGF- β_1 がLOX-1の発現を劇的に誘導するという結果を示した。

TGF- β_1 は内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージおよび血小板の重要な分泌物である。これまでの研究では、TNF- α と同様にTGF- β_1 がマクロファージにおいてクラスAスカベンジャー受容体の発現を抑制することが報告されている。また最近、TGF- β_1 がTHP-1マクロファージにおけるタイプBスカベンジャー受容体であるCD36の発現を減少させることも示されている。一方、LOX-1の発現はTNF- α やTGF- β_1 により亢進される。このことから、動脈硬化症や炎症の際にもLOX-1の発現がアップレギュレーションされるかもしれない。このとき、炎症性サイトカインがクラスAスカベンジャー受容体やCD36の発現は抑えられる。このように、LOX-1はこれらの病理学的な状況下において主要なスカベンジャー受容体かもしれない。

TGF- β_1 はLOX-1遺伝子の転写を活性化しているようだ。なぜなら、アクチノマイシンDを前処理すると、TGF- β_1 によるLOX-1 mRNAの誘導は完全に消失するからである。TGF- β の細胞内シグナル伝達に重要なSmad3やSmad4が、AP-1だけでなく12-O-tetradecanoyl-13-acetate 応答領域(TREs)と直接相互作用し、AP-1の有無に関わらずTGF- β 依存的な遺伝子転写を活性化することが最近示されている。TREに対応するコンセンサス塩基配列がLOX-1遺伝子の5'上流領域に見出されているので、Smad-TRE

経路が、TGF- β_1 により引き起こされる LOX-1 の遺伝子転写に関わるのかもしれない。しかしながら、この点を解明するにはさらなる研究が必要であろう。

④Redox 感受性の LOX-1 発現調節の解析

動脈硬化症の初期において血管内皮の酸化による障害が重要だとする報告が積み重なりつつある。我々は今回の研究で、*in vitro* ではスーパーオキシドアニオン (H_2O_2) やホモシステインによって培養血管内皮細胞で、*in vivo* では Angiotensin II の持続注入によってラット大動脈血管内皮細胞で、内皮細胞の酸化 LDL 受容体 LOX-1 の遺伝子発現が誘導されることを明らかにした。LOX-1 の遺伝子発現の亢進は抗酸化剤によって抑えられた。これらのデータから、LOX-1 遺伝子の発現調節にフリーラジカルに引き起こされるメカニズムがあることが示唆される。

今回の研究で、活性酸素種と LOX-1 の遺伝子調節の関係を示す直接的な結果を明らかにした。これまでの報告では、炎症性サイトカイン、機械的刺激、活性酸素種を産生する酸化 LDL などのような動脈硬化を促進する刺激による *in vitro* での LOX-1 の発現亢進が示されていた。活性酸素種は NF- κ B や AP-1 などの redox-sensitive な転写因子を活性化しうる。我々はまず、LOX-1 遺伝子のプロモーター領域において、NF- κ B と AP-1 の可能性があるシスエレメントを同定した。活性酸素種によるこれらの転写因子結合領域の活性化は、LOX-1 遺伝子の調節に重要な役割を果たしているかもしれない。酸化 LDL が LOX-1 を刺激することで活性酸素種が発生し、続いて転写因子 NF- κ B を活性化することがわかっている。今回の結果を考えあわせると、結果として生じた活性酸素種がさらに LOX-1 の発現を増加させ、正のフィードバックループを形成していると考えられる。

我々の研究で、Angiotensin II を持続注入したラットでは AT1 受容体を介して大動脈の LOX-1 発現が亢進しており、LOX-1 のアップレギュレーションは主に内皮細胞で起こっていることを明らかにした。この *in vivo* における影響は、Angiotensin II が培養血管内皮細胞で LOX-1 の発現を増加させるという *in vitro* での以前の結果と一致している。興味深いことに、Angiotensin II を持続注入したラットの大動脈における LOX-1 の発現誘導は、活性酸素種のスカベンジャーである Tempo により抑えられた。このことから、酸化的ストレスと Angiotensin II による LOX-1 発現誘導の関連が示唆される。酸化的ストレスが Angiotensin II により引き起こされる血管障害の一因であるという証拠は増えつつあり、LOX-1 がこのカスケードに不可欠な役割をしているかもしれない。

