

with several types of extracellular matrix and cell receptors. For example, laminin 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) differentially regulates the anchorage and motility of epithelial cells through integrin $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 3\beta 1$, respectively (47). Furthermore, targeted disruption of the *LAMA3* gene, which encodes the $\alpha 3$ subunit of laminin-5, caused an abnormality similar to human junctional epidermolysis bullosa and disturbed ameloblast differentiation (16). These results suggest that laminin is important for tooth formation. The laminin-type G (LG) domain modules consist of ~190 residues at the C-terminal of the laminin $\alpha 1$ to $\alpha 5$ chains (4); however, the function of the G domain of the laminin $\alpha 2$ chain, which is shared by laminin-2 and -4, has not been extensively studied. It has also been demonstrated that the absence of $\alpha 2$ chains in two mutant mouse strains caused severe muscular dystrophy, presumably because of a strong muscular matrix interaction (11, 12). Other indications for the potential functions of $\alpha 2$ LG modules have come from previous studies of laminin-2 and -4, which demonstrated cell adhesion through $\beta 1$ integrin and heparin binding (48), and a distinct interaction with α -dystroglycan (49, 50). Moreover, the $\beta 1$ integrin is expressed in dental mesenchymal cells and differentiated odontoblasts and may interact with laminin $\alpha 2$ during dentin formation. In addition, the heparan sulfate proteoglycan perlecan also binds to the LG module of laminin $\alpha 2$ (51), is expressed in dental mesenchymal cells, and localized in the BM of the tooth germ (data not shown). Our preliminary experiment showed that cell binding of dental epithelium to laminin-2 was inhibited by the addition of EDTA and RGD peptide. Furthermore, the enhancement of DMP and DSPP mRNA expression in dental mesenchymal cells by laminin-2 was inhibited by the addition of heparin. These results suggest that laminin-2 interacts with integrins in dental epithelial cells and heparan sulfate proteoglycan in dental mesenchymal cells, and regulates the cell binding involved with dental epithelium and dentin matrix expression. These molecules may be candidates for the partner of laminin $\alpha 2$ in the tooth germ and are now under investigation in our laboratory using inhibitory antibodies to integrins and recombinant proteins for perlecan.

The present results indicate that absence of the laminin $\alpha 2$ chain and altered regulation of dentin matrix proteins may be causative factors that contribute to mineralization defects in tooth developments disorders.

Acknowledgment—We thank Dr. Yoshihiko Yamada for helpful discussion, critical comments, and providing the antibodies.

REFERENCES

- Lumsden, A. G. (1988) *Development* 103, (suppl.) 155-169
- Ruch, J. V. (1987) *Rev. Biol. Cell.* 14, 1-99
- Thesleff, I., and Hurmerinta, K. (1981) *Differentiation* 18, 75-88
- Timpl, R. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 618-624
- Yurchenco, P. D., and O'Rear, J. J. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 674-681
- Patton, B. L., Miner, J. H., Chiu, A. Y., and Sanes, J. R. (1997) *J. Cell Biol.* 139, 1507-1521
- Tome, F. M., Evangelista, T., Leclerc, A., Sunada, Y., Manole, E., Estournet, B., Barois, A., Campbell, K. P., and Fardeau, M. (1994) *C. R. Acad. Sci. III (Paris)* 317, 351-357
- Shorer, Z., Philpot, J., Muntoni, F., Sewry, C., and Dubowitz, V. (1995) *J. Child Neurol.* 10, 472-475
- Sewry, C. A., Uziyel, Y., Torelli, S., Buchanan, S., Sorokin, L., Cohen, J., and Watt, D. J. (1998) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24, 66-72
- Sunada, Y., Bernier, S. M., Kozak, C. A., Yamada, Y., and Campbell, K. P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13729-13732
- Xu, H., Christmas, P., Wu, X. R., Wewer, U. M., and Engvall, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5572-5576
- Miyagoe, Y., Hanaoka, K., Nonaka, I., Haynsaka, M., Nabeshima, Y., Arahata, K., and Takeda, S. (1997) *FEBS Lett.* 415, 33-39
- Miyagoe-Suzuki, Y., Nakagawa, M., and Takeda, S. (2000) *Microsc. Res. Tech.* 48, 181-191
- Salmivirta, K., Sorokin, L. M., and Ekblom, P. (1997) *Dev. Dyn.* 210, 206-215
- Salmivirta, K., and Ekblom, P. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 857, 279-282
- Ryan, M. C., Lee, K., Miyashita, Y., and Carter, W. G. (1999) *J. Cell Biol.* 145, 1309-1323
- Krebsbach, P. H., Lee, S. K., Matsuki, Y., Kozak, C. A., Yamada, K. M., and Yamada, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 4431-4435
- Simmer, J. P., Lau, E. C., Hu, C. C., Aoba, T., Lacey, M., Nelson, D., Zeichner-David, M., Snead, M. L., Slavkin, H. C., and Fincham, A. G. (1994) *Calcif. Tissue Int.* 54, 312-319
- Diekwisch, T. G., Ware, J., Fincham, A. G., and Zeichner-David, M. (1997) *J. Histochem. Cytochem.* 45, 869-866
- Fisher, L. W., Stubbs, J. T., III, and Young, M. F. (1995) *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 266, 61-65
- Fukumoto, E., Sakai, H., Fukumoto, S., Yagi, T., Takagi, O., and Kato, Y. (2003) *J. Dent. Res.* 82, 17-22
- Kawano, S., Morotomi, T., Toyono, T., Nakamura, N., Uchida, T., Ohishi, M., Toyoshima, K., and Harada, H. (2002) *Connect. Tissue Res.* 43, 409-412
- Schuler, F., and Sorokin, L. M. (1995) *J. Cell Sci.* 108, 3795-3805
- Lesot, H., Osman, M., and Ruch, J. V. (1981) *Dev. Biol.* 82, 371-381
- Thesleff, I., Barrach, H. J., Foidarl, J. M., Vaheri, A., Pratt, R. M., and Martin, G. R. (1981) *Dev. Biol.* 81, 182-192
- Kukita, A., Harada, H., Kukita, T., Inai, T., Matsushashi, S., and Kurisu, K. (1992) *Calcif. Tissue Int.* 51, 393-398
- Smith, C. E., and Chen, W. Y. (1998) *Connect. Tissue Res.* 39, 75-87, 141-149
- Cerny, R., Slaby, I., Hammarstrom, L., and Wurtz, T. (1996) *J. Bone Miner. Res.* 11, 883-891
- Fong, C. D., Hammarstrom, L., Lundmark, C., Wurtz, T., and Slaby, I. (1996) *Adv. Dent. Res.* 10, 195-200
- Lee, S. K., Krebsbach, P. H., Matsuki, Y., Nanci, A., Yamada, K. M., and Yamada, Y. (1996) *Int. J. Dev. Biol.* 40, 1141-1150
- Leuch, N. J., and Winter, G. B. (1995) *Hum. Mutat.* 5, 251-259
- Lagerstrom, M., Dahl, N., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Backman, B., Landegren, U., and Pettersson, U. (1991) *Genomics* 10, 971-975
- Collier, P. M., Sauk, J. J., Rosenbloom, S. J., Yuan, Z. A., and Gibson, C. W. (1997) *Arch. Oral Biol.* 42, 235-242
- Gibson, C. W., Yuan, Z. A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E., Thyagarajan, T., Sreenath, T., Wright, J. T., Decker, S., Piddington, R., Harrison, G., and Kulkarni, A. B. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 31871-31875
- MacDougall, M., DuPont, B. R., Simmons, D., Reus, E., Krebsbach, P., Karrman, C., Holmgren, G., Leach, R. J., and Forsman, K. (1997) *Genomics* 41, 115-118
- MacDougall, M., Simmons, D., Luan, X., Nydegger, J., Feng, J., and Gu, T. T. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 835-842
- Feng, J. Q., Luan, X., Wallace, J., Jing, D., Ohshima, T., Kulkarni, A. B., D'Souza, R. N., Kozak, C. A., and MacDougall, M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 9457-9464
- D'Souza, R. N., Bronckers, A. L., Happonen, R. P., Doga, D. A., Farach-Carson, M. C., and Butler, W. T. (1992) *J. Histochem. Cytochem.* 40, 359-366
- Bogoe-Kirn, C., Krebsbach, P. H., Bartlett, J. D., and Butler, W. T. (1998) *Eur. J. Oral Sci.* 106, 963-970
- D'Souza, R. N., Cavender, A., Sunavala, G., Alvarez, J., Ohshima, T., Kulkarni, A. B., and MacDougall, M. (1997) *J. Bone Miner. Res.* 12, 2040-2049
- Xiao, S., Yu, C., Chou, X., Yuan, W., Wang, Y., Bu, L., Fu, G., Qian, M., Yang, J., Shi, Y., Hu, L., Han, B., Wang, Z., Huang, W., Liu, J., Chen, Z., Zhao, G., and Kong, X. (2001) *Nat. Genet.* 27, 201-204
- Zhang, X., Zhao, J., Li, C., Gao, S., Qiu, C., Liu, P., Wu, G., Qiang, B., Lo, W. H., and Shen, Y. (2001) *Nat. Genet.* 27, 151-152
- Sreenath, T., Thyagarajan, T., Hall, B., Longenecker, G., D'Souza, R., Hong, S., Wright, J. T., MacDougall, M., Sauk, J., and Kulkarni, A. B. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 24874-24880
- Hoshi, K., Kemmotsu, S., Takeuchi, Y., Amizuka, N., and Ozawa, H. (1999) *J. Bone Miner. Res.* 14, 273-280
- Boskey, A. L., Spevak, L., Doty, S. B., and Rosenberg, L. (1997) *Calcif. Tissue Int.* 61, 298-305
- Vachon, P. H., Loechel, F., Xu, H., Wewer, U. M., and Engvall, E. (1996) *J. Cell Biol.* 134, 1483-1497
- Nguyen, B. P., Gil, S. G., and Carter, W. G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 31896-31907
- Brown, J. C., Wiedemann, H., and Timpl, R. (1994) *J. Cell Sci.* 107, 329-338
- Yamada, H., Shimizu, T., Tanaka, T., Campbell, K. P., and Matsumura, K. (1994) *FEBS Lett.* 352, 49-53
- Pall, E. A., Bolton, K. M., and Ervasti, J. M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3817-3821
- Talts, J. F., Andae, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R. (1999) *EMBO J.* 18, 863-870

Atherosclerosis in perlecan heterozygous mice

Reeba K. Vikramadithyan,* Yuko Kako,* Guangping Chen,* Yunying Hu,* Eri Arikawa-Hirasawa,† Yoshihiko Yamada,† and Ira J. Goldberg^{1,*}

Department of Medicine,* Columbia University, New York, NY 10032; and National Institute of Dental and Craniofacial Research,† Bethesda, MD 20892-4370

Abstract The hypothesis that lipoprotein association with perlecan is atherogenic was tested by studying atherosclerosis in mice that had a heterozygous deletion of perlecan, the primary extracellular heparan sulfate proteoglycan in arteries. We first studied the expression of perlecan in mouse lesions and noted that this proteoglycan in aorta was found in the subendothelial matrix. Perlecan was also a major component of the lesional extracellular matrix. Mice with a heterozygous deletion had a reduction in arterial wall perlecan expression. Atherosclerosis in these mice was studied after crossing the defect into the apolipoprotein E (apoE) and LDL receptor knockout backgrounds. At 12 weeks, chow-fed apoE null mice with a heterozygous deletion had less atherosclerosis. However, at 24 weeks and in the LDL receptor heterozygous background, the presence of a perlecan knockout allele did not significantly alter lesion size. Thus, it appears that loss of perlecan leads to less atherosclerosis in early lesions. Although this might be attributable to a decrease in lipoprotein retention, it should be noted that perlecan might mediate multiple other processes that could, in sum, accelerate atherosclerosis.—Vikramadithyan, R. K., Y. Kako, G. Chen, Y. Hu, E. Arikawa-Hirasawa, Y. Yamada, and I. J. Goldberg. Atherosclerosis in perlecan heterozygous mice. *J. Lipid Res.* 2004, 45: 1806–1812.

