

学 位 論 文

Doctor's Thesis

レクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)は血管内皮の
メイラード反応後期生成物(AGE)の受容体として機能する
(Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as
an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE))

城野 匡

Tadashi Jono

指導教官

堀内 正公 教授

熊本大学大学院医学研究科生化学第二講座

北村 俊則 教授

熊本大学大学院医学研究科脳病態学講座

2002年3月

目次

| | | |
|----|---|----|
| 1. | 要旨 | 1 |
| 2. | 発表論文リスト | 4 |
| 3. | 謝辞 | 5 |
| 4. | 略語一覧 | 6 |
| 5. | 研究の背景と目的 | |
| | 5-1. メイラード反応 | 7 |
| | 5-2. AGE 受容体 | 10 |
| | 5-3. 新規酸化 LDL 受容体 (LOX-1) | 15 |
| | 5-4. 本研究の目的 | 16 |
| 6. | 材料と実験方法 | |
| | 6-1. 試薬 | 18 |
| | 6-2. リガンドの調節と放射性ヨード標識 | 18 |
| | 6-3. アガロースゲル電気泳動 | 19 |
| | 6-4. SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) | 20 |
| | 6-5. ウシ LOX-1 過剰発現細胞の調節 | 20 |
| | 6-6. ウシ大動脈血管内皮細胞の分離及び培養 | 21 |
| | 6-7. 抗体 | 21 |
| | 6-8. BLOX-1-CHO 細胞による標識リガンド分解の解析 | 22 |
| | 6-9. 培養細胞を用いた ¹²⁵ I 標識リガンドの結合実験 | 23 |
| 7. | 実験結果 | |
| | 7-1. リガンドの修飾 | 25 |
| | 7-2. Ox-LDL の BLOX-1-CHO 細胞への結合 | 25 |
| | 7-3. AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合 | 25 |
| | 7-4. BLOX-1-CHO 細胞による AGE-BSA および Ox-LDL の取り込み・分解 | 26 |
| | 7-5. AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対する各種リガンド並びに抗 BLOX-1 抗体の効果 | 26 |
| | 7-6. Ox-LDL の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対する各種リガンド並びに抗 BLOX-1 抗体の効果 | 27 |

| | | |
|-----|------------------------------------|----|
| | 7-7.AGE-BSA のウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)への結合 | 27 |
| 8. | 考察 | 29 |
| 9. | 結語 | 33 |
| 10. | 参考論文 | 34 |

1. 要旨

【目的】タンパク質がグルコースと長時間反応して生じるメイラード反応後期生成物(AGE)は、蛍光性・褐色化・分子架橋性などの物理化学的特性とともに、AGE 受容体によって認識されるという生物学的特性を有している。AGE はマクロファージ系細胞や血管内皮細胞に発現する AGE 受容体に結合し、増殖因子など様々な生理活性物質の産生を促進し、糖尿病性血管合併症や動脈硬化症の発症・進展に関与していると想定されている。これまでに AGE 受容体として OST48/80K-H/galectin-3 複合体、Receptor for AGE (RAGE)、スカベンジャー受容体に属する MSR-A、CD36、SR-BI が報告されている。最近、血管内皮細胞に発現する酸化 LDL 受容体として lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)が同定された。LOX-1 はこれまでに同定されたスカベンジャー受容体のいずれとも類似の構造をもたず、レクチン様構造を細胞外にもつ。今回、あらたなスカベンジャー受容体として同定された LOX-1 が AGE をリガンドとして認識するかどうかを検討した。【方法】ウシ LOX-1 (BLOX-1)を過剰発現した CHO 細胞において ¹²⁵I で標識した AGE 化ウシ血清アルブミン(AGE-BSA)の 4℃での結合活性を測定し、抗 BLOX-1 抗体による阻害効果を検討した。また、ウシ大動脈血管内皮細胞における AGE-BSA の 4℃での結合に対する抗 BLOX-1 抗体の阻害効果も検討した。【結果】AGE-BSA は BLOX-1-CHO 細胞に特異的に結合し、その結合は抗 BLOX-1 抗体により効果的に抑制された。また AGE-BSA はウシ大動脈血管内皮細胞への特異的結合を示し、特異的結合の 67%は抗 BLOX-1 抗体により抑制された。【結論】AGE-BSA と

BLOX-1-CHO 細胞の特異的結合がみられたことから、LOX-1 が AGE をリガンドとして認識することが明らかになった。また AGE-BSA の特異的結合はウシ大動脈血管内皮細胞においても観察され、この結合が抗 BLOX-1 抗体によって阻害をうけることから、LOX-1 が血管内皮細胞に発現する新たな AGE 受容体であることが判明した。

Summary

Advanced glycation end products (AGE) are known to serve as ligands for the scavenger receptors such as SR-A, CD36 and SR-BI. In the current study, we examined whether AGE is recognized by lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). Cellular binding experiments revealed that AGE-bovine serum albumin (AGE-BSA) showed specific binding to CHO cells overexpressing bovine LOX-1 (BLOX-1), which was effectively suppressed by an anti-BLOX-1 antibody. Cultured bovine aortic endothelial cells also showed specific binding for AGE-BSA, which was suppressed by 67% by the anti-BLOX-1 antibody. Thus, LOX-1 is identified as a novel endothelial receptor for AGE.

2. 発表論文リスト

1. **Tadashi Jono**, Akira Miyazaki, Ryoji Nagai, Tatsuya Sawamura, Toshinori Kitamura, Seikoh Horiuchi. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters in press.
2. Noriyuki Sakata, Noriko Uesugi, Shigeo Takebayashi, Ryoji Nagai, **Tadashi Jono**, Seikoh Horiuchi, Motohiro Takeya, Hiroyuki Itabe, Tatsuya Takano, Theingi Myint, Naoyuki Taniguchi. Glycooxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis. Cardiovascular Research 49: 466-475. 2001.
3. Noriyuki Shibata, Ryoji Nagai, Satoshi Miyata, **Tadashi Jono**, Seikoh Horiuchi, Asao Hirano, Shinsuke Kato, Shoichi Sasaki, Kohtaro Asayama, Makio Kobayashi. Nonoxidative protein glycation is implicated in familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. Acta Neuropathologica (Berlin). 100: 275-284. 2000.
4. Noriko Uesugi, Noriyuki Sakata, Ryoji Nagai, **Tadashi Jono**, Seikoh Horiuchi, Shigeo Takebayashi. Glycooxidative modification of AA amyloid deposits in renal tissue. Nephrology Dialysis Transplantation 15:355-365. 2000.
5. 木村武実、城野 匡、堀内正公、宮川太平. Advanced glycation end products (AGE)とアルツハイマー病
脳の科学 145:145-148, 2000
6. 永井竜児、城野 匡、堀内正公. AGE と老化、 CLINICIAN エーザイ株式会社、45:110-115、1998

3. 謝辞

本研究は熊本大学医学部生化学第二講座、堀内正公教授ならびに神経精神医学講座、北村俊則教授の指導の下に行いました。堀内教授ならびに北村教授には、研究においては勿論、多面に渡り御指導を頂き、深く感謝いたします。また、BLOX-1-CHO 細胞および抗 BLOX-1 抗体は、国立循環器病センター研究所、沢村達也博士に御供与頂きました。京都大学大学院医学研究科内科系専攻生体統御医学講座大学院生、井上和彦氏には、ウシ大動脈血管内皮細胞の調製をして頂きました。更に、熊本大学医学部生化学第二講座の教室員の皆様には日頃から御助言、御協力を頂きました。

皆様に心より感謝致します。

4. 略語一覽

acetyl-LDL: acetylated low-density lipoprotein
AGE: advanced glycation end products
BAEC: bovine aortic endothelial cells
BCA: bicinchoninic acid
BLOX-1: bovine LOX-1
BLOX-1-CHO cell: CHO cells overexpressing bovine LOX-1
BSA: bovine serum albumin
CBB: Coomassie Brilliant Blue
CEL: N^ε-(carboxyethyl)lysine
CHO: Chinese hamster ovary
CML: N^ε-(carboxymethyl)lysine
3-DG: 3-deoxyglucosone
3-DG-BSA: BSA modified with 3-deoxyglucosone
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FCS: fetal calf serum
GA: glycolaldehyde
GA-BSA: BSA modified with glycolaldehyde
HDL: high-density lipoprotein
LDL: low-density lipoprotein
LOX-1: lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
MCP-1: monocyte chemotactic protein-1
MSR-A: macrophage scavenger receptor class A
MG: methylglyoxal
MG-BSA: BSA modified with methylglyoxal
OST-48: oligosaccharyl transferase-48
Ox-LDL: oxidized low-density lipoprotein
PBS: phosphate buffered saline
RAGE: Receptor for AGE
SDS-PAGE: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SR-BI: scavenger receptor class B type I

5. 研究の背景と目的

タンパク質の翻訳後修飾反応として AGE (advanced glycation end products メイラード反応後期生成物) と、糖尿病性血管合併症との関係が注目されている。糖尿病性血管合併症として網膜症、腎症および神経障害などの細小血管障害 (microangiopathy)、並びに虚血性心疾患、脳血管障害などの動脈硬化に基づく大血管障害 (macroangiopathy) を挙げることができる。血管合併症の成因として現在、ポリオール代謝異常(1)、血管壁凝固線溶系の異常(2-4)、PKC (Protein Kinase C) 経路の活性化(5)、酸化ストレス(6-8)および生体タンパク質の非酵素的糖付加反応 (メイラード反応またはグリケーション) (9-11)の5つの仮説が提唱されている。約10年間に渡る大規模な臨床試験 Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) が施行され、その結果「強化インスリン療法による厳格な血糖コントロールは、糖尿病合併症の発症あるいは進展を抑制する」と結論された(12)。また、同報告はメイラード反応前期生成物の一つであるヘモグロビン A_{1c} (Hb A_{1c})レベルが糖尿病性血管合併症の発症・進展と相関することを指摘している。更に糖尿病性血管合併症の病変部には AGE の蓄積が認められている。これらのことよりメイラード反応と糖尿病性血管合併症発症・進展との因果関係が示唆されている。

5-1. メイラード反応

5-1-I.メイラード反応と AGE 構造

1912年フランス人食品化学者 Maillard はグルコースなどの還元糖とアミノ酸を加熱すると黄褐色の物質が生成することを報告した(13)。本反応はメイラード反応(グリケーション)と呼ばれ、主に食品化学の領域で研究が展開された。しかし、1970年代にヘモグロビン A_{1c} (Hb A_{1c})が発見され(14)、メイラード反応が生体でも実際に起こっていることが明らかとなり、医学生物学的意義が注目されるようになった。生体内では、高血糖が持続する状態のみならず、正常の血糖値であってもメイラード反応が進行することがわかってきた。

本反応は前期反応と後期反応に分けて考えることができる。グルコースなどの還元糖はタンパク質の N 末端のアミノ基あるいはリジンの ε-アミノ基と反応して、まず可逆性のシッフ(Schiff)塩基を形成し(15, 16)、その後、分子内転位を起こして安定なアマドリ(Amadori)化タンパク質をつくる。ここまでの前期反応生成物と呼ばれる。アマドリ化タンパク質はヘモグロビンにとどまらずアルブミンなどの血漿タンパク質からコラーゲンなどのマトリックスタンパク質に至るまで多くのタンパク質でも観察される。これらの前期反応生成物は、更に酸化・脱水・縮合・環状化などの複雑な反応を経て、蛍光・褐色・架橋形成・受容体による認識などの特性を有する後期反応生成物(AGE)に至る(17, 18)(図-1)。現在までに生体内存在が確認されている AGE 構造体は、蛍光性・架橋性の両方の特性を有するものといずれの特性も有していないものの2つのグループに大別される。前者としては pentosidine (19)、crossline (20)、fluorolink (21)など、後者としては、N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) (22)、N^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL) (23)、pyrraline (24)、imidazolone

(25) などが知られている (図-2)。

5-1-II. AGE 形成における aldehyde の役割

これまでタンパク質の AGE 化は前期生成物のうち主としてアマドリ転移物から 3-deoxyglucosone (3-DG) (26) を経由して生成されたと考えられてきた。しかし、最近ではグルコースの自己酸化によって生成した glyoxal (27)、シッフ塩基に由来する glycolaldehyde (GA) (27)、シッフ塩基およびアマドリ転位物の分解で生成する methylglyoxal (MG)(26) など、本反応中に形成されるグルコース以外の aldehyde 中間体によるタンパク質の AGE 化が注目されている (図-3)。3-deoxyglucosone は先に述べたように、アマドリ転移物の開裂から形成され、糖尿病患者、糖尿病性腎症患者では血中濃度が健常者の 1.6-4 倍になることが報告されている(28)。また 3-deoxyglucosone はマクロファージのアポトーシスの誘導(29)、血管平滑筋細胞の増殖抑制(30)などをおこし、糖尿病合併症に関与していることが考えられている。3-deoxyglucosone 由来の AGE 構造体として imidazolone、pyrraline、CML、pentosidine が報告されている(31)。glyoxal はグルコースの自動酸化や脂質の過酸化反応によって形成され、glyoxal 由来の AGE 構造体として CML があげられている(32)。methylglyoxal は細胞内で解糖系およびポリオール経路から生成し(33)、1型糖尿病患者の血中 methylglyoxal 含量は正常者の 6 倍、硝子体では 2 倍程度増加していることが報告されている(34)。また methylglyoxal 由来の AGE 構造体として argpyrimidine (35)、methylglyoxal-lysine dimer (MOLD)(36)、imidazolone (25)があげられ、生体に蓄積することが明らかになっている。

