

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 5日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390277

研究課題名（和文） 可溶性 LDL 受容体ファミリーによる細胞骨格制御と新規の動脈硬化治療への応用

研究課題名（英文） Regulation of cellular cytoskeleton by the soluble LDL receptor family with the application for novel anti-atherosclerosis therapy

研究代表者

武城 英明（BUJO HIDEAKI）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80291300

研究成果の概要（和文）：可溶性 LDL 受容体ファミリーLR11 は内膜平滑筋細胞の病的形質変換に重要な役割を担う。本研究はLR11により細胞遊走や接着能の亢進に至る細胞骨格制御機構を明らかにし、その病態との関わりと新規治療としての機能修飾の意義をあわせて明らかにすることで、新規の動脈硬化治療としての基礎的意義を解明することを目的とした。可溶性 LR11 は内膜平滑筋から発現するようになるとともに単球系細胞からも産生され、これらの細胞の運動能を活性化することで遊走や接着能を促進させた。糖尿病性血管傷害では血中可溶性 LR11濃度が従来の動脈硬化危険因子とは独立した血管傷害マーカーであった。また、LR11 ノックアウトマウスの解析から、LR11 は脂肪細胞の分化にも関わることが示され、このことが上記の平滑筋の形質変換機構と共通の分子メカニズムを有していると考えられ、本分子を標的とした機能修飾は、病的細胞分化とそれにもなう運動能の制御を介して新規の動脈硬化治療になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Soluble form of LR11, a member of LDL receptor family, plays an important role in the pathological phenotypic conversion of intimal smooth muscle cells. The aim of study was to clarify the mechanism underlying the regulation of cytoskeleton reorganization to achieve the acceleration of cellular migration and adhesion through the LR11-mediated pathways, the involvement of sLR11 in various diseases, and the basic significance for the development of novel therapy against atherosclerosis. The results obtained from the cell-biological, animal or patient analysis has shown that soluble LR11 is important for the common mechanism underlying the migration for floating cells as well as attached cells, the differentiation of adipocytes, and the development of vascular injury. These results suggested that the target regulation focused on the molecule contributes to the development of novel therapy to regulate the cell migration in the fields of atherosclerosis and also in other diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

可溶性LDL受容体ファミリーLR11は血管平滑筋細胞や神経細胞で発現し、これに関わる病態生理学において重要な役割を担うことが明らかになった (Rogaeva, Bujo, et al Nat Genet 2007. Jiang, Bujo, et al. J Clin Invest. 2008)。すなわち、動脈硬化の進展とアルツハイマー病の発症である。平滑筋細胞のフェノタイプ変換と機能変化のメカニズムは生理学における古典的学問領域であり、多くの現象は平滑筋細胞の分化・脱分化として理解される。この基礎概念を病態生理学で展開することの必要な病的細胞として血管内膜平滑筋細胞がある (Bujo & Saito, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006)。脂質・糖代謝異常等により中膜平滑筋細胞から脱分化し動脈硬化を過分に進展する細胞である。本課題にアプローチするために、我々は脂質異常による動脈硬化巣に由来する内膜平滑筋細胞を培養同定し、中膜平滑筋細胞に比べサイトカインに対する増殖/遊走/ECM代謝感受性が異なること、これがウロキナーゼ受容体 (uPAR) シグナルに起因することを解明した。この病的機能の獲得機序を明らかにするために内膜平滑筋細胞の遺伝子発現を網羅的に調べ、特異的に発現する LDL 受容体スーパーファミリーLR11 を同定し、これが細胞骨格の変化へのサイトカイン感受性亢進の原因であることを明らかにした。LR11 は放出可溶性受容体であり膜結合スーパーファミリー受容体 LRP1、LRP1B のリガンド結合を競合阻害し、LRPs によるサイトカイン受容体との複合体形成を抑制しサイトカインシグナル作用を増強する。その研究過程で発見した可溶性 LR11 (sLR11) の血中濃度が脂質異常を伴う一般住民の動脈硬化と正の相関を示すことから、血中 sLR11 と平滑筋細胞の関係を同定することが可溶性 LDL 受容体スーパーファミリーを介する平滑筋機能障害の解明に重要となる。一方、LR11 ノックアウトマウスは高脂肪食負荷による脂肪組織重量が減少し、sLR11 により培養脂肪細胞の成熟分化が抑制されることから、LR11/LRPs ネットワークは脂肪細胞の成熟過程に関与することが示された。これらの二つの異なった細胞における病的細胞形成から新たな共通機序を同定することで、平滑筋細胞のフェノタイプ変換、成熟分化における病的機能獲得を解明することにつながると考える。この基礎解析とともに、可溶性 LR11 濃度を上昇させる病態を明らかにすることが、最終的に可溶性 LR11 を修飾することで

発症する表現型を同定し、細胞機能破綻と病態形成の機能連関を解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、可溶性ファミリー受容体による新規の動脈硬化治療を展開するための分子基盤を明らかにすることを中心課題とする。そのために、LDL 受容体スーパーファミリーによる細胞骨格・運動機能の制御、バイオマーカー血中可溶性ファミリーsLR11 と病態連関、LDL 受容体スーパーファミリーによる脂肪蓄積制御機構についてそれぞれ解明し、最終的に、脂質・糖代謝異常における LDL 受容体スーパーファミリー修飾による新規動脈硬化治療法の可能性を考察する。

