

厚生労働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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 沢村達也

平成15(2003)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	1
酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における役割 沢村 達也	
II. 分担研究報告	
酸化 LDL 受容体 LOX-1 の動脈硬化における役割	9
沢村 達也	
Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) の 心筋虚血-再かん流障害における役割に関する研究	21
長谷川 浩二	
酸化 LDL 受容体 LOX-1 の炎症における役割の研究	22
本田 孔士	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

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昨年度に引き続き行った。特に、LOX-1の心筋梗塞モデル、各種炎症病態モデルを用いた検討を行い、これらの病態におけるLOX-1の役割を明らかにするとともに、LOX-1アンタゴニストの効果についての検証を行った。

分担研究者

長谷川浩二 京都大学大学院医学研究科
循環病態学 助手

本田 孔士 京都大学大学院医学研究科
視覚病態学 教授

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らいている細胞である。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て、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、我々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。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。これに基づき本研究の全体計画では4つの目標を設定した。すなわち、①LOX-1の動脈硬化症における重要性の証明、②LOX-1分子を利用した診断への応用、③LOX-1の多様な機能の解明、④LOX-1のアンタゴニストによる治療の可能性の検討、である。

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LOX-1の心筋梗塞モデル、各種炎症病態モデルを用いた検討を行い、これらの病態における

LOX-1の役割を明らかにするとともに、LOX-1アンタゴニストの効果についての検証を行った。また、昨年度に引き続き、血管、特に血管内皮細胞におけるLOX-1の機能および活性調節についてスタチンやエンドセリン-1に着目して解析を行った。

B. 研究方法

詳細な研究方法については分担研究報告書に譲るが、LOX-1についての解析を蛋白レベル、遺伝子レベルで培養細胞および個体レベルで行った。

遺伝子組換え等の実験は各所属施設の承認を得て行われ、動物の取り扱いには各所属施設の実験動物取り扱い規定に基づき、動物愛護に配慮して実験を行った。

C. 研究結果、D. 考察

得られた研究成果の中から主なものを示すと、①ラットの心筋梗塞モデルにおいて、LOX-1の発現が虚血再還流により著しく増加することを明らかにした。抗LOX-1抗体の投与は心筋梗塞巣を著明に縮小したが、これには接着分子の発現抑制による炎症細胞の心筋組織への浸潤抑制や、p38MAPKを介した細胞内情報伝達の抑制が関与している可能性が考えられた。

②スタチンは高脂血症ウサギにおいてLOX-1の発現を抑制するとともに、動脈硬化の進展を抑制することが明らかとなった。すでに警告しているAT1アンタゴニストと同様LOX-1の発現抑制がこれらの薬剤の抗動脈硬化に寄与している可能性が考えられた。

③ラットのエンドトキシン誘発ぶどう膜炎のモデルを用いてLOX-1の炎症における役割を解析した。LOX-1の発現は炎症刺激により顕著に増加するとともに、抗LOX-1抗体の投与により炎症反応、白血球の血管壁への接着が抑制され、LOX-1が炎症細胞の血管壁への接着に影響を与えることにより炎症反応に関与していることが明らかとなった。さらに、*in vitro*における解析によりLOX-1そのものが細胞接着分子であることを明らかにした。

④ヒトおよびマウス樹状細胞においてLOX-1がClass II MHCを介した抗原提示に関与する重要な分子であることが明らかになった。さらに、抗LOX-1抗体を用いて腫瘍抗原を抗原提示細胞に標的する

ことで効果的に腫瘍免疫を誘導することができ、移植した腫瘍の増殖を抑制することができることが明らかになった。このことは、新しい腫瘍ワクチンの可能性を示すだけでなく、かねてから指摘されている動脈硬化における免疫系の変化についての示唆を与えるものである。

E. 結論

LOX-1の免疫系との関連が多くの点で明らかになってきた。いくつかの炎症モデルを用いて抗LOX-1抗体が炎症抑制に有効であることが明らかになった。これには、細胞接着分子の発現抑制だけでなく、LOX-1自身の細胞接着分子としての機能を抑制することによる効果もあることが明らかとなった。さらに、樹状細胞におけるLOX-1の抗原提示能の証明により、Th1とTh2のバランスの変化が動脈硬化の進展を促進しているとの従来の仮説に対し、LOX-1がその変化を引き起こす要因のひとつとなっている可能性が示唆された。一方、抗LOX-1抗体が心筋梗塞巣の拡大抑制効果を持つことは、LOX-1の虚血性心疾患における重要性を示すとともに、LOX-1アンタゴニストが虚血性心疾患の治療に有効であることを示すものである。また、LOX-1のヒト遺伝子多型と虚血性心疾患との関係が明らかになったことから、LOX-1の遺伝子情報を元にLOX-1アンタゴニストを用いることによる、より有効な治療が施行できることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. D. Li, H. Chen, F. Romeo, T. Sawamura, T. Saldeen and J. L. Mehta, Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1, *J Pharmacol Exp Ther* 302, 601-605 (2002).
2. M. Honjo, M. Inatani, N. Kido, T. Sawamura, B. Y. Yue, Y. Honda and H. Tanihara, A Myosin Light Chain Kinase Inhibitor, ML-9, Lowers the Intraocular Pressure in Rabbit Eyes, *Exp Eye Res* 75, 135-142 (2002).
3. M. Chen, T. Masaki and T. Sawamura, LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis, *Pharmacol Ther* 95, 89 (2002).
4. H. Morawietz, N. Duerrschmidt, B. Niemann, J. Galle, T. Sawamura and J. Holtz, Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1, *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 1, 9S-12S (2002).
5. Y. Delneste, G. Magistrelli, J. Gauchat, J. Haeuw, J. Aubry, K. Nakamura, N. Kawakami-Honda, L. Goetsch, T. Sawamura, J. Bonnefoy and P. Jeannin, Involvement of LOX-1 in Dendritic Cell-Mediated Antigen Cross-Presentation, *Immunity* 17, 353 (2002).
6. T. Nakagawa, M. Akagi, H. Hoshikawa, M. Chen, T. Yasuda, S. Mukai, K. Ohsawa, T. Masaki, T. Nakamura and T. Sawamura, Lectin-like oxidized

low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis, *Arthritis Rheum* 46, 2486-2494 (2002).

7. D. Li, V. Williams, L. Liu, H. Chen, T. Sawamura, T. Antakli and J. L. Mehta, LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP-1 and inflammation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1795-1801 (2002).
8. T. Imanishi, T. Hano, T. Sawamura, S. Takarada and I. Nishio, Oxidized low density lipoprotein potentiation of fas-induced apoptosis through lectin-like oxidized-low density lipoprotein receptor-1 in human umbilical vascular endothelial cells, *Circ J* 66, 1060-1064 (2002).
9. T. Nakagawa, T. Yasuda, H. Hoshikawa, M. Shimizu, T. Kakinuma, M. Chen, T. Masaki, T. Nakamura and T. Sawamura, LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt, *Biochem Biophys Res Commun* 299, 91-97 (2002).
10. M. Honjo, H. Tanihara, K. Nishijima, J. Kiryu, Y. Honda, B. Y. Yue and T. Sawamura, Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina, *Arch Ophthalmol* 120, 1707-1713 (2002).
11. K. Kataoka, K. Hasegawa, T. Sawamura, M. Fujita, T. Yanazume, E. Iwai-Kanai, T. Kawamura, T. Hirai, T. Kita and R. Nohara, LOX-1 pathway affects the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury, *Biochem Biophys Res Commun* 300, 656-660 (2003).
12. M. Honjo, K. Nakamura, K. Yamashiro, J. Kiryu, H. Tanihara, L. M. McEvoy, Y. Honda, E. C. Butcher, T. Masaki and T. Sawamura, Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1274-1279 (2003).
13. D. Li, L. Liu, H. Chen, T. Sawamura, S. Ranganaathan and J. L. Mehta, LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells, *Circulation* 107, 612-617 (2003).
14. L. Cominacini, A. Fratta Pasini, U. Garbin, A. Pas-torino, A. Rigoni, C. Nava, A. Davoli, V. Lo Cascio and T. Sawamura, The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells, *J Am Coll Cardiol* 41, 499-507 (2003).
2. 学会発表
 1. 酸化LDL受容体LOX-1の病態生理的意義
沢村達也
第7回関西医大心臓血管病フォーラム
 2. 酸化LDL受容体LOX-1と動脈硬化、炎症
沢村達也
第8回成人病の病因・病態の解明に関する研究

