

論文の内容の要旨

論文題目 低酸素における酸化LDL受容体(lectin-like oxidative LDL receptor-1)の発現変化と役割

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 小倉 彩世子

【背景】

LOX-1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1) は内皮細胞に特異的に存在する酸化LDLのレセプターとしてクローニングされた。LOX-1の発現は定常状態では低いが、さまざまな炎症性サイトカインや血管収縮系のペプチドなどによって発現が亢進することが報告されている。また初期の動脈硬化病変においても発現が増強しており高血圧、糖尿病、高脂血症においても発現の亢進を認めている。現在ではLOX-1と動脈硬化性疾患とのかかわりが注目されている。低酸素は血管に対してHIF-1などの発現を亢進させVEGEGFなどが亢進し血管新生が行われる。一方、長期の低酸素状態は血管リモデリングを引き起こすことが知られており、この原因のひとつとして酸化ストレスの増加が考えられている。最近では睡眠時無呼吸症候群が動脈硬化のリスクを増加させることなど、低酸素と動脈硬化の関わりも注目されている。今回の研究では、低酸素における血管障害におけるLOX-1の関わりと酸化ストレスの役割について検討を行った。

【方法】

- 1) 低酸素負荷：野生型 (C57/BL6) の雄 6-8 週令を閉鎖されたチャンバーにて飼育した。チャンバーには低酸素ガス (O₂ 10%, N₂ 90%) を 300ml/min で継続的に流し、飲水・餌は自由に摂取できるようにした。床じき・餌・水は 2 日に一度チャンバーをあけて 10 分ほどで交換をおこなった。
- 2) 遺伝子発現量の測定：組織より総RNAを ISOGEN(日本ジーン製)を用いて抽出し、cDNA 合成キット (Invitrogen 製) を用いて cDNA を合成した。LOX-1 は PCR 40cycle, 特異的プライマーをもちいて mRNA 発現量を測定した。
- 3) 蛋白量測定：肺組織より蛋白を抽出し、SDS pageにより Western-blotting を行った。国立循環器病センターの澤村先生よりご提供いただいたRat-anti mouse

LOX-1抗体 (JTX-20) を用い、ビオチン化した二次抗体をもちいてHRP 標識ストレプトアビジンを加えてECL化学発光にて検出した。

4) 酸化 LDL 取り込み : Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)をラベルした oxLDL (INTRACEL 製) をあらかじめチャンバースライド上で培養した肺微小血管内皮細胞に 80 μ l/ml 添加し、4 時間 37 度でインキュベート、その後 P B S で wash し 4%ホルマリンで固定したのち、蛍光顕微鏡で観察した。

5) 活性酸素の測定 : ルシジェニン化学発光法を用いて、組織の活性酸素の測定を行った。組織はホモジナイズし、重量によって補正をおこない、器質である NADPH を 100 μ l/L を負荷して NADPH の活性化を測定した。

6) 抗酸化剤投与 : NADPH oxidase inhibitor である Apocynin(4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone) を飲水にて低酸素負荷マウスに投与した。

7) LOX-1 トランスジェニックマウス・ノックアウトマウスを野生型マウスと同様に低酸素チャンバーにて飼育し、28 日まで観察した。

8) 組織化学染色 4%ホルマリンPBSで固定した切片8 μ mに対しヘマトキシリン・エオジン染色を行い、血管のリモデリングを%MT(media thickness x 2/external diameter x100)にて測定した。また酸化ストレスのマーカーである 3-Nitrotyrosinを用いて、組織切片で蛍光免疫染色をおこなった。

9) NADPHoxidase 活性化の機序のひとつとして考えられている、small G 蛋白 Rac1 の膜への移行を調べるため、免疫沈降を用いて NADPH の膜サブユニットである p47phox との Rac1 の interaction を検討した。

10) 統計解析 統計処理は ANOVA を用いた。すべての値は平均値 SD で表し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

【結果】

1) 低酸素による LOX-1 発現の変化

低酸素負荷により、組織での LOX-1 の蛋白レベル・mRNA レベルでの発現の増加を認めた。(P<0.05)また培養肺微小血管内皮細胞において COCl₂ の 24 時間負荷後、Dil でラベルした酸化LDLを加え、内皮細胞への酸化LDLのとりこみにおいては酸化LDLの濃度は一定であるにもかかわらず、COCl₂ 後では酸化LDLの取り込みが上昇を認めた。

2) 低酸素による酸化ストレス

低酸素負荷による活性酸素種は増大し、NADPH の活性化においても有意に低酸素によって増加を認めた(P<0.001)。これにより低酸素では血管における NADPH oxidase の活性化が酸化ストレスを増大させるひとつの原因であると

考えられた。

3) 抗酸化剤投与による効果

NADPH oxidase inhibitor である Apocynin の投与によって低酸素による活性酸素の産生は抑制された。また低酸素によって発現が亢進した LOX-1 も抑制を認めた。活性酸素の除去はリモデリングの抑制および LOX-1 発現の抑制に有効であると考えられた。

4) LOX-1 トランスジェニックマウス・ノックアウトマウスでの検討

LOX-1 トランスジェニックマウス (Tg) は野生型マウス (WT) に比べ早期より死亡率の増加をみとめ ($p < 0.001$) また組織の障害は野生型に比べて強く、肺血管のリモデリングの増強が認められた ($P < 0.05$)。一方KOマウスでは死亡率がWTマウスとくらべ改善を認めた。低酸素による酸化ストレスはKOマウスはWTマウスと比べて低く、酸化ストレスの増大が、動脈硬化の増悪を惹き起こしていることが考えられた。

5) LOX-1 と Rac1, NADPH 活性化のかかわり

LOX-1 の発現の変化における低酸素での酸化ストレスの変化として、NADPH oxidase の活性化の差が認められた。そこで NADPH oxidase 活性化を small G 蛋白 Rac1 の膜への移行を NADPH の膜サブユニットである p47phox との Rac1 の免疫沈降を用いて検討した。低酸素後の Tg マウスでは Rac1 と p47phox の interaction を強く認め、一方KOマウスではこの interaction は抑制されていた。このことから、LOX-1 は Rac1 の膜への移行を亢進させ、NADPH oxidase を活性化すると考えられた。

【結論】

低酸素は酸化ストレスの増大が知られているが、そのメカニズムは不明なことが多い。今回の検討から、LOX-1 は低酸素状態によって発現が亢進し、低酸素における酸化ストレスの増加のひとつとして LOX-1 による NADPH oxidase 活性化の関与が示唆された。また LOX-1 トランスジェニックマウス・ノックアウトマウスの検討から、低酸素において LOX-1 の発現は血管リモデリング・酸化ストレスと密接に関連しており、低酸素における NADPH oxidase の活性は LOX-1 のシグナルによって Rac1 が膜へ移行するによって惹き起こされることが示唆された。