5-2. AGE 受容体

現在までに AGE 受容体として、マクロファージスカベンジャー受容体クラス A (macrophage scavenger receptor class A; MSR-A) (37)、マクロファージスカベンジャー受容体クラス B に属する CD36 (38)および SR-BI (scavenger receptor class B type I) (39)、OST-48/80K-H/galectin-3 複合体(40)、RAGE (Receptor for AGE) (41)、の 5 つが報告されている (図-4)。MSR-A、CD36、SR-BI に結合した AGE は細胞内に取り込まれリソソーム分解を受ける。細胞膜上の受容体によりエンドサイトーシスを受けた AGE がエンドゾーム区画内を経て、最終的にリソソームに到達する輸送機構の詳細は不明であるが、一般的に受容体は初期エンドゾーム内でリガンドと解離し、細胞膜に戻って再利用されると考えられている。また、後期エンドゾームに送られたりガンドは弱酸性の環境下でゴルジ体より送られてきた加水分解酵素と会合し、成熟リソソームを形成して分解されると考えられる(42)。一方、AGE 受容体にリガンド (AGE) が結合することが刺激となり、細胞内情報伝達系を通じて vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor- β (TGF- β)、platelet-derived growth factor (PDGF)などの細胞増殖因子の分泌 (43, 44, 45)、plasminogen activator の分泌(46)を誘発する。こうした AGE 受容体を介する種々の細胞現象が糖尿病合併症の促進因子と想定されている。

5-2-1. マクロファージスカベンジャー受容体クラス A (MSR-A)

アセチル化 LDL や酸化 LDL などの変性リポタンパク質をリガンドとする受容体として定義されるスカベンジャー受容体ファミリーの概念は、家族性高コレステロール血症の解析から LDL 受容体を発見した Brown と Goldstein らにより提唱され(47)、現在までに 10 種類の分子が同定されている (図-5) (48)。1990 年に Kodama らはウシ肺胞マクロファージから最初のスカベンジャー受容体ファミリーの一員として スカベンジャー受容体 AI 型、AII 型の同定に成功した(49)。MSR-A II 型を過剰発現させた CHO (Chinese hamster ovary) 細胞は、AGE の結合能および取り込み・分解能が有意に上昇したこと(37)、又、MSR-A II 欠損マウスから得られた腹腔マクロファージでは、コントロールに比して AGE の取り込み・分解活性が有意に減少することから MSR-A が AGE 受容体として同定された(50)。

MSR-A は単量体 70-80 kDa の糖タンパク質で通常 3 量体構造(220-250 kDa)をとる膜受容体である。遺伝子は 11 個のエクソンより構成されており、alternative splicing により I 型、II 型、III 型に分かれる(51)。N 端から細胞質内ドメイン、膜貫通ドメイン、スパーサードメイン、 α -helical coiled coil ドメイン、コラーゲンドメイン、システインリッチドメインの 6 つのドメインから構成される。受容体として機能するのは I 型、II 型で、III 型は転写されると I 型、II 型の発現を抑制し、dominant negative に作用する。 α -helical coiled coil ドメインは 163 アミノ酸からなる。このドメインは三量体構造の維持と酸性環境下での受容体に結合したリガンドの解離現象に必須な領域である。同部位は接着因子にも関与していると考えられ、MSR-A を認識するモノクローナル抗体 (2F8) は同ドメインに結合し、マクロファージの接着を抑制する(52)。

コラーゲンドメインはリガンドと結合するのに重要な部位である。

MSR-A はマクロファージ及びその関連細胞である Kupffer 細胞、liver endothelial cells (LECs)などに発現している。脳においては細動脈周囲に存在するマクロファージ系の Mato 細胞に発現している。I 型は単球からマクロファージに分化することにより顕著に発現が誘導されるのに対し、II 型は分化に際して有意な変動を示さない(53)。

5-2-II. OST-48・80K-H・galectin-3 複合体

Vang らは、ラット肝臓から 60 kDa と 90 kDa の AGE 結合タンパク質を分離した(54)。その後、60 kDa と 90 kDa 蛋白はそれぞれ OST-48 及び 80K-H と同一であることが判明した(40)。さらに、抗 80K-H 抗体を用いた expression cloning によって galectin-3 が同定された。OST-48、80K-H と galectin-3 が相互作用することにより、細胞膜上で安定な複合体を形成していると推測される(図-4)。OST-48 は、oligosaccharyl transferase のサブユニットの1つで、1カ所の膜貫通部位を持つ 48 kDa のタンパク質である(40)。80K-H は膜貫通部位を持たず細胞質分画に存在する 80 kDa のタンパク質である。さらに 80K-H は Protein Kinase C (PKC)の基質でもあり、実際 AGE によってリン酸化されることから、カルシウムやリン脂質依存性の細胞内情報伝達系との関わりが想定されている(55)。ガレクチン(galectin)はガラクトース結合性レクチンの総称で、膜貫通ドメインをもたない 14-36 kDa の可溶性のタンパク質である。galectin-3 は 32 kDa のタンパク質で、マクロファージ表面抗原 (Mac2)あるいは、IgE 結合蛋白ともよばれ AGE に直接結合するドメインであると考

えられている(56)。

5-2-III. RAGE (Receptor for AGE)

RAGE はウシ肺から分離精製された 35 kDa のタンパク質であり、80 kDa のラクトフェリン様タンパク質とともに細胞膜表面に存在する(57)。ヒト RAGE は N 端からアミノ酸 321 個の細胞外ドメイン、19 個の膜貫通ドメイン、41 個の C 端ドメインの合計 381 個のアミノ酸から構成されており、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。RAGE は肺胞上皮細胞のみならず、血管内皮細胞や腎メサンギウム細胞、赤血球、マクロファージなどにも発現が認められている(58, 59)。AGE と RAGE との結合により、ラット肺動脈平滑筋細胞において p21ras、mitogen activated protein kinase (MAPK)、ERK1、ERK2 の活性化をひきおこす(60)。また AGE が血管内皮細胞に発現している RAGE に結合すると NF- κ B が活性化される(8)。

5-2-IV. CD36

1993 年、Endemann ら(61)により、マウス腹腔マクロファージ cDNA ライブラリーから酸化 LDL に結合する分子として同定されたが、それはマクロファージの表面抗原として知られていた CD36 (glycoprotein IV)と同一のものであることが明らかになった。CD36 は 88 kDa の糖タンパク質で2つの膜貫通ドメインをもち、N 端、C 端には Cys の配置がみられる。CD36 は単球・マクロファージ、血小板、乳腺分泌上皮細胞、分化脂肪細胞、B リンパ球、数種の腫瘍細胞および内皮細胞の膜表面に発現している。単球での発現は

macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、interleukin-4 (IL-4)によって促進される。CD36 はトロンボスポンジンやコラーゲンを認識する血小板上の受容体として、血小板凝集に関与している (62, 63)。

2001 年、Ohgami らは CD36 過剰発現細胞を用いた解析から、CD36 が AGE をリガンドとして認識し AGE の取り込み・分解に導くことを明らかにし、CD36 は AGE 受容体の一つとして同定された(38)。

5-2-V. SR-BI

SR-BI は 1997 年に Acton ら(64)により、CHO 細胞の cDNA ライブラリーからアセチル化 LDL を認識する受容体としてクローニングされた 82-85 kDa の膜 2 回貫通型の糖タンパク質で、CD36 とのアミノ酸レベルでの相同性は約 30%である。ステロイド産生組織、肝臓、血管内皮細胞、マクロファージに発現している。SR-BI は高密度リポタンパク質(HDL)受容体として、HDL 中のコレステロールエステルを選択的に細胞に取り込むという特異な機能を有しており(65)、この機能が CD36 と大きく異なる(66)。SR-BI の cDNA を含むアデノウィルス Maus に静脈投与して肝細胞に過剰発現させると、血中 HDL レベルが激減する。これは肝臓への HDL のコレステロールエステル取り込み、ならびに胆汁へのコレステロール排泄の増加に依る(67)。このことから SR-BI が肝臓での HDL 受容体として、コレステロール逆転送系の最終ステップに関わる主要な分子であることが明確になった。

2001 年、Ohgami らは SR-BI 過剰発現細胞を用いた解析から、SR-BI が AGE をリガンドとして認識し、AGE の細胞取り込み・分解に導くことを明らかに

した。さらに AGE が SR-BI を介する HDL コレステロールエステルの選択的取り込みを阻害することを報告した。この報告は SR-BI が AGE 受容体であることを示すだけでなく、生体内の AGE が SR-BI を介したコレステロール逆転送系を阻害するという AGE の新しい病態生理学的意義を提唱している(39)。

5-3. レクチン様酸化 LDL 受容体 (LOX-1)

従来から血管内皮細胞に発現する酸化 LDL 受容体はマクロファージに発現するスカベンジャー受容体とは異なるものと考えられていたが、最近、発現クローニング法によりウシ大動脈血管内皮細胞に発現する酸化 LDL 受容体として lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)がクローニングされた(68)。

LOX-1 はレクチン様の構造を細胞外にもつ膜タンパク質であり、既知のスカベンジャー受容体のいずれとも構造類似性をもたない。ウシ LOX-1 は 50 kDa の糖タンパク質で疎水性の 26 アミノ酸残基を含む 270 アミノ酸から構成される細胞膜 1 回貫通型の膜タンパクである (図-6)。N 末端から細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、頸部ドメイン、レクチンドメインに区別される。細胞内ドメインは数カ所のリン酸化部位を有し、レクチンドメインは C 型レクチンファミリーの糖鎖認識部位とホモロジーをもち、酸化 LDL を認識するリガンド結合部位である。またヒト LOX-1 は 40 kDa のタンパク質でウシ LOX-1 とアミノ酸レベルで 72% の相同性をもつ(56)。とくにレクチンドメインでは 81% の相同性がみられる。さらに LOX-1 を発現する培養細胞では、その一部が細胞膜貫通領域近傍の細胞外ドメインにて何らかのプロテアーゼの作用に

より切断され、可溶性 LOX-1 として培地中に放出されることが明らかとなっている(69)。したがって、生体内においても可溶性 LOX-1 が産生され、その血中濃度は組織における LOX-1 発現の程度を反映し、動脈硬化の病態を推定しうる因子となる可能性がある。

LOX-1 の発現は胎盤、肺、脳、肝臓といった血管の豊富な臓器および内頸動脈粥状硬化巣の肥厚した内膜に認められ(68)、組織学的には初期動脈硬化病変の血管内皮細胞に認められている(70)。LOX-1 は酸化 LDL の取り込み・分解を行うとともに、リガンドとして老化赤血球(71)、アポトーシス細胞(71)、凝集血小板(72)、バクテリア(73)などを認識する。また LOX-1 の発現は tumor necrosis factor (TNF)などの炎症性刺激(74)、ずり応力(shear stress)などの血行力学的刺激(75)により誘導される。この LOX-1 の発現調節は MSR-A の発現が TNF などの炎症性刺激により負の調節をうけることと対照的である(76, 77)。また LOX-1 は血管内皮細胞のみならずマクロファージに発現することも確認されており(70, 78)、LOX-1 を介した酸化 LDL の取り込みがマクロファージの泡沫細胞化に関与する可能性も示唆される。LOX-1 と酸化 LDL の結合により惹起される細胞現象として、NF- κ B の活性化(79)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の発現誘導(80)、一酸化窒素(nitric oxide)の消退(81)、内皮細胞のアポトーシスの誘導(82)などがある。これらの現象により、動脈硬化の進展や心血管イベントの発症が促進される可能性が示唆されている。

