

血管系の老化におけるマクロファージ の分子細胞生物学と新規治療法

児玉龍彦（東京大学先端研教授）

血管壁への老廃物蓄積過程とそれを清掃するマクロファージ系細胞の役割は、血管の老化現象を解明する鍵になる。実際にマクロファージが発現している受容体の研究は次項に示す如く近年急速に進展し、現在までにスカベンジャー受容体ファミリーがクローニングされ、動脈硬化の進展において、各々の役割を解明する必要がある。そこで、本研究では、代表研究者が発見したグループAのI型とII型受容体を手がかりに、マクロファージが血管の老化において果たす役割を解明し、さらに変性LDLが血管壁で生じる過程を明らかにして、治療薬開発のターゲットを明確にする。

〔研究組織〕

- 児玉龍彦（東京大学先端研教授）
- 間藤方雄（国際医療福祉大学教授）
- 二木鋭雄（東京大学先端研教授）
- 高橋 潔（熊本大学医学部教授）
- 土井健史（大阪大学薬学部教授）
- 内藤 眞（新潟大学医学部教授）
- 田中良哉（産業医科大学講師）

A. 研究目的

血管壁にあって変性脂質を取り込む受容体の研究は近年急速に進展し、現在までにスカベンジャー受容体(Scavenger Receptor : SR)ファミリーがクローニングされ、動脈硬化の進展において、それぞれの役割を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、マクロファージ (Mφ) のアセチル化LDL受容体として最初に発見されたグループAのI型とII型受容体 (SR-AI/II) を起点として、血管の老化においてMφが果たしている役割を解明し、それが取り込む変性LDLが血管壁で作られる過程を実証することにより、治療薬開発のターゲットを明確にすることを目的として研究班を組

織した。

B&C. 研究方法と研究結果

1. 高脂血症、高血圧下での脳細血管の変化は他の血管と異なる。

脳細動脈の硬化は一般血管例えば大動脈、腎動脈、冠状動脈のそれと異なり、古くより血管壊死、フィブリノイド変性を伴う血管壁肥厚として定義されている。間藤は従来より脳細血管は高脂血・高血圧に際しても、血管壁細胞の反応が異なること、つまり上記の条件に於いても、血管壁内へのマクロファージ（単球）の侵入が少なく、また血管平滑筋の反応性は著しく低く、いわゆる血管壁肥厚は平滑筋細胞の変形・壊死及びFGP細胞の幼弱化及び増殖によることを示した。それら所見に関連して、脳グリア細胞の血管反応への関与、即ちミクログリアの活性化・星状膠細胞のアストロファイバーの出現及び増加が認められ、脳細血管の硬化（病変）を研究する際には脳細血管自身の病変とそれに付随する脳グリア細胞の変化を併せ検討する必要がある。そこで、以上の所見の機序を明らかにするため、1)脳細血管

に伴うMATO細胞のエンドトキシンに対する反応性。2)脳虚血時に於ける脳血管壁細胞並びにFGP細胞の反応。3)高脂血時に於ける脳血管壁細胞の反応性とマクロファージ、FGP細胞の関与。4)高血圧・脳卒中易発性ラット(SHRSP)に於けるFGP細胞の挙動。を検討した。その結果、1)の課題について、エンドトキシンによるFGP細胞の活性化はミクログリア及び星状膠細胞の活性化をもたらすこと、血管内皮細胞の細胞質突起が出現することが示された。また、幼弱FGP細胞の出現と共にFGP細胞にはIL-1 β 及びiNOSの上昇が認められた。2)に関して脳虚血時には、脳細血管の透過性の上昇に伴い、内皮細胞の細胞突起の出現、細胞間隙の増加、FGP細胞の浮腫性変化が観察されると共に、脳皮質ではミクログリアの突起が伸長し、海馬に於いてはアストロファイバーが出現、増加することが認められた。3)の高脂血状態に関しては、海馬采及び視床の血管の一部に多量のマクロファージが侵入しており、同時にFGP細胞の退行及びミクログリアの退行が認められると共に、血管壁平滑筋細胞の退行変化が認められた。この際、見かけ上は血管壁の肥厚を呈するが、その超微像は泡沫細胞の出現と退行性細胞の出現に過ぎなかった。4)の高血圧、脳卒中モデルに於いては、興味ある所見としてFGP細胞の摂取能・エピソードの低下が血管病変に先立ち出現した。次いで平滑筋細胞の著しい変性・壊死、さらに、幼弱FGP細胞ないしは軟膜細胞の増殖が認められ、同時に膠原線維の出現が顕著であった。この様ないわゆる血管壊死・血管浮腫を呈した血管壁になって初めて単球・マクロファージの侵入が認められた。この様な変化は脳血管壁の脆弱化を招き、血管破綻の原因となりうるものと推察された。

2. マクロファージの泡沫化にはスカベンジャー受容体以外の受容体が重要である。

高橋は、粥状硬化病巣形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体(SR-A type I/II)の役割を検討するために、LDL受容体欠損マウスとSR-A type I/II欠損マウスとの二重欠損マウスを作成し、4ヶ月間の高脂肪食飼育の後に大動脈弁周囲の粥状硬化病巣サイズを比較した。その結果、LDL受容体/SR-A type I/II二重欠損マウスの病巣サイズはLDL受容体単独欠損マウスに比べて有意に低値を示し、SR-A type I/IIが粥状硬化病巣形成に重要な役割を果たすことが実証された。しかし、病巣サイズの減少率は約20%で、昨年度に検討した普通食飼育下でのアポE/SR-A type I/II二重欠損マウスの病巣サイズの減少率約60%に比べ、軽度の抑制に留まった。そこで、LDL受容体/SR-A type I/II二重欠損マウスにおける残存病巣について、CD36、CD68/Macrosialin、MARCO(macrophage receptor with collagenous structure)などのSR-A type I/II以外のスカベンジャー受容体の発現を検討すると、いずれもLDL受容体単独欠損マウスと同様の発現が観察された。普通食飼育のアポE/SR-A type I/II二重欠損マウスと高脂肪食飼育LDL受容体/SR-A type I/II二重欠損マウスの血中コレステロール値を比較すると、前者で400~500mg/dlであったのに対し、後者では2000~3000mg/dlに達し、著明な高コレステロール血症状態では、SR-A type I/II欠損のみでは病巣形成の抑制には不十分だった。

3. 肝肉芽腫形成におけるSR-A type I/IIはサイトカインの発現に介在する。

同時に高橋は、肝肉芽腫形成におけるSR-A type I/IIの役割を検討するために、SR-A type I/II欠損マウスに *Corynebacterium parvum* (C. parvum) 死菌を静脈投与し、肝肉芽腫の形成過程を観察した。その結果、死菌投与後3日目から10日目までは、野生型マウスに比べ、SR-A type I/II欠損マウスでは肉芽腫の数が少なく大きさも小さく、肉芽腫形