Supplementary key words heparan • low density lipoprotein receptor • apolipoprotein E • proteoglycans • lipoproteins

Much of atherosclerosis research in the 20th century focused on the cholesterol hypothesis. The evidence that plasma cholesterol-containing lipoproteins cause atherosclerosis is indisputable. However, as was nicely summarized nearly 50 years ago (1), how these lipid-containing particles accumulate within the artery and then produce inflammatory reactions is still unclear. A refinement to the “infiltrative theory” has been an attempt to define the biochemical interactions that lead to this process. Because the lipoproteins are initially found in the extracellular space, they are thought to bind to protein or carbohydrate components of the extracellular matrix. Among the

molecules that have been most studied in this respect are proteoglycans (2).

Within the artery are a number of classes of proteoglycans, complex proteins that contain highly negatively charged carbohydrates. There are several observations that support the proteoglycan-lipoprotein association hypothesis. 1) Dermatan/chondroitin sulfate proteoglycans are found in greater amounts in lesions (3, 4), and some classes of these proteins are found in regions that also contain apolipoprotein B (apoB) (5), the major protein component of LDL and remnant lipoproteins. 2) Complexes of proteoglycans and LDL have been isolated from arteries (6). 3) Prolonged incubations of proteoglycans and LDL will, in vitro, produce aggregates (7).

Of all the proteoglycans, the most heavily charged and most avid LDL binding are the heparan sulfate proteoglycans (8). Heparin, a highly charged carbohydrate of this class, has been studied because it interacts with apoB-containing lipoproteins (9, 10). This reaction, however, is most evident in low ionic strength solutions; in several reports, the proteoglycan-LDL complexes are dissociated by physiologic saline (9). Moreover, increasing LDL charge (e.g., via oxidation) decreases the proteoglycan-lipoprotein interaction (11).

One way to study the role of proteoglycans in atherosclerosis is to use genetically manipulated mice that have an alteration in proteoglycan production. Perlecan is a 450 kDa core protein containing three heparan sulfate chains of 70 kDa attached in domain I and an additional chain associated with domain V. Perlecan is the major heparan sulfate proteoglycan in the subendothelial matrix (12). This protein has a variety of actions and is essential for normal bone formation and neurological development; a homozygous deletion of perlecan in mice is lethal as a result of bone and neurological malformations (13). Within the vasculature, perlecan helps to stabilize the endothelial barrier and decrease the proliferation of smooth muscle cells (14); these are potentially antiatherogenic actions of perlecan. We first studied perlecan expression

Manuscript received 21 January 2004, in revised form 2 June 2004, and in revised form 8 July 2004.

Published, JLR Papers in Press, July 16, 2004.
DOI 10.1194/jlr.M400019-JLR200

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: ijjg3@columbia.edu

Copyright © 2004 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

in normal and atherosclerotic mouse arteries and then tested whether a partial loss of perlecan alters atherosclerosis in the mouse.

METHODS

Mouse housing and diets

Mice were maintained in a temperature-controlled (25°C) facility with a 12 h light/dark cycle and given free access to food and water, except when fasting blood specimens were obtained. Mice were fed either laboratory rodent chow (PMI Nutrition International, Inc.) or a Paigen diet (CI3002; Research Diets, Inc.). Rodent chow contained 4.5% (w/w) fat; the Paigen diet contained 15% (w/w) fat, 1.25% (w/w) cholesterol, and 0.5% cholic acid.

Genetically altered mice

Heterozygous perlecan-deficient mice (13) were backcrossed to C57BL/6 mice for seven generations. These animals were crossed onto apolipoprotein E null (apoE0) mice or LDL receptor knockout mice in the same background that were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Immunohistochemical staining for aortic perlecan

Aortas from male apoE0 mice fed a chow diet at different time points were embedded in OCT and snap frozen on dry ice. Ten micrometer frozen sections were fixed in cold acetone, and endogenous peroxidase was quenched with 3% H₂O₂/methanol. The sections were then stained with 1:100 rat monoclonal antibody against perlecan (Neo Marks, Inc.) at 37°C for 1 h, then at 4°C overnight. The antibody was detected with the standard Avidin Biotin Complex method (Vector Laboratories, Inc.) and 3-amino-9-ethyl carbazole (Zymed Laboratories) as the substrate. Positive staining is shown as red deposits. For a negative control, slides were incubated with nonimmune rat IgG (Sigma) in place of the first antibody.

Quantitative real-time PCR for the aortic perlecan gene

Total RNA was isolated from aortas of heterozygous LDL receptor-deficient mice and heterozygous perlecan mice in the heterozygous LDL receptor-deficient background using the RNeasy mini kit (Qiagen). The mRNA levels for perlecan were determined by SYBR green (Applied Biosystems) real-time PCR using 10–100 ng of total RNA. Primer sequences were selected from domain I, the potential heparan sulfate attachment domain (PubMed sequence NM008305; 201–408). The primer sequences are as follows: P1-RT (forward), 5'-TAGCGGCTCCATGAG-3'; P1-RT (reverse), 5'-AGATCCGTCCGATTC-3'. The real-time PCR standard curve was constructed by using serial dilutions of mouse total RNA isolated from aortas. Data were normalized to mouse β -actin.

Blood sampling

Fasting blood samples were obtained from mice after removal of food for 6 h in the morning. The animals were anesthetized with methoxyflurane and bled by retro-orbital phlebotomy into tubes containing anticoagulant (5 mM EDTA) using heparinized capillary tubes. Cholesterol and triglyceride were measured using kits from Sigma. Lipoproteins—VLDL ($d < 1.006$ g/ml), intermediate density lipoprotein/LDL ($d = 1.006$ – 1.063 g/ml), and HDL ($d = 1.063$ – 1.21 g/ml)—were separated by sequential density ultracentrifugation of plasma in a TLA 100 rotor (Beckman Instruments) (15).

Quantitative atherosclerosis analysis

Mice were killed and atherosclerosis assays were performed on the aortic roots as described previously (15, 16). Hearts were perfused with PBS, fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in OCT compound, and sectioned with a cryostat at 10 μ m thickness. Slides containing the aortic tissue were stained with Oil Red O and hematoxylin and counterstained with light green. Lesions of the proximal aorta were measured in 80 μ m intervals. The mean lesion area of six sections was calculated and shown as lesion area (μ m²). The atherosclerotic lesions were assessed by en face assays (17).

Statistical analysis

Comparisons between two genotypes were performed using a two-tailed Student's *t*-test.

RESULTS

Perlecan expression in blood vessels

The expression of perlecan within the aorta of apoE mice fed a chow diet differed markedly as a function of

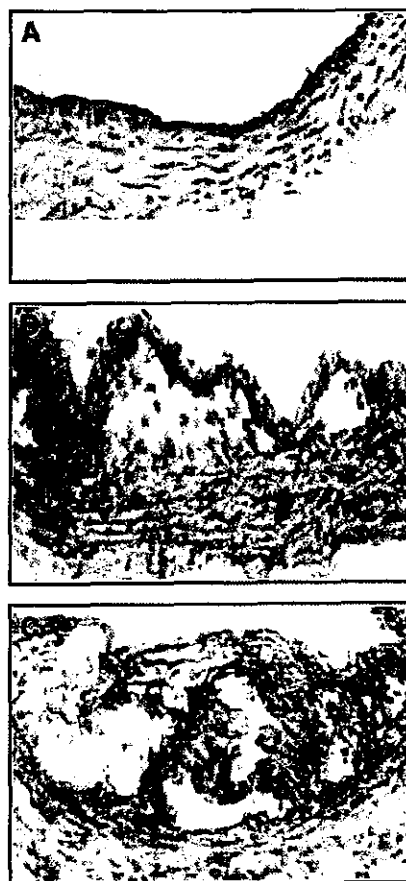


Fig. 1. Perlecan expression in lesions of atherosclerosis varies with lesion severity. A: In normal aorta, perlecan was distributed in the subendothelial regions. B,C: Perlecan expression increased markedly in advanced lesions, in the fibrous cap as well as in the plaque core.

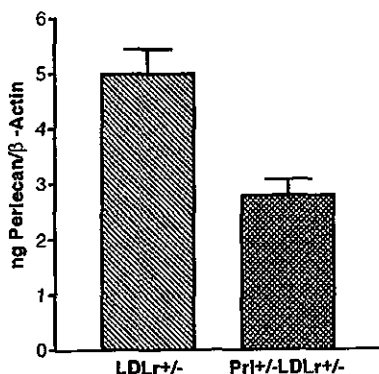


Fig. 2. Perlecan expression in aortas by quantitative real-time PCR. Aortas from heterozygous LDL receptor (LDLr)-deficient mice and heterozygous perlecan (Pr1) mice in the heterozygous LDL receptor-deficient background were used for real-time PCR. Aortas from three mice from each group were pooled for RNA per set. The data shown are averages of two sets. Values are expressed as mean \pm SEM.

disease within the vessel. In normal, nondiseased aortas, perlecan staining was primarily localized to the subendothelial regions (Fig. 1A). In more advanced lesions, additional staining was found within the fibrous cap that would be expected to have proliferated smooth muscle cells (Fig. 1B). Most remarkably, in advanced lesions with lipid-filled cores, intense staining was within the lipid core (Fig. 1C). Thus, perlecan is a major matrix protein within the lesions.

Quantitative real-time PCR for the aortic perlecan gene

To determine whether heterozygous perlecan knockout mice have an alteration of perlecan expression, the aortic content of perlecan mRNA was compared with that of control mice. As shown in Fig. 2, deletion of one allele reduced perlecan expression.

Lipids in perlecan heterozygous knockout mice

Because lipoprotein uptake by the liver is thought to be mediated, in part, by "capture" by proteoglycans, we assessed whether the loss of perlecan would alter plasma lipoproteins. Table 1 shows plasma and lipoprotein lipids

of wild-type and perlecan heterozygous mice eating chow and a Paigen diet. Both strains of mice had identical levels of plasma cholesterol and triglyceride, VLDL, LDL, and HDL. This was confirmed by FPLC analysis (data not shown). When these mice were placed on a Paigen diet, both the controls and perlecan heterozygous mice had a similar increase in plasma apoB-containing lipoproteins. However, loss of perlecan did not affect lipids.

