

氏 名	森 脇 秀 明
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2046 号
学位授与の日付	平 成 10 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein (血管内皮細胞に発現する新規酸化 LDL レセプター LOX-1 のリガンド特異性について)
	(主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 清 野 裕 教 授 成 宮 周 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

酸化LDL (Ox-LDL) およびその脂質成分は内皮依存性血管弛緩反応の抑制や増殖因子、白血球接着分子の発現誘導などの作用を持ち血管内皮細胞機能を修飾することにより粥状動脈硬化症の発症進展に重要な役割を果たしていると考えられている。また従来より培養大動脈内皮細胞においては古典的なマクロファージスカベンジャー受容体 (SR-A) 以外にOx-LDL特異的受容体の存在が示唆されており、我々はウシ培養大動脈内皮細胞cDNAライブラリーより発現クローニング法を用いて新たなOx-LDL受容体を同定し、LOX-1と命名した。ウシLOX-1は細胞外にレクチン様ドメインを持つ分子量約50Kdの糖蛋白で、他の変性LDL受容体とは全く異なる構造を持つことより、特異なリガンド認識機構が働いているものと推察された。そこで我々はウシおよびヒトLOX-1を発現するCHO細胞 (BLOX-1-CHO, HLOX-1-CHO) を作成し、¹²⁵Iで標識されたOx-LDL (¹²⁵IOx-LDL), アセチルLDL (¹²⁵I-Ac-LDL) のbindingおよびdegradation assayを行いリガンド特異性について検討した。またマウスのクラスAスカベンジャー受容体を発現するCHO細胞 (mSR-II-CHO) とで、酸化LDLの結合に対する阻害剤の効果について比較検討した。またLOX-1のOx-LDL上の認識部位を同定するためにOx-LDLを脱脂しアポタンパク部分のみとなったOx-LDLを調整し検討した。

まずOx-LDLの濃度依存性についての検討では、BLOX-1-CHOは濃度依存的にOx-LDLと結合し、高濃度のOx-LDL投与ではsaturableなkineticsを認めた。Scatchard解析の結果LOX-1とOx-LDLとの間の解離定数は36 μg/mlとSR-A (～10 μg/ml) に比べ親和性はやや低いことが明らかになった。次にLOX-1がアセチルLDLを認識するか否かについてbindingおよびdegradation assayにより検討したところ、Ox-LDLはBLOX-1-CHOおよびHLOX-1-CHOに著明に結合し、細胞内に取り込まれ分解を受けたが、アセチルLDLはほとんど認識されなかった。さらにSR-Aに対する幾つかの阻害剤を用いて、LOX-1と¹²⁵I-Ox-LDLのbindingに対する阻害効果について検討したところ、poly I, carrageenanは大過剰の非標識Ox-LDLとほぼ同程度に¹²⁵I-Ox-LDLの結合を競合的に阻害したが、fucoidin, マレイル化アルブミン (M-BSA) では阻害効果は認められなかった。Degradation assayにおいても同様にpoly I, carrageenanはOx-LDLの取り込み代謝に対して抑制効果を認めたが、fucoidin, M-BSAでは認められなかった。また脱脂された¹²⁵I-Ox-LDLでは未処理の¹²⁵I-Ox-LDLとほぼ同程度BLO-1-CHOに結合し、その結合は大過剰の非標識の未処理Ox-LDLあるいは脱脂されたOx-LDLにより抑制を受けた。

以上よりLOX-1はアセチルLDLを認識せずOx-LDLのアポタンパク部分を特異的に認識し、取り込み、代謝する受容体であることが明らかになった。またLOX-1へのOx-LDLの結合に対する阻害剤の効果やOx-LDL粒子上のLOX-1の認識部位が従来の古典的スカベンジャー受容体の場合と異なることより、その結合には古典的SR-AおよびB受容体のリガンド認識機構とは異なる分子機構が働いているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は大動脈内皮細胞における酸化LDLレセプターとして初めてクローニングされたLOX-1 (lectin-like Oxidized low density lipoprotein receptor-1) のリガンド特異性を明らかにすることである。方法としてウシおよびヒトLOX-1を強発現するCHO細胞を作成した。対照として、古典的な変性LDLレセプターであるマウスクラスAスカベンジャーレセプターを強発現するCHO細胞を使用し、¹²⁵Iで標識された酸化LDL、アセチルLDLの結合および取り込み代謝実験を行い、比較検討した。

古典的なスカベンジャーレセプターは、従来より報告されているようにアセチルLDLと酸化LDLの両者を結合したが、LOX-1はアセチルLDLは結合せず酸化LDLのみを結合し、細胞内に取り込み代謝した。さらにScatchard解析の結果ウシLOX-1と酸化LDLの間の解離定数は36 μ g/mlと古典的なスカベンジャーレセプターの約10 μ g/mlに比べ親和性はやや低いことが明らかになった。また古典的なスカベンジャーレセプターに対する幾つかの阻害剤を用いてLOX-1と酸化LDLの結合に対する阻害効果について検討した結果、ポリイノミン酸とカラゲニンについては阻害効果が認められたがフコイジン、マレイル化アルブミンでは阻害効果は認められなかった。またLOX-1による酸化LDL上の認識部位を同定する目的で酸化LDLに脱脂処理を施し結合実験を行った結果、LOX-1はこの脱脂された酸化LDLも未処理の酸化LDLとほぼ同程度認識することが明らかになった。

以上よりLOX-1はアセチルLDLを認識せず、酸化LDLのアポ蛋白部分を特異的に認識し、取り込み、代謝するレセプターであることが明らかになった。LOX-1と酸化LDLの結合には古典的なスカベンジャーレセプターのリガンド認識機構とは異なる特異的な分子機構が働いているものと考えられた。

以上の研究は大動脈内皮細胞における変性LDL取り込み機構の解明に貢献し、粥状動脈硬化症を中心とした血管病変の発生機序の解明および治療に対して新たな方向性を示した。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年7月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。