

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790247

研究課題名(和文)高LDL血症におけるマクロファージの泡沫化とプラスミン活性の役割

研究課題名(英文)The role of plasmin activity for foam cell formation of macrophages under hypercholesterolemia

研究代表者

岩城 孝行 (IWAKI, TAKAYUKI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70509463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化病変のマクロファージによるOxLDLの取り込みはスカベンジャーレセプター(SR)が必要であり、プラスミン活性によりその取り込みが上昇する。マクロファージのSRはMsr1、Cd36、Or11、及びCxcl16の4種類があるがプラスミン活性が必要となる物は不明であった。本研究では、それらSRを強制発現させた細胞を用いてOxLDLの取り込み実験を試みたが、ある種のSRでは強制発現に抵抗するため、モデルマウスから直接マクロファージを取りだすとともに、これら4種類のSRを発現するRAW264細胞を用いて細胞内のSR遺伝子を破壊しOxLDLの取り込みを確認するための実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：The uptake of OxLDL by macrophages in atherosclerotic lesions is mediated by so-called scavenger receptors. The uptake is further enhanced by plasmin activities. There are 4 SRs in macrophages, which are Msr1, Cd36, Or11, and Cxcl16. It is still unknown that what SRs are enhanced for OxLDL uptake by plasmin activities. In this study, several cell lines were utilized for exogenous expressions of these SRs, however, some of SRs were difficult to be expressed. Therefore, macrophages were directly collected from Ldlr-/-/Apobec1-/- mice. At the same time, RAW264 cell line, which is murine macrophages, is tested for the expression of these 4 SRs. The cell line expresses 4 SRs, therefore, we are now destroying these SRs from the cell line to test plasmin-mediated OxLDL uptake.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：plasminogen scavenger OxLDL atherosclerosis

1. 研究開始当初の背景

家族性高脂血症は5つの型に分類されるが、対象患者の最も多い型はIIa型である。IIa型の発症機序は低密度リポタンパク受容体(LDLr)の発現異常もしくは機能異常による血中LDLの上昇がその特徴となる。典型的なIIa型を呈するLDLr完全欠損患者においては血中LDL濃度が実に600mg/dl以上に達し、若年期から虚血性心疾患等の動脈硬化性疾患に罹患するようになる。近年の遺伝子工学の飛躍的な発展に伴って、様々な遺伝子改変マウスが作成され、動脈硬化の研究に利用されている。その中でも、最初に開発されたものがアポE欠損マウス(Apoe^{-/-})である。アポE欠損マウスは通常食飼育下でも自発的な動脈硬化病変を呈するようになるが、高脂血症の主因は超低密度リポタンパク(VLDL)と中間比重リポタンパク(IDL)の蓄積であるため、ヒトでは稀なIII型のモデルであるといえる。一方、対象患者の多いIIa型のモデルを作成するために、LDLr欠損マウス(Ldlr^{-/-})が作成されたが、このマウスは通常食飼育下では自発的な動脈硬化病変を呈さなかった。この原因は、ヒトとは異なりマウスでは肝臓においてApobec1というアポB(ApoB)のメッセンジャーRNAの一部にストップコドンを導入する酵素が発現するためであることが判明した。ヒトでは肝臓で合成されるアポBは全てApoB-100であるが、マウスではApobec1の存在のため約70%はApoB-48となる。ApoB-100のC末端にはLDLrに結合する領域があるが、ApoB-48はそのC末端を欠損しApoB-100の48%しかN末端を持っていないためLDLrに結合することがない。従って、本質的にマウスではLDL代謝においてLDLrの依存度が極端に低くなっているため、LDLr欠損が血中LDLの上昇に結びつかず、症状として出現しないと考えられる。一方、LDLrと共にApobec1も同時に欠損させたマウスでは、通常食飼育下で自発的な動脈硬化病変を呈し、高LDL血症を呈することがその後の研究で判明した。従って、Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}マウスはIIa型のモデルであるといえる(1)。