3. 研究の方法

野生型および *Lr11*^{-/-}マウスから初代平滑筋細胞および脂肪細胞を培養し、数代継代し細胞数を増やして細胞機能実験に用いた。血球樹立細胞として、HL-60、U937 細胞を用いた。培養細胞の遊走能はトランスウエル法により、細胞接着能およびトランスマイグレーションはヒト臍帯内皮細胞 HUVEC を用いて評価した。細胞発現およびその分子メカニズムは分子生物学および生化学的解析により評価した。細胞表面発現は FACS 解析ならびに免疫細胞生物学的解析に評価した。可溶性 LR11 濃度測定は LR11 特異抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により行った。病態との関連は統計学的に解析し、 $P < 0.05$ 未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) LDL 受容体スーパーファミリーによる細胞骨格・運動機能の制御

動脈硬化巣の形成において平滑筋細胞が中膜から内膜に遊走し、内膜平滑筋細胞はさまざまな機能を獲得することにより動脈硬化巣の形成を修飾する。この修飾課程ではほかの血管壁細胞である内皮細胞、浸潤細胞であるマクロファージやリンパ球との相互関係が重要である。可溶性 LDL 受容体ファミリーである LR11 は、ウサギおよびマウス中膜平滑筋では発現しないが、動脈硬化巣の内膜平滑筋細胞で発現するようになり、*Lr11*^{-/-}マウスの血管障害後の内膜肥厚が著しく減弱することから、平滑筋細胞のフェノタイプ変換とそれにとまなう遊走能に重要であることが明らかになった。一方、平滑筋細胞から放出された可溶性 LR11 は、単球に作用し、マ

クロファージへの分化、血管壁への浸潤、脂質の取り込みを促進する。骨髄細胞由来白血病細胞である HL-60、U937、THP-1 で可溶性 LR11 の発現を検討したところ、HL-60、U937 で遺伝子発現を認め、一方、THP-1 はマクロファージへ成熟後に発現が誘導された。遺伝子発現と細胞蛋白量、放出量はほぼ相関していることから、通常は遺伝子発現に応じて可溶性 LR11 が放出されると考えられた。FACS 解析から白血病細胞の多くで発現が亢進しているとともに、とりわけ急性白血病細胞 M4 の白血病細胞で特異的な発現パターンが認められた。THP-1、U937 細胞で、uPAR との相互作用を検討したところ両者は複合体を形成していることが明らかになり、さらにインテグリン CD11b とも複合体形成していた。リコンビナント可溶性 LR11 添加により、これらの細胞の遊走能が亢進し。その原因を解析した結果、可溶性 LR11 が細胞運動能を活性化することが明らかになった。すなわち、平滑筋細胞に加えて、浮遊系細胞に置いても、可溶性 LR11 は運動能を亢進させることで遊走を促進した。さらに、単球系細胞は、内皮細胞への接着能、トランスエンドセリアルマイグレーションが上昇することから、血管内皮細胞を介した血管内もしくは血管外への細胞移動に重要な役割を果たしている可能性がある。

(2) バイオマーカー血中可溶性ファミリー sLR11 と病態連関

細胞から放出された可溶性 LR11 は血中に存在することから、この濃度が細胞の分化や遊走にもなう病態と関わる可能性がある。そこで、LR11 に特異的な抗体を作製し、その2種類でサンドイッチ ELISA 測定システムを樹立した。この測定法を用いて、さまざまな病態における血中、髄液中濃度を解析した結果、血中可溶性 LR11 は、冠動脈疾患患者でもとりわけ糖尿病合併患者で上昇し、その値は、糖尿病網膜症の進展をしめす独立したリスクマーカーとなることが明らかになった。さらに、急性疾患では、炎症などでは変動しないものの、急性白血病で著しい高値を示し、化学療法による寛解とともにその値は正常化することが示された。一方、慢性血液疾患である慢性白血病、リンパ腫でも上昇する症例があり、その病態を反映して高値となることが水食された。さらに、髄液中可溶性 LR11 濃度は、アルツハイマー病で高値となり、その値は、tau やアミロイド蛋白と関連し、LR11 が神経細胞の編成過程においても重要な役割を担うことを示唆した。

(3) LDL 受容体スーパーファミリーによる脂肪蓄積制御機構

上記の一連の研究のなかで平滑筋細胞の病

的フェノタイプ変換が白色細胞から褐色脂肪細胞へのトランスディファレンシエーションに結びつくことが明らかになった。*Lr11*^{-/-}マウスの脂肪は褐色脂肪へ分化を規定する転写因子を誘導し高脂肪摂取で白色脂肪が異所性褐色脂肪に置き換わる。本マウスは生後8週で脂肪組織重量が有意に減少し、褐色脂肪転写因子 PRDM16、PGC1 α 発現が約10倍増大した。これらの遺伝子発現は高脂肪負荷すると野生型の100倍に上昇し UCP-1、Cidea 発現とともに組織学的に褐色多胞性脂肪細胞を形成した。この時点で野生型にみられる体重増加と脂肪肝、インスリン抵抗性は見られない。以上から本モデルは白色脂肪細胞が由来する前駆細胞から褐色脂肪細胞が派生する異所性褐色脂肪誘導モデルであることが明らかになった。

