

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790259

研究課題名（和文）CRP と LOX-1 による血管機能病的変化誘導に関する研究

研究課題名（英文）Mechanism of vascular dysfunction induced by the interaction of CRP and LOX-1

研究代表者 藤田 佳子 (FUJITA YOSHIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・血管生理学部・研究員

研究者番号：30416218

研究成果の概要：酸化 LDL の内皮細胞受容体 lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) と C-reactive protein (CRP) の相互作用によって、補体カスケードの古典経路が活性化されることが明らかとなった。虚血性心疾患危険因子である酸化 LDL の受容体として見出された LOX-1 が、やはり独立した危険因子である CRP の生理活性発現に強く関わっていることが *in vitro*、*in vivo* の実験で明らかとなった。また、CRP は LOX-1 だけでなく、マクロファージに多く存在し、LOX-1 と同じスカベンジャー受容体に属する SR-AII とも相互作用する可能性が示唆された。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：基礎医学

キーワード：心血管・血液

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会へと加速する日本の社会で、3 大疾患のうち、心筋梗塞と脳卒中の原因となる基礎病態である動脈硬化抑制の意義はますます高まっている。動脈硬化の病態では、形態的变化の現れる前に、最初に血管の機能的な不全、特に血管内皮細胞機能障害が起きることが重要と考えられ、*endothelial dysfunction* という言葉で表現されている。*endothelial dysfunction* は様々な因子により誘導されると考えられるが、特に高脂血症下では LDL コレステロールが酸化された、酸化 LDL の役割が示唆されてきた。我々の研究室

では、酸化 LDL の内皮細胞の受容体である LOX-1 の発見以来、一貫して研究を進め、LOX-1 の *endothelial dysfunction* への関与を明らかにしてきた。その中で、LOX-1 が動脈硬化危険因子により発現誘導されることや、細胞接着分子として機能し、炎症促進に働くことがわかってきた。LOX-1 遺伝子ノックアウトマウスでは、酸化 LDL による内皮依存性弛緩障害が生じず、動脈硬化も軽減されることを明らかにしている。

一方最近、炎症下で急激な血中濃度の増加を示し、炎症マーカーとして古くから使用されてきた CRP が、通常炎症とは判定されな

い非常に低いレベルでの血中濃度の上昇でも、虚血性心疾患の危険度を高めることが明らかになっている。さらに、CRPが単なるマーカーではなく、機能分子として内皮細胞に作用し、endothelial dysfunctionを導く可能性が示されている。

我々は、CRPがLOX-1に直接結合し、血管透過性を亢進することを近年報告した。これにより、これまで他のグループにより観察されていた、CRPによるendothelial dysfunctionの誘導が、酸化LDLの場合と同じくLOX-1を介している可能性が出てきた。また、CRPによる補体系活性化をLOX-1が促進する可能性も考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

これまでに、虚血性心疾患の新しい危険因子であるCRPと、やはり危険因子である酸化LDLが、同じ受容体LOX-1に結合することが明らかになった。本研究では、LOX-1を介してCRPが起こす現象を明らかにすることを目的とした。それは、LOX-1がこれらの危険因子との結合を通じて、どのように心血管病の発症・進展に関わっているのかの解明につながる。

また、構造上は全く異なるが、酸化LDLが結合するスカベンジャー受容体ファミリーについても、CRPと相互作用をする可能性があるかどうかについても検証した。

3. 研究の方法

(1) CRPとLOX-1の補体系活性化について、in vitroではドキシサイクリン誘導型LOX-1発現細胞、ELISAプレートに固相化した組換えLOX-1蛋白を用いて行った。CRPによる補体系活性化は、補体系活性化によって生じるC3dを免疫組織化学によって検出した。

(2) in vivoでは、LOX-1発現が亢進している脳卒中易発性高血圧ラット(Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, SHR-SP)を用いて実験を行った。SHR-SPにCRPを皮内注射し、血管透過性亢進の起こったCRP注射部位の皮膚で免疫組織化学を行い、解析した。白血球はミエロペロキシダーゼに対する抗体、補体系活性化はC3dに対する抗体を用いて検出した。

(3) LOX-1以外のスカベンジャー受容体とCRPの相互作用については、scavenger receptor class A type II (SR-AII)、CD36、scavenger receptor class B type I (SR-BI)、CD68について調べた。コントロールとしてスカベンジャー受容体ではないdectin-1受容体を使用した。LOX-1も含めた各受容体のプラスミドをpcDNA6.2/V5/GW/D-TOPO expression vectorにサブクローニングを行い用意し、トランスフェクション試薬を用いてCOS-7細胞に