Lipoprotein uptake via receptors might have obscured any uptake as a result of liver or peripheral tissue heparan sulfate proteoglycan-mediated processes. Therefore, we next examined lipids and lipoproteins in apoE0 and apoE0/perlecan heterozygous mice. As expected, compared with wild-type mice, apoE deficiency led to marked increases of cholesterol and triglyceride at 12 weeks of age (Table 2). However, perlecan deficiency did not significantly alter plasma cholesterol, which was 420 ± 105 mg/dl for apoE0 mice and 359 ± 114 mg/dl for apoE0/perlecan heterozygous mice. A second group of mice was maintained on this diet for 24 weeks (Table 2). Again, the lipids and lipoproteins were not different. Therefore, perlecan deficiency did not alter either plasma or lipoprotein lipids in the apoE0 background.

Perlecan-deficient mice were then crossed with LDL receptor knockouts. Because our primary objective was to study atherosclerosis, we created a colony of heterozygous LDL receptor knockouts and fed them the Paigen diet as reported by van Haperen et al. (18). Male LDL receptor heterozygous (LDL^{+/-}) and perlecan-deficient LDL^{+/-} mice were begun on a Paigen diet at 4 weeks of age and maintained on this diet for 16 weeks. Plasma cholesterol in these mice averaged 579 ± 33 and 595 ± 32 mg/dl in LDL^{+/-} and perlecan-deficient/LDL receptor-deficient mice, respectively (Table 3).

Atherosclerosis in control and perlecan heterozygous apoE0 mice

In the chow-fed apoE knockout mice, both early lesions (12 weeks) and later lesions (24 weeks) were studied. In 12 week old male mice, perlecan deficiency led to a dramatic and significant reduction in lesion size, which averaged $23,961 \mu\text{m}^2$ in controls and $7,796 \mu\text{m}^2$ in perlecan heterozygous animals ($P = 0.02$) (Table 4). Lesion sizes for individual animals are shown in Fig. 3A, graphed on a semi-log scale. Lack of perlecan led to a >70% reduction

TABLE 1. Lipid profiles of wild-type and heterozygous perlecan-deficient mice fed chow and Paigen diets

Genotype	Diet	Age	n	Cholesterol				Triglyceride	
				Plasma	VLDL	LDL	HDL	Plasma	VLDL
		weeks	mg/dl						
Wild-type	Chow	15	5	83 \pm 12	21 \pm 13	23 \pm 4	55 \pm 10	50 \pm 14	17 \pm 8
Pr1 ^{+/-}	Chow	15	5	95 \pm 20	17 \pm 4	27 \pm 10	63 \pm 24	52 \pm 19	13 \pm 5
Wild-type	Paigen	19	4	236 \pm 36	123 \pm 23	68 \pm 6	48 \pm 8	48 \pm 2	25 \pm 2
Pr1 ^{+/-}	Paigen	19	5	248 \pm 36	151 \pm 34	59 \pm 4	48 \pm 7	50 \pm 10	25 \pm 5
Wild-type	Paigen	40	4	198 \pm 27	114 \pm 27	33 \pm 4	41 \pm 13	44 \pm 9	27 \pm 9
Pr1 ^{+/-}	Paigen	40	5	199 \pm 2	112 \pm 15	34 \pm 3	45 \pm 9	49 \pm 6	31 \pm 6

Blood samples were obtained at 15 weeks of age for the chow diet-fed state and at 19 weeks and 10 months of age for the Paigen diet-fed state. Pr1^{+/-} denotes mice that have a heterozygous deletion of the perlecan gene.

TABLE 2. Lipid profiles of heterozygous perlecan-deficient mice in the apoE0 background

Genotype	Gender	n	Cholesterol				Triglyceride	
			Plasma	VLDL	LDL	HDL	Plasma	VLDL
			mg/dl				mg/dl	
12 weeks of age								
apoE0	Male	13	420 ± 105	311 ± 115	82 ± 23	23 ± 7	120 ± 35	88 ± 27
apoE0/Pr1 ^{+/-}	Male	13	359 ± 114	257 ± 113	71 ± 19	23 ± 7	115 ± 20	89 ± 16
apoE0	Female	18	373 ± 101	264 ± 62	76 ± 29	14 ± 5	58 ± 12	38 ± 9
apoE0/Pr1 ^{+/-}	Female	13	392 ± 87	288 ± 55	84 ± 22	14 ± 5	67 ± 14	44 ± 16
24 weeks of age								
apoE0	Male	10	487 ± 160	404 ± 156	79 ± 25	19 ± 7	127 ± 30	106 ± 27
apoE0/Pr1 ^{+/-}	Male	19	418 ± 162	320 ± 158	65 ± 21	15 ± 7	116 ± 52	92 ± 49
apoE0	Female	10	401 ± 109	302 ± 96	73 ± 19	8 ± 6	49 ± 12	29 ± 11
apoE0/Pr1 ^{+/-}	Female	17	405 ± 95	308 ± 82	65 ± 2	6 ± 4	50 ± 12	32 ± 10

Lipoprotein profiles were assessed by ultracentrifugation. apoE0, apolipoprotein E knockout mice; apoE0/Pr1^{+/-}, heterozygous perlecan-deficient mice in the apoE knockout background.

in lesion size. This amount of atherosclerosis was too small to allow for en face quantification. Lesion size in female mice is also shown in Table 4 and Fig. 3A. Although a trend toward reduced lesions was noted in the perlecan heterozygous females, this was not significant.

After 24 weeks, male perlecan heterozygous mice still had, on average, less atherosclerosis, 121,961 μm² in controls and 89,167 μm² in perlecan heterozygous animals, but this difference was not significant (Fig. 3B). Female mice had larger lesions, but there was no difference with the presence of a perlecan knockout allele. En face assays also showed no difference in lesion area with perlecan deficiency, 2.8 ± 2% in apoE0 mice and 1.9 ± 1.2% in apoE0/perlecan heterozygous mice (average ± SD, P = 0.2).

Atherosclerosis in heterozygous LDL receptor-deficient mice

It has been hypothesized that the interaction of lipoproteins with proteoglycans might differ in mice that express apoE (19), a stronger proteoglycan binding protein than apoB. For this reason, we assessed whether a similar degree of atherosclerosis in heterozygous LDL receptor knockout mice would still show the effects of perlecan deficiency on atherosclerosis. For this reason, male mice were studied at 20 weeks. As shown in Fig. 4, perlecan deficiency did not alter atherosclerosis in this model. The average lesion areas in heterozygous LDL receptor-deficient and heterozygous perlecan-deficient mice in the LDL receptor heterozygous background are shown in Table 5.

DISCUSSION

Crossing perlecan heterozygous mice into an atherosclerotic background tested the hypothetical role for heparan sulfate proteoglycans in atherogenesis. Our data show the following. 1) Although perlecan is primarily found in the subendothelial matrix in normal vessels, it is found in core regions of advanced atherosclerotic lesions. 2) Despite a possible role of perlecan in the removal of lipoproteins from the circulation, a heterozygous deletion of perlecan did not alter plasma lipoprotein profiles. 3) Young perlecan heterozygous knockout/apoE0 male mice had reduced atherosclerosis. A similar trend occurred in females. However, older mice and heterozygous LDL receptor-deficient mice had no difference in lesion size.

Endothelial cells produce a number of heparan sulfate proteoglycans when assessed in cultured cells. These include syndecans, which are a component of the cell membrane (20). Perlecan is the major heparan sulfate proteoglycan within the subendothelial matrix; some perlecan is also found associated with the apical side of the cells. Cultured smooth muscle cells express and secrete perlecan (14). Our immunohistological data suggest that both cells express perlecan in vivo, but at different times and under different stimuli. In normal vessels, perlecan was prominently found within the subendothelial matrix. However, with the development of lesions, perlecan staining was decreased in the subendothelial region. In humans, this may result in the decrease in arterial heparan sulfate proteoglycans reported with atherosclerosis (21).

TABLE 3. Lipid profiles of heterozygous perlecan-deficient mice in the LDL receptor heterozygous background on the Paigen diet for 16 weeks

Genotype	n	Cholesterol				Triglyceride		
		Plasma	VLDL	LDL	HDL	Plasma	VLDL	
			mg/dl				mg/dl	
LDLr ^{+/-}	13	579 ± 33	353 ± 44	219 ± 31	59 ± 5	55 ± 3	31 ± 2	
LDLr ^{+/-} /Pr1 ^{+/-}	13	551 ± 30	307 ± 24	167 ± 11	62 ± 4	48 ± 3	23 ± 2	

Lipoprotein profiles were assessed by ultracentrifugation. LDLr^{+/-}, heterozygous LDL receptor knockout mice; LDLr^{+/-}/Pr1^{+/-}, heterozygous perlecan-deficient mice in the heterozygous LDL receptor background.

TABLE 4. Atherosclerotic lesions of heterozygous perlecan-deficient mice in the apoE0 background

Genotype	Gender	12 Weeks of Age		24 Weeks of Age	
		n	Lesion Size (μm^2)	n	Lesion Size (μm^2)
apoE0	Male	13	23,961 \pm 26,075	11	121,961 \pm 71,643
apoE0/Pr1 ^{+/-}	Male	11	7,796 \pm 7,949 ^a	19	89,167 \pm 49,973
apoE0	Female	13	28,940 \pm 45,369	10	205,004 \pm 107,623
apoE0/Pr1 ^{+/-}	Female	14	19,789 \pm 22,302	17	180,142 \pm 63,035

^a $P < 0.05$ compared with apoE0 mice.

The reasons for this decrease might be altered perlecan expression or an increase in its degradation. The latter might result from the actions of heparanase, which is secreted by endothelial cells in response to atherogenic stimuli (22).

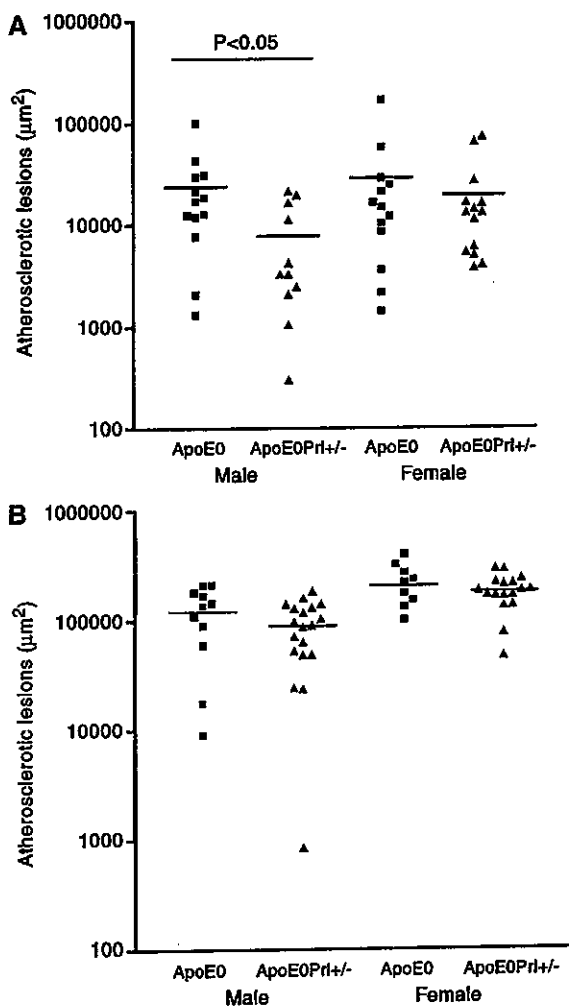


Fig. 3. Effects of heterozygous perlecan deficiency on atherosclerotic lesions. Heterozygous perlecan deficiency was crossed into the apoE knockout background. Male and female chow-fed mice were assessed for lipids and atherosclerosis after 12 weeks (A) and 24 weeks (B). The data obtained from sections of the aortic root are shown on a log scale. $P < 0.05$.

