

Title	動脈硬化病態における血管内皮細胞酸化LDL受容体(LOX-1)に関する研究
Author(s)	角谷, 真
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43252
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	かく たに まこと 角 谷 真
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 6 6 8 6 号
学位授与年月日	平成14年3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	動脈硬化病態における血管内皮細胞酸化 LDL 受容体 (LOX-1) に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 東 純一 教授 土井 健史 教授 森崎 隆幸

論 文 内 容 の 要 旨

動脈硬化は先進国に住む人誰にも関わりが深く、虚血性心疾患や脳卒中の原因であり、死亡順位の上位を占める疾患である。近年、種々の高脂血症治療薬の大規模長期臨床試験により、血中の LDL コレステロールの上昇が重要であることが明らかになってきている。しかし、この LDL コレステロールがどのように動脈硬化の発症メカニズムに関与するかについては理解が進まなかった。しかし最近の研究より、動脈硬化病態に関係している細胞に作用して、種々の生理活性を誘導する酸化(変性) LDL が重要と考えられるようになってきた。

この酸化 LDL の受容体として、マクロファージで種々の受容体が報告されているが、これら受容体の動脈血管内皮細胞での発現は報告されていない。そこで沢村らは、血管内皮細胞に発現する受容体をクローニングし、レクチン様酸化 LDL 受容体 (LOX-1) と名づけた。

そこで今回私は、この LOX-1 と動脈硬化発症や進展との関わりをより詳しく調べるため、分子遺伝学的、免疫化学的手法を用いて遺伝的高コレステロールウサギ (WHHL ウサギ) を解析した。さらに動脈硬化発症の重要な役割を担っている血小板との関係も調べた。

LDL 受容体を欠損する WHHL ウサギは家族性高コレステロール血症のモデル動物としてよく用いられている。この WHHL ウサギと LOX-1 との関係調べるため、ウサギ LOX-1 のクローニングおよび、動脈硬化巣での局在を検討した。クローニングしたウサギ LOX-1 のアミノ酸配列は、ヒトと比べると約76%保存されていた。N末より細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、ネックドメイン、レクチンドメインの4つの機能ドメインからなるII型膜蛋白質であった。さらに WHHL および Japanese White (JW) ウサギの胸部大動脈より調製したサンプルを用い RT-PCR、ウエスタンブロットを行ったところ、WHHL ウサギにおいて LOX-1 の mRNA および、蛋白質が増加していた。

次にその発現局所を調べるために、WHHL ウサギ胸部大動脈凍結切片を用い免疫染色を行った。WHHL ウサギの動脈硬化巣において、LOX-1 の明らかなシグナルが認められ、特に内膜に添って強い染色が認められた。また、内膜のみならずプラーク内部のマクロファージにも弱いながら発現が認められた。さらに動脈硬化前段階と考えられる部位において、内膜に添って LOX-1 の強い染色が認められた。以上の結果は、LOX-1 と動脈硬化の関わりを強く示唆するものである。

LOX-1 に結合しうる変性 LDL が生体内に存在するかどうか調べることは、LOX-1 と動脈硬化の関係を示唆する上でさらに重要である。そこで先にクローニングした LOX-1 を用いた LOX-1 リガンド定量系の開発を試みた。

LOX-1の酸化LDL結合特性を利用して、細胞外ドメインとヒトIgGのFc部分を組み込んだLOX-Fcキメラ蛋白質を作製した。このLOX-FcとヒトAnti-apoB血清を用いたEIA系開発し、WHHLウサギ血中のLOX-1リガンド活性の定量を行うと、 $4.00 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$ であり、JWラビットは検出限界(10ng/ml)以下であった。さらに血中に存在するリガンドが、動脈硬化巣に存在しているかどうかを免疫組織学的手法で調べた。LOX-1リガンドは動脈硬化巣の血管内皮細胞に局在し、マクロファージにも存在することがわかった。さらに病巣前段階と思われる組織においても、内膜に添ってLOX-1リガンドが沈着していた。つまりこれらデータは、LOX-1リガンドが動脈硬化発症および進展に重要な役割を担っており、その血中での測定は動脈硬化発症を予知する疾患マーカーになる可能性がある。

