

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670133

研究課題名(和文) 内因性酸化LDL阻害因子の同定とその動脈硬化性疾患制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of an endogenous oxidized LDL blocker and elucidation of its regulatory mechanism of arteriosclerotic diseases

研究代表者

垣野 明美 (KAKINO, Akemi)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：00534637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸化LDL - 酸化LDL受容体相互作用は動脈硬化の進展に重要である。本研究では、リガンドである酸化LDLを標的とする内因性ブロッカーとしてDel-1を同定した。Del-1は酸化LDLに結合し、受容体の種類に関係なく酸化LDLの細胞への取り込みを阻害し、酸化LDLによる細胞応答を抑制した。さらにマウスでのDel-1過剰発現は血管壁脂質沈着を抑制した。本研究により、変性LDLとその受容体だけではなく防御因子を含めた3者のバランスが崩れることが、動脈硬化を進行させる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Oxidized LDL (oxLDL) is implicated in atherosclerosis. Despite their potential importance, however, endogenous inhibitors that block the interaction between oxLDL and its receptors have not been extensively studied. To address this issue, we investigated whether developmental endothelial locus-1 (Del-1) might function as an endogenous inhibitor of oxLDL. Del-1 selectively bound to oxLDL. Del-1 inhibited oxLDL uptake and oxLDL-induced cellular responses irrespective of the kind of scavenger receptor. Moreover, Del-1 overexpression attenuated atherogenesis in mice. These results suggested that disrupted balance among modified LDL, scavenger receptors, and protective molecules might lead to the progression of atherosclerosis.

研究分野：薬理学

キーワード：酸化LDL 酸化LDL受容体 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の進行は、血管だけでなくその灌流する臓器の機能にも直接関わり、臓器障害を引き起こす。コレステロールと動脈硬化の関連は確立されており、中でも酸化などの修飾を受けた変性 LDL が動脈硬化進行の重要な要因である。すなわち、酸化 LDL は、その受容体を介して血管内皮障害やマクロファージ泡沫化を引き起こし、動脈硬化を進行させる。

我々はこれまで酸化 LDL などの血中因子による血管壁への作用について、血管内皮細胞の細胞膜受容体を介した機序を通じて解析を進めてきた。この過程で、酸化 LDL が血管機能に悪影響を及ぼすのであれば、その一方で、良い働きをするもの、つまり防御因子が存在するのではないかという着想に至った。酸化 LDL 制御の試みは、これまで酸化のプロセスや抗酸化物質、あるいは受容体阻害という観点から研究されてきていた。これに対して我々は、リガンドを標的とした酸化 LDL 受容体結合の内因性阻害物質という全く新しい観点から研究を進め、最近、血液中に存在する酸化 LDL の内因性阻害因子 Del-1 (Developmental endothelial locus-1) を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、新しく見出した酸化 LDL 阻害因子 Del-1 が、酸化 LDL による血管機能異常をどのように阻害するのか、そして動脈硬化性疾患に対してどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Del-1 と酸化 LDL の結合を ELISA により評価した。また、酸化 LDL の細胞への取込みに対する Del-1 の影響を、酸化 LDL 受容体 (LOX-1, SR-A, CD36, SR-BI) を発現させた COS-7 細胞や培養血管内皮細胞(HCAEC)、マクロファージに分化させた THP-1 細胞を用いて検討した。

(2) Del-1 が酸化 LDL によって起こる細胞反応に与える影響を、LOX-1 安定発現細胞株や HCAEC を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイやウェスタンブロット法により解析した。