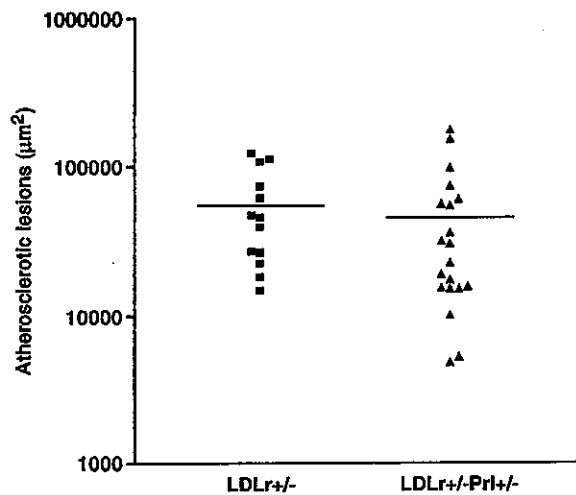


Fig. 4. Atherosclerosis in LDL receptor (LDLr) heterozygous knockout mice. Perlecan (Pr1) heterozygous knockout mice were bred with LDL receptor knockout mice. The offspring, all with a heterozygous deficiency of LDL receptor, were fed a high-fat and cholesterol/cholic acid-containing diet (Paigen) for 16 weeks, and atherosclerotic lesion size at the aortic root was quantified.

Kunjathoor et al. (23) have demonstrated that the major proteoglycans detected in murine atherosclerosis are perlecan and biglycan. Perlecan was present extensively in the lesions of apoE-deficient and LDL receptor-deficient mice. Perlecan was also detected in intermediate and advanced lesions of hypercholesterolemic nonhuman primates and in cultures of medial smooth muscle cells from human atherosclerotic tissue. Our data comparing early and advanced lesions confirm their observations. Like others, we also found perlecan staining surrounding the lipid core (24). Moreover, we found remarkable amounts of perlecan in very advanced lesions containing necrotic lipid cores. Because these regions are distant from endothelial cells, we speculate that either smooth muscle cells or macrophages are the source of this perlecan. Because macrophages do not appear to express perlecan in great quantities (25), either smooth muscle cells or some other cells are the likely origin of most perlecan in mouse atherosclerotic lesions.

We had anticipated that perlecan deficiency would result in a defect in lipoprotein removal from the bloodstream, similar to that found in some diabetic models (26). However neither fasting nor postprandial lipemia differed between control and perlecan heterozygous mice.

TABLE 5. Atherosclerotic lesions of heterozygous perlecan-deficient mice in the LDL receptor heterozygous background

Genotype	Gender	20 Weeks of Age	
		n	Lesion Size (μm^2)
LDLr ^{+/-}	Male	13	55,653 \pm 10,505
LDLr ^{+/-} /Pr1 ^{+/-}	Male	20	45,361 \pm 10,622

Mice were maintained on the Paigen diet for 16 weeks.

In fact, the rationale for the use of apoE0 mice was, in part, to allow us to assess the effect of perlecan deficiency on the removal of remnant lipoproteins. We hypothesized that the apoB-48-containing lipoproteins in these mice were unable to interact with either the LDL receptor or the LDL receptor-related protein and relied on heparan sulfate proteoglycan binding for removal. However, partial loss of perlecan was not physiologically significant. Perhaps the apoE-deficient lipoproteins were unable to bind to heparan sulfate proteoglycans, and therefore, perlecan deficiency had no effect.

To test some of these hypotheses, we performed a study in heterozygous LDL receptor knockout mice fed an atherogenic diet. These mice have sufficient hypercholesterolemia to develop atherosclerotic lesions, as noted by others (18); however, perlecan deficiency did not alter the lipoprotein profiles. Using heterozygous LDL receptor knockout mice, we attempted to create lesions that were similar in size to those of the 12 week old male apoE0 mice. Although the lesions were somewhat larger, perlecan deficiency did not alter the lesion size. Perhaps these lesions in the cholic acid-fed mice were more inflammatory and, hence, less affected by a gene deletion that would alter lipoprotein retention. Alternatively, the lesions studied might have been too advanced to find differences. Finally, the pathogenesis of lesions might differ in these two models as a result of the presence of apoE.

Although perlecan was a likely candidate to have affected atherosclerosis progression, the heterozygous mutation could have been expected to increase or decrease lesions. A central role for lipoprotein accumulation attributable to its binding to matrix molecules within the arterial walls was proposed almost 50 years ago by Page (1). The "infiltrative" theory of atherosclerosis suggested that plasma cholesterol-containing lipoproteins accumulate in vessels either because they are present in greater concentrations or that matrix is altered to increase the propensity for the lipoproteins to be retained within the artery. A refinement of this theory termed the "response to retention" suggested that proteoglycans are the matrix component that "traps" atherogenic lipoproteins (27). However, the biochemical evidence supporting an important role for lipoprotein-proteoglycan complexes has been questioned (28). Non-apoE-containing lipoproteins have relatively weak affinity for proteoglycans in physiological ionic conditions. This has led us (28, 29) and others (30) to suggest that lipoprotein-proteoglycan interaction requires an intermediary molecule such as lipoprotein lipase. The other lipoprotein-associating molecule that would be expected to increase lipoprotein-proteoglycan interaction, apoE, is antiatherosclerotic.

Our studies show that perlecan deficiency leads to less atherosclerosis. This was found in early, but not late, lesions of apoE0 mice. Most notable is the comparison of our data with those of Skalen et al. (19), who studied atherosclerosis in mice with an apoB mutation that decreases proteoglycan affinity. Like these authors, we found that later lesions were no longer significantly different from those of controls. In addition, like Skalen et al. (19), we

failed to find a major difference in atherosclerosis when perlecan deficiency was assessed in the heterozygous LDL-deficient background. These authors postulated that apoE-containing LDL, found in mice but not in humans, has greater affinity for proteoglycans. Hence, the effects of alterations in apoB structure, and perhaps the amount of vessel wall perlecan, might be less evident in LDL receptor knockout mice.

We conclude that perlecan is a major component of advanced atherosclerotic lesions in the mouse. A heterozygous deficiency of perlecan led to reduced atherosclerosis in apoE0 mice. This effect was found in young males without advanced lesions. Although it is possible that perlecan deficiency alone reduced atherosclerosis as a result of reduced lipoprotein retention, the complexity of the process and the multiple biological actions of perlecan do not allow one to make that conclusion with certainty. ■■

This research was funded by Grants HL-62301 and HL-56984 (SCOR) from the National Heart, Blood, and Lung Institute.

REFERENCES

1. Page, I. H. 1954. Atherosclerosis: an introduction. *Circulation*. 10: 1-27.
2. Camejo, G., E. Hurt-Camejo, O. Wiklund, and G. Bondjers. 1998. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. 139: 205-222.
3. Dalferes, E. R., Jr., B. Radhakrishnamurthy, H. A. Ruiz, and G. S. Berenson. 1987. Composition of proteoglycans from human atherosclerotic lesions. *Exp. Mol. Pathol.* 47: 363-376.
4. Ehrlich, K. C., B. Radhakrishnamurthy, and G. S. Berenson. 1975. Isolation of a chondroitin sulfate-dermatan sulfate proteoglycan from bovine aorta. *Arch. Biochem. Biophys.* 171: 361-369.
5. Radhakrishnamurthy, B., R. E. Tracy, E. R. Dalferes, Jr., and G. S. Berenson. 1998. Proteoglycans in human coronary arteriosclerotic lesions. *Exp. Mol. Pathol.* 65: 1-8.
6. Camejo, G., F. Laguna, F. Lopez, and R. Starosta. 1980. Characterization and properties of a lipoprotein-complexing proteoglycan from human aorta. *Atherosclerosis*. 35: 307-320.
7. Srinivasan, S. R., P. Vijayagopal, K. Eberle, B. Radhakrishnamurthy, and G. S. Berenson. 1989. Low-density lipoprotein binding affinity of arterial wall proteoglycans: characteristics of a chondroitin sulfate proteoglycan subfraction. *Biochim. Biophys. Acta*. 1006: 159-166.
8. Iverius, P. H. 1972. The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 247: 2607-2613.
9. Camejo, G., S. O. Olofsson, F. Lopez, P. Carlsson, and G. Bondjers. 1988. Identification of Apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. 8: 368-377.
10. Weisgraber, K. H., and S. C. Rall, Jr. 1987. Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites. *J. Biol. Chem.* 262: 11097-11103.
11. Hurt-Camejo, E., G. Camejo, B. Rosengren, F. Lopez, C. Ahlstrom, G. Fager, and G. Bondjers. 1992. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.* 12: 569-583.
12. Pillarisetti, S. 2000. Lipoprotein modulation of subendothelial heparan sulfate proteoglycans (perlecan) and atherogenicity. *Trends Cardiovasc. Med.* 10: 60-65.
13. Arikawa-Hirasawa, E., H. Watanabe, H. Takami, J. R. Hassell, and Y. Yamada. 1999. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 23: 354-358.
14. Paka, L., I. J. Goldberg, J. C. Obunike, S. Y. Choi, U. Saxena, I. D. Goldberg, and S. Pillarisetti. 1999. Perlecan mediates the antipro-

