

平成21年 3月30日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591036  
 研究課題名（和文） 可溶性受容体LR11欠損モデルを用いた血管平滑筋細胞の病的形質の制御  
 研究課題名（英文） Amelioration of pathological phenotypes of vascular smooth muscle cells by the sLR11 regulation.  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：武城 英明（BUJO HIDEAKI）  
 所属機関・部局・職：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：

放出可溶性LR11を用いた内膜SMCsの病的形質変換の修飾を解明し内膜平滑筋細胞バイオマーカーとしての臨床的意義を探索した。内膜平滑筋遺伝子LR11機能を修飾することにより動脈硬化巣を変化させた。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動脈硬化マーカーであった。可溶性LR11の血中濃度は動脈硬化症における新規の血管傷害バイオマーカーとなると考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：動脈硬化、平滑筋細胞、内膜中膜肥厚、遊走、アンジオテンシンⅡ、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

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、多くの現象は分化・脱分化として理解することが可能になった。この基礎概念を臨床医学で展開する

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。我々は、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。これまでに我々は動脈硬化の進展過程における形質変換の機序を明らかにすることを目的に肥厚巣に存在する平滑筋細胞 (SMCs) に着目した一連の研究結果から、動脈硬化巣における中膜より内膜へ SMCs が遊走、増殖する過程で、病的形質の制御遺伝子として遊離型分化抑制因子 LR11 の発現が重要であり、この欠損モデル動物を用いた血管機能を解析することが、病巣内での SMCs の分化、脱分化の機序を明らかにすることにつながり病巣の形成および治癒過程の機序を解明するという着想に至った。

内膜平滑筋細胞の機能はとりわけ糖尿病、高脂血症等で修飾されプラークの性状を変化させる。この変化を早期より検出するには精密な画像診断とともに血管障害をあらわす定量的な血中指標が必要だが、糖尿病、高脂血症等にもなう早期の動脈硬化の進展を特異的かつ定量的に評価する血中指標を確立するには至っていない。これらの背景から冠動脈疾患の診断および治療に内膜平滑筋細胞の性状をあらわす特異的バイオマーカーを樹立することが有用である。最近、我々は上述したLR11が放出可溶性として存在し、その特異的蛋白を培養細胞上清に免疫学的に同定することに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究は、LR11 ノックアウト動物の血管細胞の機能解析により病巣形成における内膜

SMCs の形質変換機構を解明し、放出可溶性LR11を用いた内膜 SMCs の病的形質変換の修飾を解明し、新規の内膜平滑筋細胞バイオマーカーとしての臨床的意義を探索することである。

## 3. 研究の方法

発生工学的に LR11 遺伝子を欠損したマウス *Lr11*<sup>-/-</sup>マウスの内皮傷害後の反応性内膜肥厚を大腿動脈におけるカフ障害モデルにより検討した。マウス大動脈より培養血管平滑筋細胞を調整し、培養平滑筋細胞の遊走能をボイデンチャンバー法により評価した<sup>3)</sup>。細胞運動機能およびその分子メカニズムは免疫細胞生物学的解析また分子生物学および生化学的解析により評価した。

動脈硬化の指標として頸動脈内膜中膜肥厚度 (IMT) を測定した 405 血液サンプルの可溶性 LR11 濃度をこれまでに樹立した免疫学的同定法により測定した。RAP カラムによる精製検体を電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーして LR11 特異的モノクローナル抗体を用いて反応させた。免疫学的反応を ECL により可視化した。免疫学的同定蛋白を画像処理した後に解析ソフトにより定量化した。測定結果と IMT、さらに動脈硬化に関わる危険因子との関連を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 内膜平滑筋細胞に発現した LR11 の意義

*Lr11*<sup>-/-</sup>マウスの内皮傷害後の反応性内膜肥厚は対照マウスに比べて著しく低下した。*Lr11*<sup>-/-</sup>血管平滑筋細胞の PDGF-BB 添加による遊走能は約 50%へと低下、さらに AngII による遊走能はほぼ完全に抑制されていた。細胞接着能は遊走能同様に AngII による遊走能がほぼ完全に抑制されていた。これらの減少した遊走能および接着能は可溶性 LR11 蛋白を

添加することによりほぼ回復した。細胞接着に重要なアクチン再構成を免疫細胞学的に検討すると、PDGF-BB や AngII によりみとめられるラフリング形成が *Lr11*<sup>-/-</sup>血管平滑筋細胞で障害されていた。このラフリング形成障害はやはり可溶性 LR11 蛋白を添加することによりほぼ回復した。そこで、アクチン再構成に至るウロキナーゼ受容体からのシグナル伝達を解析した結果、*Lr11*<sup>-/-</sup>血管平滑筋細胞ではウロキナーゼ受容体とインテグリンの会合が障害される結果、FAK リン酸化、ERK リン酸化、Rac-1 活性化が障害されることが明らかになった。