- 会
3. 酸化LDL受容体LOX-1と動脈硬化
沢村達也
第34回日本動脈硬化学会総会シンポジウム
 4. 酸化LDL受容体LOX-1の機能と病態との関連
沢村達也
第3回動脈硬化2001特別講演
 5. 酸化LDL受容体LOX-1
沢村達也
第25回日本高血圧学会総会サテライトシンポジウム
 6. Pathophysiological Significance of LOX-1 in Atherosclerosis
Tatsuya Sawamura
International Society for Heart Research The 19th Annual Meeting
 7. 脈絡膜新生血管における酸化LDLレセプターLOX-1
桐生純一
第4回JAPAN MACULA CLUB
 8. 脈絡膜新生血管における酸化LDLレセプターLOX-1
本庄恵、桐生純一、本田孔士、沢村達也
第26回日本眼科手術学会総会

G. 健康危険情報

なし

H. 知的所有権の取得

なし

II. 分担研究報告

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、①心筋虚血再灌流傷害におけるLOX-1の役割、②内皮における酸化LDLを介する接着分子の発現誘導に対するスタチンの抑制効果、③エンドセリン-1の内皮細胞の酸化LDL取り込みに対する増強効果、④内皮細胞のFasによるアポトーシスに対するLOX-1を介した増強作用、⑤樹状細胞を介した抗原クロスプレゼンテーションにおけるLOX-1の関与について明らかにした。

A. 研究目的

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、我々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そうだという証拠が集まりつつある。これに基づき本研究の全体計画では4つの目標を設定した。すなわち、①LOX-1の動脈硬化症における重要性の証明、②LOX-1分子を利用した診断への応用、③LOX-1の多様な機能の解明、④LOX-1のアンタゴニストによる治療の可能性の検討、である。これらに関連して本年度は特に①心筋虚血再灌流傷害におけるLOX-1の役割、②内皮における酸化LDLを介する接着分子の発現誘導に対するスタチンの効果、③エンドセリン-1の内皮細胞の酸化LDL取り込みに対する効果、④内皮細胞のFasによるアポトーシスに対するLOX-1を介した作用、⑤樹状細胞を介した抗原クロスプレゼンテーションにおけるLOX-1の関与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心筋虚血再灌流傷害におけるLOX-1の阻害:MMP-1と炎症の調節

動物モデル

実験にはオスSprague-Dawley rats (250-300g)を使用した。ペントバルビタール麻酔後挿管し、人工呼吸管理下にて実験を行った。左開胸後、左冠動脈(分岐部4mm以内の場所を)6-0の太さの絹糸で引き結びにて結さつし、虚血をひきおこさせた。虚血は、心電図にて確認した。虚血後1時間、虚血を解除し

再灌流を1時間行った。コントロールとして開胸のみをおこなったラットを使用した。

半定量RT-PCR

虚血再灌流を行った心筋からtotal RNAを抽出し、oligo(dT)primer, Moloney murine leukemia virus RTを使用し逆転写反応を行った。逆転写反応物をTaq polymerase, rat LOX-1 specific primerを使用してPCR反応を行い、増幅産物をエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドを可視化した。 β -actinを内部標準遺伝子として使用し、サンプル間のnormalizationを行った。

Western blot assay

SDS/PAGEは、10%ポリアクリルアミドゲルにて行った。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体としてanti-rat LOX-1 antibody、2次抗体としてhorseradish peroxidase-conjugated secondary antibodyを使用し、chemiluminescenceにてシグナルを増強させバンドを描出させた。

免疫組織染色

5 μ mにスライスした心筋標本切片を2時間22 $^{\circ}$ Cの条件で一次抗体と反応させ、PBSでリンスしたあと tetramethylrhodamine conjugated anti-mouse IgGと30分22 $^{\circ}$ Cで反応させた。

MAPK activityの測定

左冠動脈支配領域の心筋虚血リスク領域の心筋をホモジェナイズし、10%ポリアクリルアミドゲルにてSDS/PAGEをおこなった。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、ブロッキング後anti rat phosphospecific p38 MAPK antibodyと反応させ、バンドを検出した。同じニトロセルロース膜を再度使用し、p38 MAPKの量(リン酸化されたものとされていないもののtotal量)を検討するためにanti rat p38 MAPK antibodyと反応させ、バンドを検出した。梗塞サイズの同定

虚血1時間、虚血を解除し再灌流を1時間行ったのち、心臓を取り出し、Langendorff装置にて生理食塩水で60秒間flashした。左冠動脈を再度閉塞させ、あとで左冠動脈支配領域(area at risk: AAR)がわかるようにエバンスブルーを注入しておいた。心臓を6枚のsliceに切りわけ、1% triphenyl tetrazolium chloride (TTC)と15分incubationした。エバンスブルーで染色された組織(左冠動脈支配領

域)とTTCにて染色された組織(梗塞領域)の領域を同定し、planimetryで測定した。梗塞部位の定量は、梗塞領域面積/AARの値を計算し、normalizationした。

②スタチンは、ヒト冠動脈内皮における酸化LDLを介する接着分子の発現を調節する

実験条件

~70% confluentの条件下でヒト冠動脈内皮(HCAECs)を酸化LDL 40mg/mlの濃度で24時間刺激したときのLOX-1、E-selectin、P-selectin、VCAM-1、ICAM-1の発現を検討した。

スタチンを作用させた実験においては酸化LDL刺激する30分前に作用させておいた。

LOX-1に対するantisense oligoによるLOX-1遺伝子発現抑制

LOX-1に対するantisense oligoとコントロールとして使用するsense oligoは、human LOX-1 mRNAの5'-coding sequenceをtargetとして設計した。

Antisense oligoを使用した実験においては実験前にヒト冠動脈内皮(HCAECs)にtransfectionし、LOX-1遺伝子の発現を抑制させた。

半定量RT-PCR

HCAECsからtotal RNAを抽出し、total RNA 1mg, oligo(dT) primer, Moloney murine leukemia virus RTを使用し逆転写反応を行った。逆転写反応物をTaq polymerase, human specific primer(LOX-1, E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1)を使用してPCR反応を行い、増幅産物をエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドを可視化した。β-actinを内部標準遺伝子として使用し、サンプル間のnormalizationを行った。Western blot assay

HCAECのcell lysate(30mg/lane)をSDS/PAGEにて分離した。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体としてLOX-1 monoclonal antibody, E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1に対するpolyclonal antibodyと4°C overnightで反応させたのち2次抗体と1時間反応させた。chemiluminescenceにてシグナルを増強させバンドを描出させた。

Electrophoretic Mobility Shift Assay

T4 polynucleotide kinase, [γ -³²P]ATPを使用しAP-1とNF-κBのコンセンサス配列を含むオリゴヌクレオチドをend-labelingした。ラベルしたオリゴヌクレオチドと核抽出液を50mM Tris-HCl buffer (pH7.5)とともに30分室温にてインキュベートし、4% nondenaturing ポリアクリルアミドゲルにて分離した。ゲルを乾燥させradiographic filmに露光させた。

③エンドセリン-1による内皮細胞の酸化LDL取り込みの増加

細胞培養

すべての培養試薬および薬品は表示がないものはSigma Chemical Co.から購入した。HUVECの初代培養は、前に記載したようにコラゲナーゼIVで分離しM199培地で培養した。コンフルエンスになった培養細胞は24時間0.5%のウシ血清を含む培地でインキュベートし、次にエンドセリン(ET)-1(100 nM)も

しくはETB受容体の拮抗薬であるBQ-788(1mM; Alexis Corp.で購入)で処理した。

ヒト内皮細胞の酸化LDLの取り込み

LDLは前に記載したように調整し、

1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindo-Carboxyanine perchorate (DiI; Molecular Probesで購入)で標識した。HUVECのコンフルエンスになった初代培養細胞は24時間0.5%のウシ血清を含む培地でインキュベートし、次に指示した時間ET-1(100 nM)で刺激し、それからDiIで標識した酸化LDL(100 mg/ml)と3時間インキュベートさせた。取り込まれた酸化LDLは前に記載したように蛍光によって調べ各々のサンプルのタンパク質濃度によって換算した。

LOX-1のmRNAとタンパク質発現の定量

グアニジンチオシアン酸/塩化セシウム遠心によって内皮細胞のtotal mRNAを調整した。内部標準として試験管内で転写したLOX-1 mRNAを用いて、競合的RT-PCRによるLOX-1 mRNAの定量、または一次抗体に抗LOX-1抗体を用いたウエスタンブロットによる解析を行った。

データ解析

データはコントロールと比較した相対値で示し平均値±SEMで表示した。統計処理はBonferroni's法(複数で比較)(SigmaStat Software; Jandel Corp.)によってStudentのt検定またはANOVAで行った。P<0.05の値のときを有意差ありとみなした。

④ヒト臍帯内皮細胞のFasによるアポトーシスの酸化LDLによるLOX-1を介した増強

LDLの単離と酸化LDLの作製

健康者から採血を行い、血清を超遠心によって分離しLDLを単離した。単離したLDLを5μMの硫酸銅と37°Cで16時間インキュベートして、酸化LDLを作製した。酸化の程度はアガロースゲル電気泳動によって評価した。