成の遅延が見られ、肉芽腫内のマクロファージや単球数も低値であった。14日目以降になると、野生型マウスでは肉芽腫の退縮がみられたが、SR-A type I/II欠損マウスでは肉芽腫の退縮が遅れ、両者間の肉芽腫の数と大きさの有意差は消失した。死菌投与後の肝におけるTNF- α 、IFN- γ 、およびMCP-1の発現は、SR-A type I/II欠損マウスで遅延が認められ、これらのサイトカインの産生にSR-A type I/IIを介する何らかのシグナル伝達機構の関与が想定された。肉芽腫形成の初期では、SR-A type I/II欠損マウス肝における*C. parvum* 貪食細胞数は有意に少なく、*C. parvum* の細胞内取り込みに際してSR-A type I/IIが関与することが想定された。

4. SR-AI/II作用の分子機構の解明.

土井は、動脈硬化発症に大きく関与するマクロファージスカベンジャー受容体に着目し、その細胞質領域内の機能配列を分子生物学的手法を用い解析した結果、この領域内のN末端より21番目から28番目のアミノ酸配列が、効率の良いレセプターメディアエーティッドエンドサイトーシスに、またその内21番目から24番目の配列については、受容体の細胞表面への発現にも関与することを明らかにした。そこで、この受容体の細胞質領域と相互作用する因子を検索するため、次の手法を用いた。1) YeastのTwo hybrid systemを用いた単離法、2) 細胞質領域の合成ペプチド分子を用いた単離法。その結果、1)では、CDC10、CIG49、RIG-G、Femtinなどが相互作用できることが示唆された。2)では、1本鎖の分子、及びこれらをリンカーを介して結合させた3本鎖分子の合成を行った。これら分子の構造を分光学的に調べたが、いずれもこれら単独では明確な3次構造を形成しないことが判明した。

5. LDL抗酸化剤の効果を検討するマーカーをLDL粒子に導入する。

二木は、LDLへの理想的な分布と抗酸化作用を示す薬剤として、 α -トコフェロール (Toc) の化学構造を基に2,3-dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-*tert*-butylbenzofuran(BO653)を設計、合成し現在臨床治験を行っているが、血管壁におけるLDLの酸化の進行をリアルタイムで追跡することを目的とし、新しい蛍光プローブの細胞培養系への導入を行っている。既に、Diphenyl pyrenyl phosphine (DPPP)が脂質ヒドロペルオキシド

(LOOH)と当モルで反応し、強い蛍光を発する酸化物DPPP oxide (DPPP=O)に変わることを利用し、このDPPP=Oをphosphatidyl serine (PS)で構成されたリポソームに組み込み、これをマクロファージに取り込ませ、蛍光顕微鏡で細胞に一致してDPPP=O由来の蛍光が観察されることを確認した。

さらに、このDPPP=Oの細胞内における局在を共焦点顕微鏡を用いて検討し、DPPP=Oは核の内部以外の膜および細胞質内に存在することを確認した。ついで、生体内でのLDL酸化をモニターするため、LDL粒子内への導入方法を検討した。

次の方法にてDPPPのLDL粒子内への導入を試みた。a. 有機溶媒に溶解させて添加、b. リン脂質のリポソームあるいはリン脂質とトリオレインのエマルジョンとして添加、c. ナスフラスコの壁にフィルム状にして添加、d. LDLを脱脂し、再構成の際に添加、など行ったが、有効ではなかった。さらに、DPPPのLDL脂質二重膜との親和性を高めるためにDPPPに化学修飾することによってLDL粒子への移行促進を試みたが、いずれも満足する結果は得られず、構造上これが困難であると判断した。そこでDPPPのLDL脂質二重膜との親和性を高めるためにDPPPに化学修飾する方法を検討した。ピレン・フルオロセイン他の蛍光物質を膜プローブとして使用する際にカルボン酸付加体を用いることなどを参考に、目的物質はDPPP-(CH₂)₁₁-COOHとした。ドデカン二酸モノエチルエステル

を塩化チオニルでモノクロライドにし、プロモピレンにフリーデルクラフツ反応で付加した後、プロモ基をブチルリチウムによりリチウム化してジフェニルクロロフォスフィンとカップリングしたところ、ほとんど反応しなかった。

6. スカベンジャー受容体による細菌性抗原処理機構

スカベンジャー受容体class Aには1型、2型とそれにきわめて近似した構造を有する受容体 *macrophage receptor with collagenous structure*(MARCO)がある。MARCOは脾の濾胞辺縁帯に局在する特異なマクロファージ亜群にのみ発現し、ある種の細菌性多糖類を認識する。スカベンジャー受容体class A I型もグラム陽性および陰性細菌の抗原を認識する。しかし、これら受容体が生体防御においてどのような役割を果たしているかはほとんど解明されていない。内藤は、種々細菌性抗原の投与によってスカベンジャー受容体ファミリーの発現機構をBALB/cマウス、スカベンジャー受容体Class Aノックアウトマウスと野生型マウスを用いて検討し、細菌性抗原処理機構における本受容体ファミリーの役割の解明を行った。

BALB/cマウスにLPS、zymosan, BCG, listeriaを投与して種々の臓器を採取し、PLP固定後凍結切片を作成して抗マクロファージ抗体

(BM8/F4/80)、抗辺縁帯マクロファージ抗体(ER-TR9)、抗marginal metallophilic macrophage抗体(MOMA-1)、抗MSR-A抗体(2F8)、抗MARCO抗体を用いた免疫染色を行った。またRT-PCRにより肝における各種サイトカイン、レセプターの発現を検討した。op/opマウス及びその正常同腹マウスに対してもLPSとBCGを経静脈投与し、同様に検討した。また、脾組織について免疫染色と結核菌染色の二重染色を行った。

次に、7~12週令の雄のスカベンジャー受容体

ノックアウトマウスと対照マウスに200 μ gのLPSを腹腔投与し、経時的に肝組織を採取、ホルマリンまたはPLP固定し、抗マクロファージ抗体(F4/80)、抗CD14抗体、抗マクロファージコロニー刺激因子受容体(c-fms)抗体、抗リンパ球抗体などを用いて免疫染色を行った。エステラーゼ染色による好中球の同定も行った。また、RNAを抽出し、RT-PCRで各種サイトカインの発現を観察した。一部マウスには200 μ gの大量投与を行った。さらに腹腔マクロファージへのFITC標識LPSの取り込みをFACSを用いin vitroで検討した。