- liferative effect of apolipoprotein E on smooth muscle cells. An underlying mechanism for the modulation of smooth muscle cell growth? *J. Biol. Chem.* **274**: 36403–36408.
15. Kako, Y., L. S. Huang, J. Yang, T. Katopodis, R. Ramakrishnan, and I. J. Goldberg. 1999. Streptozotocin-induced diabetes in human apolipoprotein B transgenic mice. Effects on lipoproteins and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **40**: 2185–2194.
 16. Yagyu, H., E. P. Lutz, Y. Kako, S. Marks, Y. Hu, S. Y. Choi, A. Bensadoun, and I. J. Goldberg. 2002. Very low density lipoprotein (VLDL) receptor-deficient mice have reduced lipoprotein lipase activity. Possible causes of hypertriglyceridemia and reduced body mass with VLDL receptor deficiency. *J. Biol. Chem.* **277**: 10037–10043.
 17. Tangirala, R. K., E. M. Rubin, and W. Palinski. 1995. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* **36**: 2320–2328.
 18. van Haperen, R., A. van Tol, T. van Gent, L. Scheek, P. Visser, A. van der Kamp, F. Grosveld, and R. de Crom. 2002. Increased risk of atherosclerosis by elevated plasma levels of phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 48938–48943.
 19. Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulthen, O. Wiklund, T. L. Innerarity, and J. Boren. 2002. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. **417**: 750–754.
 20. Rosenberg, R. D., N. W. Shworak, J. Liu, J. J. Schwartz, and L. Zhang. 1997. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J. Clin. Invest.* **100** (Suppl.): 67–75.
 21. Stevens, R. L., M. Colombo, J. J. Gonzales, W. Hollander, and K. Schmid. 1976. The glycosaminoglycans of the human artery and their changes in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **58**: 470–481.
 22. Sivaram, P., J. C. Obunike, and I. J. Goldberg. 1995. Lysolecithin-induced alteration of subendothelial heparan sulfate proteoglycans increases monocyte binding to matrix. *J. Biol. Chem.* **270**: 29760–29765.
 23. Kunjathoor, V. V., D. S. Chiu, K. D. O'Brien, and R. C. LeBoeuf. 2002. Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**: 462–468.
 24. Evanko, S. P., E. W. Rames, R. Ross, L. I. Gold, and T. N. Wight. 1998. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am. J. Pathol.* **152**: 533–546.
 25. Chang, M. Y., K. L. Olin, C. Tsoi, T. N. Wight, and A. Chait. 1998. Human monocyte-derived macrophages secrete two forms of proteoglycan-macrophage colony-stimulating factor that differ in their ability to bind low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **273**: 15985–15992.
 26. Ebara, T., K. Conde, Y. Kako, Y. Liu, Y. Xu, R. Ramakrishnan, I. J. Goldberg, and N. S. Shachter. 2000. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *J. Clin. Invest.* **105**: 1807–1818.
 27. Williams, K. J., and I. Tabas. 1995. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 551–561.
 28. Goldberg, I. J., W. D. Wagner, L. Pang, L. Paka, L. K. Curtiss, J. A. DeLozier, G. S. Shelness, C. S. Young, and S. Pillarisetti. 1998. The NH₂-terminal region of apolipoprotein B is sufficient for lipoprotein association with glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **273**: 35355–35361.
 29. Saxena, U., N. M. Kulkarni, E. Ferguson, and R. S. Newton. 1992. Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 1653–1658.
 30. Babaev, V. R., S. Fazio, L. A. Gleaves, K. J. Carter, C. F. Semenkovich, and M. F. Linton. 1999. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J. Clin. Invest.* **103**: 1697–1705.

パールカンの多様な機能の解明をめざして

平澤(有川) 恵理 順天堂大学老人性疾患病態治療研究センター



はじめに

パールカンはすべての基底膜に存在するほか、軟骨などに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンである。5つの機能ドメインからなるコアタンパク質は400kDaに及び、N末とC末端にヘパラン硫酸鎖の結合部位が存在する。パールカンは成長因子シグナルを修飾し、細胞の増殖、分化を制御するなどの種々の生物学的活性を持つ¹⁻⁴⁾。ヘパラン硫酸プロテオグリカンには膜貫通型のシンデカンファミリー、GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) アンカー型のグリピカンファミリーもあるが、細胞外マトリックス型のパールカンは細胞表面や、細胞外マトリックス中への局在様式から、種々の成長因子、マトリックス分子、接着分子等の空間的配置や機能

を巧みに調整する働きが推察される。さらにコアタンパク質の5つのドメインはドメイン特異的な結合能を持つことからヘパラン硫酸鎖と補助的に働き特異的なシグナル伝達に寄与すると考えられる(図1)。実際、遺伝子改変マウスの解析や、ヒト遺伝性疾患の同定によりパールカンの発生や疾患における重要性が近年明らかになってきた。

遺伝子改変マウスの作成とパールカンの機能解明

パールカンの機能に関しては、10年以上前より他種類の細胞系譜を用いた *in vitro* の実験系において、非常に多くの解析がなされ多様な機能が報告されてきた。我々はパールカンの欠損

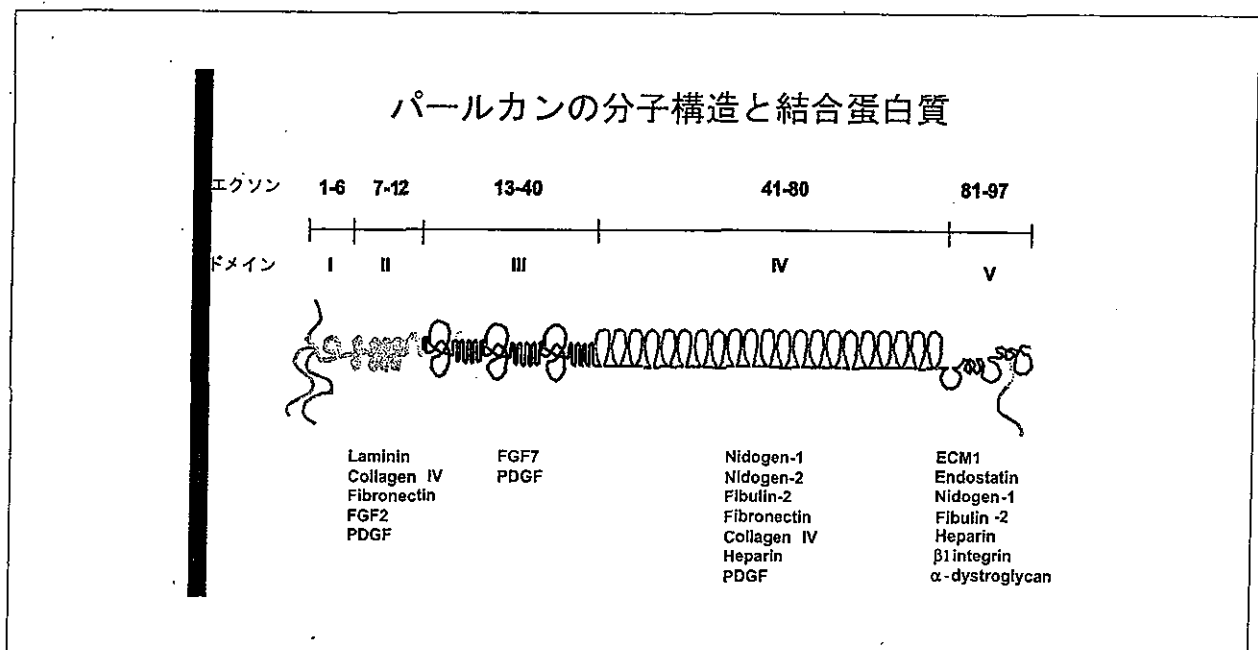


図1

が発生にどのような障害をもたらすか、また、どのような疾患に結びつくのかを調べるためには、*in vivo*での解析が必須と考えパールカン遺伝子のノックアウトマウスを作成した。パールカンは基底膜の重要な構成成分であり、さらに着床時に一過性の発現増加をみるなど初期発生における重要性も示唆されており、着床時あるいはその直後での早期胎生期致死が予測された。ところが意外なことに一部のマウスは出生まで至り、ほとんどの臓器の正常発生が確認された。一部は胎生10.5日頃に死亡するが、残りはさらに生存し胎生14.5日頃から徐々に軟骨形成異常を発症し、出生頃には明らかな四肢短縮を呈し呼吸障害を伴って死亡することが解った⁹⁾(図2)。四肢短縮は内軟骨性骨化の障害によるが、膜性骨化は逆に亢進し、四肢の長管骨は横径が増し、太く短く発達する。脊椎の椎体部分の発生も内軟骨性骨化によるので、長管骨と同様の変化をとる。Costellらの作成したノックアウトマウスも同様の表現型を呈した¹⁰⁾。パールカンノックアウトマウスにおける内軟骨性骨化の障害の原因としてはパールカン欠損により軟骨分化に深く関わるシグナル機構が変化した可能性と、軟骨マトリックス中のパールカンの欠損が他の軟骨マトリックス分子の沈着などに直接影響を

与え、これを脆弱化した可能性が考えられるが、おそらくその両方の影響があると思われる。成長板での軟骨最終分化におけるシグナル機構において重要な分子としてFGF受容体3c(FGFR3c)やインディアンヘッジホグ(Ihh)等が挙げられるが、これらはヘパラン硫酸との結合が知られるので糖鎖との関連も興味深い。

ヒト遺伝性疾患の同定-二つの予後の異なる疾患におけるパールカン遺伝子の変異

我々は、ノックアウトマウスでの解析結果をもとに、ヒトでのパールカン欠損病を探索した。その結果二つの予後の異なる疾患患者でパールカン遺伝子変異を同定した。パールカンの機能完全欠損はノックアウトマウスの症状とよく似た周産期致死性のSilverman-Handmaker型軟骨異形成症(DDSH)を、機能部分欠損では軟骨病変とミオトニア症状を併せ持つSchwartz-Jampel症候群(SJS)を発症することを示した⁷⁻¹⁰⁾。SJSの原因遺伝子の同定はこれより早くNicoleらにより報告されたが、タンパク質レベルでの解析はされておらず、二つの疾患の予後が大きく異なる原因は不明のままであった¹¹⁾。免疫組織化学的検討や初代培養からのパールカン分泌能の検討

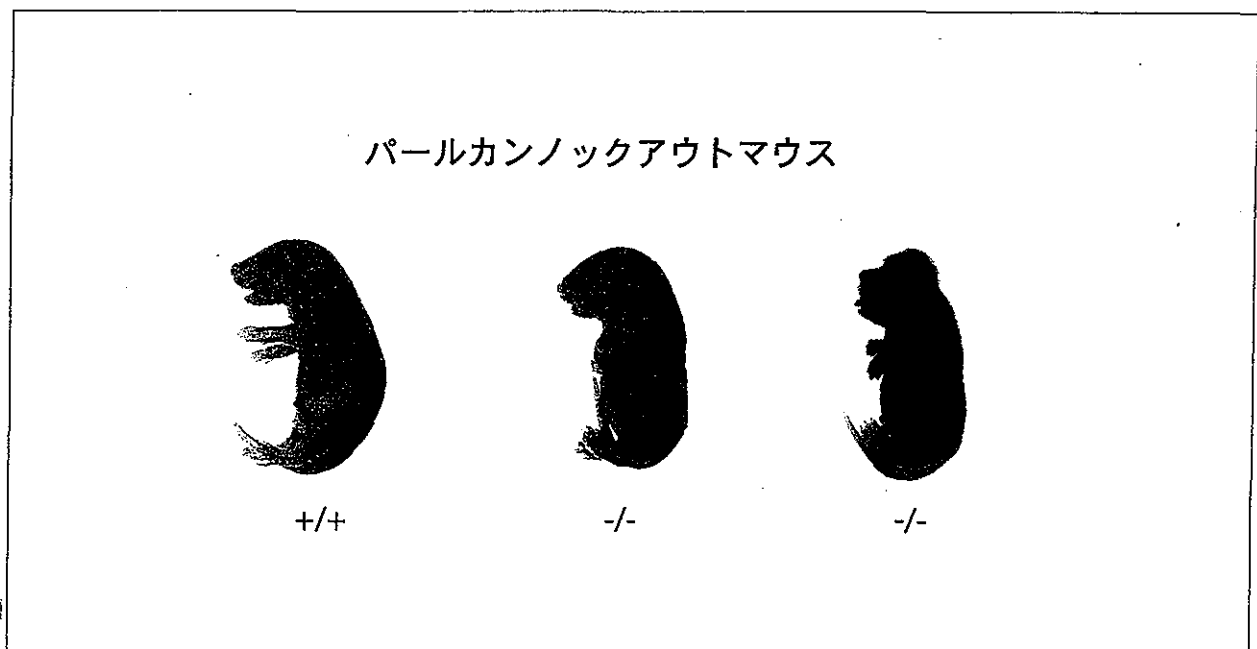


図2

により、二つの疾患における予後の違いは DDSH 変異を持つパールカンは細胞外へ分泌されず、SJS 変異を持つパールカンは細胞外に分泌され細胞外マトリックスとして部分的に機能するという違いによることが解った。細胞外にパールカンが分泌されるか否かは遺伝子変異の種類と位置にもより、構造変化や分泌シグナルを含めた検討が必要と考えられる。