5-4. 本研究の目的

AGE は、種々の AGE 受容体を介してエンドサイトーシスを受けたり、細胞に情報伝達したりすることが知られている。現在までに MSR-A、CD36、SR-BI、galectin-3 及び RAGE の 5 種類の AGE 受容体が報告されているが、LOX-1 が AGE 受容体として機能しうるか否かは、検討されていない。酸化 LDL やアセチル LDL のスカベンジャー受容体への結合にはリガンドのもつ陰性荷電が重要である。また種々のリガンドの LOX-1 への結合にもリガンドの持つ陰性荷電が重要であることが示されている。さらに AGE 自身も陰性荷電を持ち、MSR-A への結合はポリイノシン酸などのポリアニオンにより阻害されることが示されている。以上のことから LOX-1 が AGE をリガンドとして認識することが推測される。本研究では LOX-1 を過剰発現した CHO 細胞を用いて、LOX-1 が AGE をリガンドとして認識するかを検討し、さらにウシ大動脈血管内皮細胞を用いて内皮細胞に発現する AGE 受容体としての LOX-1 の意義を解析した。

6. 材料と実験方法

6-1. 試薬

ウシ血清アルブミン (BSA, Fraction V) は和光純薬 (大阪) の研究用特級を使用した。Ham's F12 medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、ペニシリン G およびストレプトマイシンは Life Technologies 社 (New York, USA) から購入した。Blastcidin-S はフナコシ (東京) から購入した。Na¹²⁵I は Amersham Pharmacia Biotech 社 (Buckinghamshire, UK) より購入した。SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)には 4-20 % acrylamide gel (第一化学、東京) を使用した。アガロース電気泳動には、Universal Gel/8 (ヘレナ社、浦和) を使用した。

6-2. リガンドの調製と放射性ヨード標識

ヒト LDL(d=1.019~1.063 g/ml)は、健康青年男子より早朝空腹時に採取した血漿を遠心にて分離し、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を含む生理食塩水 (pH 7.4) (EDTA-saline)にて透析して調製した。酸化 LDL (Ox-LDL) は、以下のような化学修飾を施したものをを用いた(83)。20 mM のリン酸緩衝液を含む生理食塩水 (pH 7.4) (phosphate-buffered saline; PBS) で透析して EDTA を除去した 20 mg のヒト LDL を PBS で 0.1 mg/ml に希釈し、5 μ M CuSO₄ と 20 時間、37°C で保温した。反応終了後、直ちに 1 mM EDTA を添加し、冷却した後、EDTA-saline で透析し、限外濾過法により濃縮した。蛋白濃度を BCA (bicinchoninic acid) protein assay reagent (Pierce Chemical 社, Rockford, USA)法にて測定し、アガロース

ゲル電気泳動を行った。AGE 化 BSA (AGE-BSA) は、以下のように調製した(84)。2.0 g の BSA を 1.6 M グルコースを含む 0.5 M ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) 10 ml に溶解し 37℃で 40 週間反応させた。20 mM ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) にて透析し、BCA 法にて蛋白濃度を測定し、アガロースゲル電気泳動と SDS-PAGE を行った。methylglyoxal 修飾 BSA (MG-BSA) は、2 mg/ml の BSA を 33 mM の methylglyoxal (Sigma 社、St. Louis, USA) と 37℃で 14 日間反応させ調製した。同様に glycolaldehyde 修飾 BSA(GA-BSA)は、2 mg/ml の BSA を 33 mM の glycolaldehyde (Sigma) と 37℃で 14 日間反応させ調製した。3-deoxyglucosone 修飾 BSA(3-DG-BSA)は、2 mg/ml の BSA を Madson らの方法(85)により作成した 33 mM の 3-deoxyglucosone と 37℃で 14 日間反応させ調製した。反応終了後、これら aldehyde 修飾 BSA を PBS にて透析し、BCA 法にて蛋白濃度を測定後、アガロースゲル電気泳動と SDS-PAGE を行った。

Ox-LDL は、McFarlane 法(86)で放射ヨード標識し、比活性 510 cpm/ng を得た。AGE-BSA を、Iodogen キット (Pierce Chemical 社) を用いて放射ヨード標識し、比活性 450 cpm/ng を得た。

6-3.アガロースゲル電気泳動

化学修飾した各リガンド (AGE-BSA、MG-BSA、GA-BSA、3DG-BSA) およびコントロールの BSA を BCA 法にて蛋白濃度を測定後、2 mg/ml に希釈した。各サンプル 1 μ l を Universal Gel/8 にアプライし、バルビタール緩

衝液 (0.05 mM sodium barbital, pH 8.6) で両電極槽を満たし、160 V で 20 分間、電気泳動した。泳動終了後、ゲルに CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色を施した。

6-4. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

化学修飾した各リガンド (AGE-BSA、MG-BSA、GA-BSA、3DG-BSA) とコントロールの BSA を BCA 法にて蛋白濃度を測定後、2 mg/ml に希釈し等量の 2×サンプル緩衝液 (125 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.02 % bromophenol blue, 750 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を添加して、3 分間、沸騰水中で加熱処理した。4-20 % acrylamide gel を泳動槽に装着し、泳動槽に泳動用緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1 % SDS, pH 8.4) を満たした。ゲルのウェルに分子量マーカー (第一化学、東京) および各サンプルを 5 μ l アプライし (5 μ g/lane)、40 mA で 100 分間泳動した後、CBB 染色を施した。

6-5. ウシ LOX-1 過剰発現細胞の調製

ウシ大動脈血管内皮細胞 (bovine aortic endothelial cells: BAEC) cDNA ライブラリーは mammalian expression vector pME18S により構築された。この BAEC cDNA ライブラリーから、ウシ LOX-1 (bovine LOX-1; BLOX-1) cDNA を RT-PCR (reverse-transcriptase mediated polymerase chain reaction) 法により増幅し、pSV2bsr 発現ベクター (Funakoshi, Japan) に挿入した。発現ベクターを calcium-phosphate transfection 法により CHO-

K1 細胞に導入し、Blasticidin-S 耐性細胞を導入細胞として選択した(68)。得られた BLOX-1 過剰発現細胞 (BLOX-1-CHO 細胞) は 10 % ウシ胎児血清 (fetal calf serum: FCS) と 10 μ g/ml Blastcidin-S を添加した Ham's F12 培地を用い CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂) 内で培養した。

6-6. ウシ大動脈血管内皮細胞の分離及び培養

ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)の分離と培養は、ウシ大動脈からの分離・培養法に基づき、一部改変を加え行った(68)。ウシ大動脈を屠殺場から入手し 0.1 mg/ml streptomycin、100 units/ml penicillin を含む DMEM 培地(培地 A)に浸し氷冷した。血管を数回洗浄し、ピンセットとハサミで血管外膜に付着している脂肪や軟部組織を取り除いた。血管の両端を約 0.5 cm 切り裂き、血管を縦方向に切り開き血管片表面に培地 A を流したあと、メスで血管片にあて、内皮細胞層だけを薄く剥離した。剥離した内皮細胞は 10 % FCS を含む培地 A (培地 B) に浮遊させた。遠心分離 (800 x g、5 分) によって細胞を集め、培地 B に再浮遊し播種した。2 - 3 日後、内皮細胞がコロニーを形成したとき培地を交換し、コンフルエントになるまで 2 - 3 日おきに培地を交換した。9-10 代の継代の後に実験に用いた。

6-7. 抗体

抗ウシ LOX-1 モノクローナル抗体 (anti-BLOX-1 antibody) の作製のために、まずウシ LOX-1 ペプチドの細胞外領域の一部 (アミノ酸残基: 61-270) をコードする遺伝子を PCR により増幅した。この断片を制限酵素 Bam HI で

処理して、 pQE10 vector (QIAGEN) に挿入し、大腸菌でウシ LOX-1 の細胞外領域を発現させた。発現したウシ LOX-1 の細胞外領域を QIA express 法 (QIAGEN) により合成・精製した。得られたタンパク質を抗原としてマウスに免役し、enzyme-linked immunosorbent assay によるスクリーニングでモノクローナル抗体産性細胞を得た。得られたクローンの中から ^{125}I -Ox-LDL の BLOX-1-CHO への結合を抑制する抗体を産生するクローンを選択し、抗 BLOX-1 抗体として確立した(68)。

6-8. BLOX-1-CHO 細胞による標識リガンド分解の解析

BLOX-1-CHO 細胞(4×10^4 cells)を 24-well プレート (直径 15 mm) に播種し、培地 B で 2 日間培養した。細胞を PBS にて洗浄後、400 μl の培地 (3% BSA, 0.1 mg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin を含む DMEM 培地; 培地 C) を添加した。過剰量の非標識リガンドの存在下および非存在下で、 ^{125}I 標識リガンド(^{125}I -Ox-LDL または ^{125}I -AGE-BSA)を添加し、全培養液量を 500 μl にあわせ 6 時間 CO_2 インキュベーター (37°C、5% CO_2) 内に静置し、反応させた。反応終了後直ちに 375 μl の培養上清を試験管に移し、これに 40% trichloroacetic acid (TCA) を 150 μl 、及び 0.7 M AgNO_3 を 100 μl 加え振盪した。2500 x g にて 10 分間遠心後、上清を 250 μl 採取し酸可溶性の放射活性を細胞内分解量として測定した。次に、プレート内の残りの培養液 250 μl を吸引、廃棄した。プレート上の細胞を 1% BSA 添加 PBS で 2 回洗浄した。更に PBS にて 2 回洗浄後、500 μl の 0.1 N NaOH を各ウェルに添加し、37°C で 40 分間保温し細胞を可溶化した。得られた細胞抽出液を試験管に移

し、その一部を BCA 法により蛋白濃度を測定し、リガンドの細胞分解量を細胞蛋白で補正した。

特異的細胞分解量の算定は、標識リガンドのみを添加した場合の細胞分解量 (total) から、過剰量の非標識リガンドの存在下における細胞分解量 (non-specific) を引いた値を特異的細胞分解量として算定した(37)。

6-9. 培養細胞を用いた ^{125}I 標識リガンドの結合実験

BLOX-1-CHO 細胞(4×10^4 cells)あるいはウシ大動脈血管内皮細胞(8×10^4 cells)を 24-well プレート (直径 15 mm) に播種し、培地 B で2日間培養した。細胞を PBS にて洗浄後、培養液を $400 \mu\text{l}$ の培地 C に交換した。過剰量の非標識リガンド存在下または非存在下、あるいは抗 BLOX-1 抗体またはコントロールマウス IgG 存在下で、 ^{125}I 標識リガンド(^{125}I -Ox-LDL または ^{125}I -AGE-BSA)を添加し、全培養液量を $500 \mu\text{l}$ にあわせ、90 分間、氷上で静置した。培養上清を吸引、廃棄した後、プレート上の細胞を 1% BSA 添加 PBS で2回洗浄し、さらに PBS で2回洗浄した。その後、 $500 \mu\text{l}$ の 0.1 N NaOH を各ウェルに添加し、 37°C で40分間保温し細胞を可溶化した。細胞抽出液を試験管に移し、放射活性を細胞結合量として測定した。さらに細胞抽出液の一部を BCA 法により蛋白濃度を測定し、リガンドの細胞分解量を細胞蛋白で補正した。

特異的な結合量の算出は、標識リガンドのみを添加した場合の結合量 (total) から、過剰量の非標識リガンドの存在下での結合量 (non-specific) を差し引くことより求めた(45)。過剰量の非標識リガンドの濃度は、標識リガンドの最高

濃度 の 50 倍ないしそれ以上の一定の濃度とした。

7. 実験結果

7-1. リガンドの修飾

本研究で使用した AGE-BSA、MG-BSA、GA-BSA 及び 3DG-BSA はアガロースゲル電気泳動では非修飾 BSA よりも陰性荷電の増加が認められた (図-7)。SDS-PAGE では、MG-BSA、GA-BSA、3DG-BSA はアミノ酸残基が修飾されたことによる見かけ上の分子量の増加がみられた。3DG-BSA、MG-BSA、GA-BSA、AGE-BSA は分子間架橋形成による重合のため分子量が増大し、とくに AGE-BSA は一部スメアー状を呈した (図-8)。

7-2. Ox-LDL の BLOX-1-CHO 細胞への結合

放射性ヨード標識した Ox-LDL (^{125}I -Ox-LDL) の BLOX-1-CHO 細胞への 4℃ における結合を、過剰量の非標識 Ox-LDL 存在下 (non-specific) あるいは非存在下 (total) に検討した。Total から non-specific を差し引いた特異的な結合は、用量に依存した飽和曲線を呈した。その Scatchard plot 解析より、Kd 値は 6.6 $\mu\text{g/ml}$ 、Bmax 値は 339 ng/mg cell protein と求められた (図-9)。

7-3. AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合

放射性ヨード標識した AGE-BSA (^{125}I -AGE-BSA) の BLOX-1-CHO 細胞への 4℃ における結合を、過剰量の非標識 AGE-BSA 存在下 (non-specific) あるいは非存在下 (total) に検討した。Total から non-specific を差し引いた特異的な結合は、用量に依存した飽和曲線を呈した。その Scatchard plot 解析より、Kd 値は 9.8 $\mu\text{g/ml}$ 、Bmax 値は 47.5 ng/mg cell protein と求められ