1. スカベンジャー受容体class A (I型およびII型(MSR-A)とMARCO)の発現

その結果、MSR-Aは種々の組織マクロファージに常に発現し、MARCOは無刺激状態では脾臓の辺縁帯マクロファージとリンパ節の辺縁洞構成細胞にのみ発現した。LPS、zymosan、BCG、L. monocytogenesの投与後、肝脾のマクロファージのMSR-A発現は増加した。一方、MARCOは一過性に発現し、BCG、listeria投与マウスでは肉芽腫構成細胞にも発現していた。マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)産生を欠損するop/opマウスではLPS投与後のMSR-AとMARCOの発現は同腹マウスに比較して弱く、MSR-AとMARCOの発現にM-CSFが関与する可能性が示唆された。免疫顕微鏡ではMSR-AとMARCOはマクロファージの細胞膜と取込み空胞の膜に局在していた。

op/opマウスの脾臓においてはER-TR9陽性の辺縁帯マクロファージとMOMA-1陽性のmarginal metallophilic macrophageは存在しない。しかし、op/opマウスでもMARCO陽性の辺縁帯マクロファージは存在し、ER-TR9と抗MARCO抗体を用いた二重染色で同腹正常マウスにはER-TR9陽性、ER-TR9およびMARCO陽性、MARCO陽性の3つの脾辺縁帯マクロファージ群が認められた。BCG投与後、同腹マウスではER-TR9およびMARCOを発現

している辺縁帯マクロファージと *marginal metallophilic macrophage* にBCG菌の著しい集積がみられ、*op/op*マウスではMARCOを発現している辺縁帯マクロファージに一致してBCGが取り込まれていたことから、MARCOは細菌性抗原の認識と取込みに関与すると考えられた。

2. LPS誘発肝障害におけるスカベンジャー受容体の役割

LPS投与後肝の好中球浸潤は野生型マウスに比較してノックアウトマウスに多かった。F4/80陽性マクロファージは両群とも一過性に増加していた。CD14、*c-fms*の陽性細胞とmRNAの発現は野生型の方が多かった。T、Bリンパ球の浸潤は両群に有意差はなかった。M-CSF、TNF- α 、MIP-1 α のmRNAの発現も野生型の方が多かったが、MIP-2mRNAの発現はノックアウトマウスが多かった。MARCO、iNOSの発現は大差がなかったが、血清中のIL-1濃度はノックアウトマウスが有意に高かった。また、200 μ gのLPS投与により、LD50はノックアウトマウスが高く、IL-1 receptor antagonistの投与により死亡率は低下した。腹腔マクロファージを用いた実験ではノックアウトマウスマクロファージのFITC標識LPSの取り込みは野生型マウスマクロファージに比較して少なかった。

7. 酸化LDLは単球のインテグリンを活性化して内皮細胞への接着を促進する。

田中は、ケモカインMCP-1や酸化LDLは、単球のインテグリンを活性化し、インテグリン依存性の微小血管由来の内皮細胞との単球の接着を誘導することを認めたので、酸化LDLによる単球のインテグリン活性化の機構を検討した。その結果、動脈硬化の病態形成に重要なリポ蛋白である酸化LDL (0.1 mg/ml) は、単球のインテグリン依存性の微小血管由来内皮細胞、ICAM-1発現COS細胞やVCAM-1発現COS細胞との接着を誘導したが、ア

セチル化LDLやnative LDLは殆ど接着を誘導しなかった。また、酸化LDLによって誘導された単球の接着は、MCP-1 (10ng/ml) を添加することによって更に増強した。さらに、酸化LDL刺激によって1分以内に単球細胞内骨格線維F-actinの著明な重合化を認めたこと、酸化LDL刺激によりインテグリンLFA-1 α 鎖のCa依存性活性化エピトープを認識するNKI-L16抗体との結合が著明に増強した。

8. 血管壁への単球動員とM ϕ への分化、泡沫細胞形成の体外モデルを作成した。

単球はさらに内皮細胞下に動員されて残留しM ϕ に分化する。兎玉は、この現象を経時的に体外で観察する為、ウサギ大動脈の初代培養平滑筋細胞と内皮細胞を重層し、ヒト末梢血由来単球を添加して混合培養するシステムを作製した。蛍光標識細胞をレーザー共焦点顕微鏡で追跡し、時系列で固定した培養系を免疫染色、電子顕微鏡で観察したところ、単球は数時間で内皮下へ入り込むこと、マトリクス内にて三日でマクロファージに分化すること、最終的に酸化LDLの存在下で混合培養を行うことによって一週間で泡沫細胞を形成することが確認され、*in vitro*での泡沫細胞形成系を昨出することができた。

D&E. 考察、結論

間藤は脳細血管の破綻を含む病変にはFGP細胞が深く関与していることを示唆する結果を得た。

高橋は、SR-A type I/II以外のスカベンジャー受容体がマクロファージの泡沫細胞化に関与することを示唆する所見を得た。また、SR-A type I/II欠損マウスでは、SR-A type I/IIを介するシグナル伝達の欠如により、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1などのサイトカインの発現が遅延し、これに続く単球の動員ならびに単球のマクロファージへの分化や活性化が遅れることにより肉芽腫形成が遅延したものと考えられた。

土井は、スカベンジャー受容体の細胞質内領域にCDC10、CIG49、RIG-G、Ferritinなどが相互作用し得ることが示したが、さらに多くの陽性クローンが得られ、この方法によって得られた陽性クローンの中には機能的に意味の無いものも含まれる可能性があり、本手法以外の方法によるアプローチが必要と考えた。現在、Two hybrid systemを用いた単離法については、別のアプローチとして免疫沈降法による相互作用因子の探求を行っている。すなわち、天然型スカベンジャー受容体と機能部位を欠失した受容体の両者に抗体認識部位を付加し、これらの受容体を発現した細胞を用いて免疫沈降を行う方法で、天然型の受容体の場合のみ共沈してくる因子を単離すれば、機能配列と相互作用する分子のみを検出できると考えられる。、細胞質領域の合成ペプチド分子を用いた単離法については、これら合成したペプチド分子を用いてアフィニティカラムを作成し、相互作用する分子の単離を試みている。

二木は酸化マーカーであるDPPPをLDL粒子内に導入するために、引き続きプロモ化した後マグネシウムを添加してGrignard試薬とし、ドデカン二酸と反応させるという経路で合成を行っており、引き続き種々の方法によってLDL内へのDPPPの導入方法を検討する。

内藤は、種々の細菌性抗原によってMSR-AとMARCOの発現が増強する事、MARCOは特異なマクロファージ群に発現するのみでなく、種々の細菌性抗原によって発現誘導されることを明らかにした。機能的にはMARCOは細菌性抗原に対する生体防御において重要な役割を果たしていることが推測された。さらに脾の辺縁帯マクロファージにはphenotypeの上で多様性があることが示された。さらに、実験2の結果から、スカベンジャー受容体欠損マウスではLPS刺激によるCD14, c-fmsなどの受容体、および種々のサイトカインの

