

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08587

研究課題名(和文)新規DAMPs受容体を利用した病的リガンド決定要因の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationships between pathogenic substances and DAMPs receptors.

研究代表者

藤田 佳子(Fujita, Yoshiko)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：30416218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞へのDil-酸化LDL取り込みを指標としたスクリーニングを複数の手法により行い、これまで研究を行ってきた酸化LDL受容体LOX-1以外に、酸化LDLを認識する新規受容体を3種同定した。また、これらの受容体を介した酸化LDLの濃度依存的な取り込みを確認した。一方で、LOX-1を含む独自に同定したこれら4種の受容体のリガンド特異性を相互に比較すると、やはり酸化LDL以外のリガンドについても一定の重複が見られ、LOX-1と同様にDAMPs受容体として、生体防御関連機能を担う可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病の成因には生体防御機構が重要な働きをしているがその全貌は明らかではない。本研究では、生活習慣病の中で重要な働きをすと考えられている酸化LDLを利用することで、生活習慣病側の視点から、新たな生体防御機構の解明を行う端緒を得た。すなわち、生活習慣病の原因物質が作用する可能性がある新規受容体を同定したが、これらは生体を防御する際に機能することが期待される。今後これらの受容体について研究を進めることで、新たな生体防御機構を明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using Dil-oxidized LDL uptake into cells as an indicator, we screened receptor library by several methods to identify a novel oxidized LDL receptor. We successfully identified three novel receptors that recognize oxidized LDL. We also confirmed the concentration-dependent uptake of oxidized LDL into cells by the expression of these receptors. On the other hand, when comparing the ligand specificities of these three types of uniquely identified receptors additionally to LOX-1, there was a certain overlap in ligand spectrum including oxidized LDL, suggesting these novel oxidized LDL receptors should work as DAMPs receptors. They might have a function related to self-defense mechanisms by recognizing DAMPs.

研究分野：薬理学

キーワード：DAMPs 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、血管内皮細胞の機能不全と酸化 LDL が動脈硬化の病態生理に深くかかわっているという仮説を証明するために、酸化 LDL の受容体 LOX-1 を内皮細胞から同定し、LOX-1 が実際に血管内皮細胞での酸化 LDL の作用を媒介することを証明するとともに、動脈硬化の進行において重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。

それだけでなく、心筋梗塞、バルーン傷害後血管再狭窄、エンドトキシンによる炎症、関節炎、炎症性骨吸収などの病態モデルでの LOX-1 の病態促進的役割を報告している。これらの個体レベルでの研究により、LOX-1 が特に炎症が関与するような病態において重要な役割を示すことが明らかになってきた。

同時にその過程で、LOX-1 を含む酸化 LDL 受容体が、酸化 LDL 以外にも様々なリガンドを結合することを明らかにしてきた。例えば、LOX-1 にアポトーシス細胞や活性化血小板が結合すること、また、heat shock protein (HSP)、バクテリア、変性蛋白質が結合することも見出している。

このような流れの中で、研究代表者は、LOX-1 や同じく変性 LDL 受容体として知られる SR-A に、C-reactive protein (CRP) が結合すること、そして、LOX-1 が血管透過性を亢進させたり、補体系を活性化することによって炎症を促進することを明らかにしてきた (Fujita Y, Clin Chem 2009; Fujita Y, Clin Chem 2010; Fujita Y, Clin Chem 2011)。CRP は古典的炎症マーカーとして知られてきたが、近年は、急性冠症候群の診断マーカーとして用いられ、動脈硬化の危険因子として治療マーカーとしても利用されようとしている物質で、CRP 自体がやはり、酸化 LDL やバクテリア、死細胞に結合することが知られ、可溶性のパターン認識分子として機能しており、パターン認識分子同士が相互作用することを明らかにしたものである。

2. 研究の目的

Toll-like 受容体 (TLRs) をはじめとするパターン認識受容体はバクテリアから生体内物質まで幅広いリガンドを認識する。しかし、何でも非特異的に認識するわけではなく、一定の特異性を持つ。内因性物質については、このリガンドスペクトラムに対して、最近では damage-associated molecular patterns (DAMPs) という言葉が使われてきているが、実際にその「パターン」が何かは明確ではない。