た (図-10)。

7-4. BLOX-1-CHO 細胞による AGE-BSA および Ox-LDL の細胞分解

次に、37℃における BLOX-1-CHO 細胞による ^{125}I -AGE-BSA および ^{125}I -Ox-LDL の分解を、過剰量の非標識リガンド存在下(non-specific)あるいは非存在下(total)に検討した。Total から non-specific を差し引いた特異的な BLOX-1-CHO 細胞による ^{125}I -AGE-BSA の分解は認められなかった。一方、コントロールとしておこなった ^{125}I -Ox-LDL の分解実験では、BLOX-1-CHO 細胞による有意な ^{125}I -Ox-LDL の分解が認められた (図-11)。

7-5. AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対する各種リガンド並びに抗 BLOX-1 抗体の効果

^{125}I -AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対する種々の aldehyde 修飾 BSA 並びに抗 BLOX-1 抗体の阻害効果を検討した。methylglyoxal、glycolaldehyde、3-deoxyglucosone はメイラード反応の中間体といわれている。さらにこれまで GA-BSA(27)、MG-BSA (87) がマクロファージに受容体を介して取り込まれ、分解されることが報告されている。そこで BLOX-1-CHO 細胞への ^{125}I -AGE-BSA の 4℃での結合に対する種々の aldehyde 修飾 BSA (MG-BSA、GA-BSA、3-DG-BSA)の阻害効果を測定した。結果として MG-BSA と GA-BSA が非標識 AGE-BSA と同様、80%の阻害活性を示した。3-DG-BSA は BLOX-1-CHO 細胞への ^{125}I -AGE-BSA の結合を阻害せず、

リガンド活性に乏しかった (図-12)。

抗 BLOX-1 抗体は精製のスクリーニング時に BLOX-1 への Ox-LDL の結合を抑制する抗体として確立されている(68)。BLOX-1-CHO 細胞への ¹²⁵I-AGE-BSA の 4℃での結合に対する抗 BLOX-1 抗体の効果を検討したところ 60%の抑制がみられた。一方、対照としておいたマウス IgG では抑制はみられなかった (図-12)。

7-6. Ox-LDL の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対する各種リガンド並びに抗 BLOX-1 抗体の効果

7-5 と同様に BLOX-1-CHO 細胞への ¹²⁵I-Ox-LDL の 4℃における結合に対する種々の aldehyde 修飾 BSA および抗 BLOX-1 抗体の効果を検討した。結果として AGE-BSA は ¹²⁵I-Ox-LDL の BLOX-1-CHO 細胞への結合を 25%しか抑制しなかった。さらに MG-BSA、GA-BSA および 3-DG-BSA も AGE-BSA と同様、部分阻害にとどまった (図-13)。

これまでの報告のとおり Ox-LDL の BLOX-1-CHO 細胞への結合は抗 BLOX-1 抗体により 70 %抑制された。一方、対照としておいたマウス IgG では抑制はみられなかった (図-13)。

7-7. AGE-BSA のウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)への結合

AGE-BSA と初代培養細胞に発現する LOX-1 との結合の有無をみるために、LOX-1 が発現することが知られている BAEC との結合をみた。まず放射性ヨード標識した AGE-BSA (¹²⁵I-AGE-BSA) の 4℃における BAEC への結合を

過剰量の非標識 AGE-BSA 存在下(non-specific)あるいは非存在下(total)に検討した。Total から non-specific を差し引いた特異的な結合は、 ^{125}I -AGE-BSA 用量に依存した飽和曲線を呈した。その Scatchard plot 解析より、 K_d 値は $2.6 \mu\text{g/ml}$ 、 B_{max} 値は $226 \text{ ng/mg cell protein}$ と求められた (図-14)。

次に AGE-BSA の BAEC への結合に対する抗 BLOX-1 抗体の阻害効果を検討した。 ^{125}I -AGE-BSA の BAEC への結合は過剰量の非標識 AGE-BSA により 75 %抑制された。この実験系で、抗 BLOX-1 抗体あるいはマウス IgG の効果を検討すると、抗 BLOX-1 抗体は ^{125}I -AGE-BSA の結合を 50 %抑制したが、コントロール IgG は全く阻害しなかった (図-15)。この結果から BLOX-1 を介する AGE-BSA の結合は全体の特異的結合のうち 3 分の 2 を占めていることが示唆される。

8. 考察

本研究において、LOX-1 過剰発現細胞およびウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC)を用いて LOX-1 が AGE 受容体として機能するか否かを解析した。結果として BLOX-1-CHO 細胞への ^{125}I -AGE-BSA の特異的な結合 (図-10) がみられた。この ^{125}I -AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合は抗 BLOX-1 抗体により有意に抑制された (図-12)。さらに BAEC においても AGE の特異的な結合がみられ (図-14)、その結合は抗 BLOX-1 抗体により有意に抑制された (図-15)。以上の結果から LOX-1 は Ox-LDL 以外にも AGE-BSA を認識する AGE 受容体であると考えられた。これまで MSR-A、CD36、SR-BI が AGE をリガンドとして認識するスカベンジャー受容体として報告されていたが、スカベンジャー受容体ファミリーのひとつである LOX-1 も AGE をリガンドとすることが示された。また、LOX-1 に結合した Ox-LDL は BLOX-1-CHO 細胞による細胞分解を受けたが、対照的に AGE-BSA は LOX-1 に結合した後、有意な細胞分解をうけなかった (図-11)。この結果は、AGE-BSA が LOX-1 に結合するがエンドサイトーシスを受けない可能性を示唆する。あるいは LOX-1 に結合した AGE はエンドサイトーシスを受けるが、リソソームに到達せず細胞外に排出される可能性も否定できない。

LOX-1 は構造的に異なる様々なリガンドを認識する多機能分子であることが知られている。リガンドとして Ox-LDL(68)、老化赤血球(71)、アポトーシス細胞(71)、凝集血小板(72)、バクテリア(73)が同定されている。LOX-1 がこれらのリガンドのどのような構造を認識しているのかについては明らかではないが、これらのリガンドに共通な特徴として陰性に荷電している点が挙げられ

る(71)。さらに LOX-1 の持つ塩基性のアミノ酸が陰性荷電を持つリガンドとの結合に重要であることが示されている(88)。AGE-BSA はリジン・アルギニン残基が修飾され既知の LOX-1 リガンドと同様に陰性に荷電している(27, 89)。以上から、AGE-BSA が LOX-1 にリガンドとして認識されることが予想され、これが実験的に示された (図-10, 12)。Ox-LDL や AGE は陰性荷電を認識している LOX-1 の部位に結合している可能性が高い。

¹²⁵I-AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対して、MG-BSA や GA-BSA などの種々の aldehyde 修飾 AGE が非標識 AGE-BSA と同様の阻害活性を示し (図-12)、LOX-1 のリガンドとして挙動することが明らかになった。MG-BSA はマクロファージ由来 P388D1 細胞による取り込み・分解をうけることが知られている(87)。LOX-1 はマウスの腹腔マクロファージに発現することが報告されており(78)、LOX-1 が P388D1 マクロファージにおける MG-BSA のエンドサイトーシスに関与している可能性がある。GA-BSA は MSR-A にリガンドとして認識されるが MG-BSA は MSR-A に認識されないということが報告されている(27)。methylglyoxal 修飾あるいは glycolaldehyde 修飾タンパク質は CEL(23)や imidazolone(90)などいくつかの AGE を形成することがいわれているが、LOX-1 に特異的に結合する AGE 構造体はまだ不明であり、今後の検討が必要である。又、AGE 受容体の一つである RAGE に関しては AGE 構造体のひとつである CML がリガンドとなり、NF- κ B を活性化することが報告されている(91)。

Ox-LDL や AGE-BSA はいずれも BLOX-1-CHO 細胞に結合するが、¹²⁵I-AGE-BSA の BLOX-1-CHO 細胞への結合に対して非標識 Ox-LDL はその 80%

を抑制するが (図-12)、一方、 ^{125}I -Ox-LDL の BLOX-I-CHO 細胞への結合に対して非標識 AGE-BSA は 25%しか抑制しなかった (図-13)。このように同じ受容体に結合する異なるリガンドが、必ずしも相互的な競合関係にない現象を non-reciprocal cross-competition と呼んでおり、MSR-A でもみられる現象である (92)。酸化 LDL とアセチル化 LDL はともに MSR-A 過剰発現細胞に特異的に結合するが、酸化 LDL の結合はアセチル化 LDL により 90 % 以上抑制されるが、アセチル化 LDL の結合は酸化 LDL により 25-45 %抑制されるにとどまった(93)。クラス B スカベンジャー受容体に属する SR-BI は、HDL を認識し、HDL コレステロールエステルを選択的に取り込む作用をもつが(64)、最近 AGE をもリガンドとして認識することが明らかになった(39)。AGE-BSA と HDL の SR-BI への結合の競合阻害実験で、AGE-BSA と HDL の両者とも互いに他方のリガンドの結合を全く抑制しなかった(39)。このことから AGE-BSA と HDL は SR-BI の異なる結合サイトに結合していることが考えられる。このような競合試験における non-reciprocal cross-competition はスカベンジャー受容体一般にみられる特徴である (92)。

本研究における生理的に最も重要な意義として、AGE-BSA の BAEC への結合の一定部分は LOX-1 に依存するという結果から (図-16)、LOX-1 が血管内皮細胞に発現する AGE 受容体の一つであることを示した点があげられる。これまで一般に RAGE が血管内皮細胞に発現する代表的な AGE 受容体とされていた。高脂血症に伴う著明な動脈硬化病変を形成するアポ E ノックアウトマウスにストレプトゾトシンによる糖尿病を誘発すると、動脈硬化病変の形成は顕著に促進される。このときマウスの腹腔に可溶性 RAGE (sRAGE) を投与

すると、糖尿病により促進された動脈硬化の病変形成が抑制されることが報告されている(94)。血漿中あるいは組織の AGE が sRAGE と結合することにより、AGE と RAGE の結合が阻害され、動脈硬化の進展が抑制されたものと考えられる。これに関連して、本研究では BAEC に発現する BLOX-1 が AGE をリガンドとして認識することを明らかにし、RAGE とは独立して LOX-1 が血管内皮細胞に発現する AGE 受容体として機能していることが示された。糖尿病を誘発したアポ E ノックアウトマウスに対する sRAGE の抗動脈硬化作用は、sRAGE が AGE と RAGE の結合を阻害するだけでなく、AGE と LOX-1 の結合を阻害することによって生じているのかもしれない。この問題に関するより深い理解を得るためには、Ox-LDL が LOX-1 に結合することにより引き起こされる様々な細胞現象、すなわち活性酸素の上昇による NF- κ B の活性化(79)、MCP-1 発現誘導による単球の遊走促進(80)、内皮細胞のアポトーシス(82)などが AGE によっても惹起されるか否かについてのさらなる検討が必要であろう。

9. 結語

本研究では、ウシ LOX-1 を過剰発現した CHO 細胞(BLOX-1-CHO)における AGE の結合並びに細胞分解、ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)における AGE の結合を検討した。AGE は、BLOX-1-CHO 細胞に特異的な結合を示したが、細胞分解はうけなかった。AGE と BLOX-1 の結合は抗 BLOX-1 抗体により効果的に抑制された。また AGE は BAEC と特異的な結合を示し、抗 BLOX-1 抗体により部分的に抑制された。

以上の実験結果から、LOX-1 は血管内皮細胞に発現するあらたな AGE 受容体として同定された。またこれまで LOX-1 と動脈硬化の関連が提唱されていたが、今回の結果から AGE と LOX-1 との相互作用により糖尿病性血管合併症が促進される可能性が示唆された。

10. 参考文献

- (1) Yabe-Nishimura C. (1998) Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. (Review) *Pharmacol. Rev.* 50, 21-33.
- (2) Glassman. A.B. (1993) Platelet abnormalities in diabetes mellitus. (Review) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 23, 47-50.
- (3) Auwerx, J., Bouillon, R., Collen, D., et al. (1988) Tissue-type plasminogen activator antigen and plasminogen activator inhibitor in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis.* 8, 68-72.
- (4) Matsuda, T., Morishita, E., Jokaji, H., et al. (1996) Mechanism on disorders of coagulation and fibrinolysis in diabetes. (Review) *Diabetes.* 45 Suppl 3:S109-10.
- (5) Koya, D., King, G.L. (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. (Review) *Diabetes* 47, 859-866.
- (6) Kashiwagi, A., Asahina, T., Ikebuchi, M., et al. (1994) Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia.* 37, 264-269.
- (7) Kaneto, H., Fujii, J., Suzuki, K., et al. (1994) DNA cleavage induced by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochem. J.* 304, 219-225.
- (8) Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., et al. (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 9889-9897.
- (9) Makino, H., Shikata, K., Hironaka, K., et al. (1995) Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 48, 517-526.
- (10) McCance, D.R., Dyer, D.G., Dunn, J.A., et al. (1993) Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 91, 2470-2478.
- (11) Vlassara, H., Bucala, R., Striker, L. (1994) Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. (Review) *Lab. Invest.* 70, 138-151

