

学位論文
Doctor's Thesis

ヒトおよびマウス胎盤における LOX-1 の組織学的同定
(Histochemical detection of
lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)
in murine and human placentas)

佐藤 広生
Hiroo Satoh

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

指導教員

高木 克公 前教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

竹屋 元裕 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻細胞病理学分野

紹介教授

水田 博志 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

2008年度

学 位 論 文
Doctor's Thesis

論文題名: ヒトおよびマウス胎盤における LOX-1 の組織学的同定
(Histochemical detection of lectin-like oxidized low-density
lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in murine and human placentas)

著者名 : 佐藤 広生

Hiroo Satoh

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻
運動骨格病態学前教授

高木 克公

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻
細胞病理学教授

竹屋 元裕

紹介教授名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻
運動骨格病態学教授

水田 博志

審査委員名 : 産科婦人科学担当教授

片瀨 秀隆

機能病理学担当教授

伊藤 隆明

分子病理学担当教授

山本 哲郎

微生物学担当教授

赤池 孝章

2008 年度

目 次

1. 要旨	1
2. 発表論文リスト	5
3. 謝辞	6
4. 略語一覧	7
5. 研究の背景と目的	9
6. 実験方法	
6-1 サンプルの収集	11
6-2 RT-PCR	13
6-3 Real-time PCR	14
6-4 In situ hybridization	15
6-5 組織染色と免疫組織化学	18
6-6 電子顕微鏡と免疫電子顕微鏡	21
7. 実験結果	
7-1 マウス全身臓器による LOX-1 mRNA 発現の分布と妊娠時期による発現推移	22
7-2 マウス胎盤の区域による LOX-1 mRNA 発現の分布	24
7-3 マウス胎盤の区域による LOX-1 mRNA ならびに蛋白の局在	26
7-4 E14.5 のマウス胎盤 MG での LOX-1 mRNA ならびに蛋白の細胞局在	28
7-5 E14.5 のマウス胎盤 DB, JZ, LZ での LOX-1 mRNA ならびに蛋白の細胞局在	30
7-6 ヒト胎盤における LOX-1 mRNA 発現	33
7-7 ヒト胎盤における LOX-1 発現細胞の同定	34

8. 考察

8-1 LOX-1 と粥状動脈硬化	36
8-2 胎盤における LOX-1 発現と酸化ストレス	36
8-3 マウス胎盤における LOX-1 の発現局在	37
8-4 ヒト胎盤における LOX-1 の発現局在	40
8-5 LOX-1 と胎盤機能	41

9. 結語	42
-------	----

10. 参考文献	43
----------	----

1. 要旨

LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) は、酸化 LDL (low-density lipoprotein) を認識するスカベンジャー受容体ファミリーの 1 つである。胎盤は全身の諸臓器の中で、LOX-1 を最も強く発現している臓器である。胎盤は妊娠期間中において酸化促進物質が強く集積する臓器であり、胎盤の酸化ストレスは妊娠初期の終わりに急激に増加し妊娠末期にかけて減少する。したがって、酸化 LDL 受容体である LOX-1 が胎盤機能に深く関与している可能性が考えられるが、その機能についてはほとんど検討がなされていない。

本研究では、ヒトおよびマウス胎盤を用いて、妊娠期間における LOX-1 の発現推移の評価ならびに発現細胞の同定を行った。発現推移の評価は real-time PCR (polymerase chain reaction) を用い、発現細胞の同定は免疫組織化学ならびに in situ hybridization を併用して行った。ヒトおよびマウスともに、LOX-1 は妊娠末期に比べて、妊娠早期から中期にかけて強く発現しており、それは妊娠早期の酸化ストレスの増加と一致していた。

マウス胎盤では，LOX-1 の発現細胞は，metrial gland および decidua basalis に分布する fibroblast-like stromal cell と，junctional zone および labyrinth zone に存在する glycogen trophoblast cell であった．ヒト胎盤では，LOX-1 の発現細胞は妊娠初期および末期ともに villous cytotrophoblast であった．ヒトおよびマウス胎盤におけるこれらの LOX-1 の局在パターンは妊娠という高い酸化ストレス状態における LOX-1 の関与を示唆するものである．

Abstract

Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) is one of the scavenger receptors that recognizes oxidized low-density lipoprotein as a major ligand. The placenta is a major source of prooxidant during pregnancy, and the level of placental oxidative stress increases rapidly at the end of the first trimester and tapers off later in gestation. In our study, we evaluated placental expression of LOX-1 during different gestational stages in mice and humans. We used immunohistochemistry and in situ hybridization (ISH) to identify LOX-1-expressing cells in murine and human placentas. In both species, higher expression of LOX-1 mRNA during early to midgestational stages compared with late gestation—corresponding to the increased oxidative stress in early pregnancy—was shown by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). In murine placenta, we showed that LOX-1-expressing cells were fibroblast-like stromal cells in metrial glands and decidua basalis and that they were glycogen trophoblast cells in the junctional and labyrinth zones. In the human, LOX-1 expression was detected in villous cytotrophoblasts in both first trimester and term

placentas. These localization patterns of LOX-1 in murine and human placentas suggest the possible involvement of LOX-1 in high oxidative stress conditions of pregnancy.

2. 発表論文リスト

① 関連論文 (学位の骨格となる参考論文)

**Hiroo Satoh, Emi Kiyota, Yasuhiro Terasaki, Ttsuya Sawamura,
Katsumasa Takagi, Hiroshi Mizuta and Motohiro Takeya.**

Expression and Localization of Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 (LOX-1) in Murine and Human Placentas.

Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 56, 773-784, 2008.

**Jawahar L. Mehta, Nobuhito Sanada, Chang Ping Hu, Jiawei Chen, Abhijit Dandapat,
Fumiaki Sugawara, Hiroo Satoh, Kazuhiko Inoue, Yosuke Kawase, Kou-ichi Jishage,
Hiroshi Suzuki, Motohiro Takeya, Laura Schnackenberg, Richard Beger,
Paul L. Hermonat, Maria Thomas and Tatsuya Sawamura.**

Deletion of LOX-1 Reduces Atherogenesis in LDLR Knockout Mice Fed High Cholesterol Diet.
Circulation Research. 100, 1634-1642, 2007.

② その他の論文

**Mika Yoshimatsu, Yasuhiro Terasaki, Naomi Sakashita, Emi Kiyota, Hiroo Sato,
Luc J. W. van der Laan and Motohiro Takeya.**

Induction of macrophage scavenger receptor MARCO in nonalcoholic steatohepatitis indicates possible involvement of endotoxin in its pathogenic process.

Int J Exp Pathol. 85, 335-343, 2004.

3. 謝辞

本研究は熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野，竹屋元裕教授と同運動骨格病態学分野，高木克公前教授のご指導の下，行いました。多くのご指導を頂き，深く感謝いたします。

熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野，寺崎泰弘助手には研究方法から実験結果の解釈など多くの助言を頂きました。さらに技術面では，熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野，中川雄伸技師には免疫組織化学を，清田恵美技師には RT-PCR, real-time PCR, in situ hybridization を，吉田淳一技師には電子顕微鏡の超薄をそれぞれ指導して頂きました。熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野の皆様には，日頃からご助言とご協力を頂きました。

ヒト胎盤組織のサンプル提供は本研究に賛同して頂いた妊婦さんのご厚意によるもので，伊井産婦人科病院の松浦講平先生と伊井小百合先生には本研究をご理解して頂き，快くご協力して頂きました。

共同研究者でもある国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部，沢村達也先生には LOX-1 抗体をご供与して頂きました。

4. 略語一覽

LOX-1 : lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1

LDL : low-density lipoprotein

SPF : specific-pathogen-free

RNA : ribonucleic acid

mRNA : messenger ribonucleic acid

rRNA : ribosome ribonucleic acid

tRNA : transfer ribonucleic acid

cRNA : complementary ribonucleic acid

DNA : deoxyribonucleic acid

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

RT : reverse transcription

PCR : polymerase chain reaction

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

PLP : periodate-lysine-paraformaldehyde

PBS : phosphate buffer saline

DIG : digoxigenin

SSC : saline sodium citrate

TNE : Tris-HCl, NaCl, EDTA

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

NBT/BCIP : nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-2-indolyl phosphate

DAB : 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

MG : metrial glands

DB : decidua basalis

JZ : junctional zone

LZ : labyrinth zone

NK cell : natural killer cell

GMG cell : granulated metrial gland cell

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

5. 研究の背景と目的

胎盤の酸化ストレスは、流産や早産、妊娠中毒といった妊娠関連の合併症の病態に関わっている (Hubel 1999; Burton and Jauniaux 2004) . フリーラジカルが多不飽和脂肪酸やコレステロール, リポ蛋白と反応すると, 高反応性の脂質過酸化物が生成される. 酸化 LDL は脂質過酸化物の主な生成物質である. 妊娠中毒症や流産を繰り返す妊娠女性では, 酸化 LDL に対する抗体が上昇しており, このことはコントロール不能となった脂質過酸化物が蓄積したり, 酸化 LDL の除去が不十分であるために胎盤の細胞傷害やダメージが誘発されることを示している (Branch et al. 1994; Tulppala and Ailus 1995) . 単離した trophoblast やマクロファージでは, 変性 LDL の細胞内取り込みと分解, すなわちスカベンジャー受容体活性は LDL のそれより 20 倍以上を示す (Bonet et al. 1995) . そのような胎盤におけるスカベンジャー受容体活性は変性リポ蛋白を分解し胎盤の細胞機能や胎児の発育・発達への毒性を防止するように機能しているかも知れない (Bonet et al. 1995) .

LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1)は, 主に

血管の内皮細胞に発現するスカベンジャー受容体の1つである (Sawamura et al. 1997) . LOX-1 は当初ウシ大動脈内皮細胞とヒト肺から, 酸化 LDL に対する受容体としてクローニングされた (Sawamura et al. 1997) . LOX-1 は, 酸化 LDL に対して結合し取り込み分解するという強い活性をもっている (Moriwaki et al. 1998) . また LOX-1 は, 酸化 LDL 自体以外にも様々な刺激 (アンジオテンシン II, tumor necrosis factor- α , advanced glycation end products) によって発現が誘導される (Aoyama et al. 1999; Li et al. 1999; Kume et al. 1998; Chen et al. 2001) .

LOX-1 は, 細胞内の活性酸素種産生を介して, 酸化 LDL による血管内皮細胞のアポトーシスに関与する (Li and Mehta 2000) .

LOX-1 は血管内皮細胞のみならず, 単球由来のマクロファージや血管平滑筋, 軟骨細胞にも発現している (Yoshida et al. 1998; Moriwaki et al. 1998; Draude et al. 1999; Aoyama et al. 2000, Nakagawa et al. 2002) . ヒト組織でのノザンブロット解析によると, LOX-1 mRNA は胎盤, 肺, 脳, 肝のような血管豊富な臓器に多く発現しているが, 胎盤はこれらの組織の中でも, 最も強く LOX-1 を発現しており, このことは LOX-1 が胎盤機能において重要な役割を果たしていることを示

唆している (Sawamura et al. 1997) . LOX-1 が妊娠早期において trophoblast の浸潤に関与しているかもしれないこと (Pavan et al. 2004; Fournier et al. 2007) や、妊娠中毒症では LOX-1 が trophoblast のアポトーシスを促進すること (Lee et al. 2005) が示唆されている。ヒト胎盤における免疫組織学的研究により、LOX-1 が妊娠初期胎盤の extravillous trophoblast (Pavan et al. 2004; Fournier et al. 2007) や妊娠末期の正常および妊娠中毒の胎盤の syncytiotrophoblast (Lee et al. 2005) に局在していることが証明されている。しかしながら、動物、とくに最も広く用いられている実験モデル動物であるマウスの胎盤における LOX-1 の局在については未だ報告はなされていない。本研究ではマウス胎盤における LOX-1 の明確な局在について、免疫組織学ならびに in situ hybridization により明らかにし、さらにヒト胎盤での結果と比較し、考察を行った。

6. 実験方法

6-1 サンプルの収集

C57BL/6 マウスを日本クレア (Tokyo, Japan) より購入し、熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究施設において SPF (specific-pathogen-free) 環境のもとで飼育した。マウスに対するすべての処置は熊本大学動物実験指針を遵守して行った。2~5 ヶ月齢の雌マウスを雄マウスと夕方に交尾させ翌朝膣プラグを確認し、膣プラグがあればその日の正午を 0.5 embryonic day (E0.5) とした。E10.5 から E18.5 までの妊娠期間において胎盤組織を採取した。組織採取の際には、胎盤組織が付着している部分の子宮筋組織と子宮内膜組織をつけたまま胎盤組織を採取した。マウス組織における LOX-1 mRNA の分布をみるために、組織は 8 週齢の雄マウスから採取した。

ヒト胎盤組織は妊娠 6~41 週の健康な妊婦から採取した。事前にヘルシンキ宣言に則った研究同意書についてのインフォームドコンセントを得て文書に署名してもらった。初期胎盤は妊娠 6~12 週の胎盤を法律に従った人工中絶により、末期胎盤は妊娠 37~41 週の胎盤を経膣自然分娩により、それぞれ得た。

6 - 2 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA は以前の報告のように抽出し逆転写を行った (Kobayashi et al. 2007) .

Total RNA は RNA STAT-60™ (Tel-Test Inc., Friendswood, TX)を使用して抽出した.

1 μ g の total RNA から, random primers (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)と共に

Omniscript RT Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を使用して cDNA を作成した. こ

の cDNA を鋳型として PCR (polymerase chain reaction) を行った. PCR のプラ

イマーは以下のものを使用した. これらのプライマーは Invitrogen (Carlsbad, CA,

USA)にカスタムメイドで作成依頼した.

• mouse LOX-1 (522-bp product) :

forward primer 5'-GAGCTGCAAACCTTTTCAGG-3'

reverse primer 5'-GTCTTTCATGCAGCAACAG-3'

• human LOX-1 (193-bp product) :

forward primer 5'-TTACTCTCCATGGTGGTGCC-3'

reverse primer 5'-AGCTTCTTCTGCTTGTTGCC-3'

• GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (392-bp product) :

forward primer 5'-GGAAAGCTGTGGCGTTGGCGTGAT-3'

reverse primer: 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3'

GAPDHのプライマーはマウスおよびヒトの両方に使用可能であるようにデザインした。PCRはiCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使用して行った。PCR反応条件は、95 °C 15分, three-step cycling (denaturation : 94 °C 30秒 ; annealing : 55~60 °C 30秒 ; extension : 72 °C 1分), 72 °C 10分とした。three-step cyclingは、LOX-1を30サイクル, GAPDHを28サイクルで行った。Annealing温度は、LOX-1を55 °C, GAPDHを60 °Cで行った。PCR産物は、100-bp DNA ladder molecular weight marker (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) と共に0.1 mg/mlのエチジウムブロマイド含有の2% (w/v)アガロースゲル上にアプライし電気泳動を行った。その後、Gel Doc 2000™ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使用してUV照射し、TDS Quantity One software package (Bio-Rad Laboratories)を使用して写真撮影した。

6 - 3 Real-time PCR

ヒトおよびマウス胎盤組織での LOX-1 mRNA の定量のために、以前の報告に

あるように ABI PRISM®7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して real-time PCR を行った (Tsujita et al. 2007) . スタンダードカーブを描き, すべての実験は duplicate で行った. real-time PCR の反応条件は, 50 °C 2 分 (for carry-over prevention with Uracil-*N*-glycosylase), 95 °C 10 分 (for hot start PCR), 続いて 95 °C 15 秒と 60 °C 1 分を 40 サイクル行った. 内因性コントロールとして 18S rRNA 遺伝子を用い, それとの比を求め定量化した.

マウスでは, E10.5, E11.5, E13.5, E14.5, E15.5, E16.5, E17.5, E18.5 の日齢の胎盤組織を使用し, ヒトでは妊娠 6~12 週の初期胎盤 (n = 8) と妊娠 37~41 週の末期胎盤 (n = 5) を使用した. ヒト初期胎盤では, 絨毛組織は実体顕微鏡を用いて脱落膜組織やその他の組織から選り分けた. ヒト末期胎盤では, cotyledon の中央部の絨毛膜絨毛を採取した.

6 - 4 In situ hybridization

ヒトおよびマウス LOX-1 に対する cRNA プローブは, 以前の報告のように in vitro において PCR で作成した cDNA を逆転写して合成した (Divjak et al. 2002).

PCR で作製した 2.5 ml の cDNA を鋳型として, PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

(Takara, Kyoto, Japan)を使用して PCR を行った。使用した PCR プライマーは以下のようである。

- T7 mouse LOX-1 primer (544-bp product) :

forward primer

5'-CTTAATACGACTCACTATAGGGGAGCTGCAAACTTTTCAGG-3'

reverse primer

5'-CTTAATACGACTCACTATAGGGACAGATGTCAAGGCCAACA-3'

- T7 human primer (544-bp product) :

forward primer

5'-CTTAATACGACTCACTATAGGGCTGGAGGGACAGATCTCAGC-3'

reverse primer

5'-CTTAATACGACTCACTATAGGGTTCCGCATAAACAGCTCCT-3'

PCR 産物は High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用して精製し、つぎに T7 RNA polymerase を使用して in vitro で逆転写し、DIG In Vitro Transcription Kit (Roche Diagnostics)を使用して DIG

(digoxigenin) 標識を行った。最後に, mini Quick Spin RNA column (Roche Diagnostics)を使用して cRNA プローブを精製し, deionized formamide (Wako, Osaka, Japan)を等量混ぜて調整した。

マウスおよびヒト胎盤組織を 4%パラフォルムアルデヒドで 4 °C overnight 固定しパラフィン包埋した。厚さ 3 μ m のパラフィン切片を作成し, 脱パラ・脱水を行い, 10 μ g/ml proteinase K (Roche Diagnostics)で 37 °C 10 分間処理し, 4% パラフォルムアルデヒドで後固定し, 0.1 N HCl で室温 10 分間処理し, 0.25% acetic anhydride in 0.1 mol/l triethanolamine (pH 8.0)で室温 10 分間アセチル化し, 脱水・風乾した。Hybridization mixture は, 50 ng の cRNA プローブを hybridization buffer で 50 倍希釈して作成した。Hybridization buffer は 50% formamide, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mg/ml tRNA, 1 \times Denhardt's solution, 600 mM NaCl, 0.25% SDS, 1 mM EDTA (pH 8.0), 10% dextran sulfate を含んでいた。Hybridization mixture を加熱し denature させて, 切片にアプライしパラフィルムでカバーした。Hybridization は 50 °C 18 時間, 湿潤箱の中で行った。Hybridization の後にパラフィルムを取り外し, 5 \times SSC (1 \times SSC: 150 mM NaCl plus 15 mM sodium citrate)で軽く洗浄し後に,