発現が減弱したが、好中球の反応は亢進しており、MIP-2の発現増強との関連が示唆された。ノックアウトマウスは高い感受性を示し、IL-1血中濃度の上昇、IL-1 receptor antagonistの投与による死亡率の低下からスカベンジャー受容体を介する細胞内シグナル伝達はIL-1産生系と関与するものと思われた。さらに、ノックアウトマウスマクロファージのLPS結合能の低下がin vitroの実験から証明され、スカベンジャー受容体はLPS受容体の一つとして機能していると考えられた。以上のように、本研究からスカベンジャー受容体class Aは細菌性抗原によって発現が誘導、増強され、それらの取り込みに重要な受容体とみなされた。さらに、ノックアウトマウスの成績から、スカベンジャー受容体を介するシグナルはサイトカインやケモカインの産生の制御に関与し、生体防御に有利に機能するものと考えられた。

田中は、酸化LDLは単球表面に発現するインテグリンの立体構造の変化や多量体化を引き起こして、接着性を誘導することを示した。また、酸化LDLやMCP-1は、単球の経内皮細胞間の潜り込みをも誘導することが認められ、動脈硬化部への単球の集積に重要な役割を担うことが示唆された。一方、動脈硬化病変においては様々な増殖因子が産生され、血管内皮細胞や平滑筋細胞の増殖、及び病態の進展をもたらすとされる。今回興味深いことに、動脈硬化部で産生されるとされるHGFやVEGF等の増殖因子も、単球に直接作用してインテグリン依存性の内皮細胞との接着と経内皮細胞間の潜り込みを誘導することが明らかとなった。以上のように動脈硬化病変は、炎症性サイトカインのみならず酸化LDLや増殖因子を始め多彩な因子が、"inside-out"のシグナルを介して接着分子の発現増強と接着性の誘導をもたらす事により、単球と内皮細胞との接着と病変部への浸潤が促進される部位であると考えられる。

兎玉は酸化LDLを用いて体外での泡沫細胞形成系を樹立したが、今後より生理的な泡沫細胞形成を再現するため、native LDLによる泡沫細胞形成系を構築する。このとき、平滑筋が産生するマトリックスの中にはSyncecanというproteoglycanの一種が生成されているが、これはLDLとの結合能を有しており、血管平滑筋の存在が有用であることが示唆された。

脳血管老化を理解するためには、Mφ細胞の挙動が今後も重要である。また理想的な抗酸化剤の開発に加え、生体内で動脈硬化に促進的なSR-A/II作用の分子機構を明らかにして阻害剤を設計することは、種々の血管病変におけるスカベンジャー受容体を標的とした治療薬を開発するうえでの主要なターゲットとなる可能性がある。さらに、Mφ自体をターゲットとする治療薬の開発の為に、単球の血管壁での動員を再現する共存培養系をスクリーニング系として使用する必要がある。SR-Aは多様なリガンド結合性のため、変性脂質を結合して動脈硬化を促進するばかりか、凝集した β -amyloidの結合を介してAlzheimer病と、AGEの結合を介して糖尿病関連疾患に関与しており、当研究が高齢化社会に暮らす人々の生活の質を改善するものとする。

マクロファージの泡沫化機構の解析

児玉龍彦（東京大学先端研教授）

動脈硬化初期病変である、泡沫細胞、脂肪線条の生成機序に関しては不明の点が多い。これは適切な体外モデルがないためであるが、我々は混合培養系に注目し、より長時間の培養が可能となるような初代培養細胞を利用して血管壁モデル培養系を構築した。これに対してヒト末梢血由来の単球細胞を添加し、一定時間の培養を継続することによって単球動員の詳細な形態、内皮細胞下における単球細胞の分化過程、および泡沫細胞の形成を観察することができた。この培養系は泡沫細胞形成機序の解明や治療薬開発に有用であると考えられる。

キーワード：動脈硬化，マクロファージ，内皮細胞，混合培養，泡沫細胞。

A. 研究目的

我々は動脈硬化特に冠動脈硬化の発症機序を明らかにするために、体外で経時的にしかも容易に観察することができる血管壁モデルを作成した。まず、動脈壁から血管平滑筋、内皮細胞、初代培養にて単離し、続いて細胞外マトリックスとともにこれらを共存培養することによって、血管壁環境の体外再構成系を構築したものである。さらに、血液から単離した単球、マクロファージ、リンパ球、血小板及びLDLなどの血清成分を添加しつつ培養を行うことによって、内皮細胞下にマクロファージが侵入、集積する過程を簡便に体外で再現することができ、さらに、あらかじめ蛍光標識しておいたマクロファージのうち、内皮細胞下に侵入したものの数を共焦点顕微鏡で観察、測定して潜り込みを定量化することができる。

この培養系を引き続き変性LDLを負荷しつつ培養を継続すると内皮細胞下において細胞室内に脂肪滴を有する単球系細胞の形成を確認し、泡沫細胞と考えられる。

このようにして作成された細胞培養系を長期短期に利用し、各種抗酸化剤や、接着因子発現阻害剤を添加したり、マクロファージスカベンジャー受容体やアポEなど、動脈硬化で重要な蛋白質を欠損したマウスやWHHLウサギの細胞を利用して、初期病変形成の詳細な機序を明らかにし、その予防法を探ることが当研究の目的である。

B. 研究方式

1. ウサギ大動脈血管壁初代培養細胞とヒト末梢血由来単球細胞による混合培養系の構築。

我々はコラゲナーゼ処理によってウサギ大動脈から内皮細胞と平滑筋細胞を分離し、初代培養する方法を新規に開発した。この内皮細胞をコラゲンマトリックスの上に播種したものをMethod I、あらかじめ播種した平滑筋が作るマトリックスの上に播種する培養系をMethod IIとした。ヒト末梢血より単離した単球細胞を、上記血管壁モデルに添加して混合培養を行った。

2. 混合培養系の観察

(1) 凍結切片作製による単球潜り込みの確認。

単球を添加する直前にMCP-1にてチャンバーを

4時間刺激した系では、固定したフィルターをまず凍結切片とし、抗CD68抗体、Mφ特異的抗体であるAM-3K、抗スカベンジャー受容体抗体による染色を行った。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡による迅速かつ直接的単球潜り込みの観察。

あらかじめ内皮細胞はRhodaminにて赤に、単球はFITCにて緑色に着色した後に混合培養を行い、固定後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。

(3) 電子顕微鏡による内皮下潜り込み、マトリクス内定着、泡沫化の観察

混合培養の終了した検体は1.5%グルタルアルデヒドにて固定したのち、走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡による定量的測定

上記混合培養系樹立の主目的の一つは大量かつ迅速な薬剤スクリーニング系への応用である。このため、共焦点顕微鏡とコンピュータ制御ステージを組み合わせた定量システムを開発した。