- (12) The diabetes control and complications trial research group (DCCT). (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986.
- (13) Maillard, L. C. (1912) Action des acides amines sur les sures ; formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Acad. Sci.* 154, 66-68.
- (14) Rahbar, S. (1968) An abnormal hemoglobin in red cells of diabetes. *Clin. Chim. Acta.* 22, 296-298.
- (15) Gottschalk, A. (1972) Interaction between reducing sugars and amino acids under neutral and acid conditions. *The glycoprotein* (Gottschalk, A. eds.) 141. Elsevier, New York.
- (16) Baynes, J. W., Thorpe, S. R., Murashaw, M. W. (1984) Nonenzymatic glycosylation of lysine residues in albumin. *Posttranslational Modifications* (World, F. eds.) 103, 88, Academic Press, New York.
- (17) Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. (1988) Advanced products of nonenzymatic glycosylation and pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes/Metab. Rev.* 4, 437-451.
- (18) Brownlee, M., Vlassara, H., Cerami, A. (1984) Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.* 101, 527-537.
- (19) Miyata, T., Ueda, Y., Shinzato, T., et al. (1996) Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patient with end stage renal failure : renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1198-1206.
- (20) Sell, D. R., Monnier, V. M. (1989) Structure elucidation of a senescence crosslink from human extracellular matrix: implication of pentoses in the aging process. *J. Clin. Invest.* 85, 380-384.
- (21) Ienaga, K., Nakamura, K., Hochi, T., et al. (1995) Crosslines, fluorophores in the AGE-related cross-linked proteins. *Contrib. Nephrol.* 112, 42-51.
- (22) Ahmed, M. U., Thorpe, S., Baynes, J. W. (1986) Identification of N^ε-carboxymethyllysine as a degradation products of fructose-lysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* 261, 4889-4894.
- (23) Ahmed, M. U., Frye, E. B., Degenhardt, T. P., et al. (1997) N-epsilon-

- (carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 324, 565-570.
- (24) Hayase, F., Nagaraj, R. H., Miyata, S., et al. (1989) Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. *J. Biol. Chem.* 264, 3758-3764.
- (25) Niwa, T., Katsuzaki, T., Miyazaki, S., et al. (1997) Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 99, 1272-1280.
- (26) Thornalley, P. J., Langborg, A., Minhas, H. S. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, 344, 109-116.
- (27) Nagai, R., Matsumoto, K., Ling, X., et al. (2000) Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes* 49, 1714-1723.
- (28) Niwa, T., Takeda, N., Yoshizumi, H., et al. (1993) Presence of 3-deoxyglucosone, a potent protein crosslinking intermediate of Maillard reaction, in diabetic serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 837-843.
- (29) Okado, A., Kawasaki, Y., Hasuike, Y., et al. (1996) Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 219-224.
- (30) Che, W., Asahi, M., Takahashi, M., et al. (1997) Selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 18453-18459.
- (31) Niwa, T. (1999) 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication (review). *J. Chromatogr. B.* 731, 23-36.
- (32) Glomb, M. A., Monnier, V. M. (1995) Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem.* 270, 10017-10026.
- (33) Hayashi, T., Nase, S., Namiki, M. (1986) Formation of three-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amines or

- amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 50. 1959-1964.
- (34) McLellan, A. C., Thornalley, P. J., Benn, J., et al. (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin. Sci. (Lond)*. 87, 21-29.
- (35) Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., et al. (1999) Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J. Biol. Chem.* 274. 18492-18502.
- (36) Frye, E. B., Degenhardt, P. T., Thorpe, S. R., et al. (1998) Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 18714-18719.
- (37) Araki, N., Higashi, T., Mori, T., et al. (1995) Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur. J. Biochem.* 230. 408-415.
- (38) Ohgami, N., Nagai, R., Ikemoto, M., et al. (2001) CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276. 3195-3202.
- (39) Ohgami, N., Nagai, R., Miyazaki, A., et al. (2001) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276, 13348-13355.
- (40) Li, Y. M., Mitsuhashi, T., Wojciechowicz, D., et al. (1996) Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: Relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93. 11047-11052.
- (41) Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., et al. (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 14998-15004.
- (42) Pastan, I., Willingham, C. (1985) The pathway of endocytosis. In *Endocytosis*. (Pastan, I. and Willingham, C. eds.), 1-44, Plenum Press, New York.
- (43) Doi, T., Vlassara, H., Kirsstein, M., et al. (1992) Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2873-2877.
- (44) Yamagishi, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., et al. (1997) Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube

- formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 272, 8723-8730.
- (45) Higashi, T., Sano, H., Saishoji, T. et al. (1997) The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* 46, 463-472.
- (46) Saishoji, T., Higashi, T., Araki, N., et al. (1995) Advanced glycation end products stimulate plasminogen activator activity via GM-CSF in RAW 264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 278-285.
- (47) Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, K., et al. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 333-337.
- (48) Steinbrecher, U. (1999) Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436, 279-298.
- (49) Kodama, T., Freeman, N., Rohrer, L., et al. (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343, 531-535.
- (50) Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., et al. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 386, 292-296.
- (51) Emi, M., Asaoka, H., Matsumoto, A., et al. (1993) Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J. Biol. Chem.* 268, 2120-2125.
- (52) Fraser, I., Hughes, D., Gordon, S. (1993) Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* 364, 343-346.
- (53) Geng, Y., Kodama, T., Hansson, G. K. (1994) Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb.* 14, 798-806.
- (54) Yang, Z., Makita, Z., Horii, Y. et al. (1991) Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycation endproducts : relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J. Exp. Med.* 174, 515-524.

- (55) Shitt, A. W., He, C., Vlassara, H. (1999) Characterization of the advanced glycation endproduct receptor complex in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 549-556.
- (56) Vlassara, H., Li, Y. M., Imani, F., et al. (1995) Identification of galectin-3 as a high affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE); a new member of the AGE-receptor complex. *Mol. Med.* 1, 634-646.
- (57) Schmidt, A. M., Vianna, M., Gerlach, M., et al. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* 267, 14987-14997.
- (58) Brett, J., Schmidt, A., Yan, S., et al. (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am. J. Pathol.* 143, 1699-1712.
- (59) Yamagishi, S., Yamamoto, Y., Harada, S., et al. (1996) Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS. Lett.* 384, 103-106.
- (60) Lander, H. M., Tauras, J. M., Ogiste, J. S., et al. (1997) Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21^{ras}-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J. Biol. Chem.* 272, 17810-17814.
- (61) Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., et al. (1993) CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 11811-11816.
- (62) Silverstein, R. L., Asch, A. S., Nachman, R. L. (1989) Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* 84, 546-552.
- (63) Silverstein, R. L., Baird, M., Lo, S. K., et al. (1992) Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 16607-16612.
- (64) Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., et al. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 21003-21009.

- (65) Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., et al. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 271. 518-520.
- (66) Connelly, M. A., Klein, S. M., Azhar, S., et al. (1999) Comparison of class B scavenger receptors. CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI). shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J. Biol. Chem.* 274. 41-47.
- (67) Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., et al. (1997) Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 387. 414-417.
- (68) Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., et al. (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386, 73-77.
- (69) Murase, T., Kume, N., Kataoka, H., et al. (2000) Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 715-720.
- (70) Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., et al. (1999) Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*. 99, 3110-3117.
- (71) Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., et al. (1998) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95. 9535-9540.
- (72) Kakutani, M., Masaki, T., Sawamura, T. (2000) A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 97. 360-364.
- (73) Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., et al. (2001) LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Immunol.* 166. 5108-5114.
- (74) Kume, N., Murase, T., Moriwaki, H., et al. (1998) Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 83. 322-327.
- (75) Murase, T., Kume, N., Korenaga, R., et al. (1998) Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 83, 328-333.

- (76) van Lenten, B.J., Fogelman, A.M. (1992) Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 148, 112-116.
- (77) Hsu, H.Y., Nicholson, A.C., Hajjar, D.P. (1996) Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J. Biol. Chem.* 271, 7767-7773.
- (78) Moriwaki, H., Kume, N., Kataoka, H., et al. (1998) Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha. *FEBS Lett.* 440, 29-32.
- (79) Cominacini, L., Pasini, A.F., Garbin, U., et al. (2000) Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 275, 12633-12638.
- (80) Li, D., Mehta, J.L. (2000) Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 101, 2889-2895.
- (81) Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A.F., et al. (2001) The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J. Biol. Chem.* 276, 13750-13755.
- (82) Li, D., Mehta, J.L. (2000) Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 1116-1122.
- (83) Sakai, M., Miyazaki, A., Hakamata, H., et al. (1994) Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 269, 31430-31435.
- (84) Takata, K., Horiuchi, S., Araki, N., et al. (1988) Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J. Biol. Chem.* 263, 14819-14825.
- (85) Madson, M., Feather, M.S. (1981) An improved preparation of 3-deoxy-D-

- erthro-hexo-2-ulose via the Bis (benzoylhydrazone) and some related constitutional studies. *Carbohydr. Res.* 94. 183-191.
- (86) McFarlane, A. S. (1958) Efficient trace labeling of proteins with iodine. *Nature* 28. 53.
- (87) Westwood, M. E., McLellan, A. C., Thornalley, P. J. (1994) Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin. *J. Biol. Chem.* 269, 32293-32298.
- (88) Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., et al. (2001) Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 499. 215-219.
- (89) Lo, T. W., Westwood, M. E., McLellan, A. C., et al. (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha- acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 269, 32299-32305.
- (90) Westwood, M. E., Thornalley, P. J. (1995) Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J. Protein. Chem.* 14, 359-372.
- (91) Kislinger, T., Fu, C., Huber, B., et al. (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 31740-31749.
- (92) Krieger, M., Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601-637.
- (93) Freeman, M., Ekkel, Y., Rohrer, L., et al. (1991) Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 88, 4931-4935.
- (94) Park, L., Raman, K.G., Lee, K.J., et al. (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 4, 1025-1031.

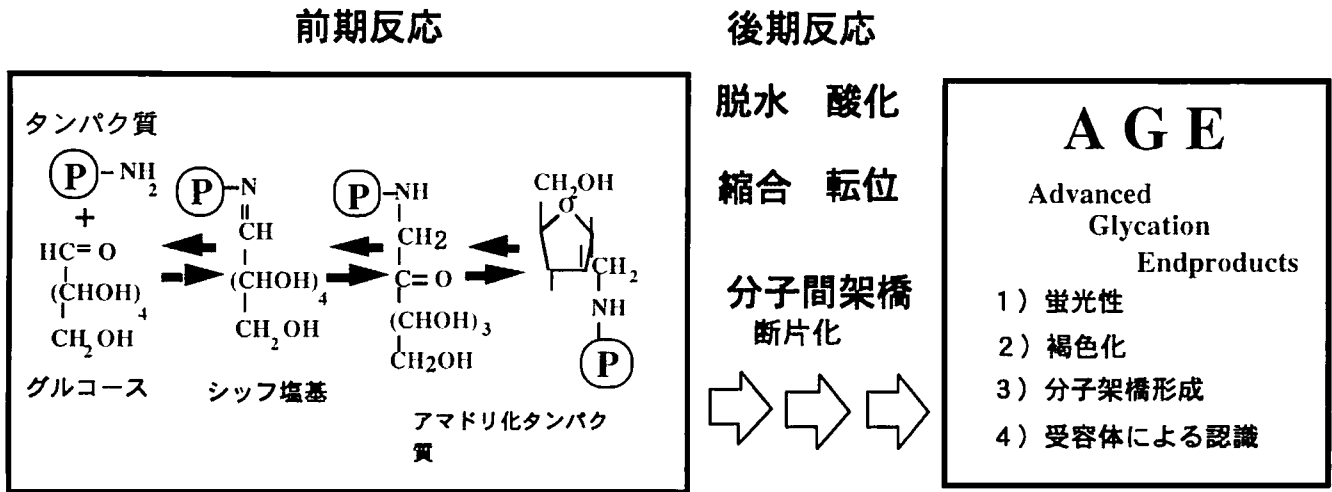
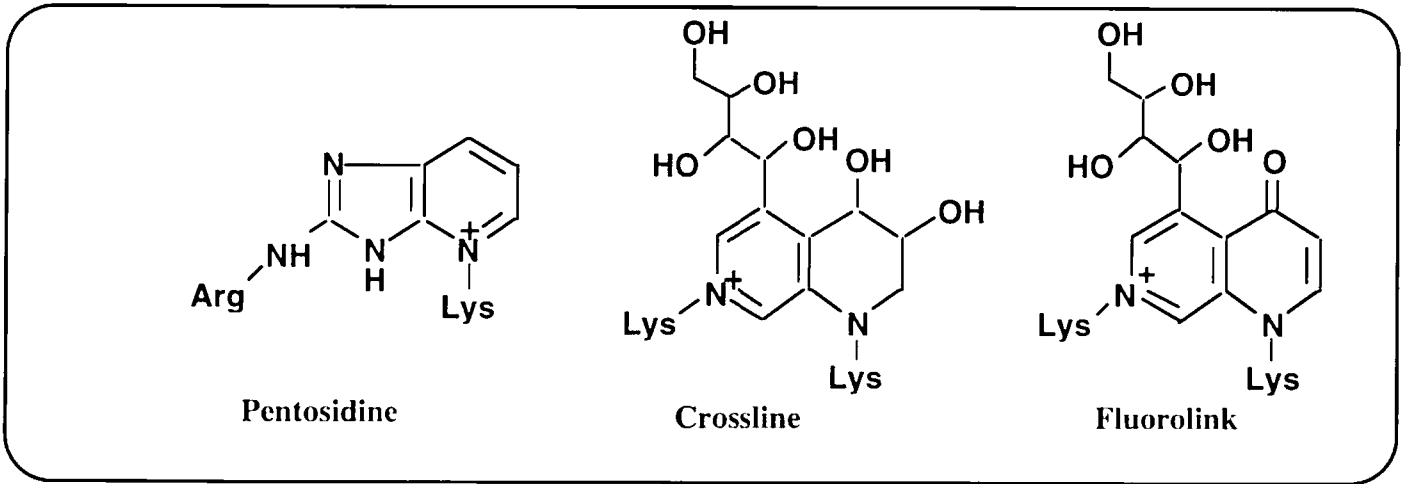