細胞培養

実験にはヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を用いた。培養は内皮細胞増殖培地(EGM-MV)にウシ胎児血清(FBS)(2%)、ヒト上皮細胞増殖因子(EGF)(10 ng/ml)、ハイドロコルチゾン(1 μg/ml)、ウシ脳由来抽出物(12 μg/ml)を加えたものを使用した。HUVECsは1%FBSを含むEGM-MVで24時間培養して静止状態にさせた後、様々な濃度の酸化LDL(10、20、40 μg/ml)、アゴニスト的作用を持つ抗Fas抗体(CH11)(1 μg/ml)、pancaspase阻害剤のz-VAD.fmk(10 μM)を加えて実験を行った。また、抗LOX-1抗体(20 μg/ml)の処理を行う群は、これらの添加物を入れる前に、あらかじめ2時間の前処理を行った。細胞死のELISAによる定量

ELISAによる細胞死の定量を行った。本方法により、細胞溶解液中の細胞質分画に含まれる断片化されたDNAを定量することができる。抗ヒストン抗体をコートしたプレートにインキュベーションバッファを加えて30分間プレインキュベートさせた後、サンプルを加えて90分間反応させた。その後、抗DNAペルオキシダーゼ抗体を加えて90分間反応させてから基質液を加えて発色させ、405nmの吸光度を測定した。

フローサイトメトリー

HUVECsと酸化LDL (10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を12時間インキュベートさせた後、FITCでラベルした抗Fas抗体と反応させて、FACSによってHUVECsのFasの発現レベルを測定した。

FasとFas関連因子に対するRT-PCR

細胞から抽出したTotal RNA (10 μg) を使って、RT-PCRを行った。プライマーは、アポトーシスに関連する遺伝子 (Fas, FasL, FADD, FLICE) と内部コントロール (GAPDH) を一度に検出できるようにセット化されたものを使用した。PCRのサイクル数はプラトーに達していないことを証明するために28と30で行った。反応終了後、2%のアガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

⑤樹状細胞を介した抗原クロスプレゼンテーションにおけるLOX-1の関与細胞の分離

細胞は10% 血清、2 mM L-グルタミンおよび抗生物質 (cRPMI) を加えたRPMI 1640培地 (すべてLife technologies, Cergy Pontoise, Franceから購入) で培養した。ヒトBDCA-1+(CD1c+)、CD11c highおよびCD123 low血液ミエロイド系樹状細胞 (Dzionekら、2000年) は以下に記した磁場ビーズ (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany) を用いて調整した。ヒト単球は末梢血単核細胞 (PBMC) から抗CD14抗体でコーティングした磁場ビーズ (Miltenyi Biotech) を用いて調整した。マクロファージは2 ng/mlのGM-CSFに20 ng/mlのGM-CSF (R&D Systems, Abingdon UK) を加えたcRPMIで5日間単球を培養することによって分化させた。未熟単球から起こした樹状細胞は20 ng/mlのIL-4に20 ng/mlのGF-CSF (R&D Systems) で単球を培養することによって分化させた。いくつかの実験では、ヒト単球から起こした樹状細胞と末梢血ミエロイド系樹状細胞は、樹状細胞を成熟させるために10 ng/mlのLPS (*Escherichia coli* のアイソタイプである0111:B4; Sigma St. Louis, MOより購入) で2日間処理した。ヒト樹状細胞を用いたすべての実験において、ただし単球から起こした樹状細胞のLOX-1発現を検討したウエスタンブロットによる解析を除いては、用時調整したCD11c+ミエロイド系末梢血樹状細胞を用いた。T細胞はヒツジ赤血球から調整した末梢血単核細胞 (PBMC) から精製し、そしてB細胞はFACSでCD19+細胞を分離することによって精製した。ミエロイド系マウス未熟樹状細胞はC57BL/6 (H-2b) マウス (Iffa Credo, L'Arbresle, France) から得た骨髄細胞を3 ng/mlのマウスGM-CSF (R&D Systems) で6日間培養することによって進化させた。

タンパク質

組換えHsp70 (StressGen Biotechnologies Corp, Victoria BC, Canada) とTT (SBL vaccine, Stockholm) は商品化したキット (Pierce, Rockford, IL) を用いてピオチン化した。エンドトキシンがコンタミするのを除くために、ピオチン化したHsp70はポリミキシンBを連結させた樹脂 (Pierce) を含むカラムに通した。エンドトキシンの濃度はリムルス法 (Chromogenix, Milano, Italy) によって測定し、0.5 EU/mgのピオチン化したHsp70以

下であった。ヒトLOX-1の71-273細胞外ドメインに対応するcDNAのシークエンスはマウス

Fc1 (LOX-1-muFc) とインフレーションに挿入し、Signal plg-Tail (R&D Systems) を用いて発現させた。融合タンパク質はOptimem培地 (Life technologies) で培養したPEAK細胞 (EdgeBio systems, Gaithersburg, MD) から生成し、そしてアガロースで固定化したプロテインA (Pierce) を用いて精製した。

トランスフェクション

CD14およびスカベンジャー受容体のCD36, MARCO, SR-AI, LOX-1およびCLA-1のcDNAは、挿入部位にprotein C tag (EDQVDPRLIDGK) の配列をもつpEBS/PL発現ベクターでサブクローニングした。CHO細胞 (ATCC, Manassas, VA) はFugene-6 (Roche Diagnostic, Meylan, France) を用いてトランスフェクトし、10%の血清を含むISCOVE培地で培養し、そしてクローンを拾う前にハイグロマイシン (いずれもLife Technologiesから購入) で選択した。トランスフェクションは以下のように行った。すなわち、CD14およびCD36を発現した細胞は各々FITCで標識化した抗CD14および抗CD36抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) を用いてFACSによって分離し、LOX-1を発現した細胞は抗LOX-1抗体23C11を用いてFACSで分離した。MARCO, CLA-1およびSR-AI発現細胞はDiIで標識化したアセチル化LDL (Harbor Bioproducts, Stroughton, MA) によって解析した。スカベンジャー受容体の発現は時と場合に応じてFACSおよびウエスタンブロットで裏づけをした。CD14, CD36およびLOX-1の発現は特異抗体を用いてFACSによって解析を行った。MARCOの発現はFITCで標識化した抗マウスIg抗体 (Silenus, Melbourne, Australia) で検出された抗tag protein抗体を用いてFACSによって分析した。アイソタイプのコントロール抗体はBD Pharmingenから購入した。結果はアイソタイプのコントロール抗体で得られたMFIを差し引いた後MFIで表した。SR-AIおよびCLA-1の発現はウエスタンブロットによって検討した。略述すると、細胞は0.5% Nonidet P40 (Sigma) およびプロテアーゼ阻害剤 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を含む10 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解した。5 \times 10⁶個の細胞分のタンパク質を非還元条件下で10%のポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し、それからニトロセルロース膜 (Biorad, Ivry sur Seine, France) へ転写した。転写後、膜を抗プロテインC抗体 (Roche Diagnostics) でインキュベートした。洗浄後、膜をパーオキシダーゼで標識した抗マウスIgG抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) でインキュベートし、結合した抗体をECL (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) の系を用いて検出した。

抗ヒトLOX-1抗体の生成

抗LOX-1抗体23C11はフロイント完全アジュバンド中に100 mgのLOX-1-muFcを腹腔内に与えて免疫性をもったBALB/cマウス (Iffa Credo) によって生成した。第二の免疫感作はフロイント不完全アジュバンドを用いて行った。さらに50 mg/mlのLOX-1-muFcを静脈接種した後4日後にマウスを殺し、脾臓細胞をSP2/0-Ag14骨髄腫細胞に融合させた。LOX-1-CHO細

胞とコントロールとしてトランスフェクトしていないCHO細胞を用いてFACSによって選別した後、23C11のクローンが腹水液生成のために増やした。23C11抗体はプロテインA/Gカラム(Pierce)を用いて精製した。23C11抗体はFACSによる分析や中和実験に使用した。

結合実験

ビオチン化Hsp 70はFACS緩衝液(0.1%のBSAと0.05%のNaN₃を含むPBS)中4℃で30分間インキュベートし次にFACS緩衝液で洗浄した。FACS緩衝液で洗浄する前に細胞をFITCで標識化したストレプトアジピン(Molecular Probes, Eugene, OR)と4℃で20分間インキュベートした。蛍光はFACScan(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用いて解析した。実験によっては、ビオチン化したHsp 70でインキュベートする前に細胞をHsp 70、Hsp90、BSA、マレイル化BSA(mBSA)、ポリイノシン酸(ポリ[I])、ポリアデノシン酸(ポリ[A])(Sigmaからすべて購入)、酸化LDLまたはアセチル化LDL(どちらもBiogenesis, Poole, UKから購入)と4℃で20分間プレインキュベートした。結合したHsp 70は上述したように検出した。