50 °C 30 分間, 50% formamide + 2 × SSC で洗浄した。さらに TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA) で 37 °C 10 分間洗浄し, 10 mg/ml RNase A (Roche Diagnostics) で 37 °C 30 分間処理した。切片をもう一度 TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA) で 37 °C 10 分間洗浄した。その後, 50 °C 20 分間, 2 × SSC で 1 回, 0.2 × SSC で 2 回の stringent washing をそれぞれ行った。切片を buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) で 5 分間洗浄した。さらに buffer 1 で希釈した 1.5% blocking reagent (Roche Diagnostics) でブロッキングを行った後に, buffer 1 で 500 倍に希釈した alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-DIG F(ab') fragment antibody (Roche Diagnostics) で室温 30 分間反応させた。buffer 1 で 15 分間, 2 回洗浄し, buffer 2 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) で 5 分間洗浄した後, NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-2-indolyl phosphate) (Roche Diagnostics) を含んだ buffer 2 で切片を覆い湿潤箱に入れ発色させた。発色の程度 (陽性像は dark blue) は光学顕微鏡で鏡検しながらモニターした。最後に水道水で軽く洗浄し, 切片を permanent aqueous medium (Nichirei, Tokyo, Japan) で封入した。対比染色は行わなかった。

sense プローブで反応させた切片を陰性コントロールとした。

6 - 5 組織染色と免疫組織化学

10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、厚さ 3 μ m のパラフィン切片を作成しエオジン・ヘマトキシレン染色で染色した。

マウス desmin の局在を調べるために、マウス胎盤組織の厚さ 3 μ m のパラフィン切片を使用した。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害のために、切片を 0.3% H₂O₂ in 100% methanol で室温 30 分間ブロックした後に、anti-human desmin rabbit polyclonal antibody (1 mg/ml, RB-9014-P; Lab Vision Ltd., Suffolk, UK)で室温 90 分間反応させた。この desimin 抗体はマウス desmin にも交差する。続いて、二次抗体である goat anti-rabbit Ig-conjugated peroxidase-labeled polymer amino acid (Nichirei) で室温 30 分間反応させた後に DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Dojin Chemicals, Kumamoto, Japan)で可視化し、Meyer's hematoxylin で対比染色を行った。陰性コントロールとして、一次抗体の代わりに normal rabbit IgG (10 mg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)を使用した。

LOX-1 の局在を免疫組織化学的に調べるために、マウスおよびヒト胎盤組織を PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) で 4 °C, 6~8 時間固定し 10%, 15%, 20%のシュクロース in 0.1 M PBS で順次置換し洗浄し, O.C.T compound にて包埋して凍結ブロックを作成した.

マウス LOX-1 の局在を調べるために、厚さ 6 μ m の凍結切片を使用した. 上記のように内因性ペルオキシダーゼ活性阻害後に, anti-mouse LOX-1 rat monoclonal antibody (JTX-58, rat IgG, 5 mg/ml)で室温 90 分間反応させた. 二次抗体である goat anti-rat Ig-conjugated peroxidase-labeled polymer amino acid (Nichirei) で室温 30 分間反応させた後に, 上記のように DAB 発色で可視化した. 陰性コントロールとして, 一次抗体の代わりに normal rat IgG (10 mg/ml; Santa Cruz Biotechnology)を使用した.

ヒト LOX-1 の局在を調べるために、厚さ 6 μ m の凍結切片を使用した. 上記のように内因性ペルオキシダーゼ活性阻害後に, biotinylated anti-human LOX-1 mouse monoclonal antibody (JTX-92, mouse IgG, 6.9 mg/ml)で室温 90 分間反応させた. 続いて avidin-biotin complex (VECTASTAIN® Elite ABC kit, Vector Laboratories,

Inc., Burlingame, CA, USA)で室温 30 分間反応させた後に, 上記のように DAB 発色で可視化した. 陰性コントロールとして, 一次抗体の代わりに biotin-conjugated normal mouse IgG (10 mg/ml; Santa Cruz Biotechnology)を使用した.

6 - 6 電子顕微鏡と免疫電子顕微鏡

電子顕微鏡による観察は以前の報告のように行った (Komohara et al. 2005) . 通常電子顕微鏡では, E14.5のマウス胎盤組織を2.5% glutaraldehydeで固定し, さらに1% osmium tetroxideで後固定した. エタノールで順次脱水し, Epon 812 resin (Shell Chemical, New York, NY)に包埋し, 超薄した後にuranyl acetateとlead citrateで染色した. 観察は, Hitachi H-7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan)で行った.

免疫電子顕微鏡では, PLP 固定のマウス胎盤組織の厚さ 6 μm の凍結切片を anti-mouse LOX-1 monoclonal antibody (JTX-58) で 4 °C overnight 反応させ, PBS で洗浄した後に, さらに peroxidase-conjugated rabbit anti-rat IgG (Dako, Glostrup, Denmark)で 4 °C overnight 反応させた. 1% glutaraldehyde で 5 分間固定した後に DAB 発色で可視化した. サンプルは以前の報告のように処理した (Komohara et

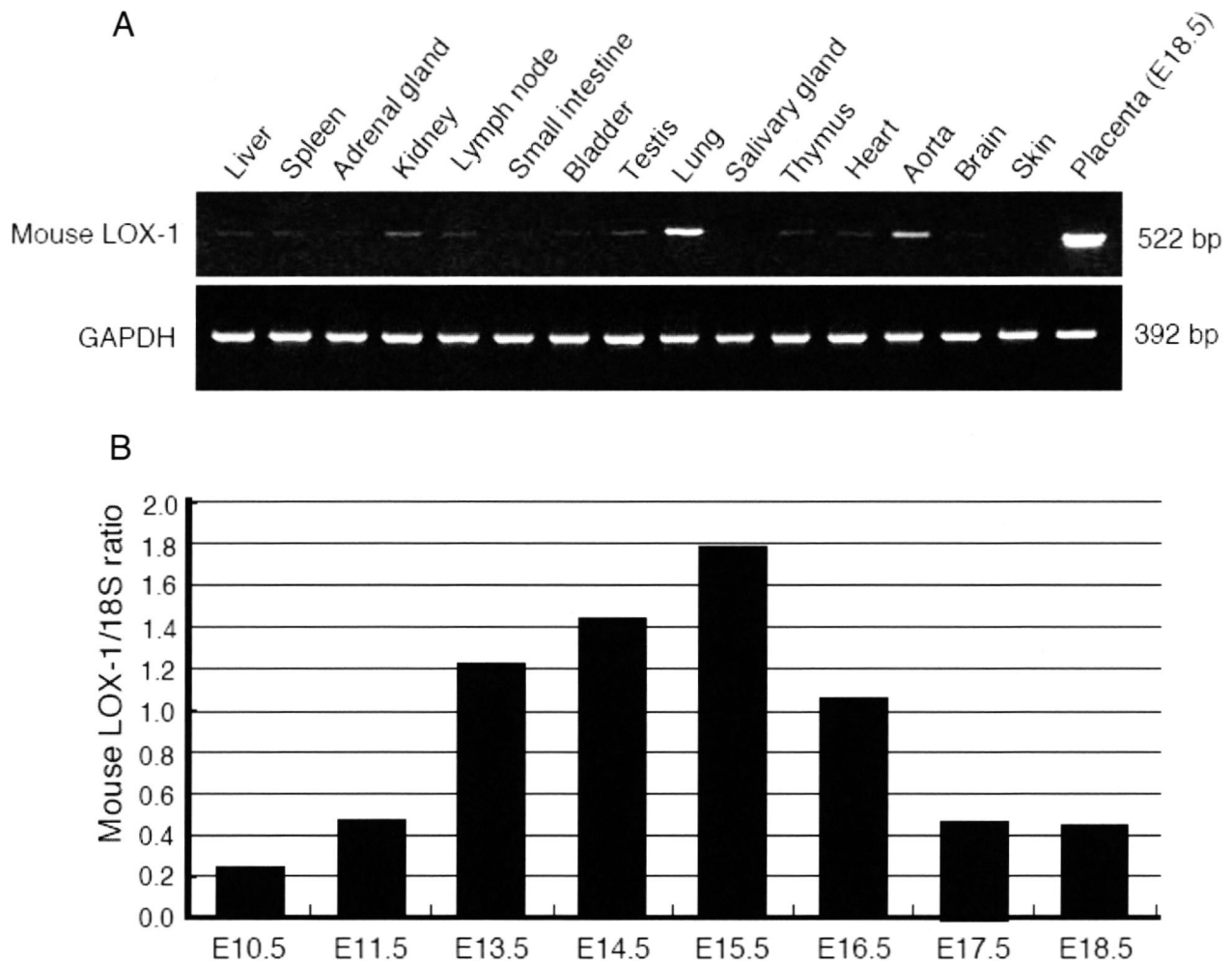
al. 2005) . 2% osmium tetroxide で 60 分間後固定し, エタノールで順次脱水し, Epon 812 resin(Shell Chemical, New York, NY)で包埋した. 超薄切片は対比染色せずに Hitachi H-7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan)を使用して観察した.