動脈硬化症だけでなく、高血圧、高脂血症、糖尿病などの動脈硬化に至る前の病態においても、血管の LOX-1 発現が亢進していることが明らかになってきている。ここで我々はさらに、動脈硬化症の重要な危険因子であるホモシステインが内皮細胞の LOX-1 mRNA 発現を亢進することを示した。血管壁の酸化ストレスの増加は、これらの臨床病態における共通の特徴であると考えられている。活性酸素種-LOX-1 経路は、血管障害や動脈硬化症を招く様々な危険因子からはじまるカスケードを統一する分子的基础になりうるかもしれない。

⑤酸化 LDL による LOX-1 を介した活性酸素種産生

の解析

酸化 LDL は内皮細胞において ROS 産生の強いインデューサーであることを示した。酸化 LDL が細胞内において蛍光試薬 DCFH の酸化を起こし、これが ROS によるものであることは以前に報告されている。BAEC を数種の抗酸化剤とインキュベートすることによって細胞内の ROS の産生が抑えられることはラジカルスカベンジャーの研究から知られている。これらのことは BAEC を酸化 LDL とインキュベートすることと細胞内の ROS が増加して DCF の産生が増加することとが関連していることを示唆するものである。今回示した内容から酸化 LDL による BAEC 内 ROS の増加が非常に速やかに起こることを確認しており、インキュベート 30 秒後には明らかな増加が確認される。われわれは細胞内 ROS の増加が BAEC 上の特異的受容体を介して起こることを示した。LOX-1 抗体を用いたときの BAEC 内の DCF 産生に顕著な減少がみられることは LOX-1 への酸化 LDL の結合が細胞内 ROS の産生に関与することを示している。これは BLOX-1-CHO について酸化 LDL の濃度に相関して DCF 産生が増加するのを LOX-1 抗体で抑えたことと一致した結果である。また BAEC を用いた実験で酸化 LDL による NF- κ B の活性化を示したが、細胞内 ROS は NF- κ B 活性化経路のうち下流において働くことが示されている。我々は最近内皮細胞において酸化 LDL や TNF- α が接着分子の発現を NF- κ B 活性化を介して誘導することを示し、これがラジカルスカベンジャーによって阻害されることを示した。このことから酸化 LDL 受容体がフリーラジカルシグナルのトリガーとなり、ROS の産生を亢進して NF- κ B 活性化する経路へとつながりうることを示唆される。RAEC において酸化 LDL による ROS の誘導は 30 秒ほどで起こるが、NF- κ B の活性化は刺激後 5 分ほどまでは強くはみられない。このことから酸化 LDL で刺激を受けた細胞では ROS の産生に続いて NF- κ B の活性化がおきていることを示し、ROS はメッセンジャーとして働いていると見られる。さらに LOX-1 抗体により NF- κ B の活性化が抑えられたことから LOX-1 に酸化 LDL が結合し、ROS が産生されることが NF- κ B の活性化の第一段階となっていることが示唆される。実際に LOX-1 遺伝子上に NF- κ B 結合サイトとなりうる配列があり、炎症などの刺激によって NF- κ B を介した LOX-1 の発現誘導が示唆される。LOX-1 は酸化 LDL によってその発現が誘導されることから ROS を介した酸化 LDL による NF- κ B の活性化は LOX-1 発現誘導にかかわっていることが示唆される。

⑥酸化 LDL による血管内皮細胞内 NO 濃度低下メカニズムの解析

酸化 LDL は濃度依存的に速やかに細胞内 NO 濃度を低下させることを非刺激および顎にストにより刺激した BAEC について示した。今回の実験結果は酸化 LDL によって NO が減少することが ROS やスーパーオキシドアニオンの増加と平行して起こることと、それがラジカルスカベンジャーとして機能する抗酸化剤によって抑えられることを示している。つまり BAEC を酸化 LDL にさらしたとき、それが細