C. 研究結果

すでに、混合培養の凍結切片を用いた免疫組織学的検討によって、混合培養系に単球細胞が侵入していることは確認されているが、今回内皮細胞の細胞間にtight junctionの構成蛋白である α catenin, VE-Cadherinが存在していることを確認した。また、Method IIにおける平滑筋の表現型を検討するためにMyosin Heavy chainの抗体を用いたところSM1, SMembが陽性であり、分泌型であることが確認された。さらに、この平滑筋が産生するマトリクスの組成は主にI型とIV型のコラーゲンであること、また、Proteoglycanの一種であり、LDL粒子との結合が知られているSyndecanも産生されていることが分かった。

レーザー共焦点顕微鏡により直接切片の垂直断

面を観察することが可能であり、実際に内皮細胞と単球細胞を異なる蛍光色素にて染色することによって潜り込んだ単球の数を定量的に測定することが可能であり、ケモカインと同様酸化LDLにも単球遊走活性が存在することが分かった。

内皮細胞上に添加された単球が内皮細胞下に遊走し、さらに内皮下マトリクスにおいて三日目にはマクロファージに分化を遂げていることは昨年度に報告していたが、マトリクス内に酸化LDLをあらかじめ混入してから、内皮細胞と単球を添加すると、内皮下のマクロファージ細胞質内に空泡形成が認められ、単球添加後四日目には、内皮下単球系細胞の細胞質内にlipid dropletが蓄積した。さらに、一週間培養を継続したところ、核の大きさは変わらないものの細胞質容積がおよそ100倍に増大し、細胞質内に多数の空泡と一部コレステロール結晶様の構造を伴う、泡沫細胞が形成されていることが確認された。

D. 考察

今回我々はウサギ及びヒト細胞の混合培養を行い、泡沫細胞を形成した。この培養系において2週間経過した後も、内皮細胞にはtight junctionの構成蛋白が発現していることから、機能的な内皮細胞層が形成されていることが確認された。混合培養系における平滑筋は分泌型であることが分かったが、この点で正常血管と異なり、今後表現型のコントロールが必要と考えられた。

酸化LDLをMethod Iのコラーゲンマトリクス内にあらかじめ添加することによって泡沫細胞を形成した。しかし、今回硫酸銅酸化LDLを使用していたこと、より生理的な泡沫細胞形成は高濃度native LDLが契機となっていると考えられることから、今後native LDLによる泡沫細胞形成を検討する必要がある。また、今回、Method IIにおいて、平滑筋はSyndecanを産生しているがこれはin vitroでLDL粒子と結合することが明らかになった

ので平滑筋を添加した混合培養系が有用であることが示唆された。

E. 結論

我々はウサギ大動脈内皮細胞，平滑筋細胞の初代培養から得た血管壁細胞とマトリックスを用いて再構成した血管壁モデルに，ヒト末梢血由来単球細胞を添加して構成した混合培養系において，酸化LDLの存在下で継続的に培養することによって，単球潜り込みモデル，さらに動脈硬化初期病変の特徴である泡沫細胞の形成モデルを作出した。

F. 引用文献

1. Pedro R. Moneno, Erling Falk, Igor F. Palacios, John B. Newell, Valentin Fuster, John T. Fallon. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994;90:775-778.
2. Michael J. Davis, Peter D. Richardson, Neville Woolf, David R. Katz, Jessica Mann. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J*. 1993;69:377-381.
3. Jeffery M. Isner, Marianne Kearney, Scott Bortman, Jonathan Passeri. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. 1995;91:2703-2711.
4. Allard C. van der Wal, Anton E. Becker, Chris M. van der Loos, Pranab K. Das. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of

- the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.
5. Zorina S. Galis, Galiana K. Sukhova, Roger Kranzhofer, Stephen Clark, and Peter Libby. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol 92, 402-406, 1995.
 6. Zorina S. Galis, Galiana K. Sukhova, Michael W. Lark and Peter Libby. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest*. vol 94, 2493-2503, 1994.
 7. Prediman K. Shah, Erling Falk, Juan J. Badimon, Antonio Fernandez-Ortiz, Alessandria Mailhac, Gerardo Villareal-Levy, John T. Fallon, Jan Regnstrom, Valentin Fuster. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995;92:1565-1569.

G. 研究発表

(論文発表)

- 1) Mikio Takaku*, Youichiro Wada*, Katsunori Jinnouchi, Motohiro Takeya, Kiyoshi Takahashi, Hiroyuki Usuda, Makoto Naito, Hiroki Kurihara, Yoshio Yazaki, Yoko Kumazawa, Yuko Okimoto, Michihisa Umetani, Noriko Noguchi,

Etsuo Niki, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama. An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, in press.

(学会発表)

2)Keystone symposium,1998,April,Lake Tahoe,Nevada,United States.

脳血管におけるマクロファージ

間藤方雄（国際医療福祉大学保健学部教授）

脳細動脈の硬化は一般血管と異なり、血管壊死、フィブリノイド変性を伴う血管壁肥厚として定義されている。我々は高脂血症や高血圧に於いても、脳細血管の血管壁細胞の反応が他の血管と異なることを示した。つまり血管壁内への単球・マクロファージの侵入が少ないこと、血管平滑筋の反応性は著しく低くいわゆる血管壁肥厚が平滑筋細胞の変形・壊死及びFGP細胞の幼弱化及び増殖によって起こる。加えてミクログリアの活性化・星状膠細胞のアストロファイバーの出現及び増加といった脳グリア細胞の血管反応への関与も認められた。従って脳細血管の硬化病変を研究する際には脳細血管自身の病変とそれに付随する脳グリア細胞の変化を併せ検討する必要がある、その機序を明らかにすることを目的とした実験を行った。

キーワード：マクロファージ、間藤細胞、ノックアウトマウス。

A. 研究目的

脳細動脈の硬化は一般血管例えば大動脈、腎動脈、冠状動脈のそれと異なり、古くより血管壊死、フィブリノイド変性を伴う血管壁肥厚として定義されている。私達の従来の研究からも脳細血管は高脂血・高血圧に際しても、血管壁細胞の反応が異なることが推察されていた。即ち、上記の条件に於いても、血管壁内へのマクロファージ

（単球）の侵入が少なく、また血管平滑筋の反応性は著しく低く、いわゆる血管壁肥厚は平滑筋細胞の変形・壊死及びFGP細胞の幼弱化及び増殖によることが示されてきた。それら所見に関連して、脳グリア細胞の血管反応への関与、即ちミクログリアの活性化・星状膠細胞のアストロファイバーの出現及び増加が認められた。即ち、脳細血管の硬化（病変）を研究する際には脳細血管自身の病変とそれに付随する脳グリア細胞の変化を併せ検討する必要がある。それらの所見の機序を明らかにするため以下の四項目に亘る研究を行った。