RT-PCRによるLOX-1 mRNA発現の解析

微小血管内皮細胞(MVEC)と比べて抗原クロスプレゼンテーション作用を示すLOX-1のmRNAの発現はRT-PCRによって検討した。略述すると、細胞は1 mlのトリゾール試薬(Life Technologies)で再懸濁した。クロロホルムで抽出した後、総RNAはイソプロピルアルコールで沈殿させた。一本鎖cDNAは逆転写によってオリゴdTプライマーと逆転写酵素

(Promega, Madison, WI)を用いてtotal RNAの2 mgから合成した。PCRの増幅は特異的なオリゴヌクレオチド(5'-ACTGGAGGGACAGATCTCAGCCGG-3'と5'-GGAAATTGCTTGCTGGATGAATCC-3')を用いて、始めが25 ngの総RNAに相当するcDNA量(94℃で2分)で行い、30サイクル(94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分)で、最後の伸長は4℃、72分で行った。完全なRNAであるかどうかの有無はGAPDHのcDNA増幅により評価した。PCRの産物はエチジウムブロマイド存在下1%のアガロースゲルを用いた電気泳動によって検討した。

ヒト抗原クロスプレゼンテーションによるLOX-1発現の解析

単球、未熟樹状細胞、マクロファージ、B細胞とTリンパ球でのLOX-1の発現はFACSおよびウエスタンブローディングによって検討した。コントロールはLOX-1 CHO細胞およびトランスフェクトしていない細胞を用いた。LOX-1の発現はアレキサ488で標識化した抗LOX-1 23C11抗体を用いたFACSによって解析した。結果はコントロールの抗体で得られたMFIを差し引いたMFIで表示した。ウエスタンブローディングを行うために、細胞を溶解した後、タンパク質を10%-20%のポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いてSDS-PAGEにより分離しPVDF膜に転写した。膜は抗LOX-1抗体の#5-2で調べた。結合した抗体はアビジン-ビオチン系(Vector, Burlingame, CA)とコニカ免疫染色キットを用いて検出した。オボアルブミン特異的T細胞ハイブリドーマB3Zの

活性化

B3Z T細胞ハイブリドーマ細胞はH-2Kbによって提示されるオボアルブミン由来ペプチドSIINGEKLによって特異的に活性化される。オボアルブミンはPierce社の指示する0.25mMのbis(sulgosuccinimetyl) suberate (BS3)を用いてHsp70と結合させた(オボアルブミン-Hsp70と表示)。コントロールとして、オボアルブミンをbis(sulgosuccinimetyl) suberate (BS3)で処理したものを準備した(オボアルブミン-BS3)。タンパク質と接合体はBCAキット(Pierce)を用いて検討した。結合したオボアルブミンの量は特異的な抗オボアルブミン抗体を用いたELISAによって定量した。未熟樹状細胞およびマクロファージの前駆体は前に報告したように生成させ、血清がない培地中でHsp70、オボアルブミンだけ、オボアルブミン-BS3複合体またはオボアルブミン-Hsp70複合体で8時間刺激させた。洗浄後、5×10⁵個の刺激させた樹状細胞を2M、mBSA、transferrin、抗LOX-1抗体23C11またはコントロール抗体でオボアルブミン-Hsp70複合体とインキュベートさせた。16時間後の上清のIL-2の生成はIL2依存cell line CTLL-2(ATCC)の増殖を測定することによって検討した。

腫瘍の処理

6匹のマウスのグループが1.5×10⁴ E. G7細胞(ATCC)を100 mgのオボアルブミン、オボアルブミンは抗LOX-1抗体23C11(抗LOX-1-オボアルブミン)またはコントロール抗体(IgG1-オボアルブミン)(Sigma)と結合させたもので、1、10および18日毎に両腹の間に不完全アジュバンドで分割させたもので処理された右横腹に皮下注射された。腫瘍の長さ(L)と幅(W)は種々の時点で測定し、腫瘍容量はL×W²/2によって決定した。

C. 研究結果、D. 考察

①心筋虚血再灌流傷害におけるLOX-1の阻害：MMP-1と炎症の調節

RT-PCR、Western blotによる解析により心筋虚血再灌流傷害時LOX-1が虚血再灌流領域において(mRNA level、タンパクレベルともに)発現誘導を受けることが明らかとなった。LOX-1のみならず、MMP-1(metalloproteinase)、ICAM-1、VCAM-1、P-selectinの発現誘導も認められた。免疫組織染色にて虚血再灌流領域の心筋組織でのLOX-1、ICAM-1、VCAM-1、P-selectinの発現がいずれも心内膜、心内膜下にて認められることが明らかとなった。これらの現象はいずれも抗LOX-1抗体投与マウスでは認められなかったことからLOX-1を介する現象であることが明らかとなった。次にICAM-1、VCAM-1、P-selectin等の接着分子の発現の上昇が認められたためこれらの接着分子を介する白血球の集積について検討した。心筋虚血再灌流時、左冠動脈支配領域にある血管のまわりに集積している白血球の数はコントロールに比べ増加していた。また抗LOX-1抗体投与ラットにおいては白血球の数は抑制されていた。次にLOX-1と接着分子の発現上昇との相関関係を明らかにするために、oxidative stress-sensitive p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK)の

活性化について検討した。虚血再灌流によってリン酸化された活性化p38MAPKの増加が認められた。なおp38MAPKの量自体は、差が認められなかった。またこの活性化は抗LOX-1抗体によって抑制されたことからLOX-1を介することが明らかとなった。次に虚血再灌流によるLOX-1と梗塞領域との関係について検討した。虚血再灌流により梗塞が引き起こされたが、抗LOX-1抗体によって梗塞領域の縮小を認めた。以上のことから心筋虚血再灌流よりLOX-1が発現誘導を受けること、LOX-1発現上昇がp38MAPK活性化を介してMMP-1や接着分子の発現を誘導していることが明らかとなった。

最近の研究によって心筋虚血患者において血漿酸化LDL濃度、心筋組織における酸化LDLが増加することが明らかとなっている。また酸化LDLは、eNOSの活性減少free radicalの増加、血小板の凝集誘起、血管収縮、アポトーシスを誘導するといわれている。こういった酸化LDLの作用は、スカベンジャーレセプターを介するといわれている。特に酸化LDLによる内皮傷害はLOX-1を介した現象であることがあきらかとなっている。

LOX-1は、free radical、サイトカイン、シェアーストレス、angiotensin II、酸化LDLによって発現誘導を受けることが明らかとなっている。また、虚血再灌流によってfree radicalの増加、サイトカインの放出がひきおこされることは、よく知られた事実である。こういったことから虚血再灌流によるLOX-1の発現誘導は、虚血再灌流時に増加するfree radical、サイトカインによって引き起こされている可能性がある。

MMPは、心筋のリモデリングに関与することが知られている。ヒト、動物の心不全モデルにおいてもMMPの増加が確認されている。最近の研究では、虚血再灌流によって虚血時間が長ければ長いほどMMPの発現が増加し、再灌流後の心筋のmechanical functionの回復が悪くなるということが示されている。今回私たちは虚血再灌流時にMMP-1が増加すること、梗塞巣の出現を示した。またこのMMP-1の増加が抗LOX-1抗体で抑制されることや、抗LOX-1抗体による梗塞巣のサイズの減少から、LOX-1を介してMMP-1の誘導がひきおこされることや、梗塞巣の形成にLOX-1が関与している可能性が示唆された。

虚血再灌流時に白血球特に多核好中球が内皮細胞、心筋細胞の機能障害を引き起こしうることが最近になって示された。原因として白血球からのfree radicalや、タンパク分解酵素の放出などが示唆されている。また白血球の接着に関与する接着分子の中和抗体投与により虚血再灌流傷害が抑制されるというデータが示されている。今回虚血再灌流傷害により接着分子(ICAM-1, VCAM-1, P-selectin)の発現誘導、血管周囲への白血球の集積の増加が明らかとなった。また抗LOX-1抗体により接着分子

(ICAM-1, VCAM-1, P-selectin)の発現が抑制されることや白血球の集積の抑制が認められたことから、白血球の接着分子の発現調節にLOX-1が関与しており、接着分子の発現誘導を介して白血球の集積が引き起こされることが示唆された。

今回虚血再灌流時にp38MAPKの活性化が起こる事

が示され、またその活性化が抗LOX-1抗体によって抑制されたことからLOX-1を介するp38MAPKの活性化が示された。上記のLOX-1を介するMMP-1の誘導、接着分子の誘導等とあわせて考えるとこれらの発現誘導が、p38MAPK活性化を介している可能性が示唆された。