神経筋接合部におけるパールカンの特異的機能の解明にむけて

さて、予後良好な SJS 患者でも骨格異常を呈し、このことはパールカン欠損により説明されるが、ミオトニア症状の発症機序は非常に興味深いと思われる。ミオトニアとは筋の弛緩障害である。パールカンは筋組織においても基底膜の重要な構成成分であるが、発生が成熟するに従い神経筋接合部に多く存在してくる。神経筋接合部においては、アセチルコリン(ACh)とニコチン型 ACh 受容体の結合が後シナプス膜の脱分

極を引き起こし筋が収縮する。筋の収縮と弛緩を速やかに制御するため、ここには ACh 受容体やアセチルコリンエステラーゼ(AChE)をはじめとする多くの分子が集合し共同して働く必要がある(図3)。AChE は ACh を加水分解することによりこの反応を収束させるとともに、ACh のリサイクルに貢献する酵素である。神経筋接合部ではコラーゲン様の分子(collagen-like tail subunit; ColQ)ドメインをもつ基底膜特異的な AChE が存在するが¹²⁾、*in vitro*の実験結果からこの分子がパールカンと結合することが想定されていた¹³⁾。パールカンノックアウトマウスは周産期に死亡するが、筋の発生、分化、神経支配、神経筋接合部形成は少なくともこの時期まではほぼ正常に達成されていた。ところが、ACh 受容体、アグリン、ラプシン、 α ジストログリカンといった神経筋接合部集合分子の集積に異常がないのに、AChE のみが特異的に欠損していることが解った¹⁴⁾。ノックアウトマウス筋全体の生化学的解析では ColQ フォームを含めたすべての AChE が発現していることから、産

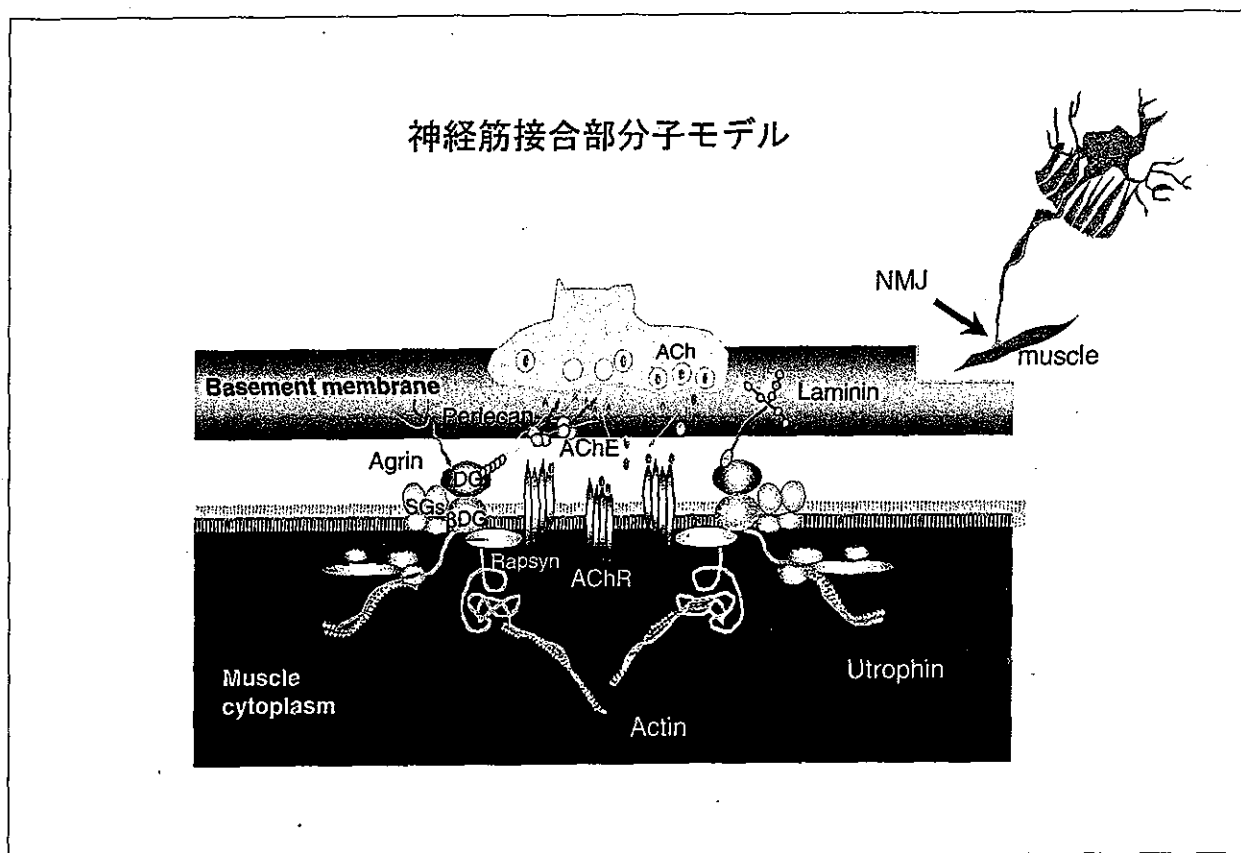


図3

生されたColQフォームが神経筋接合部に局在化することの障害によると考えられる。この結果はAChEの神経筋接合部への局在にパールカンが必須の働きをすることを示唆している。In vitroの実験系ではColQ分子がヘパラン硫酸鎖と結合するとされているが、神経筋接合部形成のキー分子とされるヘパラン硫酸プロテオグリカン；アグリンではAChEの局在が代償できないことは糖鎖の特異性を示唆する結果である。これらの結果がSJSにおける筋のミオトニア症状（弛緩障害、持続収縮）と関連するのに興味深く、新しいモデルマウスを使った電気生理学的解明や治療実験を検討中である。

おわりに

基底膜型プロテオグリカンであるパールカンはノックアウトマウスやヒト遺伝性疾患での解析結果から、基底膜構成成分としては必須ではなくむしろ機能分子として重要かつ多彩な働きをもつことが解ってきた。プロテオグリカンのコア蛋白質の特異性と糖鎖の組み合わせ、あるいは糖鎖そのものの多様性にますます面白い研究展開が予想される。

参考文献

1. Iozzo, R.V. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol* **14**, 203-8. (1994).
2. Iozzo, R.V., Cohen, I.R., Grassel, S. & Murdoch, A.D. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* **302**, 625-39. (1994).
3. Iozzo, R.V. et al. Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem* **272**, 5219-28. (1997).
4. Jiang, X. & Couchman, J.R. Perlecan and tumor angiogenesis. *J Histochem Cytochem* **51**, 1393-410 (2003).
5. Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R. & Yamada, Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* **23**, 354-8 (1999).
6. Costell, M. et al. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* **147**, 1109-22. (1999).
7. Arikawa-Hirasawa, E. et al. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nat Genet* **27**, 431-4. (2001).
8. Arikawa-Hirasawa, E. et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* **70**, 1368-75 (2002).
9. Arikawa-Hirasawa, E., Wilcox, W.R. & Yamada, Y. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type: unexpected role of perlecan in cartilage development. *Am J Med Genet* **106**, 254-7 (2001).
10. Hassell, J., Yamada, Y. & Arikawa-Hirasawa,

Point:

パールカンの機能解明から、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能の多様性が示されました。さらに糖鎖機能の多様性が解明されることが期待されます。また、このような多様性を解明する場合、総合的結果として生体はどのような異常を呈するのかを動物モデルで検討することが疾患との関連で重要であることが示唆されました。

Key word:

パールカン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、細胞外マトリックス、軟骨異栄養症、ノックアウトマウス、神経筋接合部、ミオトニア

- E. Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconj J* **19**, 263-7 (2002).
11. Nicole, S. et al. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome(chondrodystrophic myotonia). *Nature Genetics* **26**, 480-483 (2000).
 12. Krejci, E., Legay, C., Thomine, S., Sketelj, J. & Massoulié, J. Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. *J Neurosci* **19**, 10672-9 (1999).
 13. Peng, H.B., Xie, H., Rossi, S.G. & Rotundo, R.L. Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* **145**, 911-21 (1999).
 14. Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S.G., Rotundo, R.L. & Yamada, Y. Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci* **5**, 119-23 (2002).

Profile



順天堂大学医学部卒。神経内科専攻。現在神経、筋における細胞外マトリックスの役割について *in vivo*, *in vitro* の両方の系を使って解明していきたいと思います。

発生や疾患との関連を明らかにし、基礎研究と臨床の現場の連携を目指します。



神経筋接合部におけるパールカンの役割



パールカンはすべての基底膜に存在するほか、軟骨などに存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンである。5つの機能ドメインからなるコアタンパク質は400kDaに及び、N末端とC末端にヘパラン硫酸鎖の結合部位が存在する。パールカンは成長因子シグナルを修飾し、細胞の増殖、分化を制御するなどの種々の生物学的活性を持つ。これらの結果はほとんど*in vitro*の実験で確認されてきたが、近年、遺伝子改変マウスの解析や、ヒト遺伝性疾患の同定によりパールカンの発生や疾患における重要性が明らかになってきた。

我々は二つの予後の異なる疾患の原因遺伝子がともにパールカンであることを報告した。パールカンの機能完全欠損はノックアウトマウスの症状とよく似た周産期致死性のSilverman-Handmaker型軟骨異形成症(DDSH)を、機能部分欠損では軟骨病変と筋持続収縮(ミオトニア)を併せ持つSchwartz-Jampel症候群(SJS)を発症することを示した。さて、パールカンは筋組織においても基底膜の重要な構成成分であるが、発生が成熟するに従い神経筋接合部に多く存在してくる。神経筋接合部においては、アセチルコリン(ACh)とニコチン型ACh受容体の結合が後シナプス膜の脱分極を引き起こし筋が収縮する。筋の収縮と弛緩を速やかに制御するため、ここにはACh受容体やアセチルコリンエステラーゼ(AChE)をはじめとする多くの分子が集合して共同して働く必要がある。AChEはAChを加水分解することにより、この反応を終息させるとともに、AChのリサイクルに貢献する酵素である。神経筋接合部ではコラーゲン様の分子(collagen-like tail subunit; ColQ)ドメインをもつ基底膜特異的なAChEが存在するが、*in vitro*の実験結果から、この分子がパールカンと結合することが想定されていた。パールカンノックアウトマウスは周産期に死亡するが、筋の発生、分化、神経支配、神経筋接合部形成は少なくともこの時期まではほぼ正常に達成されていた。ところが、ACh受容体、アグリン、ラプシン、 α ジストログリカンといった神経筋接合部集合分子の集積に異常がないのに、AChEのみが特異的に欠損していることが解った。ノックアウトマウス筋全体の生化学的解析ではColQフォームを含めたすべてのAChEが発現していることから、産生されたColQフォームが神経筋接合部に局在化

