ワークショップ 6 リポ蛋白受容体機能の調節機構

LDL 受容体類似モザイク蛋白 LR11 の発現調節¹武 城 英 明² 齋 藤 康²

はじめに

低比重リポ蛋白 LDL (low density lipoprotein) は特異的膜受容体である LDL 受容体により細胞内へ取り込まれ、細胞内で代謝をうけ細胞膜成分などに利用されることが知られている。この LDL 受容体は、生体においてリポ蛋白を介した脂質代謝に重要な役割を演じている。さらに、その遺伝子異常により、著明な動脈硬化を伴う遺伝疾患、家族性高コレステロール血症をひきおこす。これらの遺伝子異常によりひきおこされる病態、さらにその動物モデルである WHHL ウサギの詳細な受容体解析により、LDL 受容体が生体におけるコレステロール代謝の恒常性にきわめて重要であり、受容体機能異常が高コレステロール血症さらに虚血性心疾患を生じさせることがすでに明らかになっている。一方、生体には他のリポ蛋白を認識する細胞膜受容体の存在が示唆されていたが、分子生物学の発展により、LDL 受容体に構造の類似した他のいくつかの受容体遺伝子が広範囲な生物種にわたり存在することが証明された (LDL 受容体遺伝子ファミリー)。

I. LDL 受容体遺伝子ファミリーの機能

LDL 受容体遺伝子ファミリーは、LDL 受容体の基本構造を共有する特徴に加え、apoE rich リポ蛋白をリガンドとする受容体機能を保持し、リポ蛋白の細胞内取り込みに重要な役割を有している。さらに近年、ファミリー受容体は、リポ蛋白に加え血中のさまざまな物質を取り込む多機能受

容体であることが示されている¹。すなわち LDL 受容体はリポ蛋白特異的受容体であるのに対し、ファミリー受容体は、apoE rich リポ蛋白に加え、RAP (39 kDa Receptor Associated Protein), uPA/PAI-1 複合体等の受容体でもある。一方、動脈硬化巣での受容体発現調節、受容体欠損細胞の遊走能亢進などから動脈硬化進展過程でのファミリー受容体の意義が注目されている²。加えて、受容体の多くは脳に高発現しているが、apoE フェノタイプとアルツハイマー病発症の関連と関与し、神経細胞 apoE 受容体としての役割解明が期待されている³。

II. LR11 の同定

我々が同定した LR11 (LDL receptor relative with eleven binding repeats) は、新しいモザイク構造を有し、主に脳、腎、肝に発現する約 250 kDa の I 型膜蛋白である⁴。その構造は、LDL 受容体の基本構造であるリガンド結合領域、EGF 前駆体相同領域、細胞内領域に加え、神経接着分子および細胞内蛋白輸送受容体に類似した構造よりなる⁵。LR11 は、apoE rich リポ蛋白および RAP と結合するが、近年、Gliemann らによりヒト脳より精製された RAP 結合蛋白 sorLA が LR11 と同一であることが報告され、RAP と本受容体の高親和性結合が確認された⁶。また LR11 は、ヒトに加え、ウサギ、マウス、ニワトリ間で 80% 以上の高いアミノ酸相同性を有し⁷⁻⁹、最近 Schaller らにより hydra における器官形成に重要な head activator 受容体が LR11 と構造上の特徴を共有することが示された¹⁰。

III. 動脈硬化巣における LR11 mRNA 発現の検討 (Fig. 1)

実験的動脈硬化は、1% コレステロール含有食を 12 週間負荷したウサギ大動脈および総頸動脈を摘出し、各組織より mRNA 抽出または凍結切片を作成し以下の検討に用いた。RT-PCR 解析は、ウサギ LR11 cDNA に相当する特異的プローブおよび LR11 ドメイン I および II に相当する PCR 用プライマーを作成し、上記 mRNA を用いて RT-PCR 法により LR11 mRNA 発現について検討した。LDL 受容体遺伝子ファミリーである VLDL 受容体、LDL 受容

¹ 1998 年 11 月、平成 10 年度日本動脈硬化学会冬季大会 (千葉) において発表。

² 千葉大学医学部第二内科

Regulatory expression of the LDLR-related mosaic protein, LR11

Hideaki Bujo and Yasushi Saito: 2nd Deptment of Internal Medicine, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan.