一方で、このような DAMPs が様々な病態で疾患の原因物質あるいは促進物質となっており、これらの重要性については広く認められている。

そこで、これまで LOX-1 というパターン認識受容体と、LOX-1 に対する様々なリガンドについて、申請者ら自身が積み重ねてきた研究の経験を活かし、本研究では、次の 3 つの目標を達成したい。

新しい DAMPs 認識受容体を、リガンドとして酸化 LDL を利用し同定する。

同定した新規受容体のリガンド特異性から、逆に DAMPs 定義のための情報を得る。

それぞれの新規受容体の生理的、病態生理学的意義をそれらのリガンドとの関係から解明する。

これにより、特に内因性の物質が病的形質を獲得し、それを認識する受容体を通じて、疾患の発症・進展へとつながる根源的な部分を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 酸化 LDL 受容体 LOX-1 と構造上同じ遺伝子ファミリー受容体に属すると考えられる 34 種類の遺伝子をヒト多組織 cDNA パネル (Clontech) から PCR 法で増幅し、pcDNA6.2 ベクター (invitrogen) に組み込んで受容体発現ベクターを作製した。

(2) 上記受容体発現ベクターを COS-7 細胞に一過性発現させ、蛍光標識酸化 LDL (DiI-oxLDL) を 37°C で 2 時間取り込ませた後、細胞を PBS で洗浄・ホルマリン固定後、細胞に取り込んだ DiI-oxLDL を蛍光顕微鏡およびイメージングサイトメーター Operetta (PerkinElmer) を用いて検出・定量解析した。これにより酸化 LDL 取り込みが観察された遺伝子については、濃度依存性を同方法にて検討した。

(3) 同定した新規受容体のリガンド特異性について、データベースや既報の知見より情報収集するとともに、LOX-1 と新規受容体間で共通認識するリガンドや機能的類似性について検討した。

4. 研究成果

新規酸化 LDL 受容体について、受容体発現細胞への DiI-oxLDL 取り込みを指標としスクリーニングを行った結果、LOX-1 以外に、酸化 LDL を認識する受容体を新たに 2 つ同定した (図 1. X, Z)。また、これらの受容体への濃度依存的な取り込みを確認した。

これら新規受容体は LOX-1 と 1 次構造類似性があったため、LOX-1 のアミノ酸配列を比較すると、LOX-1 で酸化 LDL 認識に重要とされているアルギニン残基(R208, R229, R231, R248)のうち、X では R231 が、Z では R231 と R248 が保存されており、受容体 X, Y においてもやはりこれらのアルギニン残基が認識に重要であることが示唆された。

さらに、LOX-1 近縁の受容体以外の新規 DAMPs 受容体の可能性について検討するため、発現クローニングによる同定を試みた結果、酸化 LDL を認識する新規受容体 Y を発見した(図 2)。

同定した新規酸化 LDL 受容体 X と Y は HSP70 を結合すること、血管内皮細胞に発現することが明らかとなっており、これは LOX-1 の性質とも共通し、その機能的類似性については今後の検討課題である。

また、受容体 Z のリガンドとして明らかになっている DAMPs の一種が、やはり LOX-1 に結合することも結合解析により確認している。受容体 Z は細胞内に ITIM モチーフを持ち、炎症抑制性の受容体として知られていることから、炎症促進性の LOX-1 と競合的に働くことが示唆される。マウスでは、各種炎症性刺激前後の好中球における受容体 Z と LOX-1 の発現強度が対照的であり、これらの受容体がりガンド依存性炎症反応のスイッチのオン・オフを調整している可能性も示唆された。

