

審査の結果の要旨

氏名 岡 幸 蔵

虚血性心疾患や脳血管障害の原因となる動脈硬化の発症および進展には様々な危険因子が関与する知見が蓄積されつつあり、中でも酸化変性を受けた低密度リポ蛋白(酸化 LDL)がマクロファージの泡沫化を引き起こすことが明らかとなつて以来、その病態形成への寄与を示唆する知見が相次いでいる。すなわち、酸化 LDL はマクロファージや血管内皮細胞に作用して、①炎症性サイトカインの産生を促進するなど炎症性の応答を惹起する、②走化性因子の産生および細胞接着因子の発現を促進し、単球やリンパ球の血管内膜への浸潤を促進する、③NO 合成酵素を阻害するなどにより内皮依存的な血管弛緩反応を減弱させる、④血液凝固因子の発現増強などによって易血栓性状態を形成する、といった動脈硬化の発症初期から進展段階、さらには虚血性心疾患発症に至る全ての段階で重要な役割を果たしていると考えられている。

このような酸化 LDL の作用を仲介する受容体として一連のスカベンジャー受容体が同定されている。中でも 1997 年に Sawamura らによって報告された LOX-1(lectin-like oxidized LDL receptor-1)は血管内皮細胞における主要な酸化 LDL 受容体として初めて同定された分子である。他のスカベンジャー受容体と同様に、LOX-1 はフコイダンや Poly[I]といった酸性高分子を結合することが明らかとなったが、生体内における実際の生理的な、あるいは病態におけるリガンドについての詳細は明らかになっていなかった。これら生体内におけるリガンドを探索し、その性質を明らかにすることは、病態における LOX-1/LOX-1 リガンドシステムの役割を明らかにすると共に動脈硬化の病態についての理解を深めることになり、ひいては治療薬や処置法の開発につながると思われる。

このような観点から、1.正常な状態でのリガンドを探索することで、LOX-1 の生理的な役割を明らかにする、2.高脂血症モデル動物における LOX-1 のリガンド(酸化 LDL)のレベルと動脈硬化との関連を探る、という 2 点について検討を進めた。

1. LOX-1 を介するアポトーシス細胞の貪食機構

まず正常な状態での生体内リガンドの探索を進めた。その中で、ウシ LOX-1 を強制発現させた CHO-K1 細胞(BLOX-1-CHO)が老化した赤血球(aged RBC)やアポトーシスをおこした細胞(アポトーシス細胞)を結合し、貪食する機能を有することを見出した。そこで、LOX-1 を発現しているウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)について検討したところ、BLOX-1-CHO と同様に aged RBC やアポトーシス細胞の結合と貪食が観察された。この結果から、LOX-1 が生理的にこのような機能を担っている可能性が示唆された。

アポトーシスの生理的意義の一つは、死細胞が細胞傷害性の内容物を漏出する前に、速やかに隣接細胞等の貪食細胞に貪食除去されることにある。しかし、本研究を開始した時点では、これを

担う分子など詳細な機構はあまり明らかになっていなかった。そこで本研究では、血管内皮細胞による aged RBC やアポトーシス細胞の貧食における LOX-1 の寄与について、またその認識機構について詳細に検討した結果、以下の知見が得られた。

- 1) BLOX-1-CHO あるいは BAEC による aged RBC やアポトーシス細胞の結合および貧食は、酸化 LDL によって競合阻害された。さらに LOX-1 の既知の各種リガンドによっても阻害された。
- 2) 抗 LOX-1 抗体および可溶性 LOX-1 (LOX-1 の細胞外ドメインにヒト IgG Fc 領域を結合させた蛋白、LOX-Fc) が BAEC に対する aged RBC およびアポトーシス細胞の結合を阻害した。
- 3) LOX-Fc を用いた細胞染色により、LOX-1 のリガンドは aging あるいはアポトーシスに伴って細胞膜表面に発現することが示された。
- 4) 赤血球の老化やアポトーシスの際には、通常細胞膜リン脂質 2 重層の細胞内側に局在しているフォスファチジルセリン(PS)が細胞外側へ表出することが知られている。そこで aged RBC を用いて PS 表出と BLOX-1-CHO への結合の経時的変化を調べたところ、両者はよく一致した。また PS 含有リボソームが LOX-1 による aged RBC、アポトーシス細胞の認識を阻害した。

以上のことから、BAEC は LOX-1 を介して老化細胞およびアポトーシス細胞上に表出した PS を認識することにより、これら細胞を貧食することが明らかとなった。