図-1: メイラード反応

グルコースなどの還元糖とタンパク質のN-末端のアミノ基あるいはリジンのε-アミノ基が反応して、まず可逆性のシッフ (Schiff) 塩基をつくり、ついで、分子内転位を起こして安定なアマドリ (Amadori) 化タンパク質をつくる。これが更に酸化・脱水・縮合・環状化などの反応を経て、蛍光・褐色・架橋構造・生物学的活性などの特性を有する後期反応生成物 (AGE) に至る

蛍光性・架橋性



非蛍光性・非架橋性

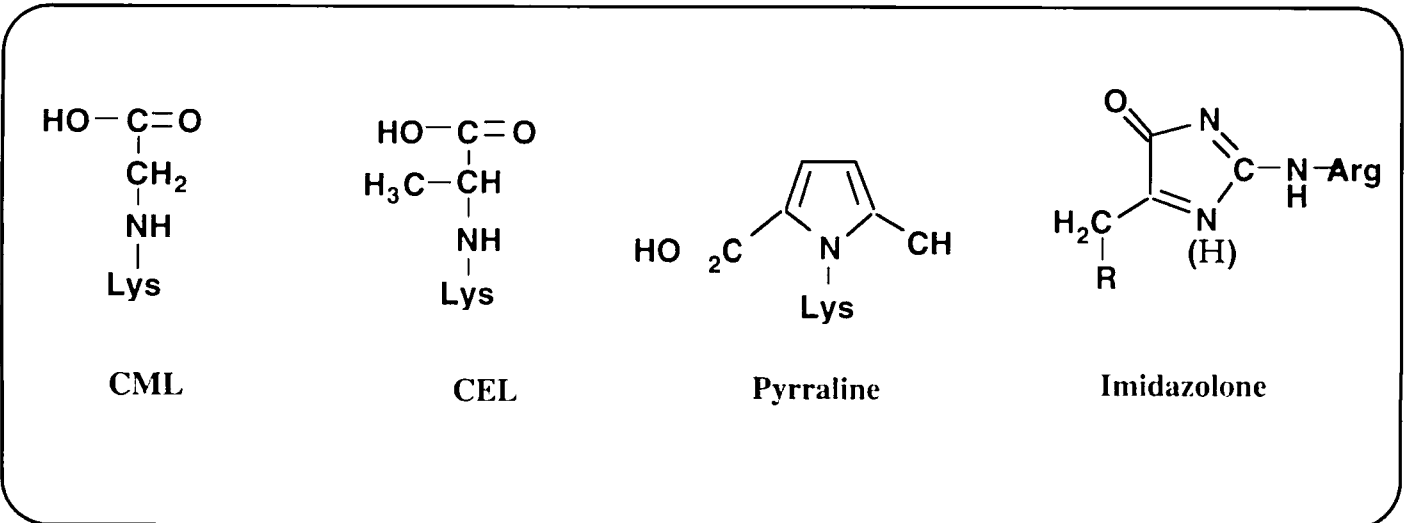


図-2: 生体内に存在するAGE構造体

AGE構造体は蛍光性・架橋性と非蛍光性・非架橋性の2つのグループに分類される。

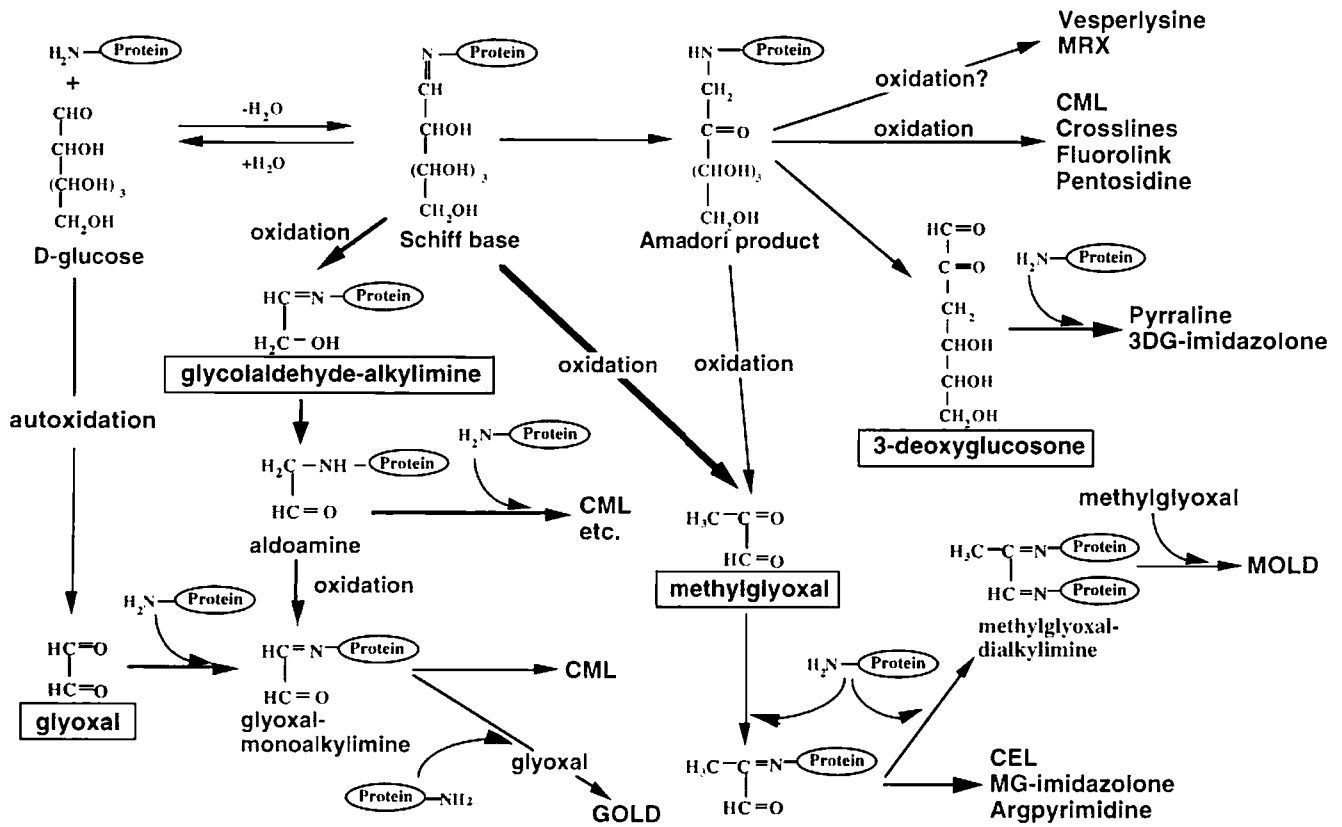


図-3: メイラード反応中間体

メイラード反応中にメチルグリオキサール、グリオキサール、3-デオキシグルコソール、グリコールアルデヒドといったアルデヒド中間体が形成され、アルデヒド中間体とタンパク質の反応によりAGEが形成される。

図-4

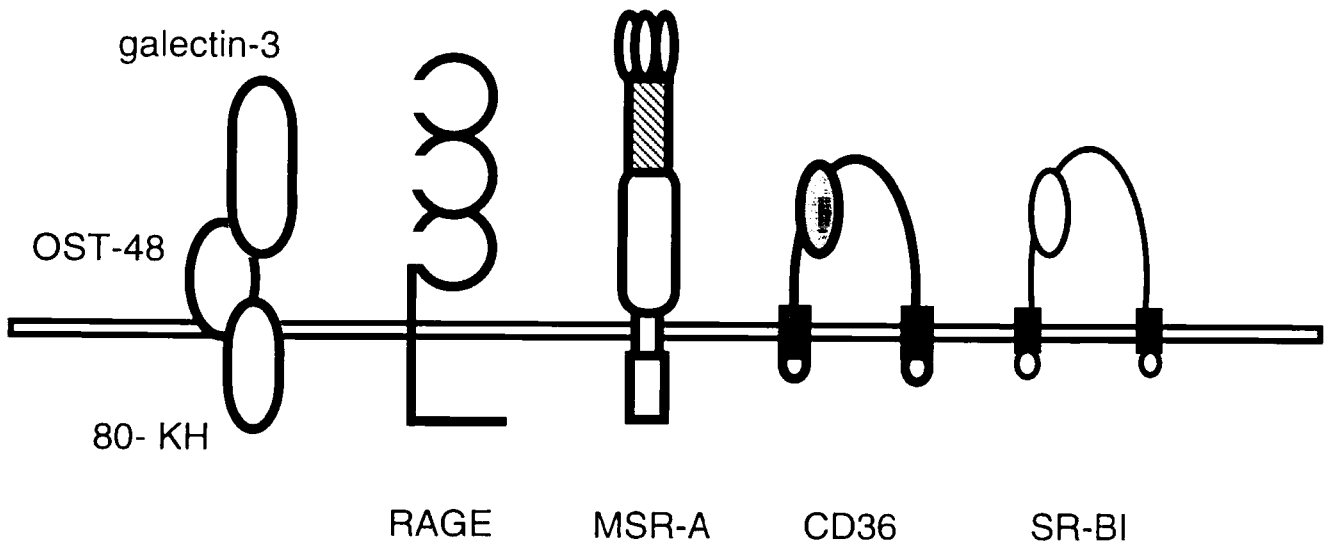


図-4:既知のAGE受容体

現在までにAGE受容体として、OST-48・80K-H・galectin-3複合体、RAGE（receptor for AGE）、マクロファージスカベンジャー受容体クラスA（MSR-A）、CD36、SR-BIの5つが報告されている。