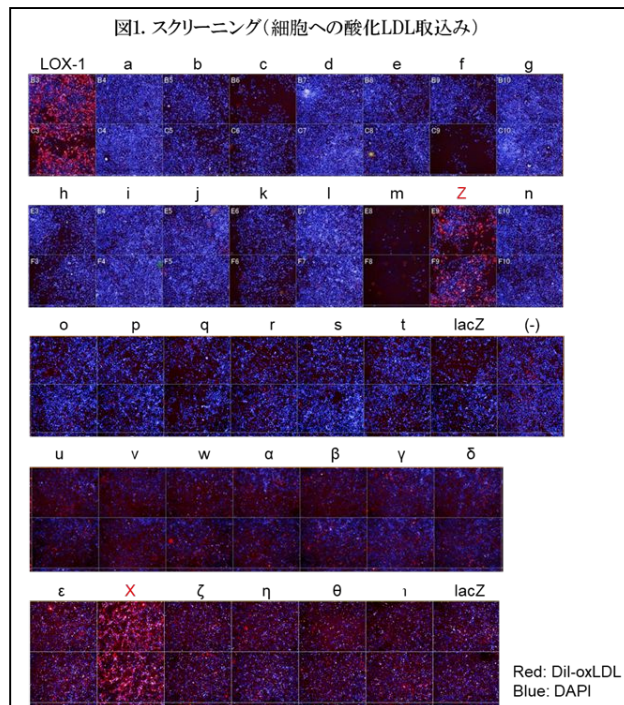
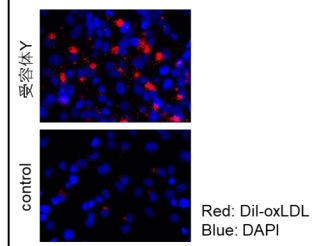


図2. 発現クローニングにより同定した新規酸化LDL受容体



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Atushi, Kawashima Hidekazu, Miyake Yoshinori, Zeniya Tsutomu, Yamamoto Akihide, Koshino Kazuhiro, Temma Takashi, Fukuda Tetsuya, Fujita Yoshiko, Kakino Akemi, Kanaya Shigehiko, Sawamura Tatsuya, Iida Hidehiro	4. 巻 52
2. 論文標題 123I Labeled oxLDL Is Widely Distributed Throughout the Whole Body in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 144 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13139-017-0497-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawamura Tatsuya, Fujita Yoshiko, Horiuchi Sayaka, Kakino Akemi	4. 巻 27
2. 論文標題 Editorial commentary: L5: An LDL fraction in which pathogenic activity of LDL is concentrated	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trends in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 247 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tcm.2016.12.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawamura Tatsuya, Fujita Yoshiko, Horiuchi Sayaka, Kakino Akemi	4. 巻 24
2. 論文標題 LOX-1 in Ischemic Stroke.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 566 ~ 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.ED071	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakino Akemi, Usami Yoko, Horiuchi Sayaka, Fujita Yoshiko, Kotani Kazuhiko, Chen Chu-Huang, Okamura Tomonori, Sawamura Tatsuya	4. 巻 26
2. 論文標題 A Novel Cell-Free, Non-Fluorescent Method to Measure LOX-1-Binding Activity Corresponding to The Functional Activity of HDL	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 947 ~ 958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.47183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 沢村達也, 藤田佳子, 堀内清香, 垣野明美
2. 発表標題 変性LDL受容体を利用した心血管病リスク評価方法の開発
3. 学会等名 第36回日本臨床化学会甲信越支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 垣野明美, 宇佐美陽子, 堀内清香, 藤田佳子, 岡村智教, 沢村達也
2. 発表標題 新規変性HDL測定系の樹立
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kakino, A., Usami, Y., Horiuchi, S., Fujita, Y., Sawamura, T.
2. 発表標題 A novel method to quantify the biological activity of modified HDL.
3. 学会等名 18th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沢村達也, 岡村智教, 藤田佳子, 堀内清香, 垣野明美
2. 発表標題 受容体結合活性で測定する変性LDL:LAB
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	沢村 達也 (SAWAMURA Tatsuya) (30243033)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究 分担者	垣野 明美 (KAKINO Akemi) (00534637)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	