

氏名 (本籍)	白 木 仁 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 964 号
学位授与日付	平成 27 年 2 月 18 日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	LOX-1 plays an important role in ischemia-induced angiogenesis of limbs
審 査 委 員	(主査) 教授 飯 田 宏 樹 (副査) 教授 竹 内 保 教授 山 口 瞬

### 論 文 内 容 の 要 旨

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- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), (p)NF- $\kappa$ 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 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ), 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:  $\alpha$ -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 $\alpha$ 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- $\kappa$ 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 $\alpha$ 発現やVEGF発現の低下を認め, 血管新生のためのROS-HIF-1 $\alpha$ -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- $\kappa$ Bのリン酸化も抑制された。LOX-1の欠失によるNF- $\kappa$ 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 $\alpha$ , VCAM-1の発現やROSの発生を抑制する。4)NF- $\kappa$ 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。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 白木仁は, LOX-1を欠損した遺伝子改変マウスを用いて, LOX-1を介するメカニズムが虚血後の炎症反応の過程においてVEGF産生するマクロファージの集簇を促し, 血管新生に寄与していることを明らかにした。LOX-1を介するメカニズムとして, LOX-1下流シグナルであるNox2, ROS, p38 MAPK, NF- $\kappa$ Bが関与しており, 白血球接着因子(VCAM-1, LOX-1)発現増強がマクロファージ集簇に重要であることを見いだした。本研究成果は, 循環器病学の発展に貢献するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Takeru Shiraki, Takuma Aoyama, Chiharu Yokoyama, Yuka Hayakawa, Toshiki Tanaka, Kazuhiko Nishigaki, Tatsuya Sawamura, Shinya Minatoguchi: LOX-1 plays an important role in ischemia-induced angiogenesis of limbs

PLOS ONE 9:e114542 (2014).