

学位論文要約
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 964 号

氏 名: 白 木 仁
Full Name Takeru Shiraki

学位論文題目: LOX-1 は下肢の虚血が引き起こす血管新生に重要な役割を果たす
Thesis Title LOX-1 plays an important role in ischemia-induced angiogenesis of limbs

学位論文要約:
Summary of Thesis

酸化 LDL (oxidized low-density lipoprotein: Ox-LDL) の受容体である LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1) は 1 回膜貫通の受容体で、短い N 末端の細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、ネックドメイン、細胞外の C 型レクチン様ドメインから成る II 型膜蛋白質である。LOX-1 は当初、内皮特異的なスカベンジャー受容体として発見され、その後、マクロファージ、平滑筋細胞などにも発現が確認された。早期のアテローム硬化病変において、LOX-1 は内皮機能障害やアテローム硬化症の発症・増悪に関係しているが、(1) 酸化 LDL は LOX-1 を介して VEGF (vascular endothelial growth factor) の発現や放出を有意に増加させる。(2) LOX-1 は白血球の接着因子である。(3) 血管内皮細胞で VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) や ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) の発現は Wild Type マウス (WT) と比較し、LOX-1 TG/ApoE (Apolipoprotein E) ノックアウトマウスにおいて有意に増加している。以上の事が報告されており、活性化された LOX-1 は心血管疾患において様々な役割を持っていると考えられている。

LOX-1 は酸化ストレスの発生や心臓虚血後の炎症に関係しており、虚血組織でも活性化される。虚血における炎症は、血管新生のために必要不可欠であり、LOX-1 は虚血後の血管新生に重要な役割を果たしているかもしれない。現在、虚血組織における LOX-1 の役割を証明した報告はほとんど無いため、本研究において LOX-1 ノックアウトマウス (KO) を使用し、LOX-1 の下肢虚血における血管新生での役割を調べた。

【対象と方法】

12 週齢の雄のマウスを使用した (n=25)。右下肢の鼠径靭帯直下に小切開を入れ、大腿部の血管系を露出させ、大腿動脈を 2 ヶ所で結紮し、中央を切断した。術前と術後 3, 7, 14, 21, 28 日の虚血下肢 (右) / 非虚血下肢 (左) の血流比を Laser Doppler Blood Flowmetry (LDBF) にて測定比較した。術後 3 日の下肢虚血部位の腓腹筋を採取し、抗マウス VEGF 抗体と抗マウスマクロファージ抗体 (F4/80) で蛍光二重染色を施行し、定量を行った。術後 7 日の下肢の虚血部位の腓腹筋を採取し、Western blot にて VEGF, Akt, phospho-(p)Akt, eNOS (endothelial nitric oxide synthase), (p)eNOS, NF- κ B (nuclear factor-kappa B), (p)NF- κ B, p38-MAPK (p38-mitogen-activated protein kinase), (p)p38-MAPK, ERK (extracellular signal regulated kinase), (p)ERK, SAPK (stress-activated protein kinase), (p)SAPK, Actin, LOX-1, HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), Nox2 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2), VCAM-1 の定量を施行し、活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) の測定を行った。術後 14 日の下肢の虚血部位の腓腹筋を採取し、CD (capillary density: CD31 抗体陽性毛細血管) と AD (arteriole density: α -SMA 抗体陽性小動脈) を測定し比較した。

【結果】

LDBF による下肢血流の測定では、術前の血流比は WT と KO の間で有意差は無かった。術後 3 日では WT と KO の両者で術前と比較し、有意に低下しており (p<0.01), WT と KO 間に有意差は無かった。術後 7 日から 28

日では KO で有意に低下していた ($p < 0.01$)。VEGF とマクロファージ (F4/80) の蛍光二重染色では VEGF を産生しているマクロファージ数は KO で有意に少なかった (20 視野, $p < 0.01$)。術後 7 日での VEGF の発現量は KO で有意に低下していたが ($n=4$, $p < 0.01$), VEGFR2 (VEGF receptor-2) の発現量に有意差は無かった。Nox2, HIF-1 α の発現量は KO で有意に低下していた ($n=4$, $p < 0.01$)。 (p)p38-MAPK, (p)NF- κ B, VCAM-1 の発現量は KO で有意に低下していた ($n=4$, $p < 0.01$)。Akt, eNOS の発現量に関して, WT と KO の間で有意な違いはなかったが, (p)Akt, (p)eNOS の発現量は KO で有意に低下していた ($n=4$, $p < 0.01$)。 (p)ERK, ERK, (p)SAPK, SAPK の発現量に関しては, WT と KO の間で有意な違いは無かった ($n=4$)。WT において LOX-1 の発現量は非虚血下肢と比較し, 虚血下肢で有意に増加していた ($n=4$, $p < 0.05$)。術後 14 日の下肢の虚血部位の腓腹筋の CD と AD の定量評価では, KO で有意に減少していた (20 視野, $p < 0.01$)。

【考察】

WT の虚血下肢において LOX-1 の発現は増加するが, LOX-1 を欠失している KO では LOX-1 の生理学的役割が失われ, 血流回復が有意に抑制されたと考えられた。この結果は LOX-1 が下肢虚血での血流の回復に重要である事を示唆した。また KO の虚血下肢における CD と AD が有意に減少しており, LOX-1 の欠失により下肢虚血後の血管新生の抑制が生じる事が明らかになった。

一方, KO の虚血下肢では, Nox2 発現, ROS 発生, HIF-1 α 発現や VEGF 発現の低下を認め, 血管新生のための ROS-HIF-1 α -VEGF 経路が抑制されていると考えられた。更に KO では, 同経路の抑制により LOX-1 の下流シグナルである p38 MAPK や NF- κ B のリン酸化も抑制された。LOX-1 の欠失による NF- κ B の活性化の抑制は内皮細胞における VCAM-1 の発現の減少を引き起こし, 更に LOX-1 自身の接着因子機能の欠失も同時に生じるため, マクロファージの浸潤は KO の虚血下肢で減少したと考えられた。これは虚血下肢における LOX-1 の活性化とその増加が内皮細胞の接着因子の発現と虚血組織へのマクロファージの浸潤を増加させることを示唆する。

蛍光二重染色では, 虚血組織の F4/80 陽性マクロファージの浸潤と, 更に VEGF 陽性のマクロファージ浸潤が KO で有意に減少していることが示された。それ故, LOX-1 の欠失が, VEGF 産生マクロファージ遊走の抑制を引き起こし, 虚血下肢における血管新生と血流の改善を抑制していると考えられた。KO では, 上記のメカニズムで VEGF の産生が減少し, 更に VEGF 受容体の下流シグナルである Akt, eNOS リン酸化が抑制され, 更に NO 産生減少を生じ, 血管新生と血流の回復の抑制を引き起こしていると考えられる。

【結論】

LOX-1 の欠失は 1) 外科的手術による虚血後の下肢血流改善を抑制する。2) 毛細血管や小動脈のような微小血管増加を抑制する。3) VEGF, Nox2, HIF-1 α , VCAM-1 の発現や ROS の発生を抑制する。4) NF- κ B と p38 MAPK のリン酸化を抑制する。5) Akt と eNOS のリン酸化を抑制する。6) 虚血組織での VEGF を分泌する浸潤マクロファージ数を抑制する。以上より, 本研究で虚血下肢では, LOX-1 の活性化に伴う VCAM-1 発現増加や LOX-1 自身の白血球接着分子としての発現増加と, それに伴う VEGF 産生マクロファージ浸潤の増加が血管新生に対して重要であることが明らかになった。従って, LOX-1 は下肢虚血における血管新生の促進に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