LOX-1は酸化LDLの受容体として同定されたが、動脈硬化等の特殊な条件において増加する酸化LDLとの結合だけではなく、他の重要な機能も持っていると考えられる。以前の研究よりホスファチジルセリン(PS)と結合することがわかっていた。一方、動脈硬化病態に関係する血小板は、活性化を受けると直ちにPSの露出が起こることが報告されている。この点に着目しLOX-1と血小板の関係を調べた。健常人ボランティアより調製した洗浄血小板とLOX-1強制発現細胞(BLOX-1-CHO)を同時に培養すると、明らかに血小板との結合が認められた。さらにこの結合は抗LOX-1中和抗体で阻害された。また、正常ウシ血管内皮細胞(BAE)でも同様にLOX-1を介した結合が50%ぐらい存在することがわかった。また、活性化血小板がLOX-1に結合することにより、動脈血管内皮細胞からエンドセリン1(ET-1)産生を亢進させることを明らかにした。この結果は、活性化血小板がLOX-1を介して血管内皮細胞を活性化させ、その結果引き起こされる血管の機能低下への関与を示唆している。

今回は、血管内皮細胞上の酸化LDL受容体として同定されたLOX-1の動脈硬化発症や進展における関与の一端を明らかにした。さらに、動脈硬化発症の引き金になると考えられている血管の機能低下とLOX-1の関係を示唆する知見を得た。最近、LOX-1中和抗体を用いた動物実験において血栓阻害作用やバルーン障害モデルでの有効性を確認している。これら知見はLOX-1の動脈硬化における関与をさらに強める結果であり、血管変化に作用する中心分子の一つである可能性を示唆している。最後に本研究が動脈硬化発症、進展のメカニズム解明の一端を担い、まったく新しい作用メカニズムを持つ新薬開発につながれば幸いである。

論文審査の結果の要旨

動脈硬化は虚血性心疾患や脳卒中の原因であり、死亡順位の上位を占める疾患である。近年、酸化(変性)LDLが動脈硬化の発症に関わることが指摘されるようになり、酸化LDLの受容体として、レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)に関する研究が進んだ。そこで本研究では、LOX-1と動脈硬化発症や進展との関わりをより詳しく調べるため、分子遺伝学的、免疫化学的手法を用いて、遺伝的高コレステロールウサギ(WHHLウサギ)を解析した。さらに動脈硬化発症の重要な役割を担っている血小板との関係も調べた。

(1) LDL受容体を欠損するWHHLウサギは家族性高コレステロール血症のモデル動物としてよく用いられている。

WHHLウサギLOX-1を遺伝子クローニングし、動脈硬化巣での局在を検討したところ、胸部大動脈にLOX-1のmRNAおよび、蛋白質が増加していた。

(2) 内膜に添って強く、またプラーク内部のマクロファージにも弱い染色が認められ、動脈硬化前段階と考えられる部位においてもLOX-1の強い染色が認められた。

(3) LOX-1リガンド定量系の開発を試みWHHLウサギ血中LOX-1リガンド活性は $4.00 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$ であり、対照ウサギは検出限界(10ng/ml)以下であった。

(4) LOX-1リガンドは動脈硬化巣の血管内皮細胞とマクロファージに局在した。

(5) 血小板とLOX-1強制発現細胞(BLOX-1-CHO)を同時に培養すると、明らかに血小板との結合が認められた。活性化血小板がLOX-1を介して血管内皮細胞を活性化させ、その結果引き起こされる血管の機能低下への関与を示唆している。

本研究は、血管内皮細胞上の酸化LDL受容体として同定されたLOX-1の、動脈硬化発症や進展における関与を

明らかにした。さらに、動脈硬化発症の引き金になると考えられている血管の機能低下と LOX-1 の関係を示唆する知見を与えた。これら知見は LOX-1 の動脈硬化における関与を示唆しており、LOX-1 が血管変化に作用する中心分子の一つである可能性を物語っている。本研究は、動脈硬化発症、進展のメカニズム解明の一端を担い、新しい作用メカニズムを持つ新薬開発につながる可能性を秘めた知見であり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものと考ええる。