することの障害によると考えられる。この結果はAChEの神経筋接合部への局在にパールカンが必須の働きをすることを示唆している。このことがSJSにおける筋の持続収縮（ミオトニア）と関連すると考えられ、新しいモデルマウスを使った電気生理学的解明や治療実験が期待される。

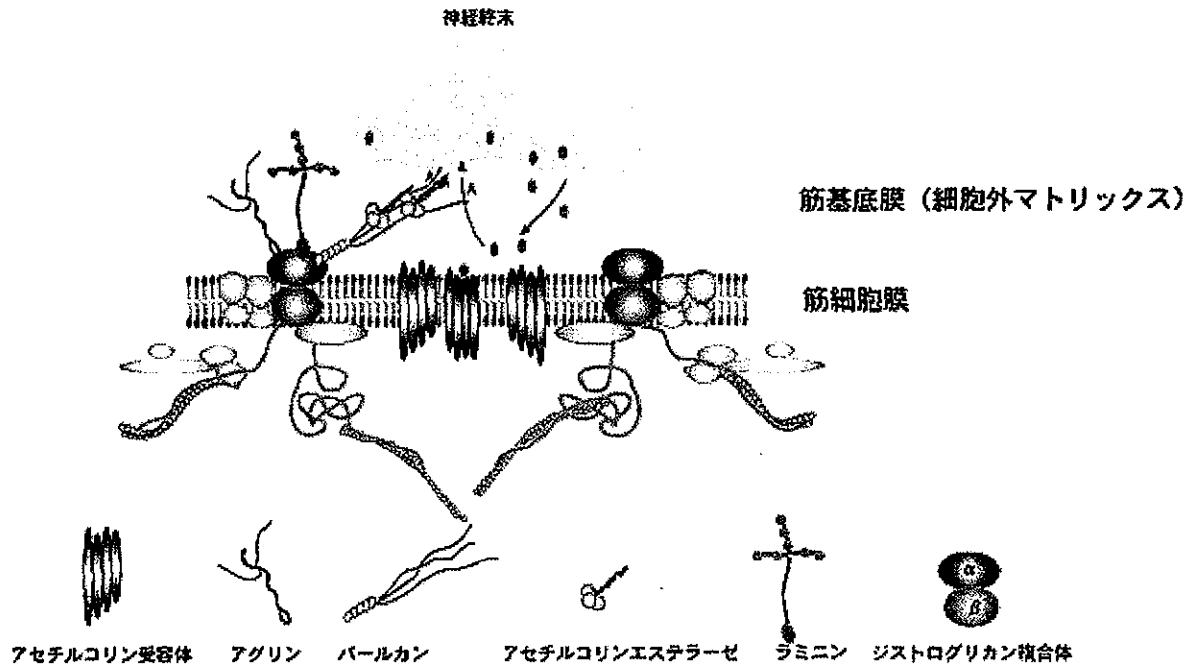


図1 神経筋接合部でのパールカンの機能

平澤恵理（順天堂大学医学部脳神経内科）

- References (1) Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y: Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 23, 354-358, 1999
- (2) Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, Le AH, Silverman N, Govindraj P, Hassell JR, Yamada Y: Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nat. Genet.* 27, 431-434, 2001
- (3) Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RE, Iannaccone S, Dalakas MC, Yamada Y: Structural and functional mutations of the

perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1368-1375, 2002

- (4) Arikawa-Hirasawa E, Rossi SG, Rotundo RL, Yamada Y: Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat. Neurosci.* 5, 119-123, 2002

Links PG-A09 基底膜のプロテオグリカン (朔 敬)

2004年8月6日

GlycoWord_{index}



遺伝子改変マウスの解析から解明される パールカンの神経筋機能への関与

平澤(有川) 恵理

基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンは多くの生物学的活性が報告されてきた。発生や疾患におけるパールカンのはたらきを研究するため、ノックアウトマウスを作製した。解析の結果から軟骨の発生、分化にパールカンが必須であることが判明し、症状の類似性と遺伝子座の解析から、2つの予後の異なるヒト疾患を同定した。また、ノックアウトマウスの神経筋接合部においてアセチルコリンエステラーズが特異的に欠損することと、パールカン機能部分欠損疾患であるSchwartz-Jampel症候群の筋異常収縮との関連性を考察する。



Key Words

パールカン ヘパラン硫酸プロテオグリカン 神経筋接合部 ミオトニア

●はじめに

パールカンは種々の生物学的活性をもつ多機能細胞外マトリックス分子として注目されるヘパラン硫酸プロテオグリカンである。すべての基底膜に存在するが、軟骨や脳などその他の組織でも発現している。パールカンの発見は、20年ほど前にさかのぼり、当初腺組織などにおける形態形成や糸球体基底膜におけるはたらきが注目された。その後、線維芽細胞増殖因子 (FGF) をはじめとする成長因子や細胞膜受容体とも結合してさまざまな細胞内シグナリングを修飾制御する機能分子としてもはたらき、器官の形態形成過程などに重要なはたらきをすることなどがわかってきた^{1,2)}。また、血管新生、組織の修復、がん細胞の増殖、転移、浸潤などにも関与していると考えられ、さらにパールカンと疾患との関連に興味もたれている³⁾。

I. パールカンのドメイン構造と機能

パールカンのコア蛋白質の分子量は400 K以上あり、5つの異なった機能ドメインをもち、*in vitro*の研究成

果から、それらのドメインの構造と生物活性の関連がわかってきた (図1)。ドメイン I はコア蛋白質のN末端にあり、3カ所のヘパラン硫酸鎖の結合部位が存在する。このヘパラン硫酸鎖はFGF2と結合して細胞分裂や血管新生を促進するとされる。この領域はもっとも相同性の低い特異的部位である。ドメイン II は低分子量リポ蛋白質 (LDL) 受容体の LDL 結合部位の配列と相同性があり、4つのシステインに富むモチーフが存在する。ドメイン III は、ラミニン短鎖N末端領域と高い相同性を持ち、3つの球状のサブドメインとシステインに富むEGF様の繰返し配列をもつ。ドメイン IV はNCAMの免疫グロブリン様構造部位と相同性の高い配列が繰返し存在し、もっとも大きいドメインである。この領域の前半は他の基底膜蛋白質と結合性を持ち、パールカンの細胞外マトリックスでの局在に強く関与していると思われる⁴⁾。もっともC末端のドメイン V はラミニン α 鎖やアグリンのC末端球状Gドメインと相同性をもつ3つのサブドメインと、それらを分断するEGF様配列からなり、 α -ジストログリカンやインテグリン β 1などの細胞表面受容体と結合することから、細胞接着への関与など特

Eri Hirasawa (Arikawa), 順天堂大学大学院医学研究科老人性疾患病態治療研究センター順天堂大学医学部脳神経内科 E-mail: ehirasaw@med.juntendo.ac.jp

Roles of perlecan in neuromuscular function: Studies in knockout mice and human disorders

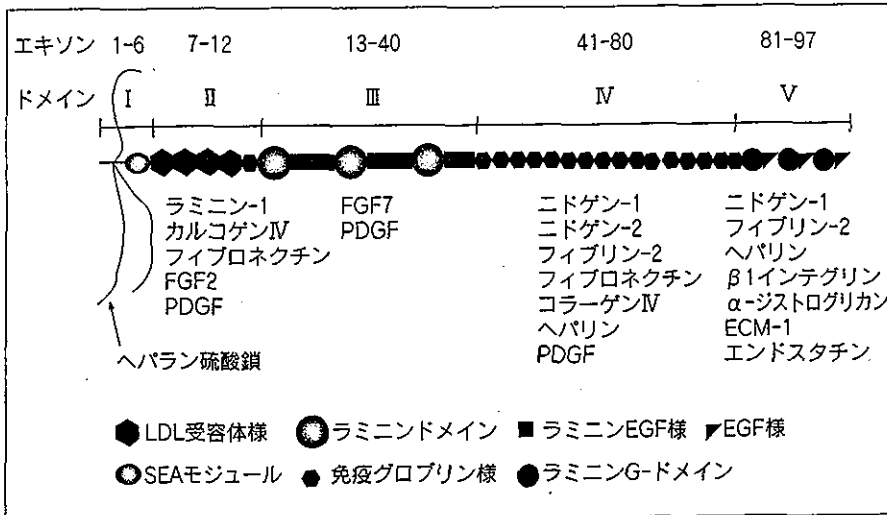


図1 パールカン分子の機能ドメインとその結合蛋白質

殊な機能が想定されている⁵⁾。

II. パールカンノックアウトマウスの作製と解析によるパールカンの機能解明

筆者らはこの多様な機能をもつと予想されるパールカンの *in vivo* での役割を明らかにし、その欠損が発生にどのような障害をもたらすか、また、どのような疾患に結びつくのかを調べるために、パールカン遺伝子のノックアウトマウスを作製した⁶⁾。このマウスの一部は頭部形成異常のため胎生10.5日ごろに早期胎生期致死を呈するが、大部分のものは胎生14.5日ごろから徐々に軟骨形成異常を発症し、出生ころには明らかな四肢短縮を呈し、呼吸障害を伴って死亡することがわかった(図2)。

この四肢短縮は内軟骨性骨化の障害によるが、膜性骨化は逆に亢進し、四肢の長管骨は横径が増し、太く短く発達する。脊椎の椎体部分の発生も内軟骨性骨化によるので、長管骨と同様の変化をとる。Costellらの作製したノックアウトマウスも同様の表現型を呈した⁷⁾。パールカンのノックアウトマウスにおける内軟骨性骨化の障害の原因としては、パールカン欠損により軟骨分化に深くかかわるシグナル機構が変化した可能性と、軟骨マトリックス中のパールカンの欠損が軟骨マトリックス分子の形成に直接影響を与え、これを脆弱化した可能性が考えられるが、おそらくその両方の影響があると思われる。成長板での軟骨最終分化におけるシグナル機構において重要な分子として、FGF受容体3(FGFR3)やインディアンヘッジホッグ(Ihh)などが挙げられるが、これら

はヘパラン硫酸鎖との結合が知られる。しかし、パールカンにおける主要なヘパラン硫酸鎖結合部位を有するドメインI欠損マウスが大きな異常を呈さなかったという報告があり、単純には説明できない。軟骨において糖鎖の結合部位や糖鎖合成に違いがある可能性も残される。軟骨細胞の最終分化帯である肥大軟骨細胞周囲でのパールカンの局在を考えると、細胞表面でのFGFシグナルの調整やマトリックスと細胞の接着などをつかさどる役割などが想定される。パールカンのFGF低親和性受容体としての生物学的機能やインテグリン、フィブロネクチンとの結合能を考えると非常に興味深い点である。ノックアウトマウス解析の結果、ほとんどの器官は一応の発生、分化を示し、出生まで至った。また、基底膜も組織学的、電子顕微鏡学的に、多くの組織でほぼ正常な構造をとった。しかし、その一方で、基底膜をもたない軟骨では致命的な異常を呈した。