7. 実験結果

7-1 マウス全身臓器による LOX-1 mRNA 発現の分布(A)と

妊娠時期による発現推移(B)

図 1.

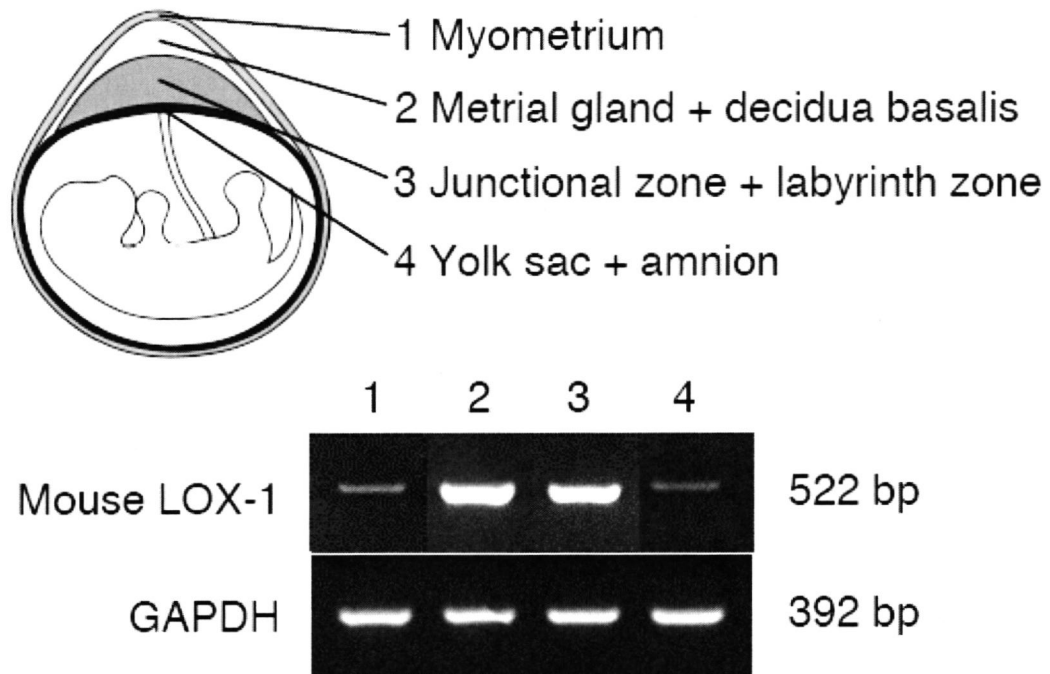


マウスの全身臓器での LOX-1 mRNA 発現を RT-PCR によって調べた(図 1 A).

胎盤は最も強く LOX-1 発現を示し, 肺や大動脈は中等度で, 他の臓器での発現はごく軽度かもしくは欠除していた. 妊娠時期による LOX-1 mRNA 発現の推移を調べるために, E10.5 から E18.5 までの胎盤組織を real-time RT-PCR によって検討した. LOX-1 mRNA 発現は E14.5 から E15.5 の妊娠中期にピークをむかえ, その後減少していた (図 1 B) .

7-2 マウス胎盤の区域による LOX-1 mRNA 発現の分布

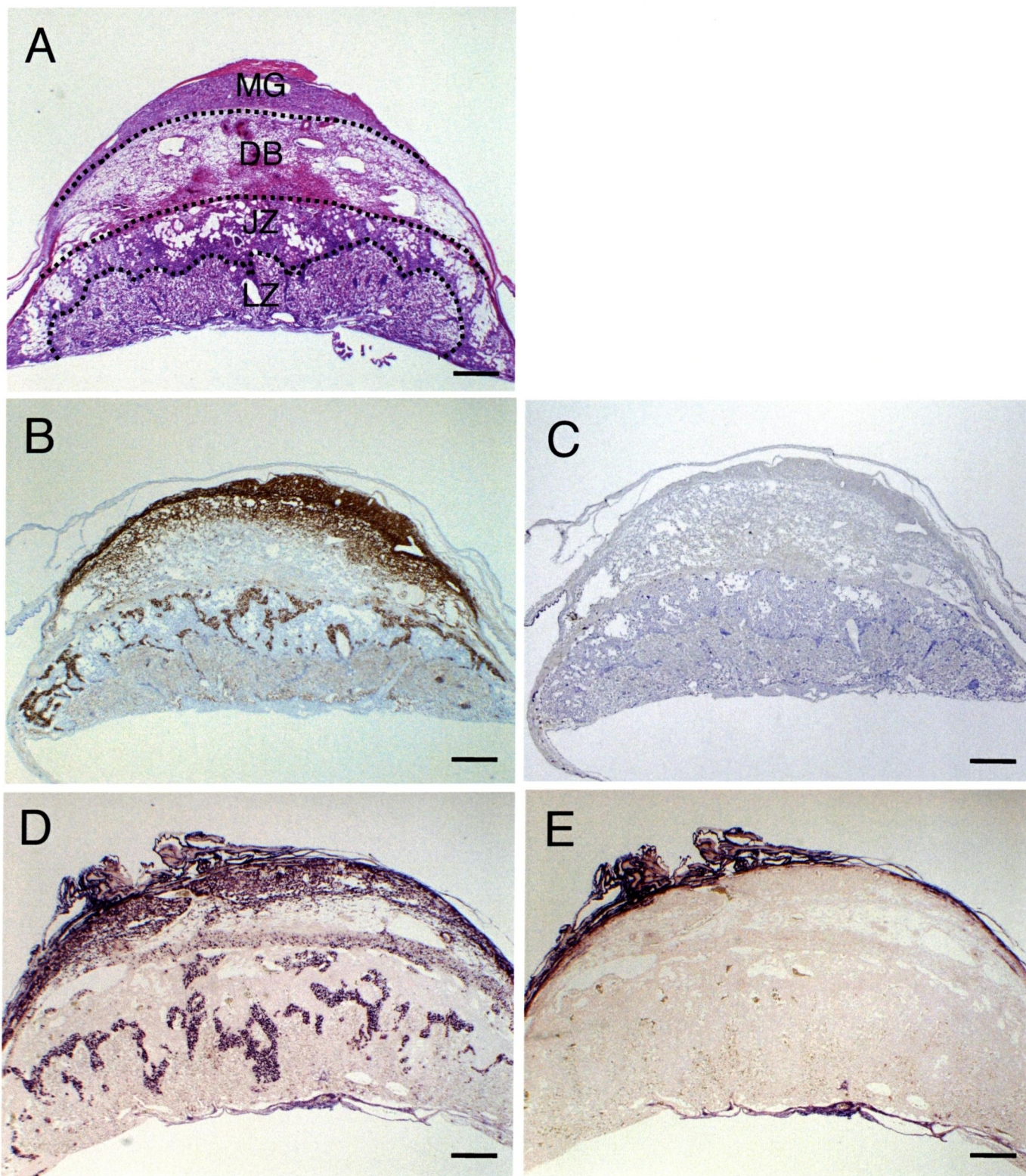
図 2.



LOX-1 mRNA 発現が妊娠中期に見られたので、E14.5 のマウス胎盤組織を使って、LOX-1 蛋白と mRNA の局在を調べた。マウス胎盤の基本構造は妊娠中期までには完成し、4つの区域に分けられる。つまり、metrial glands (MG), decidua basalis (DB), junctional zone (JZ), and labyrinth zone (LZ)である (Georgiades et al. 2002)。MG と DB は母体側に属し、一方 LZ と JZ は胎仔側に属する。4つの区域での LOX-1 mRNA 発現を調べるために、E14.5 の子宮と胎盤組織を4つの部分 (myometrium, MG + DB, JZ + LZ, yolk sac + amnion) に分けて LOX-1 mRNA 発現を RT-PCR によって検討した。MG + DB (lane 2) と LZ + JZ (lane 3) の部位は他の部位に比べて強く LOX-1 を発現していた (図 2)。

7-3 マウス胎盤の区域によるLOX-1 mRNAならびに蛋白の局在

図3 (A-E).

