

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790538

研究課題名（和文）酸化 LDL による血管内皮機能不全の分子機構解明に関する研究

研究課題名（英文）Role of LOX-1-MT1-MMP axis in oxidized LDL-triggered endothelial dysfunction

研究代表者

杉本 浩一 (SUGIMOTO KOICHI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30404867

研究成果の概要（和文）：酸化 LDL による血管内皮機能不全において酸化 LDL 受容体 LOX-1 と膜型 1 マトリックスメタロプロテアーゼ(MT1-MMP)は細胞膜上で一部会合しており、内皮機能不全において重要な分子である RhoA、Rac1 の活性および一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現や NADPH oxidase 由来活性酸素種の産生を制御していることを初めて証明し、Cardiovascular Research に掲載された。

研究成果の概要（英文）：We provided a new evidence that LOX-1, which is a receptor for oxidized LDL, forms a complex with MT1-MMP and regulates RhoA and Rac1 activation as well as eNOS and NADPH oxidase activation and ROS generation induced by oxidized LDL in endothelial cells. These results were published in *Cardiovascular Research*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞における一酸化窒素 (NO) 産生低下と活性酸素種 (ROS) 産生亢進を含む内皮機能不全は、動脈硬化の発症；進展に重要な役割を果たしている。(Ross R. Nature. 1993;362:801-809)。我々はこれまでにアデノウイルスを用いて RhoA および Rac1 のドミナントネガティブ遺伝子を導入し、酸化 LDL による eNOS 発現低下と ROS 産生亢進に与える影響を検討したところ、いずれもほぼ阻止

される結果を得、酸化 LDL による内皮機能不全において RhoA と Rac1 の活性化は重要な役割を果たしていることが示された。

Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) は 1997 年に沢村らによりクローニングされた酸化 LDL の主要な受容体であるが (Sawamura T, et al. Nature. 1997;386:73-77)、酸化 LDL による RhoA・Rac1 活性化が LOX-1 を介するか否かは不明であった。我々は LOX-1 特異抗体である TS92 を用

いて LOX-1 を阻害することにより、酸化 LDL による RhoA と Rac1 の活性化が抑制されることを明らかにした。以上から、酸化 LDL による RhoA と Rac1 の活性化には LOX-1 を介する。シグナル系が重要であると考えられた。

さらに、この酸化 LDL/LOX-1/RhoA・Rac1 活性化はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 阻害により著明に抑制されることが判明し、small interfering RNA (siRNA) を用いた実験より、MMPs の中でも特に membrane type 1 MMP (MT1-MMP) が重要であることを示唆するデータを得た。最近、MT1-MMP は蛋白分解酵素としての役割の他に、シグナル分子としても機能することが明らかとなってきた。さらに MT1-MMP は PDGF 受容体  $\beta$  と会合体を形成することも報告されており (Lehti K, et al. Gene Dev. 2005;19:979-91)、その重要性が認識されつつある。しかし、酸化 LDL 受容体と MT1-MMP との関連、およびそのシグナル伝達についての研究はこれまでほとんどなかった。我々は酸化 LDL 刺激血管内皮細胞を用いて初めて LOX-1 と MT1-MMP との関連について検討し、その成果は 2006 年の AHA にて報告した (Circulation 2006; 114 (18-Suppl): II-316)。以上の経緯により、酸化 LDL と LOX-1 の結合から RhoA および Rac1 活性化に至る詳細なメカニズムと MT1-MMP の関与について研究を進めている。

## 2. 研究の目的

- (1) ヒト血管内皮細胞において、酸化 LDL による RhoA・Rac1 活性化が LOX-1 を介するシグナルであることを確立する。
- (2) 培養血管内皮細胞、さらにウサギ高脂血症動脈硬化モデルおよびヒトの血管においても LOX-1 と MT1-MMP の局在部位を検討する。
- (3) 酸化 LDL 刺激による RhoA および Rac1 活性化において、および三量体 G 蛋白の一つである Gi の関与について明らかにする。
- (4) 酸化 LDL 刺激による MT1-MMP の活性化、MT1-MMP の阻害による RhoA・Rac1 の活性化への影響を明らかにする。
- (5) 酸化 LDL による RhoA 依存性 eNOS 発現低下、Rac1 依存性 ROS 産生 および NO の bioavailability における LOX-1 と MT1-MMP の役割を明らかにする。
- (6) MT1-MMP 阻害による eNOS の発現調整について transcriptional および post transcriptional level で検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) LOX-1 の特異的阻害抗体である JS92 および LOX-1 に対する siRNA を導入し、酸化 LDL による RhoA、Rac1 の活性を測定する。
- (2) LOX-1 と MT1-MMP の局在、会合について蛍光免疫染色、免疫沈降法により明らかに