以上のことから虚血再灌流時に増加するfree radical、サイトカインによってLDLが酸化を受けて産生された酸化LDLがLOX-1の発現を誘導し、虚血再灌流傷害の引き金となる心筋傷害を引き起こされている可能性がある。酸化LDLは、心筋の形態学的変化を引き起こし、心筋の収縮能力を減少させる作用があるといわれている。また冠動脈心疾患患者の左室壁に酸化LDLが多く沈着していることが知られている。特に左心室の心内膜、心内膜下に酸化LDLの存在が認められる。今回免疫組織学的解析によりLOX-1の発現は心内膜、心内膜下にて認められ、酸化LDLと同じ部位に局在することが明らかとなった。また今回のstudyによって抗LOX-1抗体が虚血再灌流時に出現する梗塞巣のサイズの減少を引き起こすことが明らかとなった。これらのことから心内膜、心内膜下において酸化LDLはLOX-1を介してfree radicalを産生し、脂質の過酸化、心筋のアポトーシスを引き起こし、梗塞巣のサイズの増大、心機能の増悪をひきおこす可能性が示唆された。

今回のstudyによって虚血再灌流時LOX-1の発現誘導が心筋傷害に寄与していることが明らかとなった。またLOX-1による心筋傷害においてMMP-1、接着分子の発現誘導が重要な働きをになっていることが明らかとなった。今後LOX-1の発現誘導とその活性化の阻害が虚血再灌流心筋傷害における治療のターゲットになりうるかもしれない。

②スタチンは、ヒト冠動脈内皮における酸化LDLを介する接着分子の発現を調節する

酸化LDL (40mg/ml) にて24時間刺激したとき、ヒト冠動脈内皮(HCAECs)にてE-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1等の接着分子の発現誘導が認められた。スタチンであるsimvastatin, atorvastatinにてあらかじめ細胞を処理した場合この発現誘導は抑制された。またLOX-1に対するantisenseoligoを使用し、LOX-1の発現を抑制させた場合には、酸化LDLによる接着分子の発現誘導が抑制されることから、LOX-1を介した現象であることが明らかとなった。次に酸化LDLによるLOX-1発現変化について検討したところ酸化LDLによりLOX-1の発現誘導が認められた。この発現誘導はスタチンであるsimvastatin, atorvastatinにて抑制された。次に酸化LDLによる接着分子の発現誘導の、スタチンによる抑制についての細胞内メカニズムについて考察した。酸化LDL刺激した細胞の核抽出液を使用し、Electrophoretic Mobility Shift Assayをおこなったところredox-sensitive transcription factorであるNF- κ Bが活性化されていることが明らかとなった。なお今までに酸化LDLによる刺激によって活性化されるという報告のあったpromotorであるAP-1に関しては活性化が認められなかった。以上のことから、酸化LDLによる接着分子発現誘導の、スタチンによる抑制は、酸化LDLレセプターで

あるLOX-1の発現抑制を介した現象であることが示唆された。

今回酸化LDL刺激したときのヒト冠動脈内皮における接着分子の発現誘導が認められ、その発現誘導がLOX-1を介していることと、その発現誘導がスタチンによって抑制されることを示した。

いままでに接着分子の発現とそれに引き続く単球の内皮への接着が動脈硬化初期に非常に重要であることが明らかとなっている。現在までにスタチンによってCD11bの発現が減少することが明らかとなっている。今回酸化LDLによるE-selectin、P-selectin、VCAM-1、ICAM-1の発現誘導がスタチンによって抑制されたことから単球の内皮への接着にLOX-1活性化を介したメカニズムが存在していることと、その接着がスタチンによって抑制されることが示唆された。今後simvastatin, atorvastatin以外のスタチンでも同様の現象がおりうるのかを検討している。

最近になって内皮の接着分子の発現がeNOSを介して制御されていることが示された。特筆すべきことはeNOSは、スタチンによって発現誘導を受けることが知られている。これらのことからスタチンによる酸化LDLによる単球の接着の抑制が少なくとも1部分はeNOSを調節することによる可能性がある。

いままでに酸化LDLによって活性化されるpromotorとしてAP-1、NF- κ Bが挙げられている。今回のstudyにおいて、ヒト冠動脈内皮においてはNF- κ Bのみが活性化され、またこの活性化がスタチンによって抑制されることが明らかとなった。

③エンドセリン-1による内皮細胞の酸化LDL取り込みの増加

ET-1に反応したHUVECの酸化LDL取り込みの増加

HUVECをET-1で刺激をし、次にDiIで標識した酸化LDLの取り込みを定量した。HUVECの酸化LDLの取り込みはET-1によって増加した。取り込みが最大値(コントロール)に比べて 2.2 ± 0.3 倍増加を示したのは100 nMのET-1で1時間刺激した後であった(P<0.05)。ET-1による酸化LDL取り込みの増加はETB受容体の特異的阻害剤であるBQ-788(1 mM)によって阻害されていることからETB受容体を介している。

ET-1によるLOX-1発現の増加

酸化LDLの取り込みを増加させる内皮受容体を発見するために、HUVECをET-1で刺激したときの反応時間およびET-1の濃度を変えて検討した。内皮の酸化LDL受容体のLOX-1のmRNAは競合的RT-PCRによって定量した。ET-1はHUVECのLOX-1のmRNAの発現を引き起こした。発現を引き起こした最適条件は100 nMの濃度のET-1で1時間作用させたときであり、この条件下ではコントロールに比べて 1.6 ± 0.1 倍の増加が認められた(P<0.05)。LOX-1のmRNAの発現はET-1の濃度に依存して引き起こされた(最大値は100nM)。ET-1(100 nM)によるLOX-1のmRNAの発現はETB受容体の阻害剤であるBQ-788(1 mM)によって阻害された。

LOX-1のタンパク質レベルでの発現におけるET-1刺激の効果はウエスタンブロッティングによって検討した。mRNAレベルで認められたのと同じように、

ET-1(100 nM)でHUVECを刺激すると1時間後にはLOX-1タンパク質レベルの発現はコントロールに比べて 1.7 ± 0.2 倍増加した(P<0.05)。すなわち、ET-1による酸化LDLの取り込みおよびLOX-1のmRNAまたはタンパク質レベルの発現の増加は同じ条件下で引き起こされた。

ET-1はヒト内皮細胞の酸化LDLの取り込みを増加させるということが本研究で得られた重要な知見である。この取り込みの増加はLOX-1受容体のmRNAとタンパク質の発現の増加によるものと推察される。ET-1によって起こるLOX-1の発現および酸化LDL取り込みはETB受容体を介している。さらに本研究結果はET-1で刺激した内皮の酸化LDLの取り込みにおけるLOX-1の重要性を示唆している。

ヒト内皮細胞がETB受容体を発現していることは前に報告した。それゆえ、内皮細胞において動脈硬化が起こる前段階でのET-1の効果はETBを介していると推察される。最近、ET-1を作用させたヒト内皮細胞ではNADPH酸化酵素の発現およびスーパーオキシドアニオンの生成の調節にはETB受容体を介していることを報告した。スーパーオキシドアニオンの生成が増加するとさらにLDLから酸化LDLへの変化が促進される。このようにET-1は内皮細胞の機能的変化と動脈硬化を引き起こす初期の要素を促進させる。生体内において血管壁でのET-1の遊離とスーパーオキシドアニオンの生成が酸化LDLにより増加されることによってさらに動脈硬化が起こる前段階での悪循環が促進される。高血圧や血管の老化のような動脈硬化症になる前段階での危険因子が、血管のスーパーオキシドアニオンの生成やET-1の遊離の増加によって増強される。動脈硬化症の後段階では、ET-1の増加が血管平滑筋およびマクロファージにおいてはETA受容体を介したスーパーオキシドアニオンの生成が増加されることに関与していると推察される。

結論として、我々が得た結果は、LOX-1を介した酸化LDLの取り込みの増加によって高血圧とアテローム性動脈硬化症の間の新たな結びつきができるという仮説を支持するものである。高血圧症の血管および循環器でのET-1レベルの増加によって、ヒト内皮細胞のLOX-1を介した酸化LDLの取り込みが促進される。この新しい機構によって内皮細胞の機能変化ならびにアテローム性動脈硬化症の進展と増加が促進される。それゆえ、内皮の受容体を遮断することが新しい抗アテローム性動脈硬化症の治療法として考えられる。