胞内のROSやスーパーオキシドアニオンの増加に働くことを示している。さらにLOX-1抗体によってROSの産生が抑制されることと酸化LDLによりROSが生成されてくることから、酸化LDLのLOX-1への結合が細胞内ROSの産生にかかわっていることが強く示唆される。細胞内NOの濃度低下はラジカルスカベンジャーとして機能する抗酸化剤やLOX-1抗体によって抑えられた。このことからBAECに酸化LDLをさらしたとき酸化LDLは受容体を介してROSやスーパーオキシドアニオンの産生増加に働くことが示される。NOの減少はスーパーオキシドアニオンの形成によるものであると考えられる。さらに細胞内NO濃度への酸化LDLの影響は非常に速やかにおこることからNOへの影響は細胞内に取り込まれた酸化LDLのうちの脂質ラジカルによるものではなさそうである。また酸化LDLがLOX-1に結合することによるROSの誘導にたいして、アロプリノールとアスピリンがスーパーオキシドアニオンの産生にほとんど影響しなかったことから、LOX-1を介したスーパーオキシドアニオンの産生はキサンチンオキシダーゼやシクロオキシゲナーゼを介したのではないことが示された。さらにL-NAMEとL-NMMAはBAECによるスーパーオキシドアニオンの産生を抑制しなかったことからeNOSがスーパーオキシドアニオンの産生にかかわることを否定しうる。すなわち酸化LDLによるスーパーオキシドアニオン産生にeNOSは関与しないと考えられる。また酸化LDL刺激を与えたBAECにおいてスーパーオキシドアニオンが劇的に減少した。DPIはNADPHオキシダーゼの選択的阻害剤でありNADHコビキノンオキシドリダクターゼ(complex I)およびeNOSによるミトコンドリアスーパーオキシドアニオン産生を阻害する。すなわち酸化LDLによるスーパーオキシドアニオン産生はNAADPHオキシダーゼまたはミトコンドリアのcomplex Iに関連していると思われる。LOX-1と酸化LDLが結合することによりROSが産生されることはLDLの酸化に寄与し酸化LDLによってLOX-1の発現が亢進するという悪循環につながるものと考えられる。

⑦LOX-1を利用した血漿中LOX-1リガンドの定量、および動脈硬化巣内のLOX-1リガンドの検出

酸化LDLの生体内での存在については多くの証拠が集まっている。酸化LDL抗体に対する抗原レベルや酸化LDLに対する自己抗体のレベルの上昇と動脈硬化症の間には正の相関が認められている。LOX-1の機能ドメインがレクチン様ドメインにあることがわかったので、これに基づいて、細胞外のレクチン様ドメインとIgGのFc部分を融合した遺伝子組み換え蛋白LOX-Fcを作成し、これによりLOX-1リガンドの検出を行うことを試みた。抗apoB抗体と組み合わせたsandwich enzyme immunoassayを用いることにより、LDLの中等度の酸化で十分にLOX-1に結合することがわかった。血液中ではLDLの強い酸化は起きないとされているが、循環血液中のLDLの軽微な変化をLOX-1は認識している可能性がある。実際にワタナベウサギにおいてはLOX-1リガンドのレベルが大きく上昇していることが本研究で明らかとなっ

ている。

また、LOX-Fcを用いてWHHLの動脈硬化巣を解析すると、内皮細胞と内皮下に侵入したマクロファージにLOX-1リガンドの強い分布が見られた。したがって、LOX-1リガンドは血液中と動脈硬化巣との両方に存在していることがわかる。そして、LOX-1自体も高脂血症および動脈硬化巣では、発現が強くなっていることがわかっている。酸化LDLのLOX-1への作用により活性酸素種の産生、NF- κ Bの活性化、MCP-1の産生亢進、白血球の接着性の亢進、LOX-1自体の発現亢進、アポトーシスの誘導が起きることがすでに示されており、このような状況下ではLOX-1リガンドとLOX-1の両方が増えることにより、LOX-1を介した内皮細胞の機能変化が生じることが予想される。また、LOX-1はマクロファージにも発現していることからLOX-1リガンドのLOX-1による取込を介した泡沫細胞の形成が起きている可能性もある。持続するLOX-1リガンドの存在は変性LDLが慢性的に作用していることを示すものであり、LOX-1が動脈硬化の発症だけでなく進展段階でも重要な役割をしている可能性を示唆するものである。