する。

- (3) Gi の阻害薬である Pertussis toxin (PTX) を前投与した血管内皮細胞を用いて酸化 LDL による RhoA、Rac1 の活性を測定する。
- (4) 酸化 LDL による MT1-MMP の活性化を蛍光学的アッセイ法により測定し、また、siRNA の導入により MT1-MMP の発現を抑制した血管内皮細胞を用いて、酸化 LDL による RhoA・Rac1 の活性化を測定する。
- (5) 血管内皮細胞の MT1-MMP、LOX-1 を siRNA または特異抗体にて阻害し、酸化 LDL 刺激後の eNOS 蛋白発現および ROS 産生を Western blott、蛍光色素 (H2DCF-DA) により測定する。
- (6) siRNA により MT1-MMP の発現を抑制した血管内皮細胞の eNOS promoter 活性を Luciferase assay により測定する。

## 4. 研究成果

以下の 1~6 を平成 20 年度までに明らかにしており、平成 21 年度はその追試を行った。

- (1) ヒト血管内皮細胞において、酸化 LDL は酸化 LDL 受容体 LOX-1 を介して低分子 GTP 結合蛋白質 RhoA・Rac1 を数分内に活性化する。
- (2) LOX-1 と MT1-MMP は血管内皮細胞膜および細胞質内で一部局在が一致していることが蛍光免疫染色より確認され、免疫沈降法により LOX-1 と MT1-MMP が直接会合している。
- (3) Gi の阻害剤である pertussis toxin にて酸化 LDL による RhoA・Rac1 の活性化は抑制されることが示され、LOX-1/MT1-MMP から RhoA/Rac1 活性化のシグナルに Gi が関与する。
- (4) siRNA の導入により MT1-MMP の発現を抑制した血管内皮細胞では、酸化 LDL による RhoA・Rac1 の活性化が抑制され、LOX-1/Gi を介する RhoA と Rac1 の活性化には MT1-MMP が重要と考えられた。
- (5) LOX-1 阻害および MT1-MMP 阻害により酸化 LDL による RhoA 依存性 eNOS 発現低下および Rac1 依存性 ROS 産生は抑制された。
- (6) eNOS のプロモーター解析により MT1-MMP 阻害による eNOS の発現調節は、post transcriptional レベルで起きている。

## 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 1 件)

1. Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Inoue N, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Sakamoto T, Sakamoto N, Okamoto Y, Takuwa Y, Kakino A, Fujita

Y, Tanaka T, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y. LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells. Cardiovasc Res. 2009 ;84(1):127-136 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. K. Sugimoto, T. Ishibashi, T. Sawamura, H. Uekita, H. Ohkawara, N. Inoue, Y. Takuwa, M. Shiomi, T. Teramoto, Y. Takeishi. MT1-MMP forms a complex with LOX-1 and plays a crucial role in oxidized LDL-induced endothelial dysfunction via RhoA/Rac1 activation. (第74回 日本循環器学会学術集会 2010.3.7京都)
2. 杉本 浩一、石橋敏幸、沢村達也、上北洋徳、上岡正志、井上信孝、坂本信雄、大河原 浩、多久和 陽、寺本民夫、塩見雅志、竹石恭知 RhoA・Rac1活性化を介する酸化LDLによる血管内皮細胞機能不全の新しい分子機序：MT1-MMPの関与 (日本心臓血管作動物質学会 2010.2.5名古屋)
3. 杉本 浩一、石橋敏幸、竹石恭知 酸化LDLによる血管内皮機能不全におけるLOX-1/MT1-MMP系の役割 (第1回 Advance 研究会 2009.12.26名古屋)
4. K. Sugimoto, T. Ishibashi, T. Sawamura, H. Uekita, M. Kamioka, N. Inoue, M. Shiomi, Y. Takuwa, T. Teramoto, Y. Takeishi. Cooperation of MT1-MMP and LOX-1 for RhoA- and Rac1-dependent signaling pathways in oxidized LDL-mediated endothelial dysfunction. (Scientific Sessions of American Heart Association, 2009.11.14, オランダ)
5. Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Inoue N, Takuwa Y, Teramoto T, Takeishi Y. Membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a cell surface modifier of RhoA/Rac1-mediated signaling pathways and forms a complex with LOX-1 in oxidized LDL-induced endothelial dysfunction. (European Society of Cardiology Congress 2009, 2009.8.29, バルセロナ)
6. Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Uekita H, Takuwa Y, Teramoto T, Shiomi M, Takeishi Y. New insights of LOX-1-MT1-MMP Axis into RhoA and Rac1 Activation Induced by Oxidized Low-Density Lipoprotein in Endothelial Cells. (Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009, American Heart Association, 2009.7.20, ヘンダーソン)
7. K. Sugimoto, T. Ishibashi, N. Inoue, Y. Takuwa, T. Teramoto, Y. Takeishi. Silencing of MT1-MMP Blocks Ox-LDL-Induced Rac1/NADPH Oxidase Activity and Reactive Oxygen Species (ROS) Generation. (第41回 日本動脈硬化学会学術総会 2009.7.17 下関)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

杉本 浩一 (SUGIMOTO KOICHI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30404867

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