④ヒト臍帯内皮細胞のFasによるアポトーシスの酸化LDLによるLOX-1を介した増強

初めに、酸化LDLによるHUVECsの生存率を調べた。酸化LDL(40 μ g/ml)とHUVECsをインキュベートさせ、ELISAによってアポトーシスの割合を測定したが、酸化LDLを加えないコントロール群と比べてアポトーシスの割合に変化はなかった。そこで、酸化LDLがFasのシグナル伝達経路活性化しているのではないかと考え、アゴニスト的作用を持つ抗Fas抗体のCH11を酸化LDLと同時にインキュベートさせると、アポトーシスの割合が増加した。なお、CH11単独のインキュベートでは、アポトーシスの割合に変

化がなかった。CH11によるアポトーシスの増加は、pancaspase阻害剤のz-VAD.fmkによって阻害された。次に、酸化LDLとHUVECsを12時間インキュベートさせた際の、HUVECs表面におけるFasの発現をFACSによって調べた。この結果、酸化LDLの濃度依存的にHUVECs表面上のFasの発現が上昇することが判明した。

このFasを介した酸化LDLによるHUVECsのアポトーシスに、細胞死を調節する遺伝子群が関与しているのではないかと考え、Fas、FasL、FLICE、FADDのmRNA量をRT-PCRによって調べた。酸化LDLとHUVECsを6時間インキュベートさせそれぞれの遺伝子発現を調べたが、酸化LDLを加えないコントロール群と比べて発現量に変化はなかった。

一方、HUVECsには血管内皮細胞に発現する酸化LDL受容体LOX-1が発現している。そこで、このFasを介した酸化LDLによるHUVECsのアポトーシスにLOX-1が関与しているのではないかと考え、あらかじめ抗LOX-1抗体によって前処理を行ったHUVECsに、CH11と酸化LDLを同時にインキュベートさせると、抗LOX-1抗体を前処理しなかった群に比べてアポトーシスの割合が減少した。さらに酸化LDLの濃度依存的に上昇するHUVECs表面上のFasの発現が、HUVECsを抗LOX-1抗体で前処理することにより抑制された。

Fasを介したアポトーシスは動脈硬化形成に特徴的な現象である。また、内皮細胞にはFas、FasLが発現しているが、通常条件下ではFasを介してのアポトーシスに対して内皮細胞は抵抗性を持っている。一方、酸化LDLは内皮細胞に障害をきたし、実際にアポトーシスを誘導することが知られている。Setaらは内皮細胞が酸化LDLによってFasを介したアポトーシスを引き起こすことを報告している。しかし、この実験で用いられた酸化LDLの濃度は300 µg/mlであり、これは生理的な濃度とはいえない。そこで、酸化LDLの濃度をもっと下げて、生理的な条件下での酸化LDLによるFasを介したアポトーシスについて調べてみた。

酸化LDLの濃度が10~40 µg/mlの場合、酸化LDL単独では内皮細胞のアポトーシスは起こらないが、アゴニスト的作用を持つ抗Fas抗体のCH11と同時にインキュベートさせると、内皮細胞のアポトーシスが確認できた。これはpancaspase阻害剤のz-VAD.fmkで阻害されることから、酸化LDLがFasを介してアポトーシスを引き起こすことを示している。また、内皮細胞上のFasの発現が、酸化LDLの濃度依存的に増加することも判明した。もっとも、酸化LDLによって内皮細胞上に発現したFasが、細胞のアポトーシスを引き起こすのに十分な量かどうかはわからないが、少なくとも細胞表面上のFasの発現量がFasLに対する感受性の変化に関連していることが示唆された。しかし、酸化LDLとのインキュベーションの時間を短くした場合、細胞死に関連したFas、FasL、FLICE、FADDの遺伝子群の発現に差は見られなかった。すなわち、酸化LDLによるFasの発現上昇は直接的な作用ではなく、酸化LDLとレセプターとの結合の下流に位置する可能性が考えられた。Sawamuraらによってクローニングされた酸化LDL受

容体LOX-1は、これまでに報告された酸化LDL受容体とは異なり、主に内皮細胞に発現する。そこで、内皮細胞を抗LOX-1抗体で前処理すると、酸化LDLによるFasを介したアポトーシスが阻害された。また、酸化LDLによって発現が増加した内皮細胞上のFasの発現量が減少することも判明した。

この結果、内皮細胞において、酸化LDLによって誘導されるFasを介したアポトーシス、及び酸化LDLによる細胞表面上のFasの発現誘導は、LOX-1を介した反応であるということが明らかになった。高脂血症患者では動脈硬化が促進するが、本研究の結果はそのメカニズムの解明と治療法の確立に新しい視点を与えることになる可能性がある。

⑤樹状細胞を介した抗原クロスプレゼンテーションにおけるLOX-1の関与

ヒト樹状細胞に存在するHSP結合部位

FACSの分析によってヒト未熟樹状細胞はビオチン化したHsp70と濃度依存的に結合し、1 nMで十分検出でき(蛍光強度は8±3、但し平均値±Sdでn=5)、実験に用いた一番高濃度である500 nMが最高値であった(蛍光強度は95±12)。ネガティブコントロールとして用いたビオチン化した破傷風毒素とは結合しなかった。アレキサ488でラベル化したHsp70およびビオチン化した破傷風毒素を用いても同様の結果が得られた(200 nMのアレキサ488でラベルしたHsp70およびビオチン化した破傷風毒素の各々の蛍光強度は85±7と3±2であった。n=5)。樹状細胞に結合したHsp70は飽和することができ、そして一部は標識化していないHsp70と競合するが、破傷風毒素およびBSAに関しては標識化していないものもビオチン化したものも飽和も競合もしない。Hsc70は末梢血の未熟樹状細胞とはHsp70と同様の濃度依存性を示しながら結合する(蛍光強度は88±10、但し200 nMのビオチン化したHsc70を用いたとき、平均値±Sdでn=5)。これらのデータはヒトの抗原提示細胞にはHsp70と結合する構造をもつことを示唆している。

前に報告したように、ビオチン化したHsp70は末梢血の単核細胞とも結合する(ダブルカラーのFACS分析によってCD14+単球とCD19+B細胞を同定した)し、精製したヒト単球、マクロファージそして程度は低いB細胞と成熟した樹状細胞とも結合するが、T細胞とは結合しない。興味あることに、Hsp60とHsp90についても同様の結合パターンを示す。

用いたHsp70は低レベルのエンドキシン(内毒素)を含んでいるにもかかわらず、以下の認識に基づいて抗原提示細胞に結合したHsp70のエンドキシンが関与する可能性は無視した。すなわち、(1)Hsp70の熱処理(100℃、20分間)は総合的に見て抗原提示細胞へのその結合を完全に破壊させる、(2)ポリミキシンBとLPSはHsp70が結合するのを阻害しない。CD14がHSPを介した抗原提示細胞の活性化に関与していることが疑われた。中和した抗CD14抗体(クローンMY14)は樹状細胞やマクロファージとHsp70の結合には影響がなく、Hsp70はCD14をトランスフェクトした細胞とは結合しなかった。これらのデータからCD14はHsp70の受容体としての役割は持っていないことを示唆している。前に行った研究

ではCD91はHsp70、Hsp90、gp96やマクロファージ上のカルモジュリンに対するリガンドであると報告した。Hsp70はヒトマクロファージや末梢血ミエロイド系樹状細胞と結合するにもかかわらず、CD91は樹状細胞ではなくマクロファージの上でFACSによって検出された(各々平均蛍光強度は 37 ± 5 と 5 ± 4)。同時にこれらのデータはHSPと結合する因子はヒト未熟樹状細胞に存在することを示唆しており、それらはCD91とは違うことが推察される。樹状細胞にHsp70が結合するのをスカベンジャー受容体が関与する

マレイル化したBSAは非常に多くのスカベンジャー受容体に対するリガンドである。驚いたことに、BSAではなくマレイル化したBSAはHsp70が末梢血ミエロイド系樹状細胞または程度は低いマクロファージと結合するのを阻害する(阻害の程度は各々 $80 \pm 10\%$ と $55 \pm 9\%$ であった)。スカベンジャー受容体は細胞表面に存在する糖タンパク質であり、リポタンパク質や、変化したLDL(酸化またはアセチル化LDL)、アポトーシス細胞および細菌によって誘導される細胞壁構成成分(すなわちLPSやリポテイコ酸)のような広いスペクトルをもつ構造的に関連のないリガンドに結合する。それから、阻害効力はスカベンジャー受容体の他のリガンドでも見られた。酸化LDL、アセチル化LDL、アポタンパク質B(アポB)、ポリIやフコイダンは十分にHsp70が樹状細胞、マクロファージや単核細胞と結合するのを阻害した(但しネガティブコントロールとして用いたポリAは阻害しなかった)。Hsp60とHsp90のヒト樹状細胞への結合もマレイル化BSAによって抑制された(各々 85 ± 10 および $72 \pm 9\%$ の阻害であった)。これらの結果は、スカベンジャー受容体がヒトの抗原提示細胞におけるHSPに対する細胞表面結合部位であることを示唆している。