III. 神経筋接合部におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの重要性とパールカンのユニークな機能

神経筋接合部は高度に発達した基底膜構造であり、運動神経からの電気的興奮をアセチルコリン(ACh)による化学的興奮に置き換え、筋収縮・弛緩を制御している。筋の収縮・弛緩をすみやかに行うため、アセチルコリン受容体、アセチルコリンを分解するアセチルコリンエステラーゼ(AChE)のほか、MuSK(muscle specific kinase)、ニューレグリン、ラプシン、ジストログリカン、ラミニンなどの分子が神経筋接合部構成分子として集束してい

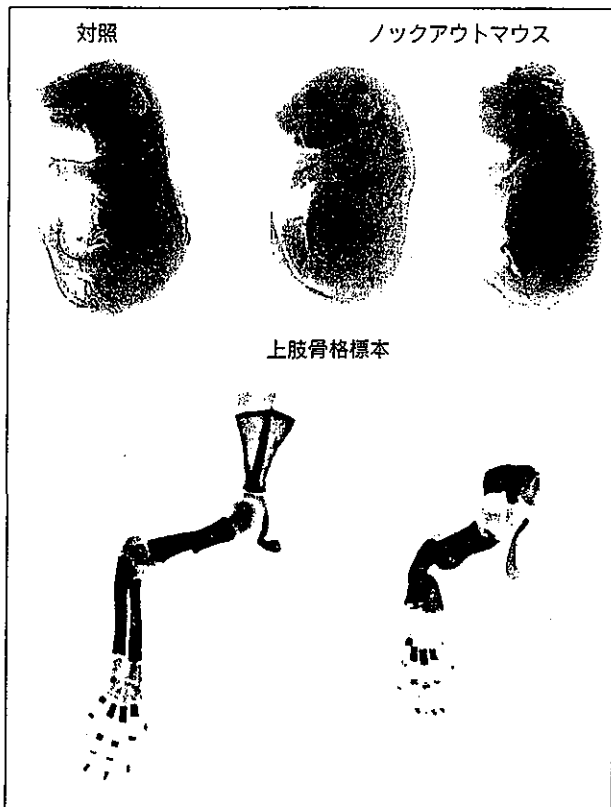


図2 胎生18.5日パールカンノックアウトマウスの外観と上肢の骨格標本

内軟骨性骨化の障害により短縮を認める。ノックアウトマウス右は脳ヘルニア合併例。骨格標本は鎖骨、肩甲骨を含む上肢骨格標本。軟骨部分がアルシャンブルーによって青く、骨部分がアリザリンレッドによって赤く染色されている。ノックアウトでは軟骨マトリックスの染色性が悪く、長管骨が太く短い。

る(図3)。神経筋接合部においてはいくつかのヘパラン硫酸プロテオグリカンが特異的に発現し、重要なはたらきをすることが推定されている⁹⁾。たとえばアグリンは神経筋接合部形成のための必須分子であり、その遺伝的欠損により神経筋接合部が形成されなくなることが知られている。パールカンは筋基底膜に存在するが、発生が進むにつれ神経筋接合部に多く発現するようになり、神経筋接合部における重要性が示唆された⁹⁾。筆者らはパールカンノックアウトマウスにおける神経筋接合部の解析を行った。機能完全欠損であるノックアウトマウスは出生時までに死亡するが、神経筋接合部発生および形成を観察することができる。新生ノックアウトマウスの横隔膜、肋間筋、骨格筋などにおいて、末梢神経の支配、神経筋接合部へのアセチルコリン受容体、アグリン、ラプシンなどの分子の集合などがみられ、ほぼ正常な神経筋接合部が形成されているにもかかわらず、AChEの局

在のみが欠損していることを示した¹⁰⁾。筋全体の生化学的検討ではAChEの各アイソフォームは確認されたことから、生成されたAChEの基底膜への局在化の障害と考えられた。

IV. パールカン欠損による2種類のヒト遺伝性疾患の同定

1. パールカン機能完全欠損による遺伝性疾患の同定

ノックアウトマウスの解析結果から、軟骨分化におけるパールカンの重要性が示され、その後ヒトでのパールカン欠損病を見いだす大きな鍵を与えた。筆者らは、パールカン欠損マウスの表現型から、ヒトでのパールカン欠損疾患が存在するものと考え、その探索を開始した。候補となる疾患の同定に際しては、ヒトでのパールカン欠損病でもノックアウトマウスと同じような表現型を呈する可能性から、ノックアウトマウスでの特徴的な骨X線所見、骨成長板の病理所見と合致する常染色体劣性遺伝形式軟骨異形成症を探した。その結果、周産期致死性の軟骨異形成症(Silverman-Handmaker型 dyssegmental dysplasia; DDSH)の表現型¹¹⁾がパールカンノックアウトマウスのそれと合わせて類似していることがわかった。この疾患では患児は体幹、四肢とも著しく短縮し、四肢長管骨の彎曲、椎体骨の大小不同など、ノックアウトマウスと非常によく似た骨格異常を示すが、さらに一部の例で脳ヘルニアを合併するとされる点もノックアウトマウスと共通し、非常に有力な候補と考えられた。この遺伝子は100 kb以上の巨大遺伝子であるため、その欠損病を探すアプローチとして、各ドメインに対する抗体を用いた免疫染色によりスクリーニングを行い、cDNAを用いたRT-PCRでmRNAレベルの異常を検出し、染色体DNAレベルでの変異を同定するという方法を用いてパールカン遺伝子変異を探索した。その結果、3症例2種類の遺伝子変異を同定した^{12,13)}。これらの変異は、それぞれフレームシフトを起こし、変異の直後で転写を終了するアウトオブフレーム変異であった。筆者らはさらに、蛋白質レベルの解析を行い、遺伝子変異によりこの疾患ではパールカンが細胞外に分泌されず、細胞外マトリックスとして機能しないことがわかった。すなわち、パールカン機能完全欠損に起因する症状と考えられた。

2. パールカン機能部分欠損による遺伝性疾患の同定

パールカン分子は前述したように複数のドメインからなる巨大な多機能分子と考えられ、ヒト疾患を考慮するにあたっては、部分欠損などによる他の表現型も考慮する必要がある。そこで、パールカン遺伝子がマップされている染色体1p36に連鎖する疾患を探したところ、Schwartz-Jampel症候群 (SJS) が候補として挙げられた。詳細なマッピングの結果、SJSの遺伝子座がパールカン遺伝子と450 kb以内の距離にあることがわかった。SJSは別名、軟骨異常栄養性筋強直症 (chondrodystrophic myotonia) とよばれ、ミオトニア症状と軟骨異常を伴う遺伝性疾患で、DDSHと異なり患者は生存する。患児は一般に出生時には明らかな症状を認めず、乳児期以降、低身長や特徴的な顔貌に気づかれ、3歳くらいまでに診断される。顔面筋の緊張のため眼裂は狭小となり、口を尖らせた仮面のような顔貌を呈する。その他の合併症としては、小眼症、白内障、斜視、眼振などの眼症状がある。高口蓋、低位耳介などの小奇形もしばしば合併する。骨格異常としては、低身長、大関節の屈曲拘縮、脊椎の後彎が認められる。X線所見にて、扁平椎、骨端、骨幹

端異形成がみられるが、骨端、骨幹端異形成は大関節に限られる。大腿骨頭の変化は比較的強く、内反股を認めることがある。この疾患では、骨格異常とミオトニアという臨床症状のユニークな組合せから、その病因解明に興味をもたれていた。また、ミオトニア症状に関しても、他のミオトニア疾患で観察されるミオトニアと異なった特徴をもっており、病因遺伝子の分子機構解明が待たれていた。パールカンは筋細胞をとりまく基底膜にも存在し、神経筋結合部 (NMJ) にはとくに多く局在する。Cエレガンスにおけるパールカン相同体と考えられる *unc-52* の欠損では、筋線維の横紋構造 (myofilament lattice) が破壊され胎生致死を呈することが知られており¹⁴⁾、パールカンと筋疾患の関連の可能性が示唆されていた。また、パールカン分子の生物学的機能の一つに、NMJ特異的な非対称型AChEのコラーゲン様ドメイン (collagen-like tail; ColQ) と結合することが知られている。ColQはAChEの構造のうち神経筋接合部基底膜に接着する尾部構造である^{15,16)}。それゆえ、パールカンはNMJの基底膜にAChEを結合、集束させることにより、AChによる神経筋の興奮とその解除を速やかに調整する機能をもつと予測される¹⁷⁾。筆者らは、遺伝子座の

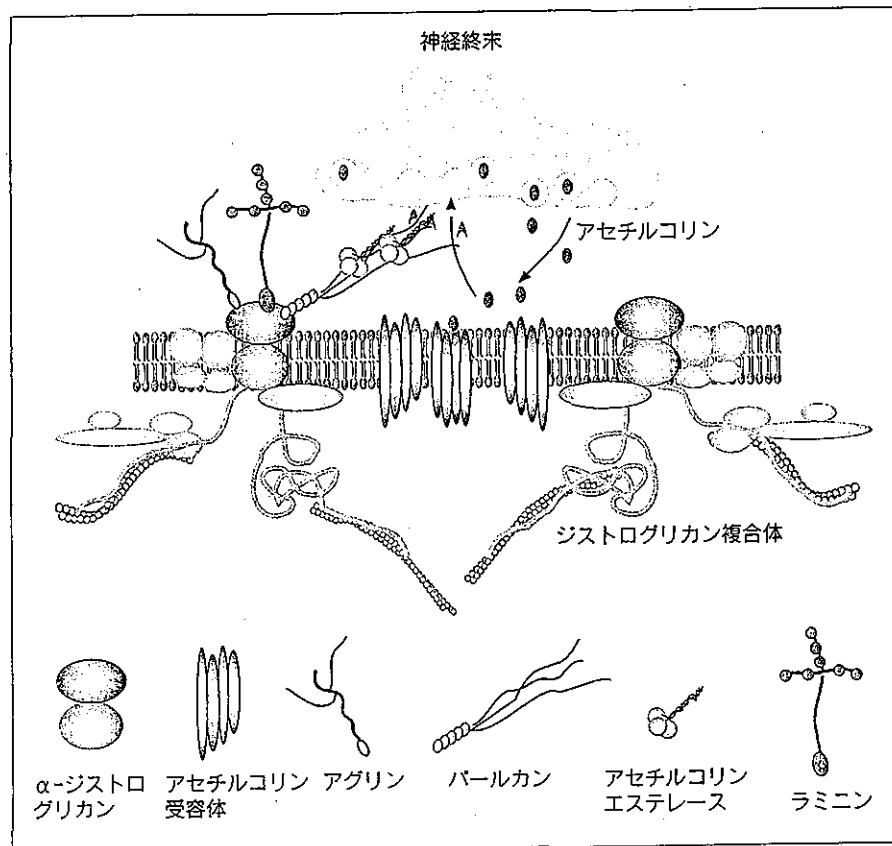


図3 神経筋結合部の模式図

パールカン、ラミニン、アグリンはいずれもその球状ドメインでα-ジストログリカンに結合し、神経筋接合部に集合するとされる。神経終末から放出されるアセチルコリンは受容体に作用した後、速やかにアセチルコリンエステラーゼにより分解され、筋収縮のシグナルは終了する。パールカンはこのアセチルコリンエステラーゼの局在に必須と考えられる。