Key words: LDL receptor, LR11, Atherosclerosis, Mosaic protein, Smooth muscle cells, Gene family

原稿受取日: 1999 年 3 月 4 日

Fig. 1 高コレステロール負荷による動脈硬化巣での LR11 の発現。
RT-PCR 法により LR11 および cyclophilin (コントロール) mRNA を検出した。
1: 普通食飼育うさぎ摘出大動脈, 2: 高コレステロール食飼育うさぎ摘出大動脈, 3: 普通食飼育うさぎ摘出頸動脈, 4: 高コレステロール食飼育うさぎ摘出頸動脈。

体および LRP は動脈硬化巣の形成進展過程においてその発現調節を受けるが、動脈硬化の進展とともにマクロファージならびに平滑筋細胞において特にその発現が増強することが知られている³⁾。そこで、12 週高コレステロール食飼育ウサギの大動脈および頸動脈組織を採取し、RT-PCR 法により LR11 の発現を検討したところ、正常頸動脈および大動脈に有意な LR11 mRNA の発現を検出した。12 週高コレステロール食負荷後、動脈硬化のみられない頸動脈ではその発現にほとんど変化を認めなかったが、著明な動脈硬化巣が存在する大動脈においては LR11 の発現が明らかに亢進していた。

IV. 動脈硬化巣における LR11 の発現部位 (Fig. 2)

組織免疫解析により、LR11 蛋白発現部位について詳細に検討した。組織免疫学解析には、LR11 ドメイン IV に対する特異的モノクローナル抗体を用いた。正常食飼育ウサギにおける大動脈において LR11 は、ほとんど発現が認められなかった。高コレステロール食負荷による動脈硬化形成後、LR11 の大動脈肥厚内膜における発現が検出された。また、この発現部位を平滑筋細胞およびマクロファージ特異抗体による細胞染色と比較検討した結果、肥厚内膜での LR11 の発現は主に平滑筋細胞の局在と一致した。これらの結果は、上述の結果とあわせ、LR11 は動脈硬化巣形成とともに内膜平滑筋細胞に発現が亢進することを示した。

V. 内皮傷害後ウサギ大動脈硬化巣における LR11 の発現 (Fig. 3, 4)

そこで次に、平滑筋細胞の増殖による内膜肥厚が主体の動脈硬化巣を形成するバルーンカテーテル法を用いた内膜

Fig. 2 高コレステロール負荷による動脈硬化巣での免疫組織学的 LR11 発現。
A および D (強拡大): 動脈硬化巣における LR11 発現 (抗 LR11 抗体), B: コントロール (抗 GST 抗体), C: 正常血管における LR11 発現 (抗 LR11 抗体), E: 抗平滑筋細胞抗体による染色, F: 抗マクロファージ抗体による染色。

Fig. 3 内皮傷害後の内膜肥厚にともなう LR11 mRNA の発現。
傷害後 3 日, 14 日後の LR11, cyclophilin, cyclin E, cyclin B mRNA について RT-PCR 法により検出した。数字 (1-9) は実験に用いたウサギの番号を示す。

障害モデルを用いて同様の検討を行った。バルーンカテーテル法によるラット内皮傷害後の大動脈を摘出し、各組織より mRNA 抽出または凍結切片を作成し以下の検討に用いた。RT-PCR 法により処置後 3~14 日目において LR11 mRNA の発現の亢進を明らかに認めた。本条件下では正常ラット大動脈にはほとんど LR11 mRNA 発現を認めなかったが、内皮傷害 3 日後に弱い発現を検出し、その後内膜肥厚が著明となった 14 日後には、その発現はさらに増大した。そこで、*in situ* hybridization 法によりその発現

Fig. 4 内皮傷害後の内膜肥厚にともなう LR11mRNA 発現。
A: 内膜肥厚部における LR11mRNA 発現 (アンチセンスプローブ), B: コントロール (センスプローブ), C: 正常血管における LR11mRNA 発現 (アンチセンスプローブ), D: 抗平滑筋細胞抗体による免疫染色。

様式について検討した。in situ hybridization 解析には、LR11cDNA より作成した RNA プローブおよび凍結切片を用いた。LR11mRNA は障害部位肥厚内膜に強い発現を示した。これは免疫組織学的に検討した内膜に存在する平滑筋細胞にほぼ一致し、上記の結果とあわせ、LR11 は内膜平滑筋細胞に局在して発現することが明らかになった。

VI. 動脈硬化における LR11 の発現調節とその役割

新たな LDL 受容体遺伝子ファミリー LR11 は、実験的動脈硬化作成モデルにおいて、動脈硬化とともにその発現が増大することが明らかになった。高コレステロール負荷による硬化巣において、その発現は内膜平滑筋細胞に局在し、さらにバルーンカテーテルによる内皮傷害による内膜肥厚において、同様に内膜肥厚部平滑筋細胞に認められた。