次に、a2Mとマレイル化BSA(各々CD91とスカベンジャー受容体のリガンド)の阻害活性を測定することによって、ヒトマクロファージと樹状細胞に結合するHsp70のCD91対スカベンジャー受容体の相対的な役割を分析した。末梢血ミエロイド系樹状細胞に結合したHsp70を阻害するのにa2Mよりもマレイル化BSAの方がよりいっそう効果が強かった(各々2.5 mMの濃度を使用し、 80 ± 10 および $27 \pm 5\%$ の阻害を示した)。これに対して、a2Mとマレイル化BSAはマクロファージに結合したHsp70を同じように濃度に依存して阻害した(各々 55 ± 9 および $65 \pm 6\%$ の阻害であった)。コントロールタンパク質として用いたトランスフェリンおよびBSAは樹状細胞およびマクロファージに結合したHsp70に影響を与えなかった。このことから樹状細胞に結合したHsp70のスカベンジャー受容体は主要な役割を果たしていることが示唆された。

組換えLOX-1にHsp70が結合する

Hsp70が結合するスカベンジャー受容体を同定するために、各種スカベンジャー受容体をエンコードしたcDNAをCHO細胞にトランスフェクトすることにより、Hsp70との結合を検討した。細胞をトランスフェクトすることにより、スカベンジャー受容体の発現は、DiI-Ac-LDLの結合を分析するのと同様の確

にウエスタンブロッティングあるいはFACSによって立証した。結果はLOX-1にトランスフェクトしたCHO(LOX-1-CHO)細胞に結合したビオチン化したHsp70を指す(平均蛍光強度= 875 ± 69 、平均値 \pm Sd、 $n=5$)。但し、他のスカベンジャー受容体、すなわちCD36、SR-A1、MARCOとCLA-1については分析していない。トランスフェクトしていないCHO細胞ではHsp70とDiI-Ac-LDLとの結合は認められなかった。LOX-1は元々酸化LDL受容体として同定され4つの機能ドメインもつ。標識化していないHsp70、マレイル化BSAや異なったリガンドのスカベンジャー受容体(酸化LDL、フコイダン、アポBやポリIを含む)はLOX-1-CHO細胞とHsp70の結合は十分阻害されたが、コントロール分子であるBSAとポリAには阻害されなかった。興味あることに、Hsp60およびHsp90もまたLOX-1-CHO細胞に結合した(各々平均蛍光強度= 950 ± 60 と 640 ± 40 、平均値 \pm Sd、 $n=5$)。これらのデータは、LOX-1にはHsp70と結合部位があることを示唆している。

樹状細胞に結合するHsp70におけるLOX-1の関与

LOX-1タンパク質の発現は内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞や単球-マクロファージにおいても認められると報告されている。抗LOX-1抗体(23C11)を用いたFACSによる分析結果より、ヒト末梢血ミエロイド系樹状細胞とマクロファージはLOX-1を発現していた(各々平均蛍光強度= 38 ± 6 と 40 ± 8 、平均値 \pm Sd、 $n=5$)。LOX-1の発現はIL-4とGM-CSFで単球を培養することによって生じた、単球から誘導された未熟樹状細胞では低く(平均蛍光強度= 18 ± 7)、T細胞や末梢血プラズマ樹状細胞では検出されなかった。樹状細胞のLOX-1の発現は成熟化因子であるLPSで2日処理した後では消失した。抗LOX-1抗体(5-2)を用いて行ったウエスタンブロッティングによる解析により、これらの結果を確認した。コントロールとして用いたLOX-1をトランスフェクトしたCHO細胞でも認められた。これらの結果に一致して、LOX-1のmRNAがヒトの単球、マクロファージ、末梢血ミエロイド系樹状細胞、B細胞、そして前に報告したように、ヒトの内皮細胞に検出されたが、T細胞と成熟樹状細胞では認められなかった。

イソタイプのコントロール抗体ではなく抗LOX-1抗体23C11はモックトランスフェクトしたCHOではなくLOX-1をトランスフェクトしたCHO細胞において総合的にHsp70との結合を阻害した(各々 90 ± 5 と $3 \pm 4\%$ の阻害、平均値 \pm Sd、 $n=5$) (データは表示されていない)。面白いことに、抗LOX-1抗体23C11はヒト樹状細胞とマクロファージに結合したHsp70も阻害した(各々 $45 \pm 8\%$ と $32 \pm 9\%$ の阻害、平均値 \pm Sd、 $n=5$)。

同時にこれらのデータはヒト未熟樹状細胞ではLOX-1を発現しており、樹状細胞ではHsp70に対する受容体としてLOX-1が作用することを証明している。樹状細胞に結合したHsp70は23C11で一部しか阻害されないのは、いくつかのスカベンジャー受容体のリガンド(マレイル化BSAなど)が総合しているからであり、このことはLOX-1に加えて他のスカベンジャー受容体が未熟樹状細胞に発現しHsp70と結合していることを示唆している。

抗原クロスプレゼンテーションにおけるLOX-1の関与

HSPはペプチド提示を介しており、またHSPと結合または融合するすべての抗原に逆らったMHC class Iに依存した免疫反応を始める。そこで我々はLOX-1がHsp70を介した抗原クロスプレゼンテーションに関与しているかどうかを、マウスオボアルブミン特異的B3Z CD8+ハイブリドーマ細胞（この細胞はオボアルブミンのp257-264のペプチド-Kb複合体で刺激するとIL-2が産生する）を用いて検討した。Hsp70はマウス未熟樹状細胞とマクロファージに結合し、そして両細胞ともLOX-1を発現した（23C11抗体を用いたFACSによって証明した）。コントロール抗体ではなく、23C11抗体はマウス樹状細胞とマクロファージにHsp70が結合するのも抑制した（各々45±8と29±5%の阻害、平均値±Sd、n=5）（データは表示していない）マウス樹状細胞はHsp70と結合したオボアルブミン（Hsp70-オボアルブミン複合体）とパルスさせ、B3Z T細胞ハイブリドーマへさらした。Hsp70と結合するにはCTLL-2 cell lineの同様な増殖を誘導するために用いる可溶性のオボアルブミンだけの量に比べて、100倍低い濃度のオボアルブミンが必要であった。結合した試薬で処理したオボアルブミンでは未処理のオボアルブミンと同様の増殖を引き起こした。Hsp70-オボアルブミン複合体で誘導されたIL-2の生成は抗LOX-1抗体によって阻害された（50 µg/mlの23C11で58±9%阻害）。マレイル化BSA、程度は低いがa2MもHsp70によって引き起こされるオボアルブミンクロスプレゼンテーションを阻害した（それぞれ2 mMの濃度を用いたとき各々75±8%と22±6%の阻害であった）。ネガティブコントロールとして用いた、コントロールIgG1抗体とトランスフェリンはオボアルブミンクロスプレゼンテーションに影響はなかった。これらのデータからスカベンジャー受容体、特にLOX-1はin vitroにおいては、Hsp70を介するすべての抗原クロスプレゼンテーションに関与していることを示唆している。

In vivoにおいて腫瘍抗原がLOX-1を標的にすることは免疫反応の保護を引き起こす

それゆえ我々はin vivoにおいて腫瘍抗原がLOX-1を標的にすることによって、腫瘍細胞を発現する抗原に対して治療的かつ保護的な免疫反応を導くのかどうかを検討した。我々は23C11がマウスLOX-1を認識するという事を利用した。C57BL/6(H-2b)マウスに 2×10^4 E. G7細胞（C57BL/6胸腺腫は、NK細胞を介した溶菌と抗オボアルブミンを介した補体に依存した溶解には反応しないオボアルブミンcDNAでトランスフェクトした）を右脇腹に皮下注射し、それから3回（1、10、20日）オボアルブミン（抗LOX-1-オボアルブミン）プラスアジュバント（抗原性補強剤）が結合した抗LOX-1抗体23C11を注射した。その結果、抗LOX-1-オボアルブミンによって、40日後腫瘍が遊離したままであった6匹中6匹のマウスの腫瘍の成長が抑制された。23C11だけ、あるいは23C11とオボアルブミン（結合させていない状態）を投与されたマウスでは、オボアルブミンだけを投与され

たマウスに比べて腫瘍の成長はほとんど遅くならなかった。イソタイプのオボアルブミンと結合したコントロールIgG1（IgG1-オボアルブミン複合体）を投与されたマウスでは、オボアルブミンだけを投与されたマウスに比べて僅かに腫瘍の成長の遅れが認められた。最後に、抗LOX-1-オボアルブミンを注射する前にCD8+T細胞を取除くと抗LOX-1-オボアルブミンによる保護効果は無くなった。これらの結果はin vivoにおいて、腫瘍抗原がLOX-1を標的にすることによって抗腫瘍免疫反応が起こることを示唆している。