⑧活性化に伴うLOX-1のヒト血小板表面上への発現

LOX-1はヒト血小板で発現し、血小板における主要な酸化LDL結合タンパクであることがわかった。血小板における他の酸化LDL結合蛋白には血小板GP IVと呼ばれるCD36がある。CD36は細胞膜上の糖蛋白であり単球、血小板、ある種の微小血管内皮細胞に発現しており、thrombospondin、collagen、マラリア原虫に感染した赤血球、アポトーシスを起こした細胞、酸化LDLの受容体として働く。今回の実験でこれらの受容体間に細胞内局在の違いがあることがわかった。CD36は非活性化状態の血小板の細胞膜上にあり、LOX-1は活性時の血小板の表面に現れる。このことはこれらの2つが血小板の異なる代謝に働いていることを示す。活性化により発現するLOX-1の性質を考えるとLOX-1は正常に血中を循環しているときよりも、病態における血栓形成時の血小板において重要な意味をもつ。いったん血管内皮細胞が障害を受けると血小板はすぐに活性化され血管の障害部で凝集する。この結果LOX-1が障害を受けた血管部位に集積することになる。機能変化した血管内皮細胞でのLOX-1発現の亢進が種々の血管病変のinitiationに重要な役割を果たすと考えられ注目されてきたが、障害を受けた血管部位への血小板を介したLOX-1機能発現もまた血管病変の進行に重要である可能性がある。

LOX-1は活性化された血小板を認識し結合するということも考えると、活性化された血小板上でLOX-1が活性化された血小板と結合することにより血栓を安定化させ、血栓形成を進行させたり、動脈血栓の形成に関わっている可能性がある。

E. 結論

構造解析から可溶性のLOX-1の存在を明らかにし、この測定による動脈硬化進行度の診断への可能性を開いた。LOX-1の発現解析からLOX-1が高血圧や高

脂血症で強い発現を示すこと、そしてそれは生体内の酸化ストレスの増大と関連している可能性を明らかにした。さらに、LOX-1自体が酸化ストレスを生み出す元となりうることを示し、老化における重要な因子と考えられてきた酸化ストレスとの強い関係がここに来て明らかとなってきた。虚血性心疾患の発症と酸化ストレスとの関連も近年注目されるようになっており、この様な点でもLOX-1の役割を解明することは今後重要と考えられる。一方、LOX-1リガンドの新たな測定系の開発によりリガンド側からの動脈硬化進行の危険性診断を行える可能性が出てきた。動脈硬化の危険性がコレステロールレベルによる判断だけでは充分でないことはよく知られており、新たな指標として有用である可能性がある。酸化LDLの結合以外のLOX-1の機能からLOX-1の多様な機能の解明につながる知見としては、血小板でのLOX-1の強い発現が明らかとなったことがあげられる。LOX-1の血栓形成における役割も示唆されており、今後の研究結果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minami, M., Kume, N., Kataoka, H., Morimoto, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.: Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **272**:357-361, 2000.
- 2) Murase, T., Kume, N., Kataoka, H., Minami, M., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.: Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:715-720, 2000.
- 3) Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N. and Kita, T.: Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding. *J Biol Chem*, **275**:6573-6579, 2000.
- 4) Iwakura, A., Fujita, M., Hasegawa, K., Sawamura, T., Nohara, R., Sasayama, S. and Komeda, M.: Pericardial fluid from patients with unstable angina induces vascular endothelial cell apoptosis. *J Am Coll Cardiol*, **35**:1785-1790, 2000.
- 5) Chen, M., Kakutani, M., Minami, M., Kataoka, H., Kume, N., Narumiya, S., Kita, T., Masaki, T. and Sawamura, T.: Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:1107-1115, 2000.
- 6) Yoneda, T., Fujita, M., Kihara, Y., Hasegawa, K., Sawamura, T., Tanaka, T., Inanami, M., Nohara, R. and Sasayama, S.: Pericardial fluid from patients with ischemic heart disease accelerates the growth of human vascular smooth muscle cells. *Jpn Circ J*, **64**:495-498, 2000.
- 7) Kume, N., Moriwaki, H., Kataoka, H., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.: Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for

- oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci*, **902**:323-327, 2000.
- 8) Kataoka, H., Kume, N., Minami, M., Moriwaki, H., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.: Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*, **902**:328-335, 2000.
- 9) Chen, H., Li, D., Sawamura, T., Inoue, K. and Mehta, J. L.: Upregulation of LOX-1 expression in aorta of hypercholesterolemic rabbits: modulation by losartan. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**:1100-1104, 2000.
- 10) Cominacini, L., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M., Rigoni, A., Pastorino, A. M., Lo Cascio, V. and Sawamura, T.: Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **275**:12633-12638, 2000.
- 11) Araki, M., Hasegawa, K., Iwai-Kanai, E., Fujita, M., Sawamura, T., Kakita, T., Wada, H., Morimoto, T. and Sasayama, S.: Endothelin-1 as a protective factor against beta-adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol*, **36**:1411-1418, 2000.
- 12) Nagase, M., Kaname, S., Nagase, T., Wang, G., Ando, K., Sawamura, T. and Fujita, T.: Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, **11**:1826-1836, 2000.
- 13) Honjo, M., Tanihara, H., Inatani, M., Kido, N., Sawamura, T., Yue, B. Y., Narumiya, S. and Honda, Y.: Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**:137-144., 2001.
- 14) White, S. J., Nicklin, S. A., Sawamura, T. and Baker, A. H.: Identification of Peptides That Target the Endothelial Cell-Specific LOX-1 Receptor. *Hypertension*, **37**:449-455., 2001.
- 15) Nagase, M., Ando, K., Nagase, T., Kaname, S., Sawamura, T. and Fujita, T.: Redox-Sensitive Regulation of LOX-1 Gene Expression in Vascular Endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**:720-725., 2001.
- 16) Iwakura, A., Fujita, M., Hasegawa, K., Toyokuni, S., Sawamura, T., Nohara, R., Sasayama, S. and Komeda, M.: Pericardial Fluid from Patients with Ischemic Heart Disease Induces Myocardial Cell Apoptosis via an Oxidant Stress-sensitive p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *J Mol Cell Cardiol*, **33**:419-430., 2001.
- 17) Chen, M., Kakutani, M., Naruko, T., Ueda, M., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Activation-dependent surface expression of lox-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**:153-158., 2001.
- 18) Kakutani, M., Ueda, M., Naruko, T., Masaki, T. and Sawamura, T.: Accumulation of lox-1 ligand in plasma and atherosclerotic lesions of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: identification by a

- novel enzyme immunoassay. *Biochem Biophys Res Commun*, 282:180-185., 2001.
- 19) Halvorsen, B., Staff, A.C., Henriksen, T., Sawamura, T., and Ranheim, T.: 8-iso-Prostaglandin F2 increases expression of LOX-1 in JAR cells. *Hypertension*, in press.
 - 20) Chen, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T.: Conserved carboxyl-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized LDL binding. *Biochem J*, in press.
 - 21) Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A.F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A.M., Cascio, V.L., Sawamura, T.: The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, in press.
2. 学会発表
 - 1) 酸化LDL受容体LOX-1の意義
沢村達也
2000年4月 東京 東京大学先端科学技術研究セミナー
 - 2) Role of LOX-1 in inflammatory process
T Sawamura, M Sawamura, Y Honda, T Masaki
June 2000 Stockholm Sweden, 12th International Symposium on Atherosclerosis
 - 3) Increased Expression of LOX-1 in diabetic rat arteries
M Chen, T Sawamura, T Masaki
June 2000 Stockholm Sweden, 12th International Symposium on Atherosclerosis
 - 4) 酸化LDL受容体LOX-1の病態生理学的意義
沢村達也
2000年7月 大阪 第1回日中循環器病シンポジウム
 - 5) 酸化LDL受容体LOX-1の血栓形成における意義
沢村達也
2000年10月 横浜 第73回日本生化学会
 - 6) レクチン様酸化LDL受容体 (LOX-1) の発見とその生理的意義の解明
沢村達也
2000年10月 横浜 第73回日本生化学会
 - 7) 酸化LDL受容体LOX-1の血栓形成における意義
沢村達也
2000年10月 岐阜 日本薬理学会第93回近畿部会
 - 8) Role of LOX-1 in Inflammatory Process
T Sawamura, M Sawamura, Y Honda, T Masaki
November 2000 New Orleans, Louisiana, 73rd Scientific Sessions of American Heart Association
 - 9) Overexpression of LOX-1 Induces Myocardial Cell Apoptosis Via a P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway
E Iwai-Kanai, T Yanazume, M Fujita, T Sawamura, K Hasegawa
November 2000 New Orleans, Louisiana, 73rd Scientific Sessions of American Heart Association
 - 10) Role of LOX-1 in Thrombosis
M Kakutani, T Sawamura, M Chen, T Masaki
November 2000 New Orleans, Louisiana, 73rd Scientific Sessions of American Heart Association
 - 11) C-Terminal Residues within the Lectin-like Domain of LOX-1 are Essential for Oxidized LDL Binding
M Chen, T Sawamura, T Masaki
November 2000 New Orleans, Louisiana, 73rd Scientific Sessions of American Heart Association
 - 12) Diabetes Enhances LOX-1 Expression in Vascular Endothelium: Possible Roles of Age and Lox-1 Ligand
M Chen, T Sawamura, T Masaki
November 2000 New Orleans, Louisiana, 73rd Scientific Sessions of American Heart Association
 - 13) Strong Expression of Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 (LOX-1) Is Associated with Plaque Inflammation and Destabilization in Human Coronary Atherosclerotic Lesions
Y Sakanoue, T Naruko, M Ueda, K Haze, A Itoh, M Otsuka, Y Ikura, M Ogami, T Sawamura, T Masaki
November 2000 New Orleans, Louisiana, 73rd Scientific Sessions of American Heart Association
 - 14) 酸化LDL受容体LOX-1の病態生理学的意義
沢村達也
2000年11月 東京 東京カルディアックセミナー
 - 15) 創薬の標的分子としての酸化LDL受容体LOX-1の可能性
沢村達也
2000年12月 東京 創薬薬理フォーラム第23回談話会
 - 16) 酸化LDL受容体LOX-1の生理的意義
沢村達也
2000年12月 神戸 第23回日本分子生物学会年会
 - 17) 創薬の標的としての変性LDL受容体LOX-1の可能性
沢村達也
2001年2月 豊中 一新適塾-21世紀の薬箱第40回会合
- G.知的所有権の取得 なし