B. 研究方式

上記目的に従い、下記のような実験を計画した。

- 1) 脳細血管に伴うMADO細胞のエンドトキシンに対する反応性。
- 2) 脳虚血時に於ける脳血管壁細胞並びにFGP細胞の反応。
- 3) 高脂血時に於ける脳血管壁細胞の反応性とマクロファージ、FGP細胞の関与。
- 4) 高血圧・脳卒中易発性ラット(SHRSP)に於けるFGP細胞の挙動。

C&D. 研究結果及び考察

上記研究に関し、その結果と考察を以下のように示す。1)の課題について、エンドトキシンによるFGP細胞の活性化はミクログリア及び星状膠細胞の活性化をもたらすこと、血管内皮細胞の細胞質突起が出現することが示された。また、幼弱FGP細胞の出現と共にFGP細胞にはIL-1 β 及びiNOSの上昇が認められた。

2)に関して脳虚血時には、脳細血管の透過性の上昇に伴い、内皮細胞の細胞突起の出現、細胞間隙の増加、FGP細胞の浮腫性変化が観察されると

共に、脳皮質ではミクログリアの突起が伸長し、海馬に於いてはアストロファイバーが出現、増加することが認められた。

3)の高脂血状態に関しては、海馬采及び視床の血管の一部に多量のマクロファージが侵入しており、同時にFGP細胞の退行及びミクログリアの退行が認められると共に、血管壁平滑筋細胞の退行変化が認められた。この際、見かけ上は血管壁の肥厚を呈するが、その超微像は泡沫細胞の出現と退行性細胞の出現に過ぎなかった。4)の高血圧、脳卒中モデルに於いては、興味ある所見としてFGP細胞の摂取能・エピトープの低下が血管病変に先立ち出現した。次いで平滑筋細胞の著しい変性・壊死、さらに、幼弱FGP細胞ないしは軟膜細胞の増殖が認められ、同時に膠原線維の出現が顕著であった。この様ないわゆる血管壊死・血管浮腫を呈した血管壁になって初めて単球・マクロファージの侵入が認められた。この様な変化は脳血管壁の脆弱化を招き、血管破綻の原因となりうるものと推察された。

E. 結論

以上のように、脳細血管の破綻を含む病変にはFGP細胞が深く関与していることが示唆された。これら所見を踏まえて、私達は今後脳細病変の本態に接近しようと考えている。

なお、本多等はヒトスカベンジャーレセプター抗体の作製に成功した。また、三好等はロボット技術による老化動物のFGP細胞内老廃物の検討を行っている。大河原は水頭症の研究を進めた。

G. 研究発表

1) Masao Mato, Atsushi Sakamoto, Shigeo Ookawara, Koichi Takeuchi, Koki Suzuki: Ultrastructural and immunohistochemical changes of fluorescent granular perithelial cells and the interaction of FGP cells to microglia after lipopolysaccharide administration. *Anatomical Record* 251: 330-338, 1998.

2) 間藤方雄: Mato細胞の形態と機能一特に病態時における一。蘇生, 17: 13-22, 1998.

3) 間藤方雄: 脳の血管周囲細胞。脳と神経, 50: 965-976, 1998.

4) Makoto Honda, Haruhiko Akiyama, Yoshihiko Yamada, Hiromi Kondo, Yoshiki Kawabe, Motohiro Takeya, Kiyoshi Takahashi, Hiroshi Suzuki, Takefumi Doi, Atsushi Sakamoto, Shigeo Ookawara, Masao Mato, Peter J. Gough, David R. Greaves, Siamon Gordon, Tatsuhiko Kodama, Masaaki Matsushita: Immunohistochemical evidence for a macrophage scavenger receptor in Mato cells and reactive microglia of ischemia and Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 245: 734-740, 1998.

5) Masao Mato, Shigeo Ookawara, Toshihiko Mashiko, Atsushi Sakamoto, Takashi K. Mato, Nobuyo Maeda, Tatsuhiko Kodama: Regional difference of lipid distribution in brain of apolipoprotein E deficient mice. *Anatomical Record*, in contribution.

6) 大河原重雄、美馬達夫、森惟明、間藤方雄: 先天性水頭症ラット(HTX)大脳皮質微小血管の変化。厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究分科会平成9年度研究報告書(分科会長 森惟明) pp. 76-80.

LDL酸化変性の追跡と抗酸化剤作用の測定

二木鋭雄（東京大学先端研教授）

動脈硬化の引き金となっている酸化LDLの生成を抑制するための、新規抗酸化剤を合成し、この効果と作用機序を検討した。また、従来不明な点が多い、血管壁での脂質酸化メカニズムを明らかにするため、LDL酸化を経時的に観察することを可能とする蛍光試薬を合成し、これを大動脈細胞混合培養系に加えるシステムの構築を行った。

キーワード：酸化LDL, 抗酸化剤, マクロファージ, DPPP.

A. 研究目的

血管壁におけるLDLの酸化の進行をリアルタイムで追跡することを目的とし、新しい蛍光プローブの細胞培養系への導入を行っている。前年度は、Diphenyl pyrenyl phosphine (DPPP)が脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) と当量で反応し、強い蛍光を発する酸化DPPP (DPPP=O)に変わることを利用し、このDPPP=Oをphosphatidyl serine (PS)で構成されたりポソームに組み込み、これをマクロファージに取り込ませ、蛍光顕微鏡で細胞に一致してDPPP=O由来の蛍光が観察されることを確認した。そこで、今年度は、このDPPP=Oの細胞内における局在を検討し、ついで、生体内でのLDL酸化をモニターするために必要である、LDL粒子内への導入方法を検討した。

B. 研究方式

1. 共焦点顕微鏡を用いて、DPPP=Oの細胞内での局在を検討した。
2. 種々方法にてDPPPのLDL粒子内への導入を試みた。a. 有機溶媒に溶解させて添加、b. リン脂質のリポソームあるいはリン脂質とトリオレイン

のエマルジョンとして添加、c. ナスフラスコの壁にフィルム状にして添加、d. LDLを脱脂し、再構成の際に添加。

3. DPPPのLDL脂質二重膜との親和性を高めるためにDPPPに化学修飾することによってLDL粒子への移行促進を試みた。

C. 研究結果

1. DPPP=O核の内部以外の膜および細胞質内に存在することを確認した。
2. 上記4通りの方法を試みたが、いずれも満足する結果は得られず、構造上これが困難であると判断した。
3. DPPPのLDL脂質二重膜との親和性を高めるためにDPPPに化学修飾する方法を検討した。ピレン・フルオロセイン他の蛍光物質を膜プローブとして使用する際にカルボン酸付加体を用いることなどを参考に、目的物質はDPPP-(CH₂)₁₁-COOHとした。