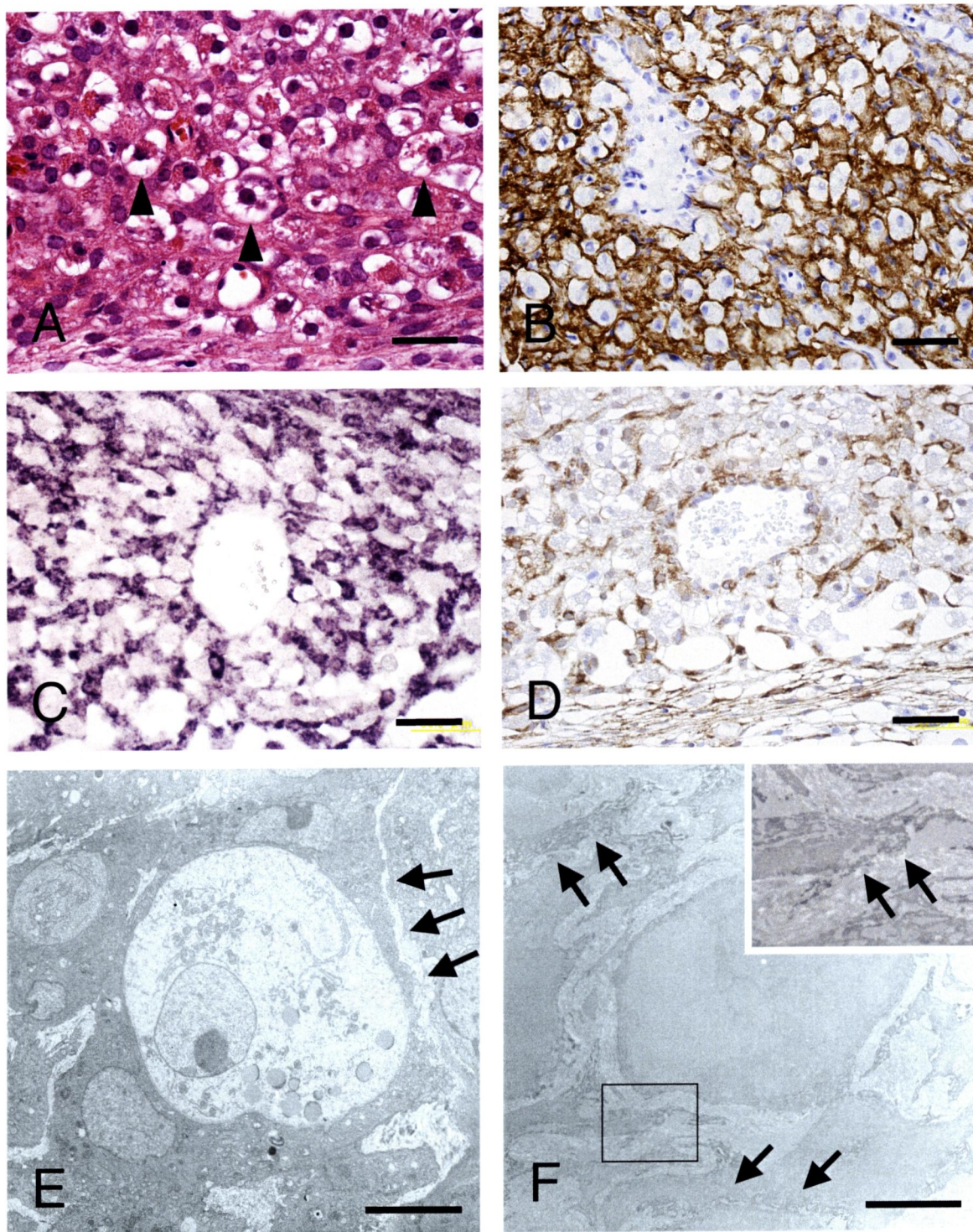


- A : ヘマトキシレン・エオジン染色.
- B : LOX-1 の免疫組織化学.
- C : 正常ラット IgG による陰性コントロール.
- D : LOX-1 の in situ hybridization.
- E : sense プローブによる陰性コントロール.
- Scale bar = 300 μ m.

E14.5 のマウス胎盤では、4つの区域は組織学的に明確な特徴をもっている (図 3 A) . それぞれの区域での LOX-1 発現の正確な局在を明らかにするために、免疫組織化学と in situ hybridization を使用して検討した. LOX-1 蛋白は RT-PCR 解析の結果を反映する局在パターンを示した. つまり、LOX-1 の陽性像は、MG と DB にびまん性に強く、JZ では索状に強く、LZ では弱くびまん性に見られた (図 3 B) . in situ hybridization でも、すべての区域において LOX-1 蛋白と一致した LOX-1 mRNA の共局在を示した (図 3 D) . sense プローブによる陰性コントロールでは組織の辺縁に非特異的な反応が見られたが、antisense プローブに見られた陽性像は全く見られなかった (図 3 E) .

7-4 E14.5のマウス胎盤MGでのLOX-1 mRNAならびに蛋白の細胞局在

図4 (A-F).



A : MG でのヘマトキシレン・エオジン染色.

B : MG での LOX-1 の免疫組織化学.

C : MG での LOX-1 の in situ hybridization.

D : MG での desmin の免疫組織化学.

E : MG での電子顕微鏡.

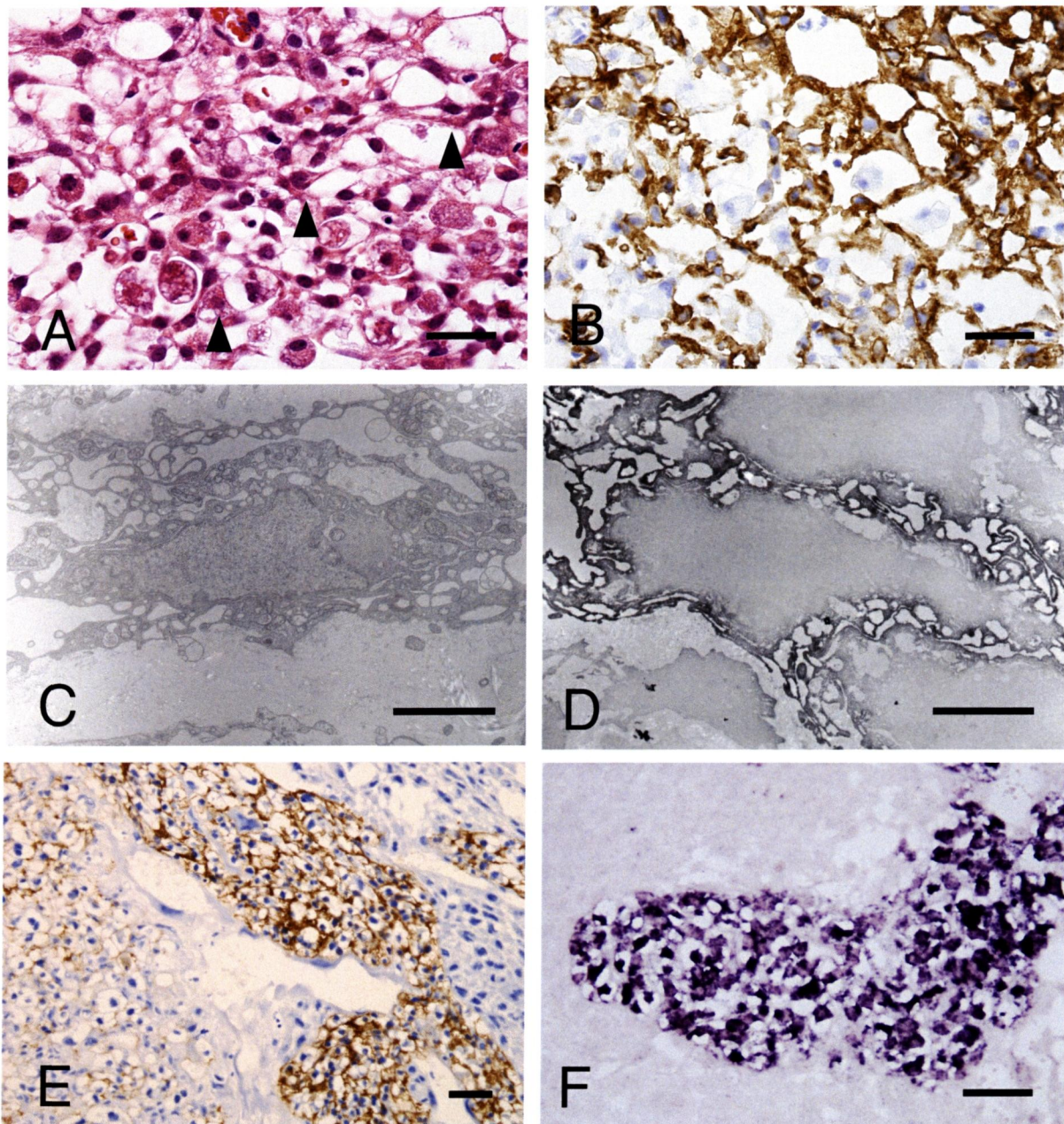
F : MG での LOX-1 の免疫電子顕微鏡.

Scale bar : A-D = 50 μm ; E, F = 10 μm .

妊娠中期のマウス胎盤の MG では、主な構成細胞は、uterine natural killer (NK) cell として知られる granulated metrial gland (GMG) cell と fibroblast-like stromal cell である。これらの2つの細胞は近接して存在し、大きくて丸い GMG cell (図 4 A 矢印) の周りを fibroblast-like stromal cell が取り囲んでいる (図 4 A)。免疫組織化学では、LOX-1 は GMG cell ではなく fibroblast-like cell に陽性所見を示した (図 4 B)。in situ hybridization では、LOX-1 mRNA が GMG cell を取り囲む fibroblast-like cell の細胞質に存在することが明らかである (図 4 C)。in situ hybridization での LOX-1 mRNA 発現パターンは fibroblast-like cell のマーカーである desmin 蛋白と一致していた (図 4 D)。電子顕微鏡で見ると、fibroblast-like cell は GMG cell と非常に密接しており (図 4 E)、長い細胞突起を出してその周囲を取り囲んでいた (図 4 E 矢印)。免疫電顕では、LOX-1 が fibroblast-like stromal cell の細胞突起の細胞膜に存在することが確認された (図 4 F 矢印)。

7-5 E14.5のマウス胎盤DB, JZ, LZでのLOX-1 mRNAならびに蛋白の細胞局在

図5 (A-F).