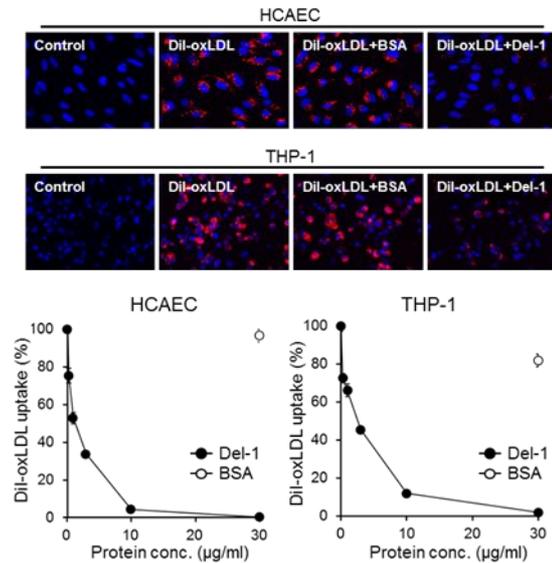
(3) in vivo での Del-1 の作用を調べるため、Del-1 過剰発現マウス(Del-1Tg)を作製し、24 週齢の Del-1Tg および野生型マウス(WT)に、高脂肪食を 20 週間自由摂取させた。高脂肪食負荷後の血管組織や血液検体を用いて、Del-1 が血管の病的機能変化に対してどのような影響を及ぼすかを Oil red 染色、qRT-PCR、ELISA により解析した。

4. 研究成果

(1) Del-1 と酸化 LDL の結合を ELISA により

評価した結果、Del-1 は用量依存的に酸化 LDL に結合した。一方、LDL への結合は認められなかった。

次に、酸化 LDL の細胞への取込みに対する Del-1 の影響を調べると、Del-1 は LOX-1 や SR-A, CD36, SR-BI といった一群の酸化 LDL 受容体発現細胞への DiI 標識酸化 LDL (DiI-oxLDL) 取込みを阻害した。一方、LDL 受容体を発現させた細胞への DiI 標識 LDL (DiI-LDL) の取込みには影響を与えなかった。また、酸化 LDL 受容体を内在性に発現するヒト培養血管内皮細胞(HCAEC)やマクロファージへの DiI-oxLDL の取込みも Del-1



によって阻害された。(図 1)

図 1. 培養血管内皮細胞(HCAEC)、マクロファージ(THP-1)への酸化 LDL 取込みに対する Del-1 の阻害効果。写真の赤色は細胞に取り込まれた酸化 LDL を示す。

Del-1 は N 末端側に RGD モチーフを含む EGF ドメイン、C 末端側に PS 結合ドメインを有している。そこでどの領域が酸化 LDL 阻害作用に重要であるかを調べるため Del-1 に部位特異的変異を導入した蛋白質を作製して解析に用いた。RGD 配列を変異した RGD モチーフ中の 98 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に変換した変異体(D98E)では、野生型の Del-1 と同様に酸化 LDL に結合し、酸化 LDL 取込み阻害能は変わらなかった。一方、PS 結合ドメイン内の 195 番目のアルギニンまたは 375 番目のアルギニンのアラニン変異体(R195A, R375A)では、酸化 LDL への結合と酸化 LDL 取込み阻害能は共に減少した。そしてこれらのアルギニンに同時に変異を入れると(R195A/R375A)、酸化 LDL への結合と酸化 LDL 取込み阻害能はさらに減少した。このことから、Del-1 の酸化 LDL 阻害作用には、PS 結合ドメイン中のこれらのアルギニンが機能していると考えられた。

(2) 次に、Del-1 が酸化 LDL によって起こる細胞反応に与える影響を検討した。LOX-1 安定発現細胞を酸化 LDL で刺激すると ERK リン酸化が亢進する。このとき、酸化 LDL と同時に Del-1 を添加するとその反応は抑制された。また酸化 LDL により転写因子 NF- κ B と SRF が活性化され、それは Del-1 用量依存的に抑制された。

培養血管内皮細胞でもやはり、Del-1 は酸化 LDL 依存的な ERK リン酸化を抑制した。また培地中に分泌されるエンドセリン-1 を ELISA で測定すると、酸化 LDL 刺激によりエンドセリン-1 分泌が亢進し、その反応は Del-1 を添加することにより抑制された。(図 2)