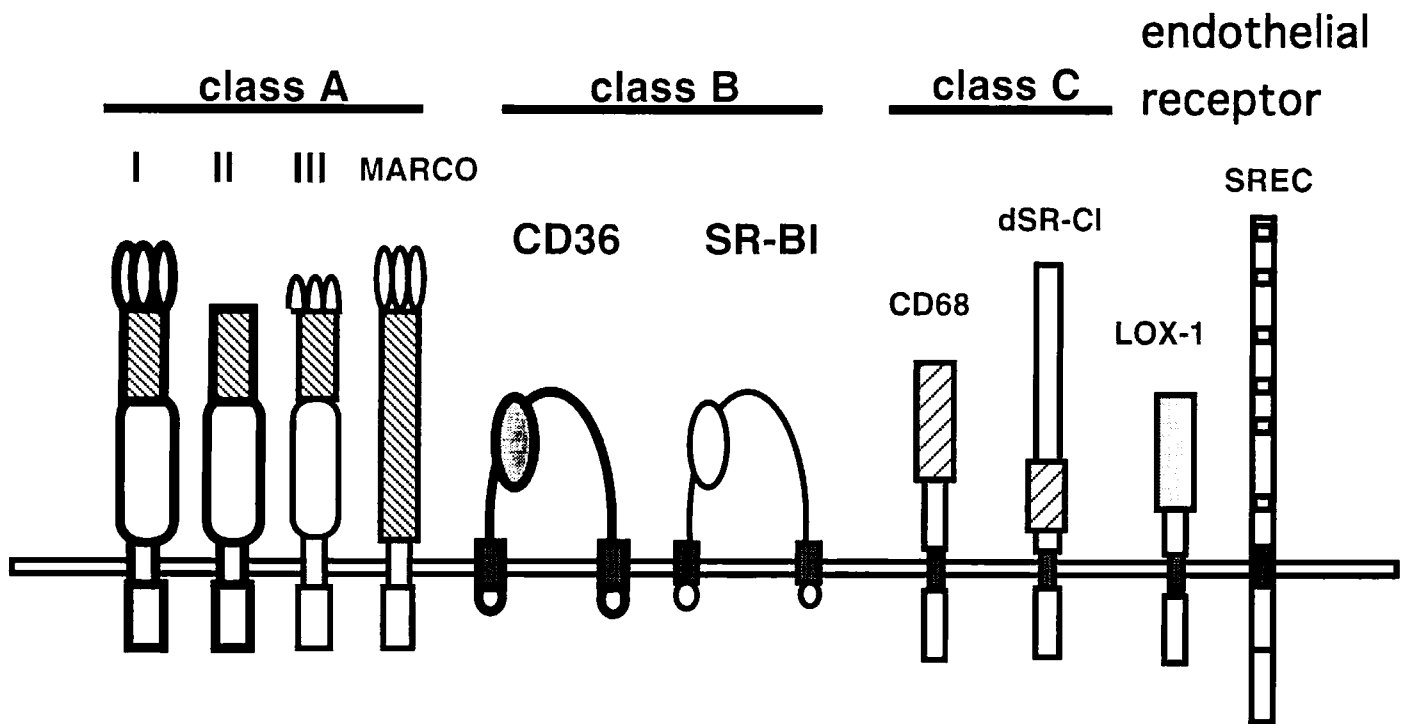


図-5: 変性リポ蛋白をリガンドとするスカベンジャー受容体ファミリー

構造や組織分布の違いから以下の3つのサブクラスに大別される。

1. クラスA: I型、II型、III型およびMARCO (macrophage receptor with collagenous structure) が含まれる。細胞外のコラーゲン様ドメインが幅広いリガンド結合能を有する。

2. クラスB: CD36およびSR-BI (scavenger receptor class B type I) が含まれ、細胞膜表面のカベオラに局在する。

3. クラスC: CD68/macrosialinとdSR-CI (drosophila scavenger receptor type CI) が含まれる。ムチン様ドメインを持ち、この部位に酸化LDL結合能が存在する。

4. 内皮細胞に発現するスカベンジャー受容体: LOX-1、SREC (scavenger receptor expressed by endothelial cells) がある。

図-6

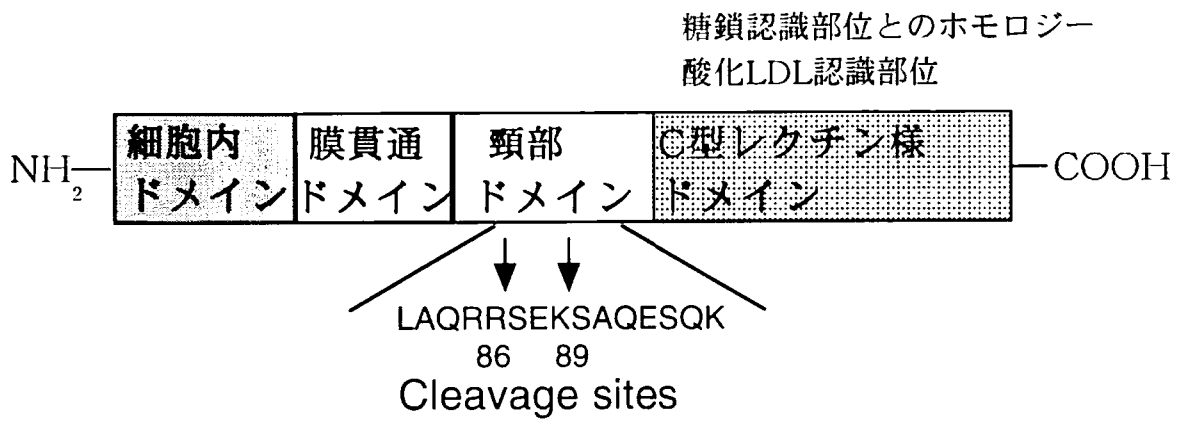


図-6: LOX-1の分子構造

LOX-1は4つの部位から構成されている。細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、頸部ドメイン、C型レクチン様ドメインといった構造体が存在する。頸部領域にcleavage siteをもつ。

図-7

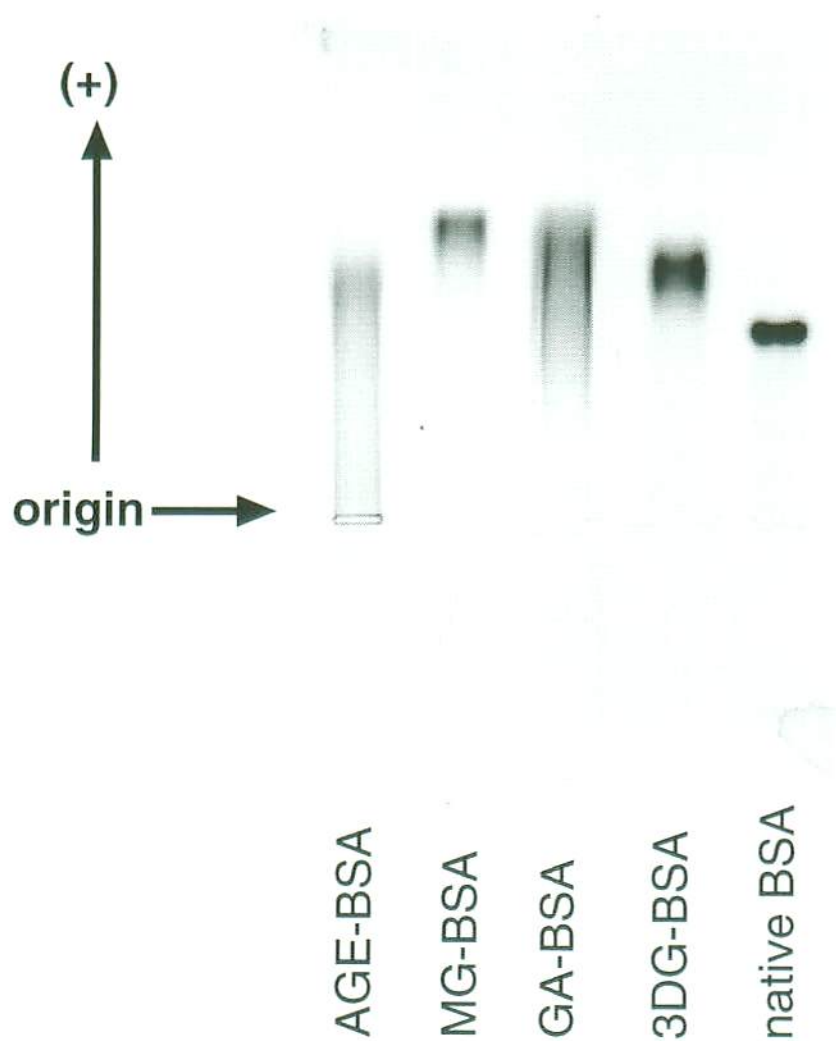


図-7: 修飾タンパク質のアガロースゲル電気泳動

各サンプル $2\mu\text{g}$ を始点にアプライし、160V、20分間、電気泳動後、CBB染色した。

図-8

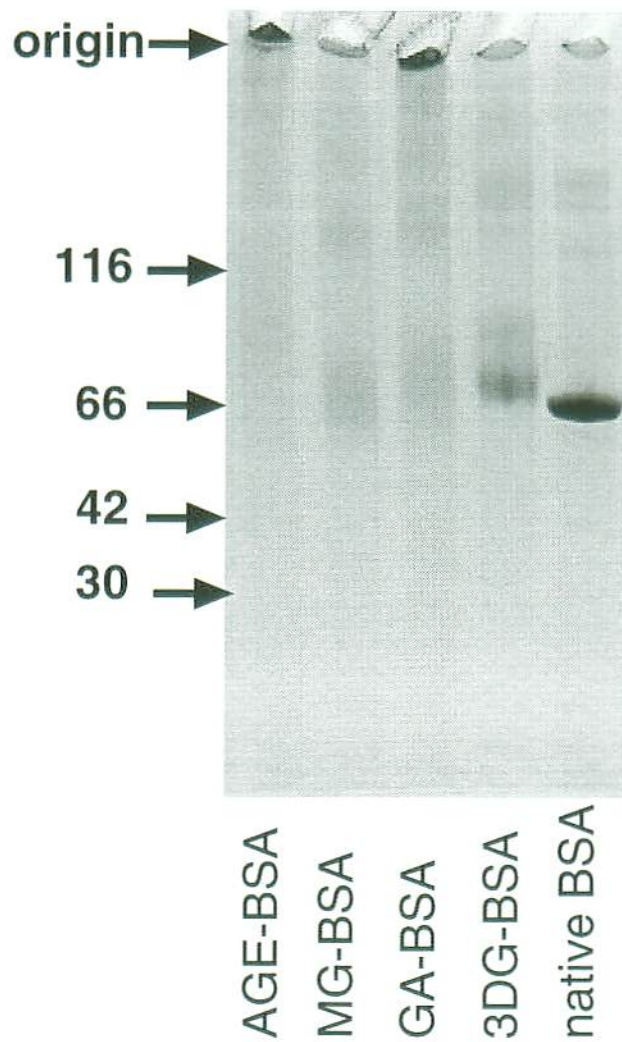


図-8: 修飾タンパク質のSDS-PAGE

SDS化した各サンプル $5\mu\text{g}$ を4-20% acrylamide gelの始点にアプライし、40mA、100分間、電気泳動後、CBB染色した。

図-9

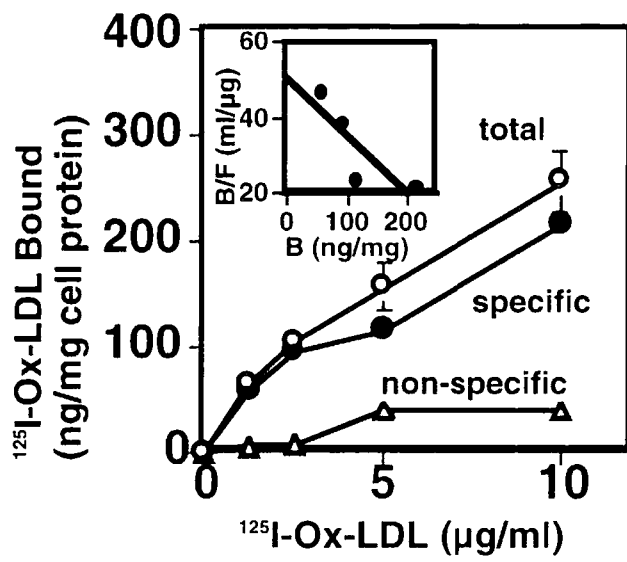


図-9: Ox-LDLのBLOX-1-CHO細胞への結合

BLOX-1-CHO細胞を種々の濃度の¹²⁵I-Ox-LDLと4℃で90分間静置し、細胞に結合した放射活性を測定した(○)。このとき同時に0.5 mg/mlの非標識Ox-LDLを添加し、非特異的結合(△)を測定した。特異的結合(●)は¹²⁵I-Ox-LDLのみを添加した場合の結合量(○)から非標識Ox-LDLを添加した場合の結合量(△)を引いて算出した。

図-10

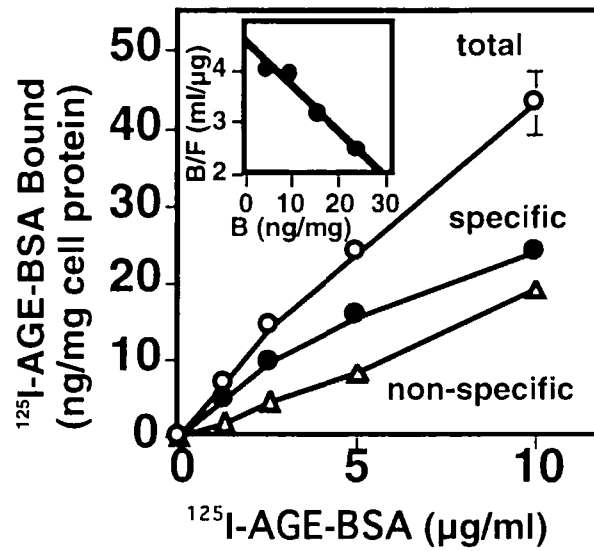


図-10: AGE-BSAのBLOX-1-CHO細胞への結合

BLOX-1-CHO細胞を種々の濃度の $^{125}\text{I-AGE-BSA}$ と 4°C で90分間静置し、細胞に結合した放射活性を測定した (○)。このとき同時に 0.5 mg/ml の非標識AGE-BSAを添加し、非特異的結合 (△) を測定した。特異的結合 (●) は $^{125}\text{I-AGE-BSA}$ のみを添加した場合の結合量 (○) から非標識AGE-BSAを添加した場合の結合量 (△) を引いて算出した。