一過性で発現させて実験に用いた。そして、蛍光標識したCRPの取り込み能が各受容体にあるかどうかを調べた。

また、phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA)刺激を行ったヒト単球様細胞株THP-1を用い、SR-AIIを発現したマクロファージ様細胞として用いた。THP-1細胞に取り込まれた蛍光標識CRPを観察し、SR-AIIに対するsiRNAの影響をみた。

細胞実験は96wellプレートに調整して行った。補体系活性化の免疫組織化学、蛍光標識CRPの取り込み後、PBS(-)で細胞の洗浄、ホルマリン固定、DAPIによる核染色を行い、IN Cell 1000 Analyzerを用いて各wellについて蛍光顕微鏡での撮影、解析を行った。1視野あたりのC3d蛍光強度、CRP蛍光強度を数値化し、核数で割ることによって細胞あたりの補体系活性化、CRPの取り込み量を算出した。

4. 研究成果

(1) LOX-1発現CHO細胞では対照のWt-CHO細胞と比較し有意に補体系活性化がみられた。固相化した組換えLOX-1蛋白においても、補体系活性化がみられ対照の固相化BSAでは補体系活性化はみられなかった(図1-A)。また、LOX-1-CRPによる補体系活性化は、C1q欠損血清を用いた場合にはみられないため、古典経路を介していることがわかった。C1q欠損血清を用いた補体系活性化は、C1q、CRP単独の添加ではみられず、C1qとCRPを同時に添加したときのみみられた(図1-B)。

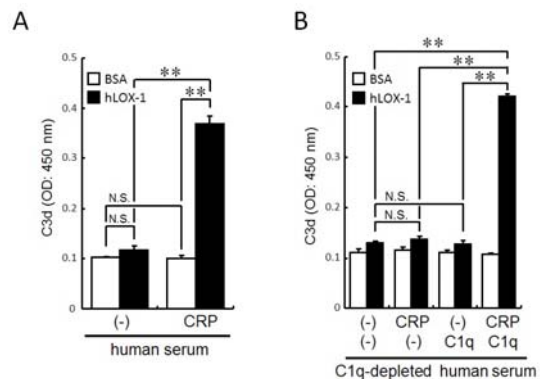


図1 CRP-LOX-1による補体系活性化

CRPの働きとして以前から知られていた、補体系カスケードの古典経路活性化にLOX-1が関与していることが明らかとなった。

(2) SHR-SPラットのCRP注射部位の皮膚組織では、補体系活性化、白血球の浸潤が観察された。補体系活性化によって産生されるC5a、C3aなどのアナフィラトキシンは、血管壁に作用し、血管透過性を亢進させ、マク

ロファージ、好中球、リンパ球などの血管外遊走を引き起こすことが知られている。また、LOX-1 発現の亢進している SHR-SP ラットは、コントロール WKY ラットと比較して血管透過性亢進が強かった。それらのことから、SHR-SP ラットでは CRP と LOX-1 が相互作用し、補体系活性化を引き起こしている可能性が考えられた。補体系活性化、白血球浸潤は CRP 単独、または CRP とコントロール IgG の同時投与でみられ、CRP と抗 LOX-1 抗体の同時投与では抑制されていた。

in vitro で明らかとした CRP と LOX-1 による補体系活性化は、in vivo でも起こっていることがわかった。CRP が LOX-1 を介して血管病変を引き起こしている可能性が示唆された。

(3) スカベンジャー受容体 SR-AII、CD36、SR-BI、CD68、LOX-1 を発現させた COS-7 細胞と蛍光標識 CRP を 37°C でインキュベートし、その取り込み能を観察したところ、LOX-1 だけでなく SR-AII も CRP と相互作用することがわかった(図 2)。

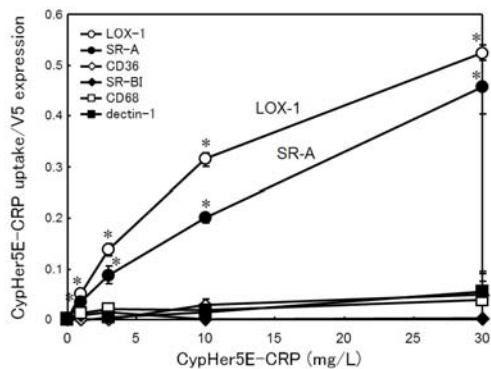


図2 各スカベンジャー受容体への蛍光標識 CRP の取り込み

また、ヒト単球様細胞株 THP-1 を PMA 刺激し、マクロファージ様細胞に分化させた後、蛍光標識 CRP を取りこませた。その取り込みは SR-AII に対する siRNA で抑制された。CRP が、分化したヒト単球様細胞株 THP-1 に発現した SR-AII を介して、細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