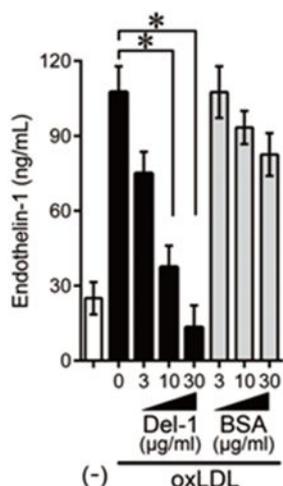


図 2. 培養血管内皮細胞(HCAEC)における、酸化 LDL 刺激依存性エンドセリン-1 分泌に対する Del-1 の阻害効果

以上の結果より Del-1 は酸化 LDL を標的として、酸化 LDL - 受容体相互作用を阻害することにより、内因性の酸化 LDL 阻害蛋白質として機能することが考えられた。

(3) そこで、in vivo で、Del-1 や酸化 LDL の血中濃度の変動や相互のバランスが、動脈硬化の発症や進展にどのように影響し得るのかについて検討するため、作製した Del-1Tg マウスに高脂肪食負荷を行い解析した。

高脂肪食負荷後、各個体から大動脈を取り出して Oil red O 染色を行い観察すると、Del-1Tg では野生型マウスに比べ、大動脈基部中の脂質沈着が抑制されていた($P < 0.001$)。(図 3)

また、高脂肪食負荷を行ったマウスから大動脈血管を摘出して全 RNA を抽出・精製し、血管内皮細胞機能に関連する因子について、定量 RT-PCR により解析した。結果、Del-1 過剰発現マウスは野生型マウスに比べて、ICAM-1 や MCP-1 の発現が減少していた。このことから、in vivo における血管内皮細胞の病的機能変化に対して、Del-1 が抑制的に作

用していることが示唆された。

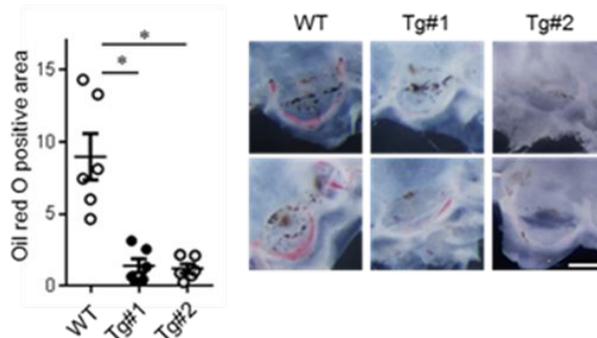


図 3. Del-1 トランスジェニックマウス(Tg#1, Tg#2)の血管壁脂質沈着への影響。写真の赤色の部分が血管壁に取込まれた脂質を示している。

また、高脂肪食負荷したマウスの血漿サンプルを用いて、血液中の Del-1 量、酸化 LDL 量、LAB (LOX-1 ligands containing apolipoprotein B; 酸化 LDL の受容体への結合活性)を ELISA により測定した。その結果、Del-1 過剰発現マウスは野生型マウスに比べ、血中酸化 LDL 量は変化しないが、LAB すなわち酸化 LDL 活性が減少することが明らかになった。このことから、in vivo でも Del-1 が酸化 LDL 活性に対して抑制的に働くことが示唆された。

以上より、(酸化)変性 LDL とその受容体だけではなく、Del-1 のような防御因子を含めた 3 者のバランスが崩れることが、動脈硬化を進行させる可能性が示唆される。

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 4 件)

1. Kakino, A. and Sawamura, T.: Modified LDL functions in human and LOX-1-mediated signal transductions. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 147:107-113, 2016. (査読無)
2. Yamamoto, K., Kakino, A., Takeshita, H., Hayashi, N., Li, L., Nakano, A., Hanasaki-Yamamoto, H., Fujita, Y., Imaizumi, Y., Toyama-Yokoyama, S., Nakama, C., Kawai, T., Takeda, M., Hongyo, K., Oguro, R., Maekawa, Y., Itoh, N., Takami, Y., Onishi, M., Takeya, Y., Sugimoto, K., Kamide, K., Nakagami, H., Ohishi, M., Kurtz, T.W., Sawamura, T. and Rakugi, H.: Oxidized LDL (oxLDL) activates the angiotensin II type 1 receptor by binding to the lectin-like oxLDL receptor. *FASEB J*, 2015. (査読有)
3. Nakayachi, M., Ito, J., Hayashida, C., Ohyama, Y., Kakino, A., Okayasu, M., Sato, T., Ogasawara, T., Kaneda, T., Suda, N.,