我々は血液凝固線溶因子の機能を様々な生理的、病理的な条件下で検討してきた。特にIIa型高脂血症のモデルマウスであるLdlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}に、フィブリノゲン(Fg)(2)、プラスミノゲン(Plg)、プラスミノゲンアクティベーターインヒビター1(PAI-1)(3)の各々の欠損マウスを掛け合わせることで、IIa型高脂血症におけるそれらの機能を解析した。これらの機能は既にアポE欠損マウスにて確認されているが、Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}にプラスミノゲン欠損を掛け合わせたマウス(Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}/Plg^{-/-})では、血中コレステロール、とりわけLDLがLdlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}マウスに比べて2倍以上になるにもかかわらず、動脈硬化プラークのサイズは僅か10%程度にしかならない事があげられる(図1)。そ

の後の追加研究において、このように制限された動脈硬化プラークの発展機序は、マクロファージのOxLDLの取り込みが、プラスミノゲンの活性体であるプラスミンによって制御されている為であることが判明した。この研究におけるマクロファージは完全にLDLrを欠損しているため、取り込みに関してはLDLの修飾状態にかかわらず全てスカベンジャーレセプター(SR)を介していると考えられる。従って我々は、プラスミンによって影響を受けるLDLやOxLDLの取り込みを担っているSRの同定を行っている。

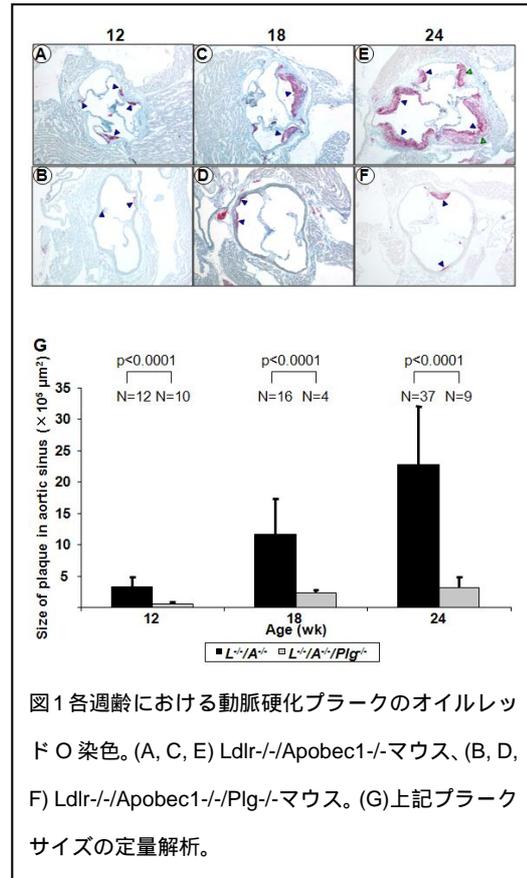


図1 各週齢における動脈硬化プラークのオイルレッドO染色。(A, C, E) Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}マウス、(B, D, F) Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}/Plg^{-/-}マウス。(G)上記プラークサイズの定量解析。

参考文献

1. Powell-Braxton L.; Veniant M.; Latvala R. D.; Hirano K. I.; Won W. B.; Ross J.; Dybdal N.; Zlot C. H.; Young S. G. and Davidson N. O. (1998) Nat Med 4, 934-8.
2. Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Brechmann M, Ploplis VA, Castellino FJ. (2006). Blood. 107:3883-3891. Epub 2006 Jan 24.
3. Iwaki T, Ploplis VA, Castellino FJ. (2006). Blood. 108:512A.

2. 研究の目的

本申請に先立ち平成 21 年度上原記念財団研究奨励賞が申請者に授与されている。この助成により、マクロファージに発現しOxLDLの取り込みに重要なSRであると考えられている、SR-AI/II (遺伝子名:Msrl)、

CD36 (遺伝子名:Cd36)、LOX-1 (遺伝子名:Orl1)、及び SR-PSOX (遺伝子名:Cxcl16) を組み込んだ昆虫細胞用と哺乳細胞用の発現ベクターを作成し、昆虫細胞用発現ベクターはショウジョウバエから株化された S2 細胞に、哺乳細胞用の発現ベクターは C57Bl/6 マウスから株化された LLC 細胞に安定的に導入することができた。

本研究ではこれらの安定細胞腫を利用し、プラスミンにより取り込み活性が増強される SR を *in vitro* にて同定し、更に得られた結果を *in vivo* にて検証することを目的とする。そのために以下の項目を検討する。