ドデカン二酸モノエチルエステルを塩化チオニルでモノクロライドにし、プロモピレンにフリーデルクラフツ反応で付加した後、プロモ基をブチ

ルリチウムによりリチウム化してジフェニルクロ
ロフォスフィンとカップリングしたところ、ほと
んど反応しなかった。

D. 考察

上述の方法では、DPPPをLDL粒子内に導入す
ることに成功していない。

E. 結論

現在はDPPPをプロモ化した後マグネシウムを
添加してGrignard試薬とし、ドデカン二酸と反応さ
せるという経路で合成を行っており、引き続き
種々の方法によってLDL内へのDPPPの導入方法
を検討する。

G. 研究発表

- 1) N. Noguchi, H. Yamashita, N. Gotoh, Y.
Yamamoto, R. Numamo, E. Niki. 2,2'-Azobis (4-
methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile), a new lipid-
soluble azoinitiator: Application to oxidations of lipids
and low density lipoprotein in solution and in aqueous
dispersions. *Free Rad. Biol. Med.*, 24, 259-268, 1998.
- 2) N. Noguchi, M. Takahashi, J. Tsuchiya, H.
Yamashita, E. Komuro, E. Niki. Action of 21-
aminosteroid U74006F as an antioxidant against lipid
peroxidation. *Biochem. Pharmacology*, 55, 785-791,
1998.
- 3) H. Shi, E. Niki. Stoichiometric and kinetic studies
on ginkgo biloba extract and related antioxidants.
Lipids, 33, 365-370, 1998.
- 4) K. Uchida, M. Kanematsu, K. Sakai, T. Matsuda, N.
Hattori, Y. Mizuno, D. Suzuki, T. Miyata, N. Noguchi,
E. Niki, T. Osawa. Protein-bound acrolein: Potential
markers for oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA, 95, 4882-4887, 1998.
- 5) K. Uchida, M. Kanematsu, Y. Morimitsu, T. Osawa,
N. Noguchi, E. Niki. Acrolein is product of lipid
peroxidation reaction. *J. Biol. Chem.* 273, 16058-
16066, 1998.

- 6) K. Yazu, Y. Yamamoto, E. Niki, K. Miki, K.
Ukegawa. Mechanism of lower oxidizability of
Eicasapentaenoate than linoleate in aqueous micelles.
II. Effect of antioxidants. Lipids, 33, 587-600, 1998.
 - 7) O. Cynshi, Y. Kawabe, T. Suzuki, Y. Takashima, H.
Kaise, N. Noguchi, E. Niki, T. Kodama.
Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in
three different animals models. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA, 95, 10123-10128, 1998.
 - 8) N. Noguchi, E. Niki. Dynamics of vitamin E action
against LDL oxidation. *Free Radical Research*, 28,
561-572, 1998.
 - 9) N. Noguchi, R. Numano, H. Kaneda, E. Niki.
Oxidation of lipids in low density lipoprotein particles.
Free Rad. Res., 29, 43-52, 1998.
- Review
1. 野口範子・二木鋭雄. 酸化変性のメカニズム
治療学、32、461-467、1998.
 - 2) 二木鋭雄. ビタミンE：抗酸化物質としての反
応論的研究. ビタミン、72、535-538、1998.
- Book
- 1) M. Takahashi, E. Niki. Chap.2 The Effect of
Oxidative Stress on Cells by Oxygen Radicals and Its
Inhibition by Antioxidants. *Oxidative Stress in Cancer,
Aids, and Newrodegenerative Diseases.*(L. Montagnier,
R. Olivier, C. Pasquier, eds.) pp. 9-14, 1998, Marcel
Dekker, New York.
 - 2) N. Noguchi, E. Niki. Chap.24 Inhibition of Plasma
Cholesterol Ester Hydroperoxide and
Phosphatidylcholine. Hydroperoxide Formation as
Measures of Antioxidant Status. *Methods in
Enzymology. Vol. 28. Vitamins and Coenzymes* (D.B.
McCormick, J. W. Suttie, C. Wagner, eds.) pp. 271-
278, 1997, Academic Press, San Diego.
 - 3) 二木鋭雄. 第一編、第一章フリーラジカル傷害
の分子メカニズム、第三編、第一章、フリーラジ

カル理論と予防医学の今後. 成人病予防食品の開発 (二木鋭雄、吉川敏一、大澤俊彦、編) pp. 1-6, pp. 323-327, 1998, シーエムシー、東京。

4) N. Noguchi, Y. Okimoto, O. Cynshi, T. Kodama, E. Niki. Inhibition of oxidative modification of low density lipoprotein by novel antioxidant BO-63 prepared by theoretical design. *Biological Oxidants and Antioxidants* (L. Packer, A. S. H. Ong, eds.) pp. 139-152, 1998, AOCS Press, Champaign.

5) 二木鋭雄. 生体の酸化傷害と防御システム、抗酸化ビタミンの相互作用、ビタミンE. 抗酸化物質のすべて (吉川敏一編) pp. 25-34, pp. 58-65, pp. 93-101, 1998, 先端医学社、東京。

6) N. Noguchi, E. Niki. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health* (A. M. Papas, ed.) pp. 3-29, 1998, CRC Press, Boca Raton.

Proceeding

1) N. Noguchi, E. Niki. Inhibition of oxidative modification of low density lipoprotein by antioxidants. In: *Pathophysiology of Lipid Peroxides and Related Free Radicals* (K. Yagi, ed.) pp. 91-101, 1998, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo. 20th General Meeting of the Japanese Society of Lipid Peroxide and Free Radical Research: 1997

血管系老化におけるマクロファージの活性化と形質変化

高橋 潔 (熊本大学医学部病理学教授)

遺伝子欠損マウスの解析から、マクロファージスカベンジャー受容体 (SR-A type I/II) が粥状硬化病巣の形成に深く関与することが明らかにされている。LDL受容体欠損マウスとSR-A type I/II欠損マウスとの二重欠損マウスを作成し、高脂肪食飼育をして粥状硬化病巣サイズを比較したところ、マクロファージの泡沫化には他の受容体が重要であることが分かった。また、肝肉芽腫形成におけるSR-A type I/IIを介したサイトカインの発現が、単球の動員や単球のマクロファージへの分化、活性化に重要であることが明らかになった。

キーワード：動脈硬化、スカベンジャー受容体、ノックアウトマウス、間藤細胞

A. 研究目的

1. 粥状硬化病巣形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体 (SR-A type I/II) の役割を検討した。
2. 肝肉芽腫形成におけるSR-A type I/IIの役割

