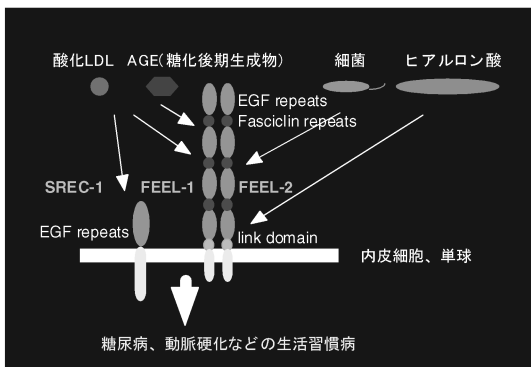


血管内皮細胞スカベンジャー受容体群の機能と血管病変を伴う多因子疾患発症機構の解明

●安達栄樹

理化学研究所 細胞生化学研究室

〈研究の目的と進め方〉



動脈硬化巣に集積して観察される泡沫細胞の形成には、内皮細胞の傷害と内皮細胞の活性化が関与するというRossらの障害反応仮説は広く受け入れられている。すなわち、傷害を受けた血管内皮に血流中の単球、マクロファージ、Tリンパ球が浸潤し、単球、マクロファージはスカベンジャー受容体経路で酸化されたLDLを介して飽和することなく取り込むためにコレステロールエステルの油滴を蓄積した泡沫細胞となり、Tリンパ球や血管平滑筋とともに脂肪線条(fatty streak)を形成するという仮説である。脂肪線条に存在する細胞間の相互作用により病変の進行につれ、繊維性硬斑といわれる血管内腔に突出した硬性の隆起病変へと移行し、さらに結合組織が増加することにより石灰化や血栓の付着を伴う病態、粥状動脈硬化へ進行する。内皮細胞の傷害を引き起こす多くの因子のなかで盛んに研究されているのが酸化LDLである。in vitroでは酸化LDLは脂肪線条に存在する細胞間の相互作用を説明するようなサイトカイン、接着因子等の発現誘導活性を示すことが報告されている。しかしながら酸化LDLを認識する受容体についてはその存在が示唆されていたものの、ようやく最近、受容体のcDNAがクローン化されその実体が明らかになりつつある。内皮細胞の主要な酸化LDLの受容体であるLOX-1、コラーゲンやトロポスポンジン等の受容体として報告されてきたCD36、そしてアセチルLDLの取り込みを指標とした発現クローニングにより私共がクローン化したSRECである。SRECは7個のEGFドメインを含む10個の繰り返し構造から構成される細胞外ドメインと391アミノ酸残基の細胞内ドメインから構成されている。細胞内ドメインはセリン、プロリンに富んだ領域とコラーゲンやニューロフィラメントH蛋白質と弱い相同性を示すグリシンに富んだ領域から構成されている。SRECに対する中和活性を持つモノクローナル抗体を用いた解析から内皮細胞にはSRECの他にスカベンジャー受容体の存在が示唆された。そこで発現クローニングにより新たに二種のスカベンジャー受容体cDNAを単離した。そのうち一つはHDL受容体として知られるCLA-1であった。内皮細胞のスカベンジャー受容体活性はHDLによっても阻害されないことから主要なスカベンジャー受容体とは考えられなかった。もう

一つの受容体cDNAは新規な受容体FEEL-1であった。内皮細胞はこのように種々のスカベンジャー受容体を発現し、その発現量を変化させることによってその生理機能を調節していると考えられる。血管内皮細胞に発現しているスカベンジャー受容体群は陰性荷電を持つ高分子の生体からの排除という本来の機能から種々の疾患に関与するものと考えられているが病態との関連は明確ではない。個々の受容体の生理機能を解明するとともに既にクローン化したSRECの発現抑制を担う新規転写因子EZF-1によって転写調節される遺伝子群を、また受容体の生理的リガンドによってもたらされる遺伝子の発現変化を明らかにすることにより血管病変を伴う多因子疾患におけるスカベンジャー受容体群の役割を解明する。

〈研究開始時の研究計画〉

血管内皮細胞由来スカベンジャー受容体群SREC、CLA-1、FEEL-1の発現調節機構について病態との関連を明らかにする。発現調節に関しては正常組織、病態組織での血管内皮細胞由来スカベンジャー受容体群のmRNAレベルや蛋白質レベルでの発現の差異検討を行い、in vitroで得られている炎症性サイトカインによる発現制御と病態との関連を明らかにする。1)SRECに関しては既にモノクローナル抗体を用いて正常組織、病態組織における分布、発現量を検討している。最近明らかにしたCLA-1、FEEL-1についても発現量と病態との関連を明らかにすることにより構造遺伝子の発現調節領域と病態との関連を明らかにする。mRNAレベルでの検討に関してはそれぞれの受容体が少なくとも二種類のパラログス遺伝子(paralogous gene)をもっており、さらにオルタナティブスプライシングにより数種のmRNAに転写されるため正確な定量にはRT-PCRを用いた定量法が必須である。また可溶性型のスカベンジャー受容体やスカベンジャー受容体リガンドの血中濃度を測定しうるELISAの系を構築し動脈硬化や糖尿病など血管内皮細胞傷害に基づく多因子疾患における血中濃度と病態との関係を明らかにしたい。2)SRECの転写調節を担う新規転写因子としてEZF-1を見出している。EZF-1により転写制御を受ける遺伝子群をDNA Array (DNAチップ)やDifferential Display法を用いて同定することにより病態との関連を解明する。血管内皮細胞由来スカベンジャー受容体群の生理的リガンドによる遺伝子変化と病態との関連を明らかにする。発現クローニングの手法によりSRECの生理的リガンドとしてVimentin、CD46を同定している。またCLA-1の生理的リガンドのひとつとしてHDLが知られている。これらの生理的リガンドによる血管内皮細胞に対する生理作用の検討を中心に病態との関連を明らかにしたい。3)既に得ているSRECの(アセチルLDLとの結合を阻害する)中和モノクローナル抗体をツールとして内皮細胞に生理的リガンドを作用させたときの接着因子やサイトカインの発現誘導、内皮細胞の増殖、遊走等の血管新生への影響を遺伝子レベルの変化として検討することにより病態との関連を明らかにする。4)SRECノックアウトマウスを樹立し