2. 高脂血症における血中 LOX-1-ligand(酸化 LDL)レベルと動脈硬化の進行～抗酸化薬の作用

酸化 LDL が動脈硬化の発症及び進行に中心的な役割を果たしていることを示唆する報告が相次いでいるが、病態における酸化 LDL のレベルを実際に測定して動脈硬化との関連を調べた報告はあまりなく、両者の関係が不明であった。酸化 LDL は様々な酸化的ストレスにより血管内皮下で生成すると考えられているが、循環血中にも存在していることが示唆されている。そこで本研究では、LOX-1 をツールとして開発された新規アッセイ系を改変して、家族性高コレステロール血症モデルである WHHL ウサギにおける血漿中酸化 LDL レベルを定量し、動脈硬化の進展との関連について検討した。また抗酸化薬であるプロブコール(PC)およびビタミン E(VtE)、ならびに抗酸化作用を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬フルバスタチン(FV)の作用を検討した。

血漿中酸化 LDL レベルは、LOX-Fc と抗ウサギ Apo B 抗体を用いたサンドウィッチ ELISA に類似の方法によって、LOX-1-ligand として測定した。2 ヶ月齢の WHHL ウサギに PC(1%)、VtE(0.5%)および FV(0.03%)を連日混餌投与し、6 ヶ月後に動脈硬化の評価を行った。その結果、WHHL ウサギでは LOX-1-ligand レベルは 2 ヶ月齢において正常対照(日本白色種)の 5 倍以上の高値を示し、この高値は試験終了時まで持続した。PC および VtE は投与 1 ヶ月目よりこの LOX-1-ligand レベルを低下させたが、総コレステロール値への影響はほとんどなかった。FV は LOX-1-ligand レベルおよび総コレステロール値をどちらも低下させたが、その程度は LOX-1-ligand レベルにおいて顕著であった。全ての薬物投与群において 6 ヶ月後の大動脈弓部における動脈硬化の進展は有意に抑制された。

以上の成績より、血漿中酸化 LDL レベルは動脈硬化形成の初期から上昇しており、病態進行に重要な役割を果たす事が示唆された。また酸化 LDL の生成抑制作用を有する薬剤により、動脈硬

化の発症及び進展を抑制することができる可能性が示唆された。特に FV はコレステロール低下作用に加え、酸化 LDL 生成抑制作用を併せ持つことから、より有効な治療手段となる可能性が示唆された。さらに血漿中 LOX-1-ligand は、虚血性心疾患の診断マーカーとしても有用である可能性が示唆された。

LOX-1 は血管内皮細胞における主要な酸化 LDL 受容体として機能している。上記 1 の成績から、LOX-1 の生理的なリガンドの一つが老化細胞およびアポトーシス細胞であることが明らかとなった。このような細胞上に表出した PS は血液凝固反応を促進することが報告されているが、PS の表出は血小板の活性化に伴って生じること、およびこの PS が血液凝固反応の場となっていることは良く知られている。したがってこれら PS を表出した細胞を取り除くことは血栓を予防する上で重要であると考えられる。血管内皮細胞はトロンボモジュリンの発現やプロスタサイクリンの分泌、NO の産生等、正常な状態では抗血栓性を維持する働きをしていることから、LOX-1 は血栓形成に促進的に働く老化細胞/アポトーシス細胞や、更には(後の研究で明らかとなった)活性化血小板の貧食を仲介することによって、生理的には血管内皮細胞の抗血栓的機能の一部を担っている可能性が示唆された。

一方、酸化 LDL がこの貪食機能を阻害することは、高脂血症あるいは動脈硬化症における易血栓性の成因を精査する上で興味深い対象であると考えられた。実際に上記 2 の成績から、高脂血症においては血中に LOX-1 のリガンドとなる酸化 LDL が病態形成過程のごく初期から上昇していることが明らかとなった。このことから、LOX-1 が本来有している抗血栓的機能を破綻させることが、酸化 LDL が血栓性イベントの発症頻度を高める機序の一つとして考えられた。

以上の研究から、LOX-1/LOX-1 リガンドシステムが動脈硬化の前病変段階から進行病変に至る各過程において、血管内皮細胞がうける種々の機能障害に重要な役割を果たしていることが示唆される。LOX-1 あるいはそのリガンドの機能的もしくは量的な修飾(特に LDL の酸化変性の抑制)をもたらすことにより、動脈硬化や虚血性心疾患の発症予防あるいは治療法のあらたな手掛かりが得られる可能性が期待される。このように、本研究は動脈硬化における酸化 LDL 受容体とそのリガンドの役割を明らかにしただけでなく、治療薬や予防薬の開発に新たな知見を与えるものであり、博士(薬学)の学位授与に値すると判断した。