抗原提示細胞である樹状細胞とマクロファージは自然免疫と適応免疫の間を調和するのに重要な役割を果たしている。それらは多数の病原体の認識と飲食作用に関連している非常に多くの受容体、すなわちCD36、CLA-1やマンノース受容体を発現している。マクロファージは多くの病原体を摂取して殺す際に分化する。樹状細胞は初期のCD4+とCD8+T細胞を飲食し免疫反応を開始することができる唯一の抗原提示細胞である。

いくつかの外因性分子（HSP、OmpAやいくつかの毒素のような）は特異的な受容体を經由して抗原提示細胞によって飲食され、MHCクラスI経路に接近してCD8+細胞障害性リンパ球を刺激するこの過程はクロスプレゼンテーションと呼ばれている。樹状細胞に発現し抗原クロスプレゼンテーションに関与している受容体の性質は決定されていないままである。それらを同定することは腫瘍特異的な細胞障害反応を開始するのにとても重要である。ここで我々はスカベンジャー受容体、その中でもLOX-1には、樹状細胞を発現しin vivoにおいて細胞障害性Tリンパ球の保護反応の産生に関与したHSPとの結合部位がある。

これまで研究でCD91（ $\alpha 2$ マクログロブリン受容体）はマクロファージ上でHSPとの結合部位があると報告されている。我々はヒトの樹状細胞上ではCD91を検出できなかった。このことは樹状細胞ではCD91ではなくむしろ他のHSPと結合する部位が存在することを示唆している。スカベンジャー受容体は変化したりポタンパク質、アポトーシス細胞、細菌によって生じた細胞壁成分およびマレイル化した抗原のようなリガンドと結合する。我々はマレイル化したBSAが樹状細胞およびマクロファージに結合したHSPを阻害することを報告した。マレイル化BSAとa2Mは同じような濃度依存性を示しながらマクロファージに結合したHsp70を阻害するが、マレイル化BSAは主に未熟樹状細胞に結合したHsp70を抑制する。これらの結果に従って、Basuらはa2Mによってマウスマクロファージのcell lineであるRAW264.7によるHSPを介したペプチドの再提示を阻害することを示している。同時に、これらのデータはHSPの結合に対してCD91対スカベンジャー受容体の相対的な役割は抗原提示細胞の性質によって変化することを示唆している。Hsp70がマクロファージに結合するのにCD91とスカベンジャー受容体の両者が関与するが、樹状細胞上ではスカベンジャー受容体が主なHsp70と結合する部位である。著者によっては、標識化していないHsp70では標識化した

Hsp70が抗原提示細胞と結合するのを全部は阻害しないと報告している。この相違はスカベンジャー受容体の特質によって説明できるかも知れない。膜に結合したリガンドはリガンドによって不完全に置換するが、これは微絨毛もしくはヒダとスカベンジャー受容体とリガンド複合体の結合に関連した機構によるのであろう。さらに、スカベンジャー受容体は次に結合したリガンドと相互作用すると急速に細胞内に取込まれるが、ダウンレギュレーションは起こらない。

我々はHSPがスカベンジャー受容体LOX-1と結合することを示した。LOX-1は内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞および単球/マクロファージ系にも検出される。我々はLOX-1がまた未熟樹状細胞にも発現することを示唆した。LOX-1の異なったアイソフォームを示すウエスタンブロットングによる解析に従って、抗LOX-1抗体が広く免疫反応を起こしたバンドを認識することを報告した。LOX-1、これは酸化LDL受容体としてはじめは同定されたが、LOX-1は4つの機能ドメインをもち核酸とリン脂質に結合しており、ホスファチジルセリンの認知を介してアポトーシス細胞の食作用に関与する。LOX-1に結合した酸化LDLを阻害する化合物がLOX-1をトランスフェクトした細胞に結合したHsp70を完全に阻害するという結果は、LOX-1におけるHsp70と酸化LDLの結合部位に関連性があるか同じであることを示唆している。興味あることに、未熟樹状細胞に結合しているHsp70はマレイル化した抗原に完全に阻害され抗LOX-1抗体には一部だけ阻害されるが、このことは増大するスカベンジャー受容体ファミリーの他のメンバーが抗原提示細胞に結合したHsp70に関与する可能性を示唆している。

HSPを介した細胞の活性化にはCD14、TLR4/MD2複合体およびTLR2/TL4が関与することを前に報告した。我々はLOX-1が樹状細胞にHsp70との結合部位を発現していることを示した。しかしながら、LOX-1を介して抗原提示細胞を刺激することはできなかった。CD91がシグナル受容体かどうかということもまたはっきりしていない状態である。同時にこれらのデータはHSPの反応は飲食作用の受容体(LOX-1やCD91)とシグナル受容体(CD14、TLR2とTLR4)の両方の受容体が共同作用して抗原提示細胞を活性化する可能性を示唆している。この仮説はイーストおよびOmpAで得た最近のデータによって支持される。HSPを介した細胞の活性化における飲食作用およびシグナル受容体の間の相互作用を決定するにはさらに検討をする必要がある。

HSPはペプチドをシャペロンして抗原結合することによりクロスプレゼンテーションを行う。この経路でのLOX-1の役割を解析するために、T細胞ハイブリトーマB3Z、これは融合タンパク質によるCD8+T細胞の誘導はHSPのシャペロンの性質に依存していないというモデルであるが、これを活性化するためにHsp70に結合したオボアルブミンを用いた。我々はLOX-1がHsp70に結合した抗原のMHCクラスIに依存した提示に関与していることを示した。このように脂質代謝における役割を持つのに加えて、スカベンジャー受容体は抗原クロスプレゼンテーションに

も重要な役割を担っている。クロスプレゼンテーションにおけるスカベンジャー受容体の関与は前から指示してきた。抗原のマレイル化は*in vitro*においてはMHCクラスIおよびIIとも抗原提示を引き起こす。さらに、CD36は樹状細胞によるアポトーシス本体の取り込みとクロスプレゼンテーションに関与している。結局、スカベンジャー受容体のリガンド複合体は飲食作用を行うが、これはHSPに対してすでに報告されそしてMHCクラスIの提示に必要である機構である。

スカベンジャー受容体の他に、CD91はマクロファージによる抗原クロスプレゼンテーションを媒介していると報告されている。シュードモナス外毒素A(PEA)はMHCクラスI経路を標的にする抗原であるが、マクロファージのCD91に結合する。このように、これまで同定されたHSP結合する二つの部位(CD91とLOX-1)は二つの関連した多くのリガンドリポタンパク質受容体ファミリーの要素であるという知見は内在的な細胞がかざられた数の認識部位で危険なシグナルの広範囲にわたるスペクトルを認識するという仮説に一致する。

我々は*in vivo*において、腫瘍抗原がLOX-1を標的にすることが抗腫瘍CD8+T細胞の反応を防護することに発展していくということを報告した。さらにマウスは腫瘍細胞の2回目の注入には抵抗を示すが、これはT細胞の反応によって記憶されているからである。前にマイコバクテリアのHsp70について報告したように、オボアルブミンは抗オボアルブミンT細胞防御反応を生じるために抗LOX-1抗体と共有結合する必要がある。この所見は抗LOX-1抗体はオボアルブミンがLOX-1受容体を標的とするためにベクターとして作用していることを示唆している。IgG1-オボアルブミン複合体を投与することによってオボアルブミンを投与したマウスに比べて腫瘍の成長が少し遅れた。前の研究でFcγRは*in vitro*ではIgと抗原の複合体の抗原クロスプレゼンテーションを媒介し、そして*in vivo*では抗原特異的CD8+CTL反応を開始させるということを報告した。このことはなぜIgG1-オボアルブミン複合体がわずかだが十分な抗オボアルブミンT細胞防御反応が起こるのかの説明を与えているのかもしれない。In vitroおよび*in vivo*のデータはLOX-1がMHCクラスI経路の方へ外因性抗原を導くことに関与している受容体の一つであることを示唆している。結論として、スカベンジャー受容体のLOX-1は樹状細胞上に発現し、抗原全体のクロスプレゼンテーションと防御的抗腫瘍免疫の引き金となる受容体であることを証明した。スカベンジャー受容体、特にLOX-1を標的にすることは*in vivo*においてMHCクラスIに依存した免疫防御反応を開始させるための新たなアプローチである。

E. 結論

本研究は我々が発見したLOX-1の研究を通じ、LOX-1の機能を操作することにより血管病の病態に即した治療の開発を目指したものである。本研究では炎症や虚血再還流障害と関連したLOX-1の全く新しい機能を見だし、LOX-1が心筋梗塞の病態にお