Ⅱ．研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Minami, M., Kume, N., Kataoka, H., Morimoto, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.	Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1.	Biochem Biophys Res Commun	272	357-361	2000
Kume, N., Moriwaki, H., Kataoka, H., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.	Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells.	Ann N Y Acad Sci	902	323-327	2000
Kataoka, H., Kume, N., Minami, M., Moriwaki, H., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.	Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human atherosclerotic lesions.	Ann N Y Acad Sci	902	328-335	2000
Murase, T., Kume, N., Kataoka, H., Minami, M., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T.	Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	20	715-720	2000
Cominacini, L., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M., Rigoni, A., Pastorino, A. M., Lo Cascio, V. and Sawamura, T.	Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kB through an increased production of intracellular reactive oxygen species.	J Biol Chem	275	12633-12638	2000
Chen, M., Kakutani, M., Minami, M., Kataoka, H., Kume, N., Narumiya, S., Kita, T., Masaki, T. and Sawamura, T.	Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	20	1107-1115	2000

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N. and Kita, T.	Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding.	J Biol Chem	275	6573-6579	2000
Iwakura, A., Fujita, M. Hasegawa, K., Sawamura, T., Nohara, R., Sasayama, S. and Komeda, M.	Pericardial fluid from patients with unstable angina induces vascular endothelial cell apoptosis.	J Am Coll Cardiol	35	1785-1790	2000
Yoneda, T Fujita, M. Kihara, Y. Hasegawa, K Sawamura, T Tanaka, T. Inanami, M. Nohara, R. and Sasayama, S.	Pericardial fluid from patients with ischemic heart disease accelerates the growth of human vascular smooth muscle cells.	Jpn Circ J	64	495-498	2000
Chen, H. Li, D. Sawamura, T. Inoue, K. and Mehta, J.	Upregulation of LOX-1 expression in aorta of hypercholesterolemic rabbits: modulation by losartan.	Biochem Biophys Res Commun	276	1100-1104	2000
Araki, M. Hasegawa, K. Iwai-Kanai, E. Fujita, M Sawamura, T Kakita, T Wada, H Morimoto, T and Sasayama, M	Endothelin-1 as a protective factor against beta-adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiac myocytes.	J Am Coll Cardiol	36	1411-1418	2000
Nagase, M Kaname, S. Nagase, T. Wang, G. Ando, K. Sawamura, T. and Fujita, T	Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis.	J Am Soc Nephro	11	1826-1836	2000
White, S.J., Nicklin, S.A., Sawamura, T., and Baker, A.H.	Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor.	Hypertension	37	449-455	2001