Sawamura, T. and Hakeda, Y.: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state. *Bone*, 75:170-182, 2015. (査読有)

4. Okamura, T., Sekikawa, A., Sawamura, T., Kadowaki, T., Barinas-Mitchell, E., Mackey, R.H., Kadota, A., Evans, R.W., Edmundowicz, D., Higashiyama, A., Nakamura, Y., Abbott, R.D., Miura, K., Fujiyoshi, A., Fujita, Y., Murakami, Y., Miyamatsu, N., Kakino, A., Maegawa, H., Murata, K., Horie, M., Mitsunami, K., Kashiwagi, A., Kuller, L.H., Ueshima, H. and Group, E.J.S.: LOX-1 ligands containing apolipoprotein B and carotid intima-media thickness in middle-aged community-dwelling US Caucasian and Japanese men. *Atherosclerosis*, 229:240-245, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Identification of oxLDL blocking protein and its anti-atherogenic function
Kakino, A., Nakano, A., Fujita, Y., Sawamura, T.
第 93 回日本生理学会大会
札幌 2016 年 3 月 22 日 3 月 24 日
2. AT1 は LOX-1 を介した酸化 LDL によるシグナル伝達を促進する
垣野明美、山本浩一、藤田佳子、楽木宏美、沢村達也
第 1 回 J-ISCP 学術集会
京都 2015 年 6 月 20 日 6 月 21 日
3. PAF receptor interacts with LOX-1 and promotes oxidized LDL-induced cellular responses
Kakino, A., Fujita, Y., Yamamoto, K., Rakugi, H., Sawamura, T.
17th International Congress on Atherosclerosis 2015
Amsterdam 2015 年 5 月 23 日 5 月 26 日
4. AT1 promotes oxLDL-induced cell responses through interact with LOX-1
Kakino, A., Yamamoto, K., Li, L., Fujita, Y., Rakugi, H., Sawamura, T.
第 92 回日本生理学会大会
神戸 2015 年 3 月 21 日 3 月 23 日
5. Interaction between AT1 and LOX-1 promote oxLDL-induced cell responses
Kakino, A., Yamamoto, K., Li, L., Fujita, Y., Rakugi, H., Sawamura, T.
第 88 回日本薬理学会
名古屋 2015 年 3 月 18 日 3 月 20 日
6. AT1 directly interacting with LOX-1 mediates signal transduction induced by oxidized LDL

Kakino, A., Yamamoto, K., Nakano, A., Li, L., Fujita, Y., Rakugi, H., Sawamura, T.
The 82nd Congress of the European Atherosclerosis Society

7. 酸化 LDL 阻害分子 Del-1 の過剰発現は、マウス血管壁脂質沈着を抑制する
垣野明美、中野厚史、藤田佳子、沢村達也
第 23 回日本循環薬理学会
福岡 2013 年 12 月 6 日
8. Del-1 as an endogenous blocker of oxidized LDL which suppresses arterial lipid accumulation
垣野明美、中野厚史、藤田佳子、沢村達也
第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
大阪 2013 年 11 月 22 日 11 月 23 日
9. Identification of endogenous anti-atherogenic protein which blocks the interaction between oxidized LDL and its receptors
Kakino, A., Nakano, A., Fujita, Y., Sawamura, T.
AHA Scientific Sessions 2013
Dallas 2013 年 11 月 16 日 2013 年 11 月 20 日
10. Inhibition of oxidized LDL action by an endogenous protein
垣野明美、中野厚史、藤田佳子、沢村達也
第 86 回日本生化学会大会
横浜 2013 年 9 月 11 日 9 月 13 日
11. An endogenous blocker of oxidized LDL
Kakino, A., Nakano, A., Fujita, Y., Sawamura, T.
13th International Conference on Endothelin
東京 2013 年 9 月 9 日 9 月 11 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

垣野 明美 (KAKINO, Akemi)
信州大学・先鋭領域融合研究群
バイオメディカル研究所・助教(特定雇用)
研究者番号 : 00534637