1. S2 細胞に導入した各 SR に対して OxLDL の取り込み試験を行う。
2. LLC 細胞に導入した各 SR に対して、C57Bl/6 マウスを用いて免疫し、脾臓中の B リンパ球から自己抗体の cDNA を単鎖可変領域フラグメント (single-chain variable fragment: scFv) としてコンビナトリアルライブラリー化し各 SR と特異的に反応するものをスクリーニングした後に、#1 の S2 細胞による取り込み実験の阻害実験を行う。
3. C57Bl/6 マウスから分離したマクロファージを用いて、#2 で得られた阻害効果のある scFv を用いて OxLDL の取り込み阻害試験を行う。
4. #2 及び 3 にて阻害効果の確認できた SR に対する scFv をその C 末端に定常領域を付加した抗 SR 抗体の cDNA に変換し、さらにプラスミンの阻害作用を示す $\alpha 2$ アンチプラスミン ($\alpha 2$ AP) を遺伝子組み換えにより導入した、抗 SR 抗体- $\alpha 2$ AP 複合体を Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-} に導入し、動脈硬化プラークへの影響を検討する。

3. 研究の方法

各種スカベンジャーレセプター (SR) を導入した LLC 細胞を C57Bl/6 マウスの皮下に接種、免疫した。SR はマウスに対しては自己抗原であるため通常の方法では抗体を入手することができないので、接種 4 週間後に脾臓を摘出し、B 細胞を分離し、RT-PCR にて全クラスの免疫グロブリンの可変部位を増幅した後、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖が直列に並んだ単鎖可変領域フラグメント (single-chain variable fragment: scFv) となるように PCR にて再増幅し、リボソームディスプレイ法にて scFv を提示させ、対応する SR と反応するものを分離し、大腸菌発現系にて精製する。

LLC 細胞に導入した SR をショウジョウバエから分離された S2 細胞にも同様に導入し、恒常的に発現する細胞群を FACS を用いて分離選択した。発現の確認は SR のアミノ末端もしくはカルボキシル末端に融合した EGFP の蛍光強度の確認を行うことで、FACS による分離選択時に行うとともに、S2 細胞の細胞膜から膜タンパクを抽出し、EGFP に対する抗体を用いたウエスタ

ンプロット法により最終確認する。

Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-} マウス由来のマクロファージを用いて、SR に対して作成し上記 scFv の OxLDL 取り込み阻害活性を探索する。

マウス培養細胞腫である RAW264 を用いて SR のノックダウンを試み、上記 scFv の機能を探索する。

4. 研究成果

LLC 細胞に EGFP を C 末端に融合させた形で Msr1、Cd36、Orl1、及び Cxcl16 を発現させた結果、EGFP の発現を認めたため、これらの細胞を C57Bl/6 マウスへ移植し、腫瘍形成させることで免疫を行い、脾臓より B 細胞由来の mRNA を抽出し scFv ライブラリーを構築し保存した。しかしながら、LLC 細胞膜表面における各種 SR の発現を直接確認したところ、Msr1 及び Cd36 については推定通りの分子量であったが、Orl1 及び Cxcl16 については予想される分子量よりもはるかに低いものであった。したがって、後者の 2 分子については強制発現させた LLC 細胞や S2 細胞では解析ができないことが判明した。この傾向は S2 細胞でも同様であり、Orl1 及び Cxcl16 の機能解析については、Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-} 及び Ldlr^{-/-}/Apobec1^{-/-}/Plg^{-/-} マウス由来のマクロファージを用いて検討する必要が出たため、米国ノートルダム大学より輸入する手続きを行った。輸入元からの異常手続きに予想外に時間を消費したため日本への搬入が 2013 年後半にずれ込んでしまい、またノロウイルスに感染しているため SPF 化が必要となったためそれらの作業を行った結果研究期間が終了してしまった。