A: DBでのヘマトキシレン・エオジン染色.

B: DBでのLOX-1の免疫組織化学.

C: DBでの電子顕微鏡.

D: DBでのLOX-1の免疫電子顕微鏡.

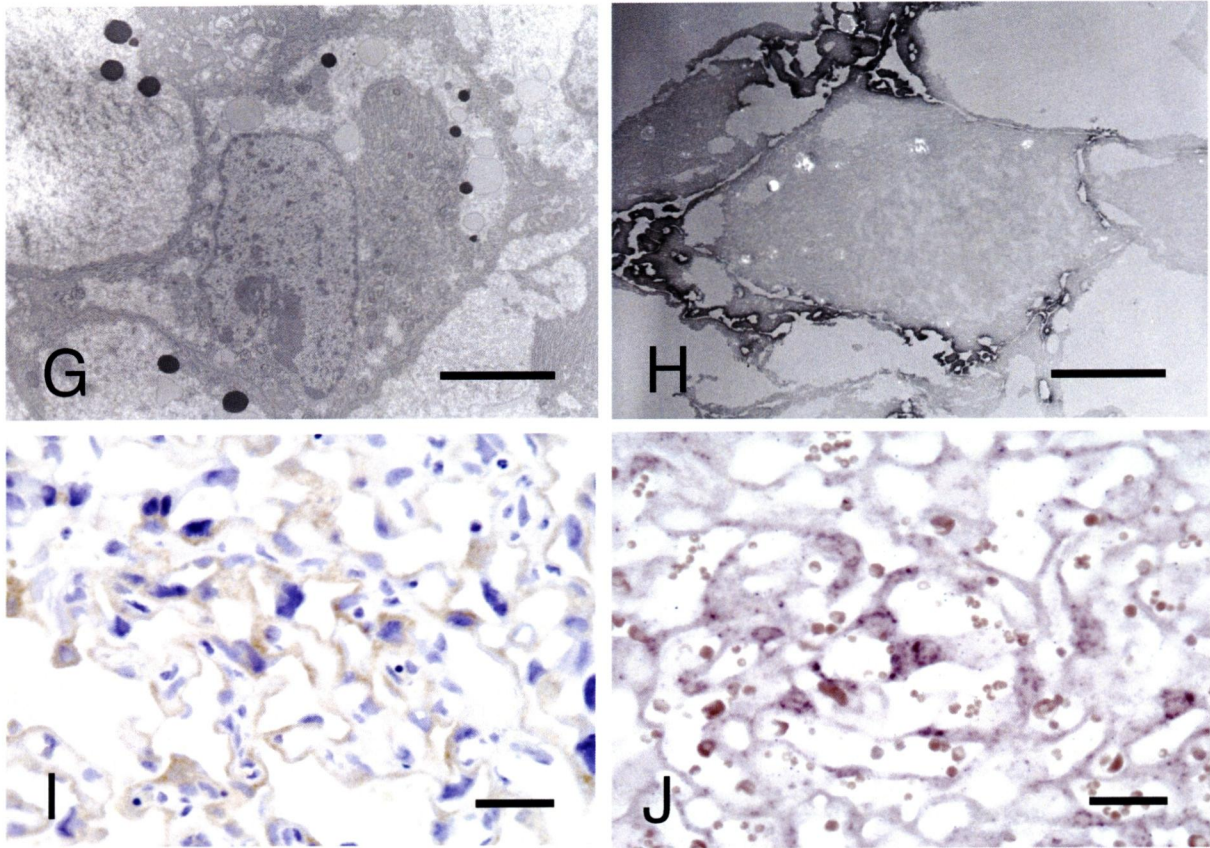
E: JZでのLOX-1の免疫組織化学.

F: JZでのLOX-1のin situ hybridization.

Scale bar: A, B, E, F = 50 μ m; C, D = 2.5 μ m.

7-5 E14.5のマウス胎盤DB,JZ,LZでのLOX-1 mRNAならびに蛋白の細胞局在

図5 (G-J).



G:JZでの電子顕微鏡.

H:JZでのLOX-1の免疫電子顕微鏡.

I:LZでのLOX-1の免疫組織化学.

J:LZでのLOX-1のin situ hybridization.

Scale bar:I, J = 50 μ m; G, H = 5.0 μ m.

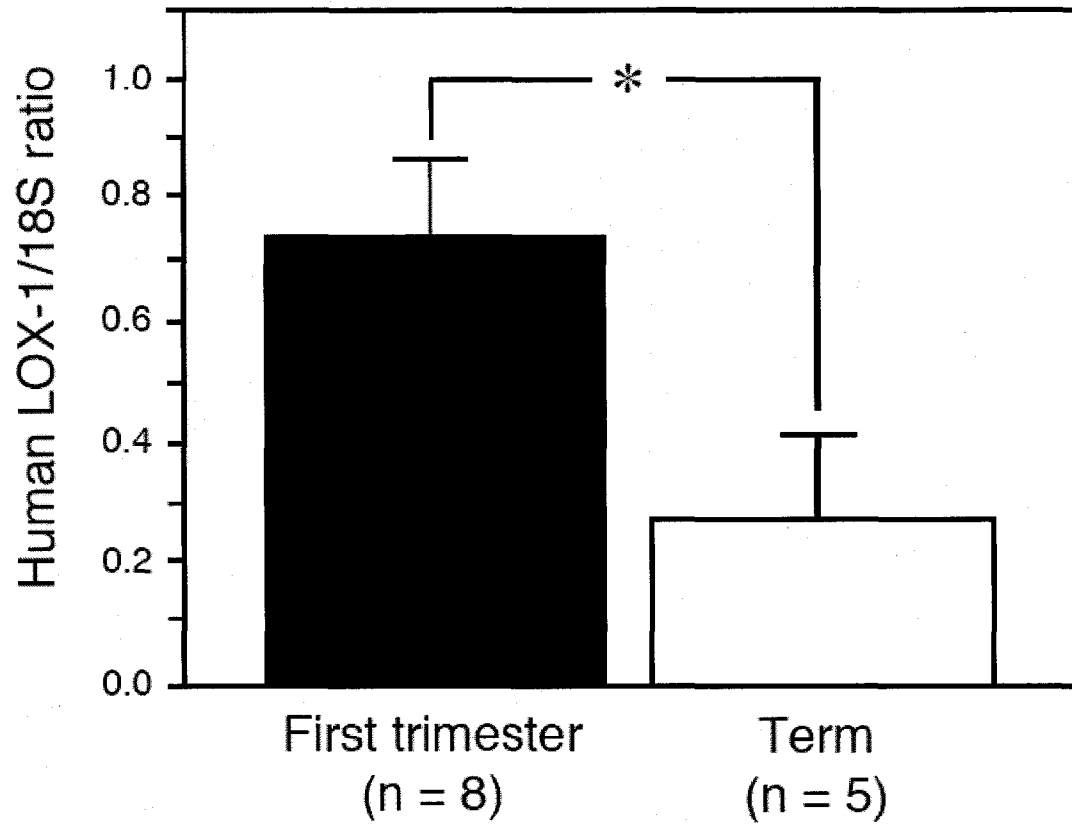
DB では fibroblast-like cell は GMG cell の周りを網目状に存在していた(図 5 A) . MG に比べると, DB では fibroblast-like cell と GMG cell の間隔は粗であるため, LOX-1 発現細胞が fibroblast-like cells であることが容易に分かった (図 5 B) . 電子顕微鏡では, fibroblast-like cell は非常に発達した細胞突起をもった細胞で, 免疫電顕では, LOX-1 は fibroblast-like stromal cell の細胞膜に存在することが確認された (図 5 C, D) .

E12.5 以降, JZ では spongiotrophoblast の間に明るい細胞質をもった glycogen trophoblast cell がクラスターを形成して存在する. JZ では, 索状にクラスターを形成した glycogen trophoblast cell に LOX-1 蛋白と mRNA の強い陽性所見を認めた (図 5 E, F) . E14.5 以降, glycogen trophoblast cell の一部は giant trophoblast の層を横切って DB に浸潤するが, 浸潤した glycogen trophoblast cell では LOX-1 の陽性像は弱くなっていた (図 5 E) . spongiotrophoblast と giant trophoblast に LOX-1 陽性像は見られなかった (図 5 E, F) . 電子顕微鏡では glycogen trophoblast cell は細胞質に存在する空胞によって特徴づけられ (図 5 G) , 免疫電顕では LOX-1 はこのような glycogen trophoblast cell の細胞膜に局在していた(図 5 H) .

LZ では labyrinthine cytotrophoblast に LOX-1 蛋白と mRNA の中等度の陽性像を認めた (図 5 I, J) .

7-6 ヒト胎盤における LOX-1 mRNA 発現

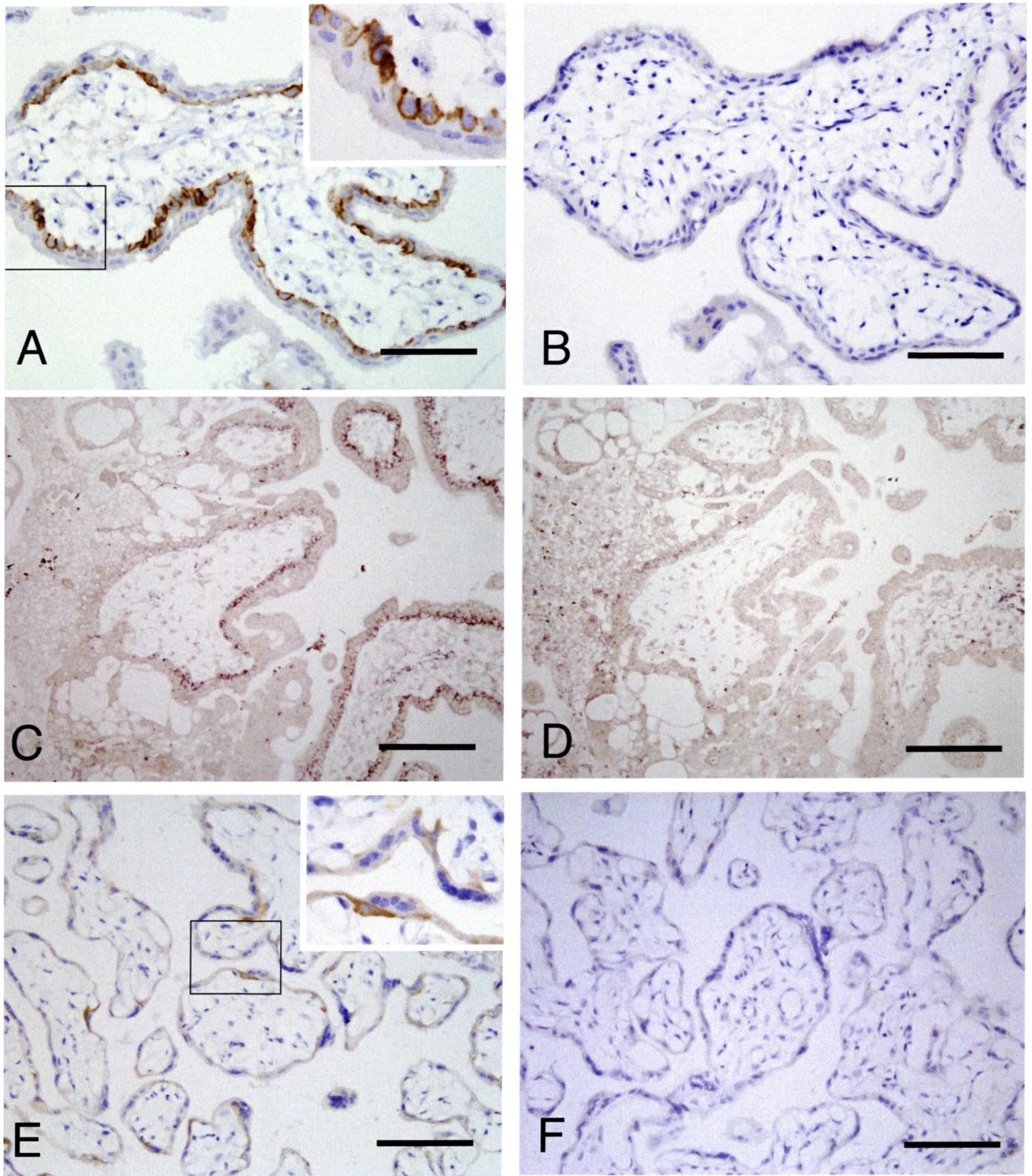
図 6.



ヒト初期胎盤と末期胎盤における LOX-1 mRNA 発現を比較するために、real-time RT-PCR を行った。末期胎盤に比べて初期胎盤では LOX-1 mRNA が有意に強く発現していた (図 6)。

7-5 ヒト胎盤におけるLOX-1 発現細胞の同定

図 7 (A-F).



- A : ヒト初期胎盤での LOX-1 の免疫組織化学.
- B : ヒト初期胎盤での正常マウス IgG による陰性コントロール.
- C : ヒト初期胎盤での LOX-1 の in situ hybridization.
- D : sense プローブによる陰性コントロール.
- E : ヒト末期胎盤での LOX-1 の免疫組織化学.
- F : ヒト末期胎盤での正常マウス IgG による陰性コントロール.
- Scale bar : A-D = 100 μ m ; E, F = 50 μ m.

ヒト初期胎盤では, ほとんどの villous cytotrophoblast の細胞膜に強い LOX-1 陽性像が見られ, syncytiotrophoblast には見られなかった (図 7 A) . ヒト初期胎盤の in situ hybridization においても, villous cytotrophoblast に LOX-1 mRNA の陽性像を確認した (図 7 C) . 末期胎盤でも, LOX-1 の局在パターンは同様に, syncytiotrophoblast 下に存在する扁平化した villous cytotrophoblast に LOX-1 陽性像が見られた (図 7 E) . 陰性コントロールには何も見られなかった (図 7 F) .

8. 考察

8-1 LOX-1 と粥状動脈硬化

LOX-1 は, 1997 年に Sawamura らによって発見されてから (Sawamura et al. 1997), 動脈硬化の病因に関与する可能性を示唆する報告が数多くなされている (Mehta et al. 2006). 最近, Mehta らによって, 動脈硬化モデルマウスである LDL receptor ノックアウトマウスにおいて LOX-1 を欠損させると動脈硬化病変が縮小し, 同時に炎症促進と酸化促進のシグナルも減少することが示された (Mehta et al. 2007). また, LOX-1 は, 動脈硬化を促進する状態, すなわち高血圧症と高脂血症における動脈硬化病変において発現が上昇し (Mehta et al. 2006), 粥状硬化に促進的に作用することが報告されている.

8-2 胎盤における LOX-1 発現と酸化ストレス

LOX-1 は正常状態の血管内皮細胞ではその発現がとても低く, 生理的状态での LOX-1 の役割についてはよくわかっていない (Sawamura et al. 1997). ヒト組織における LOX-1 mRNA の発現分布を検討したノザンブロットティングの結果では, 胎盤にもっとも強い発現がみられ, LOX-1 が妊娠を維持する上で重要な

役割を果たしている可能性が示唆された (Sawamura et al. 1997) . 妊娠中, 胎盤は酸化促進物質と内因性抗酸化物質の産生を示す主要臓器と考えられる (Walsh 1998) . フリーラジカルが過剰に発生すると抗酸化物質が激減し, 脂質や蛋白質, DNA の酸化損傷につながる. 胎盤の酸化ストレスのレベルは, 胎盤の血管が発達する初期胎盤の終わりに急速に増加し, それ以降次第に減少する

(Jauniaux et al. 2000) . 本研究では, マウスおよびヒト胎盤の両方において, 妊娠後期に比べて妊娠早期, 中期において LOX-1 mRNA 発現がより強いことを示した. このことは酸化ストレスの増加により LOX-1 が誘導され妊娠早期の胎盤機能に積極的に関与している可能性が示唆される.

8-3 マウス胎盤における LOX-1 の発現局在

マウス胎盤において, 母体側の脱落膜組織である MG と DB では, 主な構成細胞は血管内皮細胞と uterine NK cell (GMG cell) および fibroblast-like stromal cell である. LOX-1 が血管内皮細胞ではなく fibroblast-like stromal cell に局在していたことは興味深いことである. fibroblast-like stromal cell は GMG cell と密接に関連する細胞である. これまでの報告で, 妊娠前半では uterine NK cell が trophoblast

の浸潤や子宮らせん動脈のリモデリングを制御する役割を担っている可能性が示唆されている (Bulmer and Lash 2005) . 一方、uterine NK cell と fibroblast-like stromal cell の密接な関係は uterine NK cell の生存に重要であると言われている (Stewart 2000) . 線維芽細胞では LOX-1 に酸化 LDL が結合すると intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) のような様々な接着分子の発現が誘導されることが知られており (Chen et al. 2005), LOX-1 がこれらの細胞の密接な結合を強化するのに関与しているかもしれない. Uterine NK cell の数は妊娠後期には減少し, ラット胎盤においては妊娠 16 日齢でアポトーシスに陥った uterine NK cell を見ることができ, その数は妊娠 16 日齢以降増加する (Fukazawa et al. 1998) . LOX-1 には老化した細胞やアポトーシス細胞を除去する機能があるので (Oka et al. 1998), fibroblast-like stromal cell による LOX-1 発現はアポトーシスした uterine NK cell の除去にも寄与している可能性が考えられる. JZ と LZ では, LOX-1 発現は glycogen trophoblast cell に局限していた. Glycogen trophoblast cell は JZ から発生するがその起源は不明である (Fukazawa et al. 1998). 以前は glycogen trophoblast cell は spongiotrophoblast

から分化すると考えられていたが (Adamson et al. 2002; Georgiades et al. 2002), 最近の研究では glycogen trophoblast cell は spongiotrophoblast とは異なることが示された (Rampton et al. 2005; Bouillot et al. 2006) . 本研究では、spongiotrophoblast は LOX-1 を蛋白および mRNA の両方のレベルで発現していないことを見出したので、LOX-1 は glycogen trophoblast cell と spongiotrophoblast を識別する分子の一つであると考えられる。本研究は、マウス胎盤における LOX-1 の明確な局在を述べたはじめての研究である。LOX-1 発現が血管内皮細胞に見られなかったことは興味深いものである。Sawamura らの報告では LOX-1 の発現細胞は主に血管内皮細胞であると考えられていたので (Sawamura et al., 1997), マウス胎盤における fibroblast-like stromal cell と glycogen trophoblast cell による LOX-1 発現はユニークな機能をもっているのかもしれない。

マウスの glycogen trophoblast cell は脱落膜組織へ浸潤していくので、ヒトでの extravillous trophoblast に相当すると考えられている (Malassine et al. 2003, Coan et al. 2006) . Pavan らは native LDL ではなく酸化 LDL がヒト extravillous trophoblast の浸潤を濃度依存的に阻害すると報告している (Pavan et al. 2004) . また彼らは

cytotrophoblast による酸化 LDL の取り込みに関与する主要なスカベンジャー受容体は LOX-1 であることも見出している (Pavan et al. 2004) . これらのことを総合すると, glycogen trophoblast cell による LOX-1 発現は DB への glycogen trophoblast cell の浸潤を制御しているのかもしれない. DB へ浸潤した glycogen trophoblast cell には LOX-1 発現が弱かったことはその仮定を支持するものである. この点については, 更なる検討が期待される.

8 - 4 ヒト胎盤における LOX-1 の発現局在

ヒト初期胎盤を用いて LOX-1 の局在を免疫組織化学と in situ hybridization で検討すると, LOX-1 は血管内皮細胞や syncytiotrophoblast ではなく villous cytotrophoblast に局在することが確認された. ヒト末期胎盤においても LOX-1 の局在は villous cytotrophoblast に認められた. ヒト末期胎盤での LOX-1 の局在は, 以前の報告 (Lee et al. 2005) とは異なるものであった. Lee らはヒト正常末期胎盤と妊娠中毒胎盤を用いて, 免疫組織化学的に LOX-1 の局在を検討し, LOX-1 は syncytiotrophoblast に陽性で, 妊娠中毒胎盤でより強く陽性となると報告している (Lee et al. 2005) . しかしながら, 彼らの論文中的図 3 の LOX-1 の

染色を見ると，LOX-1 の陽性像は syncytiotrophoblast 層ではなく villous cytotrophoblast 層に局在しているように見える（Lee et al. 2005）．最近の報告によると，ヒト末期胎盤での villous cytotrophoblast 層は細胞表面が広がり薄くなっているが，その連続性は 80%が残っていると述べられている（Mori et al. 2007）．この結果は我々のヒト末期胎盤における LOX-1 局在を支持するものである．

8 - 5 LOX-1 と胎盤機能

本研究では，マウス胎盤において LOX-1 発現細胞が MG と DB での fibroblast-like stromal cell と，JZ と LZ での glycogen trophoblast cell，さらに LZ での labyrinthine cytotrophoblast であることを明確に実証した．LOX-1 欠損マウスでは繁殖能力に異常がないことから，LOX-1 は胎盤機能の維持には必須ではないようである

（Mehta et al. 2007）．しかしながら，LOX-1 発現細胞は妊娠中の酸化ストレスの調節に関与しているのかもしれない．妊娠における LOX-1 の正確な役割を明らかにするためにはさらなる研究が必要と考えられる．

9. 結語

本研究は、マウス胎盤における LOX-1 発現細胞の正確な局在を免疫組織学ならびに *in situ hybridization* により明らかにした初めての報告である。すなわち、マウス胎盤では、MG と DB での fibroblast-like stromal cell と、JZ と LZ での glycogen trophoblast cell, さらに LZ での labyrinthine cytotrophoblast が LOX-1 発現細胞である。この基礎的な実験結果は、マウスが最良の実験モデル動物であることを考慮すれば、胎盤における LOX-1 の機能を探る上で非常に有用な情報である。また我々は、ヒト初期胎盤における LOX-1 の発現局在を初めて明らかにした。さらに、すでに報告があっていたヒト末期胎盤における LOX-1 の発現局在についても、以前の報告とは異なる実験結果を得たが、妊娠初期および末期を通して考慮すればヒト胎盤における LOX-1 発現細胞が syncytiotrophoblast ではなく villous cytotrophoblast であることは理にかなった結果であると思われる。ヒトならびにマウス胎盤における LOX-1 発現細胞が以前から考えられていたような血管内皮細胞ではなかったことは興味深く、LOX-1 本来の生体内での機能を考える上で非常に重要であると考えられる。

1 0 . 参 考 文 献

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 250:358-373

Aoyama T, Chen M, Fujiwara H, Masaki T and Sawamura T (2000) LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. *FEBS Lett* 467:217-220

Aoyama T, Fujiwara H, Masaki T and Sawamura T (1999) Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 31:2101-2114

Bonet B, Chait A, Gown AM and Knopp RH (1995) Metabolism of modified LDL by cultured human placental cells. *Atherosclerosis* 112:125-136

Bouillot S, Rampon C, Tillet E, Huber P (2006) Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta* 27:882-888

Branch DW, Mitchell MD, Miller E, Palinski W, Witztum JL (1994) Pre-eclampsia and serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein. *Lancet* 343:645-646

Bulmer JN, Lash GE (2005) Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 42:511-521

Burton GJ, Jauniaux E (2004) Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 11:342-352

Chen K, Chen J, Liu Y, Xie J, Li D, Sawamura T, Hermonat PL, Mehta JL (2005)

Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids. *Hypertension* 46:622-627

Chen M, Nagase M, Fujita T, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T (2001) Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE. *287:962-968*

Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC (2006) Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* 235:3280-3294

Divjak M, Glare EM, Walters EH (2002) Improvement of non-radioactive in situ hybridization in human airway tissues: use of PCR-generated templates for synthesis of probes and an antibody sandwich technique for detection of hybridization. *50:541-548*

Draude G, Hrboticky N, Lorenz RL (1999) The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin. *Biochem Pharmacol* 57:383-386

Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D (2007) Involvement of PPAR γ in human trophoblast invasion. *Placenta* 21:S76-S81

Kobayashi H, Sakashita N, Okuma T, Terasaki Y, Tsujita K, Suzuki H, Kodama T, Nomori N, Kawasuji M, Takeya M (2007) Class A scavenger receptor (CD204) attenuates hyperoxia-induced lung injury by reducing oxidative stress. *J Pathol* 212:38-46

Fukazawa Y, Yamamura Y, Sato T, Iguchi T, Ohta Y (1998) Mode of cell death in the rat metrial gland during peripartum regression. *Anat Rec* 252:369-377

Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002) Comparative developmental

anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23:3-19 Hubel CA (1999) Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:222-235

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ (2000) Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157:2111-2122

Komohara Y, Terasaki Y, Kaikita K, Suzuki H, Kodama T, Takeya M (2005) Clearance of apoptotic cells is not impaired in mouse embryos deficient in class A scavenger receptor types I and II (CD204). *Dev Dyn* 232:67-74

Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T (1998) Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 83:322-327

Li D, Mehta JL (2000) Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1116-1122

Lee H, Park H, Kim YJ, Kim HJ, Ahn Y-M, Park B, Park JH, Lee BE (2005) Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in human preeclamptic placenta: possible implications in the process of trophoblast apoptosis. *Placenta* 26:226-233

Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T and Mehta JL (1999) Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *84:1043-1049*

Malassine A, Frenzo J-L, Evain-Brion D (2003) A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 9:531-539

Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G (2006) Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 69:36-45

Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Takeya M, Schnackenberg L, Beger R, Hermonat PL, Thomas M, Sawamura T (2007) Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res* 100:1634-1642

Mori M, Ishikawa G, Luo S-S, Mishima T, Goto T, Robinson JM, Mtsubara S, Takeshita T, Kataoka H, Takizawa T (2007) The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol Reprod* 76:164-172

Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T, Nishi E, Sawamura T, Masaki T and Kita T (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

Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T and Kita T (1998) Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1541-1547

Nakagawa T, Akagi M, Hoshikawa H, Chen M, Yasuda T, Mukai S, Ohsawa K, Masaki T, Nakamura T, Sawamura T (2002) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46:2486-2494

Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T (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

Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, Therond P, Sawamura T, Evain-Brion D, Fournier T (2004) Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology* 145:4583-4591

Rampon C, Prandini MH, Bouillot S, Pointu H, Tillet E, Frank R, Vernet M, Huber P (2005) Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Exp Cell Res* 302:48-60

Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T and Masaki T (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386:73-77

Stewart IJ (2000) Mouse granulated metrial gland cells require contact with stromal cells to maintain viability. *J Anat* 197: 495-502

Tsujita K, Kaikita K, Hayasaki T, Honda T, Kobayashi H, Sakashita N, Suzuki H, Kodama T, Ogawa H, Takeya M (2007) Targeted deletion of class A macrophage scavenger receptor increases the risk of cardiac rupture after experimental myocardial infarction. *Circulation* 115:1904-1911

Tulppala M, Ailus K (1995) Antibodies to oxidized low-density lipoprotein and to cardiolipin in nonpregnant and pregnant women with habitual abortion. *Fertil Steril* 64:947-950 Walsh SW (1998) Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 16:93-104

Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D, Quehenberger O (1998)
Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human
macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J* 334:9-13