## (2) 放出可溶性 LR11 の特性と応用

動脈硬化の指標として頸動脈内中膜肥厚度 (IMT) を測定した 405 血液サンプルの可溶性 LR11 濃度をこれまでに樹立した免疫学的同定法により測定した。RAP カラムによる精製検体を電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーして LR11 特異的モノクローナル抗体を用いて反応させた。免疫学的反応を ECL により可視化した。免疫学的同定蛋白を画像処理した後に解析ソフトにより定量化した。測定結果と IMT、さらに動脈硬化に関わる危険因子との関連を検討した。405 検体の IMT と各基本データとの相関を検討したところ、年齢、BMI、収縮期および拡張期血圧値、トリグリセリド値、インスリン値、血中可溶性 LR11 濃度と有意 ( $P < 0.05$ ) な正の相関を示した。また、HDL-コレステロール、LDL サイズと有意な負の相関を示した。2群間解析では有意に男性、喫煙者で高値だった。多変量解析の結果、IMT と年齢、血圧、HDL-コレステロール、血中可溶性 LR11 濃度の間で、血中可溶性 LR11 濃度は IMT を規定する独立因子であり、さらに、年齢、性別、BMI、血圧、喫煙、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリド、LDL サイ

ズ、血糖、インスリン、血中可溶性 LR11 濃度の間においても、血中可溶性 LR11 濃度は IMT を規定する独立因子だった。血中可溶性 LR11 濃度 4 分割による IMT 高値へのオッズ比を解析すると、2.13-2.78 では 2.13 以下に比べて 1.93 倍、2.79-3.52 では 2.96 倍、3.52 以上では 7.6 倍であった (年齢 10 歳増加のオッズ比は 1.97 倍)。血中可溶性 LR11 濃度と動脈硬化危険因子との関連を単解析検討すると、血中可溶性 LR11 濃度は男性で収縮期および拡張期血圧、IMT と有意な正の相関、HDL-コレステロールと負の相関を示した。また、女性で LDL-コレステロール、LDL サイズ、インスリン、IMT と有意な正の相関、HDL-コレステロールと負の相関を示した。これらの変数の間での多変量解析では男女ともに IMT が独立した規定因子だった。

## (3) 放出可溶性 LR11 の臨床的意義

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。この修飾課程には、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。このような位置づけにある内膜平滑筋細胞の機能変化を知る方法として新たな遺伝子発現を同定することが有用と考えられる。我々がこれまでに内膜平滑筋細胞で特異的に発現する遺伝子として同定した LR11 遺伝子は、特に平滑筋細胞の遊走能の亢進に必要であり、LR11 遺伝子が欠損することにより遊走能が低下する。内膜平滑筋特異的遺伝子 LR11 は、動脈硬化の進展における平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走と増殖過程に重要であり、LR11 機能を修飾することにより動脈硬化巣を変化させる可能性がある。*Lr11*<sup>-/-</sup>マウス血管平滑筋細胞の解析から、LR11 はウロキナーゼ受容体/インテ

グリンを介したとりわけAngII刺激での細胞アクチン再構成に重要であり、*Lr11*<sup>-/-</sup>細胞ではこれが障害されることにより遊走能が減弱することが明らかになった。血中可溶性LR11濃度が頸動脈内膜中膜肥厚度と密接に関連し、多変量解析の結果、従来の動脈硬化危険因子とは独立した動脈硬化マーカーとなることが示唆された。以上の結果から、可溶性LR11の血中濃度の測定は動脈硬化症における新規の血管傷害バイオマーカーとして臨床的にあらたな診断および治療学的アプローチとなると考えられる。さらに、LR11遺伝子多型がアルツハイマー病の発症と密接に関連することを明らかになったことから、今後、血中可溶性LR11濃度の正確なアッセイ系を確立することが急務と考えられる。

#### 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3件)

(1) Jiang M, Bujo H, Ohwaki K, Unoki H, Yamazaki H, Kanaki T, Shibasaki M, Azuma K, Harigaya K, Schneider WJ, Saito Y. AngII - stimulated migration of vascular SMC is dependent on LR11. J. Clin. Invest. 2008;118, :2733-2746. (査読有)

(2) Ohwaki K, Bujo H, Jiang M, Yamazaki H, Schneider WJ, Saito Y. A secreted soluble form of LR11, specifically expressed in intimal smooth muscle cells, accelerates formation of lipid-laden macrophages. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007;27:1050-1056. (査読有)

(3) Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Sjobata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni

A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Prtersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St. George-Hyslop P. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. Nat. Genet. 2007;39: 168-177.  
(査読有)

#### 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

無し

##### (3) 連携研究者

無し