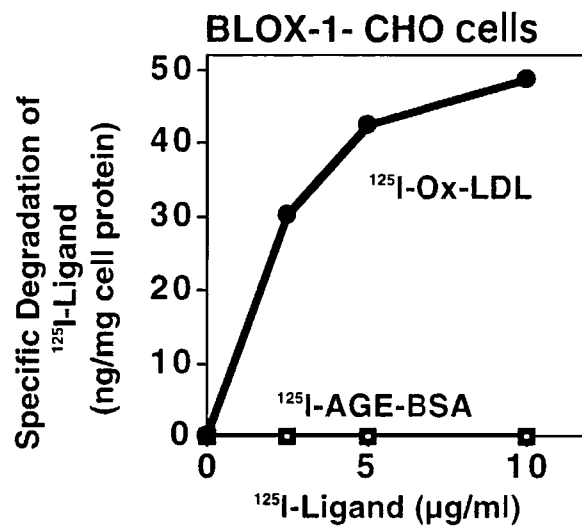


図-11: BLOX-1-CHO細胞によるAGE-BSAおよびOx-LDLの細胞分解

BLOX-1-CHO細胞に、種々の濃度の放射性ヨード標識した酸化LDL (¹²⁵I-Ox-LDL) あるいは放射性ヨード標識したAGE-BSA (¹²⁵I-AGE-BSA) を添加し、0.5 mg/mlの非標識リガンドの存在下に、37℃で6時間保温した。”材料と方法”の項に従って培養液の酸可溶性放射活性を測定し、細胞蛋白で補正後、特異的分解量を算定した。酸化LDLの特異的分解量 (●) AGE-BSAの特異的分解量 (□)。

図-12

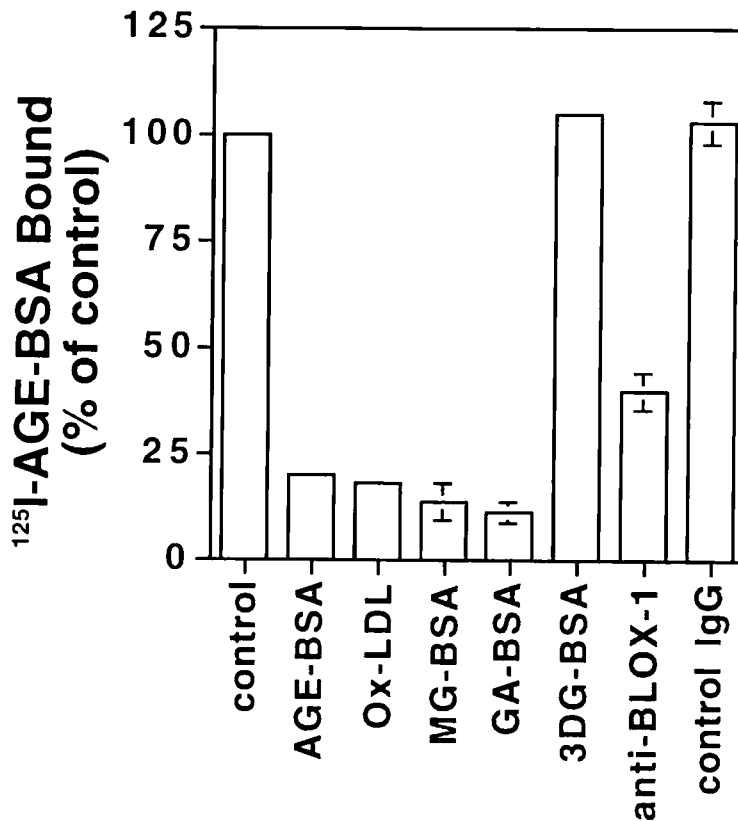


図-12: AGE-BSAのBLOX-1-CHO細胞への結合に対する各種リガンド並びに抗BLOX-1抗体の効果

BLOX-1-CHO細胞を5 μ g/mlの¹²⁵I-AGE-BSAと4℃、90分間静置し、細胞に結合した放射活性を測定した。このとき同時に200 μ g/mlの非標識AGE-BSA、Ox-LDLまたは種々のアルデヒド修飾タンパク質(MG-BSA、GA-BSA、3DG-BSA)を添加して結合阻害活性を検討した。同様の実験系で30 μ g/mlの抗BLOX-1抗体またはマウスIgGの結合阻害効果を検討した。¹²⁵I-AGE-BSAのみを添加した場合の結合量をcontrol (100%)とした。

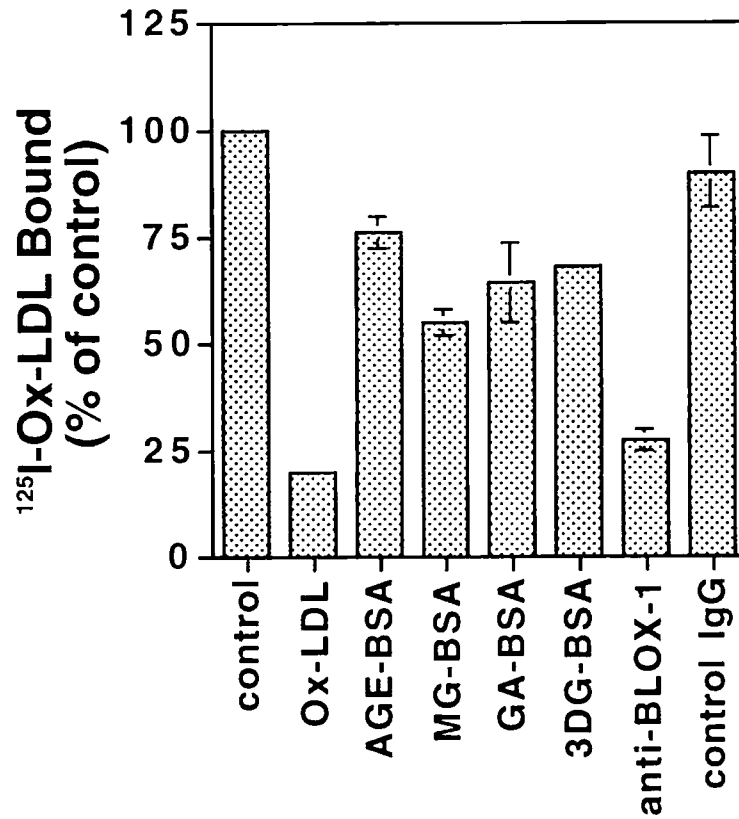


図-13: Ox-LDLのBLOX-1-CHO細胞への結合に対する各種リガンド並びに抗BLOX-1抗体の効果

BLOX-1-CHO細胞を5 μ g/mlの¹²⁵I-Ox-LDLと4℃、90分間静置し、細胞に結合した放射活性を測定した。このとき同時に200 μ g/mlの非標識Ox-LDL、AGE-BSAまたは種々のアルデヒド修飾タンパク質(MG-BSA、GA-BSA、3DG-BSA)を添加して結合阻害活性を検討した。同様の実験系で30 μ g/mlの抗BLOX-1抗体またはマウスIgGの結合阻害効果を検討した。¹²⁵I-Ox-LDLのみを添加した場合の結合量をcontrol (100%)とした。

図-14

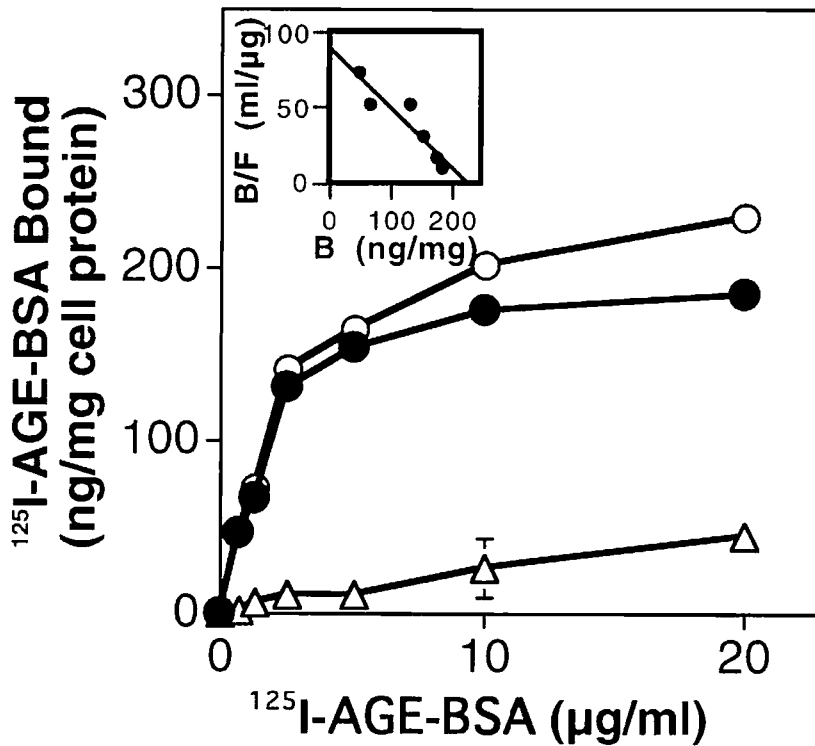


図-14: ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)におけるAGE-BSAの結合

BAEC中を、種々の濃度の $^{125}\text{I-AGE-BSA}$ と 4°C で90分間静置し、細胞に結合した放射活性を測定した(○)。このとき同時に 1.0 mg/ml の非標識AGE-BSAを添加し非特異的結合(△)を測定した。特異的結合量(●)は $^{125}\text{I-AGE-BSA}$ のみを添加した場合の結合量(○)から非標識AGE-BSAを添加したときの結合量(△)を引いて算出した。

図-15

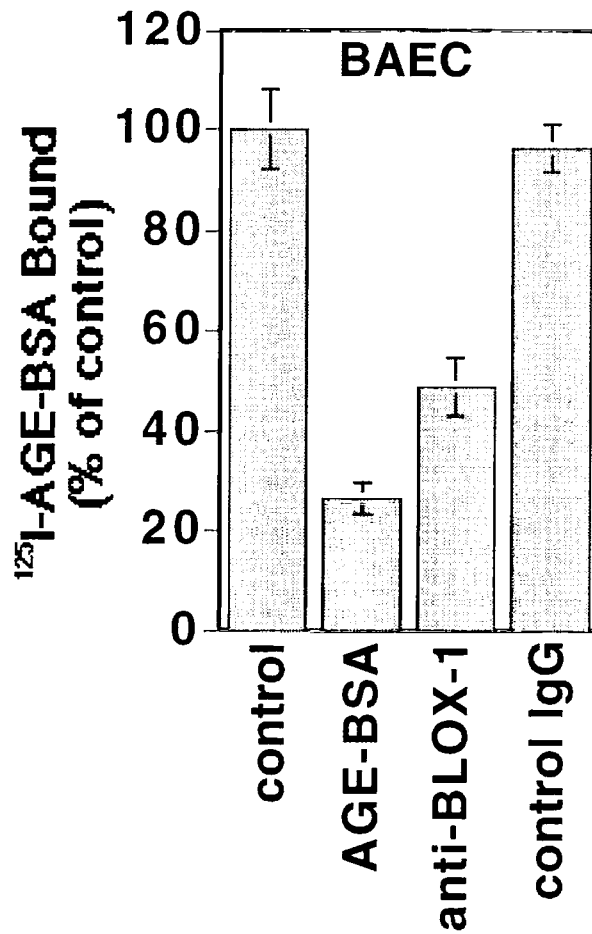


図-15: ウシ大動脈血管内皮細胞(BAEC)へのAGE-BSA結合に対する抗BLOX-1抗体の阻害効果

BAECを $5\mu\text{g/ml}$ の ^{125}I -AGE-BSAと 4°C 、90分間静置し、細胞に結合した放射活性を測定した。このとき同時に $30\mu\text{g/ml}$ の抗BLOX-1抗体またはマウスIgGを添加して結合阻害効果を検討した。 ^{125}I -Ox-LDLを添加した場合の結合量をcontrol (100%)とした。