(4) まとめ

本研究は、可溶性ファミリー受容体 LR11 による新規の動脈硬化治療を展開するための分子基盤を主に三つの異なったアプローチから解析した。LDL 受容体スーパーファミリーによる細胞骨格・運動機能の制御において、LR11 は接着細胞のみならず浮遊系細胞の運動能と内皮細胞への接着能を亢進することを明らかにし、その分子機序に、ウロキナーゼ受容体との複合体形成を介して、浮遊細胞に発現する異なったインテグリン分子と結合し細胞骨格へのシグナル経路を活性化することが重要であることが示された。バイオマーカー血中可溶性ファミリー sLR11 と病態連関では、血中および髄液中の可溶性 LR11 濃度が、糖尿病にもなう動脈硬化の進展とアルツハイマー病の発症をそれぞれ反映することが明らかになり、この分子がこれらの病態の基盤となる病的未分化細胞への移行に関わることを示唆した。最後に、脂肪蓄積制御機構における役割が明らかになり、病的未分化細胞への移行の分子機序と白色脂肪内での褐色脂肪細胞トランスディファレンシエーション機構に共通の分子基盤があると考えられた。以上の結果から、LDL 受容体スーパーファミリー LR11 は、動脈硬化症の形成に置ける細胞機能変化に重要であり、その血中濃度は血管壁における病的細胞の移行の程度をあらわす可能性がある。血中可溶性 LR11 の高値を示す動脈硬化症例に対し、この発現や機能を修飾による新規動脈硬化治療法が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件) 全て査読有

- ① Takahashi M, Bujo H, Shiba T, Jiang M, Maeno T, Shirai K: Enhanced circulating soluble LR11 in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2012 in press
- ② Tsolakidou A, Alexopoulos P, Guo L-H, Guo, Grimmer T, Westerteicher C, Kratzer M, Jiang M, Bujo H, Rosselli F, Leante MR, Livrea P, Kurz A, Pernecky R: BACE1 activity is related to CSF concentrations of SORL1, soluble amyloid precursor protein and tau. *Alzheimers Dement* 2012 in press
- ③ Guo L-H, Guo, Westerteicher C, Wang X-H, Kratzer M, Tsolakidou A, Jiang M, Grimmer T, Laws SM, Alexopoulos P, Bujo H, Kurz A, Pernecky R: SORL1 genetic variants and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2012 in press
- ④ Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Kubota Y, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Satoh Y, Bujo H: Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Exp Mol Med* 2012 in press
- ⑤ Alexopoulos P, Luo L-H, Tsolakidou A, Kratzer M, Grimmer T, Westerteicher C, Jiang M, Bujo H, Diehl-Schmid J, Kurz A, Pernecky R: Interrelations between CSF soluble APP, amyloid- β 1-42, SORL1, and tau levels in Alzheimer's disease *J Alzheimers Dis* 2011 ; 28(3) in press
- ⑥ Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio T, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H: Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes in vitro. *Exp Cell Res* 318: 8-15, 2012, DOI:10.1016/j.yexcr.2011.10.007
- ⑦ Kuroda M, Bujo H, Aso M, Saito Y: Adipocytes as a vehicle for ex vivo gene therapy: Novel replacement therapy for diabetes and other metabolic diseases. *J Diabet Invest* 2: 333-340, 2011, DOI:10.1111/j.2040-1124.2011.00133.x
- ⑧ Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Fukaya Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H: Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C181-C185, 2011, DOI:10.1152/ajpcell.0080.2011
- ⑨ Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Bujo H, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Ishii I, Aso M, Saito Y: Fibrin glue increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. *Exp Mol Med* 243:161-167, 2011, DOI: 10.3858/emm.2011.43.3.021
- ⑩ Nakata Z, Nagae M, Yasui N, Bujo H, Nogi T, Takagi J: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67:129-132, 2011, DOI: 10.1107/S1744309110048153
- ⑪ Takahashi M, Bujo H, Jiang M, Noike H, Saito Y, Shirai K. Enhanced circulating soluble LR11 in patients with coronary organic stenosis. *Atherosclerosis* 210:581-584, 2010, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.010>
- ⑫ Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Ebinuma H, Takubo K, Kaneko H, Kasuga K, Kakita A, Takahashi H, Bujo H, Saito Y, Nishizawa M: Increased Levels of Soluble LR11 in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30:28-32, 2010, DOI: 10.1159/000315539

- ⑬ Matsuo M, Ebinuma H, Fukamachi I, Jiang M, Bujo H, Saito Y: Development of an immunoassay for the quantification of soluble LR11, a circulating marker of atherosclerosis. Clin Chem 55:1801-1808, 2009, DOI: 10.1373/clinchem.2009.127027

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武城 英明 (BUJO HIDEAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：80291300

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：