CRP は、LOX-1 だけでなく SR-AII を介してマクロファージに取り込まれる可能性が示唆された。CRP は LOX-1 だけでなく、SR-AII も介して心血管病に関わっていることがわかった。

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 9 件)

著者名 : Nishizuka, T., Fujita, Y., Sato, Y., Nakano, A., Kakino, A., Ohshima, S., Kanda, T., Yoshimoto, R., Sawamura, T.

論文標題: Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox

雑誌名: Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci

査読の有無 : 有

巻 : 87(3)

発行年 : 2011

ページ : 104-113

著者名 : Nakano, A., Inoue, N., Sato, Y., Nishimichi, N., Takikawa, K., Fujita, Y., Kakino, A., Otsui, K., Yamaguchi, S., Matsuda, H., Sawamura, T.

論文標題 : LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state

雑誌名 : J Hypertens

査読の有無 : 有

巻 : 28(6)

発行年 : 2010

ページ : 1273-1280

著者名 : Matsumoto, T., Fujita, M., Sawamura, T., Kakino, A., Sato, Y., Fujita, Y., Matsuda, H., Nakanishi, M., Uchida, K., Nakae, I., Kanda, H., Yoshida, A., Miwa, K., Hayashi, H., Mitsunami, K., Horie, M.

論文標題 : Pitavastatin reduces lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 ligands in hypercholesterolemic humans

雑誌名 : Lipids

査読の有無 : 有

巻 : 45(4)

発行年 : 2010

ページ : 329-335

著者名 : Takaya, T., Wada, H., Morimoto, T., Sunagawa, Y., Kawamura, T., Takanabe-Mori, R., Shimatsu, A., Fujita, Y., Sato, Y., Fujita, M., Kimura, T., Sawamura, T., Hasegawa, K.

論文標題 : Left ventricular expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in failing rat hearts

雑誌名 : Circ J

査読の有無 : 有

巻 : 74(4)

発行年 : 2010

ページ : 723-729

著者名 : Inoue, N., Okamura, T., Kokubo, Y., Fujita, Y., Sato, Y., Nakanishi, M., Yanagida, K., Kakino, A., Iwamoto, S., Watanabe, M., Ogura, S., Otsui, K., Matsuda, H., Uchida, K., Yoshimoto, R., Sawamura, T.

論文標題 : LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease

and stroke
雑誌名 : Clin Chem
査読の有無 : 有
巻 : 56(4)
発行年 : 2010
ページ : 550-558

著者名 : Fujita, Y., Kakino, A., Harada-Shiba, M., Sato, Y., Otsui, K., Yoshimoto, R., Sawamura, T.
論文標題 : C-reactive protein uptake by macrophage cell line via class-A scavenger receptor
雑誌名 : Clin Chem
査読の有無 : 有
巻 : 56(3)
発行年 : 2010
ページ : 478-481

著者名 : 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.
論文標題 : LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells
雑誌名 : Cardiovasc Res
査読の有無 : 有
巻 : 84(1)
発行年 : 2009
ページ : 127-136

著者名 : Ogura, S., Kakino, A., Sato, Y., Fujita, Y., Iwamoto, S., Otsui, K., Yoshimoto, R., Sawamura, T.
論文標題 : Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction
雑誌名 : Circ J
査読の有無 : 有
巻 : 73(11)
発行年 : 2009
ページ : 1993-1999

著者名 : Fujita, Y., Sawamura, T.
論文標題 : [Oxidized LDL receptor LOX-1]
雑誌名 : Nippon Yakurigaku Zasshi
査読の有無 : 有
巻 : 133(5)
発行年 : 2009
ページ : 295-296

[学会発表] (計 13 件)

発表者 : 善本亮、西塚太一、藤田佳子、佐藤優子、中野厚史、垣野明美、大嶋俊二、神田智正、沢村達也

発表標題 : プロシアニジンは LOX-1 アンタゴニストであり、血管壁への脂質沈着を抑制する
学会名 : 第 84 回日本薬理学会年会
発表年月日 : 2011 年 3 月 23 日
発表場所 : 誌上開催