LDL 受容体遺伝子ファミリーは、その脂質代謝における中心的役割から動脈硬化進展過程に関与する可能性が考えられるが、実際にスカベンジャー受容体とともに血管構築細胞に強い発現が認められている³⁾。LRP/ α 2MR は、動脈硬化巣においてマクロファージおよび平滑筋細胞に発現し、特に平滑筋細胞での高い発現は、マクロファージおよび平滑筋細胞の泡沫細胞への進展過程に関与する可能性が示唆されている。LRP/ α 2MR は、リポ蛋白リパーゼ (LPL)-アポ E 複合体の一部として酸化 LDL も取り込むことが知られ、さらにスカベンジャー受容体同様リポ蛋白に対するフィードバック機構が存在しないことから、脂質の過剰蓄積に重要な役割を有することが考えられる。これまでに LRP はマクロファージの分化とともに発現が増強することが知られているが、正の発現調節因子として Col-

ony stimulating factor-1、発現抑制因子として interferon gamma, lipopolysaccharide などが知られている。一方、LDL 受容体の発現は動脈硬化巣において他のファミリー受容体に比較し強くない。これは硬化巣細胞外液の高いコレステロール含量によるフィードバック機構の結果とも考えられる。VLDL 受容体は正常血管においては、細小血管、毛細血管および冠動脈の内皮細胞に発現し、アポ E リッチリポ蛋白の血管壁への輸送に関与している可能性が指摘されている。またマクロファージおよび平滑筋細胞での VLDL 受容体の発現が報告され、動脈硬化巣において、これらの発現が亢進しているとの報告がある。VLDL 受容体は granulocyte macrophage colony-stimulating factor により発現調節をうけることが示されているが、他の明らかな発現調節因子は不明である。

今回の結果から、LR11 は、動脈硬化巣において内膜平滑筋層に発現が増強していることが示され、他のファミリー同様、動脈硬化進展過程における平滑筋細胞の増殖ならびに遊走に関与する可能性が考えられる。これとあわせ、最近、LRP/ α 2MR 欠損血管平滑筋細胞の遊走能が増強することが報告され、これはプロテアーゼ複合体代謝の障害によると考えられている。ファミリー受容体のリポ蛋白の取り込みは、LPL およびアポ E により増強されることが知られている¹⁾。LPL およびアポ E 共に硬化巣に多量に存在すること、平滑筋細胞により LPL が産生されていること、LDL の酸化により LPL との結合能が増大することなどから、硬化巣に存在するリポ蛋白がアポ E リッチに、そして LPL と結合し、よりファミリー受容体のリガンドとして高い親和性をもつようになる可能性がある。

おわりに

アポ E をリガンドとすることが共通する機能的特徴である LDL 受容体遺伝子ファミリーのヒトでの生体機能は、現在のところほとんど明らかにされていない。一方でファミリー受容体の多くは多機能受容体であることが示され、今後、血管壁における LR11 の特徴的な発現調節の機能を明らかにするために、血管壁における詳細な細胞間インターアクションさらにその発現調節物質について解明する必要がある。

文 献

- 1) Yamamoto T and Bujo H: Close encounters with apolipoprotein E receptors. *Cur Opin Lipidol*, 7: 298-302, 1996
- 2) Yi-Herttua S: Expression of lipoprotein receptors and related molecules in atherosclerotic lesions. *Cur Opin Lipidol*, 7: 292-297, 1996
- 3) Schneider WJ, Nimpf J, and Bujo H: Novel members of

- the LDL receptor superfamily and their potential roles in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 8: 315-319, 1997
- 4) Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, and Saito Y: Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian LDL receptor family member. *J Biol Chem*, 271: 24761-24768, 1996
 - 5) Bujo H and Saito Y: A new member with eleven binding repeats: Novel insights into the LDL receptor gene family. *Ann NY Acad Sci*, 811: 185-190, 1997
 - 6) Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A, Sottrup-Jensen L, Gliemann J, and Petersen CM: Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the α 2-macroglobulin receptor associated protein (RAP). *J Biol Chem*, 271: 31379-31383, 1996
 - 7) Yamazaki H, Bujo H, and Saito Y: A novel member of the LDL receptor gene family with eleven binding repeats is structurally related to neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor. *J Atheroscler Thromb*, 4: 20-26, 1997
 - 8) Moerwald S, Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Kanaki T, Seimiya K, Morisaki N, Nimpf J, Schneider WJ, and Saito Y: A novel mosaic protein containing LDL receptor elements is highly conserved in humans and chickens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 996-1002, 1997
 - 9) Kanaki T, Bujo H, Hirayama S, Tanaka K, Yamazaki H, Seimiya K, Morisaki N, Schneider WJ, and Saito Y: Developmental regulation of LR11 expression in murine brain. *DNA Cell Biol*, 17: 647-657, 1998
 - 10) Hermans-Borgmeyer I, Hampe W, Schinke B, Methner A, Nykjaer A, Suesens U, Fenger U, Herbarth B, and Schaller HC: Unique expression pattern of a novel mosaic receptor in the developing cerebral cortex. *Mech Dev*, 70: 65-76, 1998