マウス由来のマクロファージを調整するための作業に合わせて、RAW264 細胞を入手し、Msr1、Cd36、Orl1、及び Cxcl16 の発現を確認したところ、いずれの分子の発現も確認できたため、当初は当該分子に対する siRNA にて発現のノックダウンを計画したが、2013 年初頭ごろより導入可能になったゲノム DNA を直接編集することが可能な CRISPR/Cas9 システムを導入することにより RAW264 細胞における Msr1 遺伝子の破壊を試み、その破壊に成功した。残念ながら、Cd36、Orl1、及び Cxcl16 の破壊までは終了できなかったが、今後はこれら残りの因子も破壊した RAW264 細胞を作成し、また 4 因子すべてを破壊した細胞と、4 因子のなかで 1 因子のみ破壊しない細胞を作成し OxLDL の取り込みを確認した後に論文化する予定である。

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 6 件)

1. Iwaki T, Malinverno C, Smith D, Xu Z,

Liang Z, Ploplis VA, Castellino FJ. (2010). The generation and characterization of mice expressing a plasmin-inactivating active site mutation. J Thromb Haemost. 8:2341-4. 査読有。

2. Iwaki T, Tanaka A, Miyawaki Y, Suzuki A, Kobayashi T, Takamatsu J, Matsushita T, Umemura K, Urano T, Kojima T, Terao T, Kanayama N. (2011). Life-threatening haemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete PAI-1 deficiency in humans. J Thromb Haemost. 9:1200-6. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04288.x. 査読有。

3. Iwaki T, Umemura K. (2011). A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection, fluorescence-assisted cell sorting, and doxycycline-inducible protein expression in mammalian cells. Cytotechnology. 63:337-43. Epub 2011 May 7. 査読有。

4. Iwaki T, Nagahashi K, Kobayashi T, Umemura K, Terao T, Kanayama N. (2012). The first report of uncontrollable subchorionic and retroplacental haemorrhage inducing preterm labour in complete PAI-1 deficiency in a human. Thromb Res. Apr;129:e161-3. Epub 2011 Nov 17. 査読有。

5. Iwaki T, Urano T, Umemura K. (2012). PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. Br J Haematol. May;157(3):291-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09074.x. Epub 2012 Feb 24. 査読有。

6. Nagahashi K, Umemura K, Kanayama N, Iwaki T. (2013). Fusion of fluorescent protein to puromycin N-acetyltransferase is useful in Drosophila Schneider S2 cells expressing heterologous proteins. Cytotechnology. 2013 Mar;65(2):173-8. doi: 10.1007/s10616-012-9473-y. Epub 2012 Jun 16. 査読有。

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 岩城孝行、梅村和夫、A Plasminogen Deficiency Attenuates Atherosclerosis、第 33 回日本血栓止血学会学術集会、鹿児島、2010/4/22-24
2. 岩城孝行、Plasminogen and Atherosclerosis in a Murine Model of Human Familial Hypercholesterolemia、第 8 回血管オルビス、東京、2010/8/21
3. Takayuki Iwaki、Takao Kobayashi, Kazuo Umemura, Tetsumei Urano, Tetsuhito Kojima, Naohiro Kanayama、PAI-1 deficiency in humans and mice、XXIII ISTH Congress & 57th

Annual SSC Meeting, Kyoto、2011/7/23-28

4. 岩城孝行、梅村和夫、Is the phenotype manifested by complete PAI-1 deficiency in human compatible to that in mouse?、日本薬理学会、京都、2012/3/14-16

5. Takayuki Iwaki、The Role of Blood Coagulation and Fibrinolytic Factors in the Placenta、XVIII IFPA Meeting, Hiroshima、2012/9/19-21

6. 岩城孝行、A Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerosis in a Murine Model of Human Familial Hypercholesterolemia、第 86 回日本薬理学会、福岡、2013/3/21-23

7. Takayuki Iwaki、PAI-1 deficiency Men and Mice、VIII Aso International Meeting, Aso、2013/5/16-18

8. 岩城孝行、PAI-1 deficiency、日本血栓止血学会、山形、2013/5/30-6/1

9. 岩城孝行、PAI-1 deficiency in humans and mice、日本検査血液学会静岡支部総会、静岡、2014/3/15

10. 岩城孝行、Analysis of a new PAI-1 deficient patient、第 87 回日本薬理学会、仙台、2014/3/19-21

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩城孝行 (IWAKI, TAKAYUKI)

浜松医科大学 医学部 准教授

研究者番号：70509463