発表者 : 岩元真、藤田佳子、垣野明美、柳田一樹、善本亮、沢村達也
発表標題 : 酸化 LDL 測定のための人工標準蛋白作製
学会名 : 第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会年会
発表年月日 : 2010 年 12 月 9 日
発表場所 : 神戸

発表者 : 西塚太一、藤田佳子、佐藤優子、中野厚史、垣野明美、大嶋俊二、神田智正、善本亮、沢村達也
発表標題 : プロシアニジンは酸化 LDL 受容体 LOX-1 のアンタゴニストであり、ラット血管壁への脂質沈着を抑制する
学会名 : 第 20 回日本循環薬理学会
発表年月日 : 2010 年 11 月 11 日
発表場所 : 札幌

発表者 : 藤田佳子、乙井一典、垣野明美、山口三郎、佐藤優子、善本亮、沢村達也
発表標題 : C-REACTIVE PROTEIN BINDS TO LOX-1 AND CAUSES VASCULAR DYSFUNCTION VIA COMPLEMENT ACTIVATION
学会名 : International SHR Symposium
発表年月日 : 2010 年 9 月 25 日
発表場所 : モントリオール

発表者 : 藤田佳子、乙井一典、垣野明美、山口三郎、佐藤優子、善本亮、沢村達也
発表標題 : LOX-1 is involved in the complement activation by endogenous C-reactive protein and myocardial reperfusion injury
学会名 : 15th World Congress on Heart Disease
発表年月日 : 2010 年 7 月 25 日
発表場所 : バンクーバー

発表者 : Okamura, T., Inoue, N., Kokubo, Y., Fujita, Y., Sato, Y., Watanabe, M., Sawamura, T.
発表標題 : The effect of LOX-1 and LOX-1 ligand containing ApoB on the incidence of coronary heart disease and stroke in an 11-year population-based cohort study: The Suita study
学会名 : 第 42 回日本動脈硬化学会
発表年月日 : 2010 年 7 月 16 日
発表場所 : 岐阜

発表者 : 藤田佳子、乙井一典、垣野明美、山口三郎、佐藤優子、善本亮、沢村達也

発表標題: Recognition of endogenous C-reactive protein by LOX-1 abrogates myocardial infarction

学会名: ISHR (World Congress of the International Society for Heart Research)

発表年月日: 2010年5月13日

発表場所: 京都

発表者: 藤田佳子、垣野明美、佐藤優子、善本亮、沢村達也

発表標題: CRPはSR-Aを介してマクロファージに取り込まれる

学会名: 第83回薬理学会年会

発表年月日: 2010年3月16日

発表場所: 大阪国際会議場

発表者: 佐藤優子、藤田佳子、垣野明美、小倉紗世子、岩元真、善本亮、沢村達也

発表標題: HSP90は細胞膜受容体を介して血管新生を促進する

学会名: 第19回日本循環薬理学会

発表年月日: 2009年11月27日

発表場所: 京都

発表者: 藤田佳子、垣野明美、乙井一典、山口三郎、佐藤優子、沢村達也

発表標題: CRPによる心筋梗塞悪化へのLOX-1の関与

学会名: 日本心血管内分泌代謝学会

発表年月日: 2009年10月24日

発表場所: 大宮

発表者: 藤田佳子、垣野明美、乙井一典、山口三郎、佐藤優子、沢村達也

発表標題: CRPはLOX-1依存性に補体系を活性化し、心筋梗塞を悪化させる

学会名: 高血圧関連疾患モデル学会学術総会

発表年月日: 2009年9月4日

発表場所: 東京

発表者: 藤田佳子、垣野明美、乙井一典、山口三郎、佐藤優子、小倉紗世子、岩元真、沢村達也

発表標題: 酸化LDL受容体LOX-1はCRPと協調して血管機能変化・心筋梗塞巣拡大を引き起こす

学会名: 第7回メタボリックシンドローム研究会

発表年月日: 2009年7月18日

発表場所: 京都

発表者: 藤田佳子、垣野明美、乙井一典、西道教尚、山口三郎、松田治男、沢村達也

発表標題: LOX-1 BINDS TO C-REACTIVE PROTEIN AND MEDIATES ITS EFFECTS ON CARDIOVASCULAR SYSTEM

学会名: 国際動脈硬化学会

発表年月日: 2009年6月17日

発表場所: ポストン

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 佳子 (FUJITA YOSHIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

血管生理学部・研究員

研究者番号: 30416218

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし