

スカベンジャー受容体欠損マウスを用いた動脈硬化発症の分子機構の解析

Gene targeting of macrophage scavenger receptors: Implications for atherosclerosis

児玉 龍彦

東京大学先端科学技術研究センター
分子生物学部門教授

Tatsuhiko Kodama

Department of Molecular Biology and Medicine
Research Center for Advanced Science and Technology
University of Tokyo

Abstract Macrophage scavenger receptors (MSR) exhibit unusual broad ligand binding specificities and have been implicated in atherogenesis. Their physiologic and pathophysiologic functions, however, have not yet been established with certainty. In mice lacking both type I and type II MSR, as created by gene targeting, peritoneal macrophages exhibited impaired uptake of its ligands, such as modified low density lipoproteins (LDL) and advanced glycosylation end product (AGE), and defected adhesion activities. MSR deficiency markedly reduced a progression of atherosclerotic lesion in apo E defected mice and exhibited increasing sensitivity against pathogens such as *Listeria monocytogenes* and herpes simplex virus (HSV). These results indicate that the MSR not only function to uptake modified LDL but participate widely in the removal of foreign bodies and wasted materials. It was clarified that MSR plays a role of host defense systems in addition to its role in atherosclerosis. Moreover, MSR seems to be involved in multi-functions of macrophage such as endocytosis, adhesion and phagocytosis.

1. 研究目的

急速に高齢化社会をむかえつつあるわが国においては、成人病死因の上位を占める脳血管障害や虚血性心疾患の原因となるアテローム性動脈硬化の原因解明と予防および治療法の開発は寿命の延長のみならず、高齢者の生活の質を決定する大きな要因ともなっている。

アテローム性動脈硬化の発症には血管壁への単球/マクロファージ系細胞が集積して泡沫細胞になっていくことが鍵となる。この泡沫細胞化をになうのがマクロファージのスカベンジャー受容体とその関連遺伝子群である。

血管壁でマクロファージはスカベンジャー受容体を用いて酸化変性をうけたLDLをとりこみ泡沫細胞化することが仮説として有力であるが、いまだ直接的には証明されていない。

長い時間をかけて成立する動脈硬化の発症過程の解析は困難であり、適切な実験動物モデルの作成が求められている。我々はマクロファージスカベンジャー受容体I型、II型のcDNAクローニングに成功し、これを用いてスカベンジャー受容体欠損マウスを作成し、スカベンジャー受容体の生理的役割および動脈硬化発症における役割の解明をめざした。

2. 研究経過

スカベンジャー受容体遺伝子第四エクソンをネオマイシン耐性遺伝子でdisruptし、スカベンジャー受容体欠損マウスを作成した。この欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、マクロファージの性質の解析に用いた。

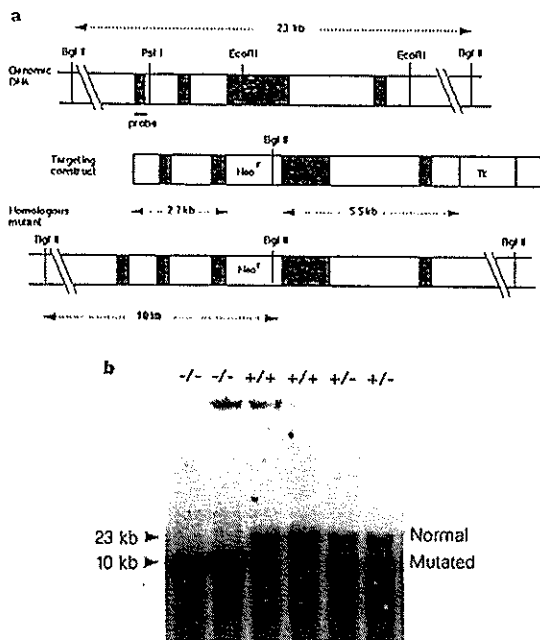


Figure 1 Targeting of the mouse MSR gene. a, The targeting construct of the mouse MSR gene and predicted structure of the targeted MSR locus. b, Southern blot analysis of *Bgl*II-digested genomic DNA. The 10-kb *Bgl*II fragment represents the homologous recombinant allele.

生体防御機能をみるために、リステリアとHSV1の感染実験を行った。

動脈硬化の進展をみるためには、高脂血症血漿と動脈硬化好発の表現型を示すAPOE欠損マウスをノースカロライナ大学前田教授より提供をうけ、交配実験をおこないメスにつきアテロームサイズの比較を行った。すべての実験計画はとどこおりなく進行し、えられた結果はNATURE誌に掲載され国際的にも高く評価された。

3. 研究成果

スカベンジャー受容体欠損マウスはFig1に示す様なターゲティングコンストラクトを用いて作成された。得られたマウスはサザン解析でホモ、ヘテロが確認された。ホモマウスのマクロファージは免疫組織学的検討でスカベンジャー受容体I型、II型蛋白を全く欠損していた。

スカベンジャー受容体欠損のマクロファージは、アセチルLDL、酸化LDLの取り込みが顕著に低下していた(Fig2.A,B)。

一方、血液中に注射された変性LDLの消失は全く差がなかった。このことはI型、II型は、マクロファージの異物処理には重要であるが血液中の異物処理はことなる遺伝子産物によりなわれていることを示している(Fig.2D)。

我々にとって意外であったのは糖尿病血管障害の原因に関与するAGE産物の取り込みにもスカベンジャー受容体が重要であることが証明されたことである。(Fig.2C)

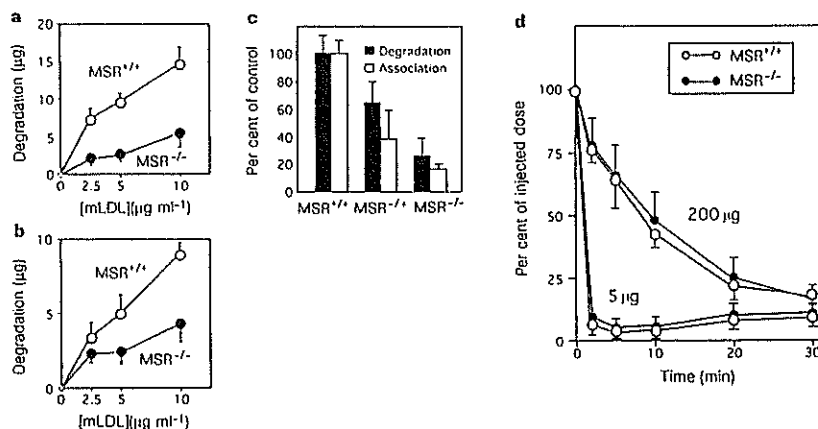


Figure 2 Modified-lipoprotein (mLDL) metabolism in MSR^{-/-} compared with MSR^{+/+} mice. a, Degradation of ¹²⁵I-labelled acetyl-LDL; b, ¹²⁵I-labelled oxidized-LDL; and c, ¹²⁵I-labelled AGE-BSA by peritoneal macrophages. Cell association is also shown in c. Degradation is given as micrograms of protein degraded per mg of protein in 5h for a and b, and 18h for c. d, Clearance of intravenously injected

¹²⁵I-acetyl-LDL from plasma of MSR^{-/-} (n = 3) and MSR^{+/+} (n = 3) mice. After injection of radiolabelled acetyl-LDL (5 or 200 μg protein), 50 μl blood was taken from the inferior cava at the indicated times and counted²⁰. Data are presented as means ± s.d.

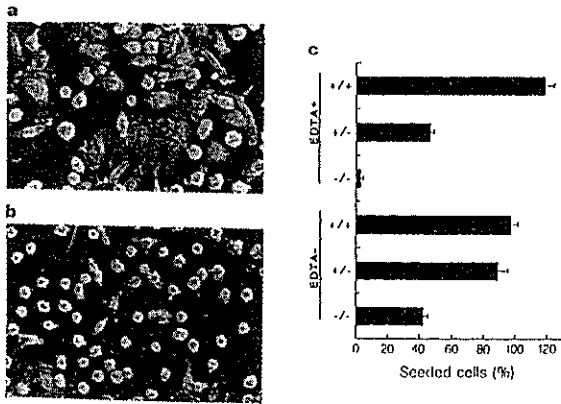


Figure 3 Adhesion properties of MSR-deficient macrophages. a, b, Scanning electron micrographs of peritoneal macrophages from MSR^{+/+} (a) and MSR^{-/-} (b) mice after 24 h in culture. About 60% of MSR^{+/+} mouse macrophages adhere tightly to glass, with their cytoplasm and plasma membrane spreading well (a). In contrast, more than 85% of macrophages from MSR^{-/-} mice still remain round, with few cytoplasmic processes (b). c, Adhesion of MSR-deficient macrophages to tissue-culture-treated plastic surfaces. Data are means \pm s.d.

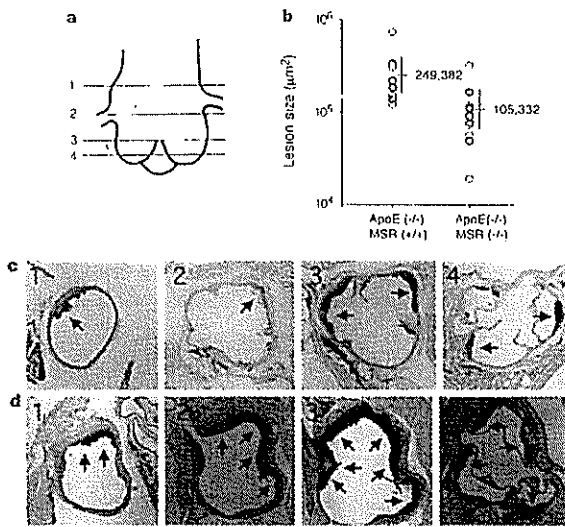


Figure 4 Evaluation of atherosclerotic lesions in apoE-knockout and MSR-A-and-apoE double-knockout mice. a, The four sections shown were used for quantitative evaluation of atherosclerotic lesions¹⁶: (1) the most proximal part of the ascending aorta had a round cross-section; (2) the valve attachment sites and the coronary ostia, but not the valve leaflets; (3) the valve leaflets appear as small nodules in the valve attachment sites; (4) the valves appear complete and are joined to their attachment sites. b, The average size of the atherosclerotic lesions in sections 1-4 in apoE-knockout ($n = 14$) and MSR-A/apoE double-knockout ($n = 15$) females at 5 months of age. Statistical analysis used Student's *t*-test. c and d, Representative sections from MSR-A/apoE double-knockout (c, 1-4) and apoE knockout mice (d, 1-4). Arrows indicate atherosclerotic lesions.

スカベンジャー受容体欠損マクロファージは接着とファゴサイトーシスにも大きな変化を示した。Fig3に示すようにスカベンジャー受容体が欠損しているとEDTA抵抗性の接着活性が消失した。

アポトーシスをおこした胸腺細胞は胸腺内マクロファージにより処理されるが、スカベンジャー受容体欠損マウスではマクロファージのファゴサイトーシスでの処理能力が正常の50%に低下していた。

アポE欠損マウスとの交配ではアポE欠損ホモマウスでもスカベンジャー受容体がないと動脈硬化のサイズは約40%に低下を示した (Fig4)。このことはスカベンジャー受容体の動脈硬化における役割の初めての直接的証明である。動脈硬化サイズの低下は変性LDL取り込み活性の低下と平行であり、他のスカベンジャー受容体関連遺伝子が残存アテロームの発症をになっていると考えられた。

すでにのべたように、スカベンジャー受容体欠損マウスでも変性LDLの血液中からの消失には違いがないので、LDLの血管壁での変性が重要であると考えられた。残存する病変にはマクロファージの集積と平滑筋細胞の増殖がみられ病変自体の質的性格にはかわりがなかった。

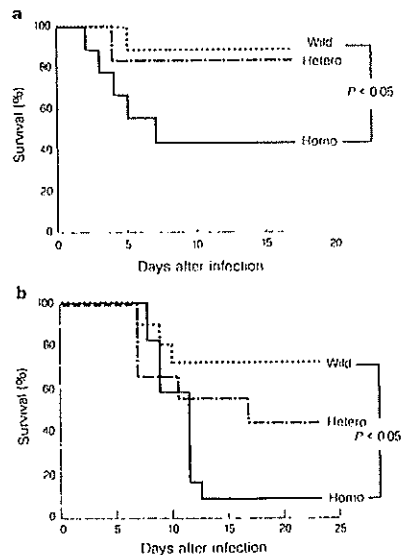


Figure 5 Survival of MSR-A-deficient mice after infection with pathogens. a, Survival after *L. monocytogenes* infection (10^6 CFU per mouse). b, Survival after HSV-1 infection (5×10^6 PFU per mouse). For statistical analysis, the Wilcoxon method was used.

Table 1 Multiplication of *L. monocytogenes* in MSR-A-knockout mice

	Genotype	Numbers (log) of bacteria (mean \pm s.d.)						
		10 min	1h	6h	24h	48h	96h	144h
Liver	-/-	3.8 \pm 0.05	3.1 \pm 0.37	2.0 \pm 0.61	4.5 \pm 0.30	4.5 \pm 0.82		
	+/+	4.0 \pm 0.06	3.0 \pm 0.19	2.2 \pm 0.19	3.7 \pm 0.33	4.2 \pm 0.71	4.2 \pm 1.28*	1.5 \pm 1.41
Spleen	-/-	4.3 \pm 0.10	3.6 \pm 0.20	4.3 \pm 0.45	5.9 \pm 0.12*	5.9 \pm 0.52	5.5 \pm 0.54	2.6 \pm 1.06
	+/+	4.1 \pm 0.33	3.4 \pm 0.29	3.9 \pm 0.32	5.4 \pm 0.02*	5.3 \pm 0.23	3.8 \pm 0.39	2.6 \pm 1.56
Blood	-/-	1.8 \pm 0.08	0	0.3 \pm 0.24	0.1 \pm 0.17	0.2 \pm 0.39	0.2 \pm 0.35	0
	+/+	2.2 \pm 0.14	0.1 \pm 0.17	0	0	0	0	0

Mice were each infected with 10^7 CFU *L. monocytogenes*.

* $P < 0.05$.

スカベンジャー受容体欠損マウスはリステリアおよびHSV1の感染実験において細菌感染後の生存率の低下がみられた (Fig5)。これは、血液中からの細菌などの除去の差ではなく (Table1)、マクロファージにとりこまれたあとも生存しつづける病原体の増加によることが示された。このことは、スカベンジャー受容体経路がマクロファージの殺菌力にも関連していることを示唆するデータである。

4. 今後の課題と発展

動脈硬化の成立過程におけるスカベンジャー受容体の役割に関しては、上記のように多くの知見が得られたが、次の課題も残っている。

第一に、LDLの変性がどこでどのように進展しているかということである。LDLの血液中での変性はあまり影響しないことを示すデータがえられたが血管壁でのLDLの変性過程は明らかではない。

さらにスカベンジャー受容体がAGE修飾物の処理にも重要であることが証明され、AGE化された蛋白の病理学的役割にスカベンジャー受容体がどのように関与するかの解明がいそがれる。

これらの課題にこたえるため、現在血管壁の細胞の混合培養系で *in vitro* での変性解析が進展中であり、新規の変性抑制剤の開発が進行中である。

第二に、I型、II型以外の関連遺伝子の役割である。これらの欠損マウスの作成は国際共同研究として進展中である。

第三に、単球/マクロファージの集積過程の動脈硬化進展における役割である。スカベンジャー受容体がEDTA抵抗性接着因子の正体であった。これらをふまえてマクロファージの集積をターゲットとした薬物の開発が急がれるであろう。

謝辞：今回の研究が実験内容でも、財源面でもおおきなピンチにあったときに日産財団の助成は大きな支えとなった。改めて感謝するとともに、今後も我々に続く若手の研究者へ人類の将来を切り開くような日産財団からの大胆な助成を期待申し上げます。

5. 発表論文リスト (スペースの関係から重要なもののみをあげた)

1. Suzuki H, Kodama T et al. Resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in scavenger receptor knockout mice *Nature*, 1997, 386, 292-6

2. Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T and Gordon S. A role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes *in vitro* *Proc natl Acad Sci USA*, 1996, 93:12456-60

3. Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Kodama T, Suzuki H, Kobori S, Schichiri M, Horiuchi S. The scavenger receptor serves as a route for internalization of lysophosphatidylcholine in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation *J Biol Chem* 1996, 271, 27346-52

4. Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masuzawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, Watanabe E, Luoma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T. Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci* 93(8):3269-74, 1996