たので、その個体の性状や血管内皮細胞の性状を検討することにより、また高コレステロール食等による負荷や apoEやSRAノックアウトマウス等とのダブルノックアウトにより病態との関連を明らかにする。FEEL-1のノックアウトマウス作製を行い最終的にスカベンジャー受容体群の病態との関連を明らかにする。

〈研究期間の成果〉

SRECの転写調節機構を明らかにした。その過程で新規転写因子EZF-1のクローニングを行った(論文2)。SREC-1にホモロジーの高いSREC-IIのクローニングを行い、SREC-1と細胞外ドメインを介して相互作用し接着因子として機能しうることを明らかにした(論文3)。SREC-1の細胞内ドメインはadvillinと相互作用することにより神経突起の生成に関与することを明らかにした(論文6)。SREC-1のノックアウトマウスを樹立し、SRAノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウスを用いた解析から、マウスマクロファージにおいてLPSで発現が誘導されること、またアセチルLDLの取り込み活性に関してSRAに次ぐ寄与を担う受容体であることを明らかにした(論文7)。発現クローニングにより新規スカベンジャー受容体FEEL-1をクローン化し、その発現組織を検討した。また血管新生における役割を検討した。FEEL-1にホモロジーの高いFEEL-2のクローニングを行った。またリガンドとして変性LDLだけでなく、グラム陽性、陰性の細菌も結合することを明らかにした。(論文4)。FEEL-1とFEEL-2はAGE(糖化後期生成物、advanced glycation end product)の受容体であることを明らかにした(論文5)。これらの結果は私共のクローン化したスカベンジャー受容体が動脈硬化や糖尿病さらに感染症などの病態の進展に関与することを強く示唆している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

私共は世界に先駆けてSREC-1, SREC-II, FEEL-1, FEEL-2 cDNAの単離を報告してきた。ほぼ同時期にドイツの研究グループによりヒト脾臓を免疫して得られたモノクローナル抗体の抗原Stabilin、アメリカの研究グループによりラットヒアルロン酸のクリアランス受容体HARE、さらに最近リンパ球の遊走を制御する分子CLEVER-1としてFEEL-1, FEEL-2と同一のcDNAが報告された。未同定な機能の解明を含め競争は熾烈である。またshRNAやmiRNAを発現するファイバーミュータントアデノウィルスを用いた初代培養細胞での受容体のノックダウンに成功しており、動物個体での検討も可能となった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

FEEL-1, 2ノックアウトマウスの樹立に時間を要した。私共の研究室にノックアウトマウス樹立の技術、施設がなかったことがその理由である。大阪大学微生物病研究所岡部勝教授の御指導によりノックアウトマウスの樹立に成功した。

〈今後の課題〉

FEEL-1, 2ノックアウトマウスを樹立し、繁殖と機能解析を行っている。FEEL-2と膵臓がん抑制遺伝子に関する研究を2005 American Association of Cancer Research Annual MeetingにおいてHGNT-IV-H and FEEL-2/Stabilin-2 Represent Potential Candidate Pancreatic Cancer Tumor Suppressor Genes Localized to 12q21-23のタイトルで発表した様にUniversity of Pittsburgh Department of Medicine Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutritionの

Kay Pogue-GeileとMTAを交わした上で共同研究を行っている。難治疾患である膵臓がんの転移機構の解明にも貢献できるものと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1. Ikemoto, M. Arai, H, Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. and Inoue, K. : Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6583-6543, 2000
2. Adachi, H. and Tsujimoto, M.: Characterization of human gene encoding scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2; J. Biol. Chem. 277, 24014-24021, 2002
3. Ishii, J., Adachi, H., Aoki, J., Koizumi, H., Tomita, S., Suzuki, T., Tsujimoto, M., Inoue, K. and Arai, H. : SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain; J. Biol. Chem. 277, 39696-39702, 2002
4. Adachi, H. and Tsujimoto M.: FEEL-1, a Novel Scavenger Receptor with in Vitro Bacteria-binding and Angiogenesis-modulating Activities; J. Biol. Chem. 277, 34264-34270, 2002
5. Tamura, Y., Adachi, H., Osuga, J., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S., Iizuka, Y., Shimano, H., Nagai, R., Kimura, S., Tsujimoto, M. and Ishibashi, S.: FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products; J. Biol. Chem. 278, 12613-12617, 2003
6. Shibata, M., Ishii, J., Koizumi, H., Shibata, N., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. and Arai H.: Type F scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neurite-like outgrowth.; J. Biol. Chem., 279, 40084-40090, 2004
7. Tamura, Y., Osuga, J., Adachi, H., Tozawa, R., Takanezawa, Y., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S., Iizuka, Y., Koizumi, H., Inaba, T., Yagyu, H., Kamada, N., Suzuki, H., Shimano, H., Kadowaki, T., Tsujimoto, M., Arai, H., Yamada, N. and Ishibashi, S.: Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-I) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. ; J. Biol. Chem., 279, 30938-30944, 2004