B. 研究方式

1. 粥状硬化病巣形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体 (SR-A type I/II) の役割を検討するために、LDL受容体欠損マウスとSR-A type I/II欠損マウスとの二重欠損マウスを作成し、4ヶ月間の高脂肪食飼育の後に大動脈弁周囲の粥状硬化病巣サイズを比較した。
2. 肝肉芽腫形成におけるSR-A type I/IIの役割を検討するために、SR-A type I/II欠損マウスに *Corynebacterium parvum* (C. parvum) 死菌を静脈投与し、肝肉芽腫の形成過程を観察した。

C. 研究結果

1. LDL受容体/SR-A type I/II二重欠損マウ

スの病巣サイズはLDL受容体単独欠損マウスに比べて有意に低値を示し、SR-A type I/IIが粥状硬化病巣形成に重要な役割を果たすことが実証された。しかし、病巣サイズの減少率は約20%で、昨年度に検討した普通食飼育下でのアポE/SR-A type I/II二重欠損マウスの病巣サイズの減少率約60%に比べ、軽度の抑制に留まった。そこで、LDL受容体/SR-A type I/II二重欠損マウスにおける残存病巣について、CD36、CD68/Macrosialin、MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) などのSR-A type I/II以外のスカベンジャー受容体の発現を検討すると、いずれもLDL受容体単独欠損マウスと同様の発現が観察された。

2. 死菌投与後3日目から10日目までは、野生型マウスに比べ、SR-A type I/II欠損マウスでは肉芽腫の数が少なく大きさも小さく、肉芽腫形成の遅延が見られ、肉芽腫内のマクロファージや単球数も低値であった。14日目以降になると、野生型マウスでは肉芽腫の退縮がみられたが、SR-A type I/II欠損マウスでは肉芽腫の退縮が遅れ、両者間の肉芽腫の数と大きさの有意差は消失

した。

D. 考察

1. 普通食飼育のアポE/SR-A type I/II二重欠損マウスと高脂肪食飼育LDL受容体/SR-A type I/II二重欠損マウスの血中コレステロール値を比較すると、前者で400~500mg/dlであったのに対し、後者では2000~3000mg/dlに達し、著明な高コレステロール血症状態では、SR-A type I/II欠損のみでは病巣形成の抑制には不十分だった。

2. 死菌投与後の肝におけるTNF- α 、IFN- γ 、およびMCP-1の発現は、SR-A type I/II欠損マウスで遅延が認められ、これらのサイトカインの産生にSR-A type I/IIを介する何らかのシグナル伝達機構の関与が想定された。肉芽腫形成の初期では、SR-A type I/II欠損マウス肝におけるC. parvum 貪食細胞数は有意に少なく、C. parvum の細胞内取り込みに際してSR-A type I/IIが関与することが想定された。

E. 結論

1. 上述のSR-A type I/II以外のスカベンジャー受容体がマクロファージの泡沫細胞化に関与するものと考えられた (Sakaguchi et al. Lab Invest, 1998)。

2. 以上の結果から、SR-A type I/II欠損マウスでは、SR-A type I/IIを介するシグナル伝達の欠如により、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1などのサイトカインの発現が遅延し、これに続く単球の動員ならびに単球のマクロファージへの分化や活性化が遅れることにより肉芽腫形成が遅延したものと考えられた (Hagiwara et al. Am J Pathol, 1999)。

G. 研究発表

1) Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, van der Laan LJW, Kraal G,

Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis

Lab Invest, 78:423-434, 1998

2) Honda M, Akiyama H, Yamada Y, Kondo H, Kawabe Y, Takeya M, Takahashi K, Suzuki H, Doi T, Sakamoto A, Ookawara O, Mato M, Gough PJ, Greaves DR, Gordon S, Kodama T, and Matsushita M. Immunohistochemical Evidence for a Macrophage Scavenger Receptor in Mato cells and Reactive Microglia of Ischemia and Alzheimer's Disease.

Biochem Biophys Res Commun, 245:734-740, 1998

3) Cynshi O, Kawabe Y, Suzuki T, Takashima Y, Kaise H, Nakamura M, Ohba Y, Kato Y, Tamura K, Hayasaka A, Higashida A, Sakaguchi H, Takeya M, Takahashi K, Inoue K, Noguchi N, Niki E, Kodama T. Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animal models. Proc Natl Acad Sci, USA, 95:10123-10128, 1998

4) Hakamata, H, Sakaguchi H, Zhang C, Sakashita N, Suzuki H, Miyazaki A, Takeya M, Takahashi K, Kitamura N, Horiuchi S. The very low- and intermediate-density lipoprotein fraction isolated from apolipoprotein E-knockout mice transforms macrophages to foam cells through an apolipoprotein E-independent pathway. Biochemistry, 37:13720-13727, 1998

5) Matsuda H, Hakamada H, Kawasaki T, Sakashita N, Miyazaki A, Takahashi K,

- Shichri M, and Horiuchi S. Molecular cloning, functional expression and tissue distribution of rat coenzyme A: cholestrol acyltransferase with its activation by acetylated LDL in peritoneal macrophages. *Biochem Biomed Acta* 1391:193-203, 1998
- 6) Miyazaki A, Sakashita N, Lee O, Takahashi K, Horiuchi S, Hatamata H, Morganelli PM, Chang CCY, Chang T-Y. Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerotic lesions and in cultured human monocyte-macrophages. *Atheroscl Thromb Vasc Biol* 18:1568-1574, 1998
- 7) Tomita H, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Koyanagi M, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Takeshita A. Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:1456-1464, 1998
- 8) Yamashiro S, Takeya M, Kuratsu J, Ushio Y, Takahashi K, Yoshimura T. Intradermal injection of monocyte chemoattractant protein-1 induces emigration and differentiation of blood monocytes in rat skin. *Int Arch Allergy Immunol* 115:15-23, 1998
- 9) Yamamoto T, Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Suga M, Ando M, Takahashi K. Morphological alteration of cultured tracheobronchial epithelial cells is accompanied by the expression of chemokines, MCP-1 and CINC/gro, in rats. *Int J Exp Pathol*, 79:81-92, 1998
- 10) Yamaguchi Y, Matsumura F, Takeya M, Ichiguchi O, Kuratsu J, Horiuchi T, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Ohshiro H, Liang J, Mori K, Yamada S, Takahashi K, Ogawa M. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances expression of intercellular adhesion molecule-1 following ischemia-reperfusion of the liver in rats. *Hepatology* 27:727-34, 1998
- 11) Takahashi K, Miyakawa K, Nakayama K, Myint YY, Naito M, Shultz LD, Tominaga A, and Takatsu K. Effects of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on the development and differentiation of CD5-positive macrophages and their derivation from a CD5-positive B cell lineage in mice. *Am J Pathol* 152: 445-456, 1998
- 12) Yano M, Kanazawa M, Terada K, Takeya M, Hoogenraad N, Mori M. Functional analysis of human mitochondrial receptor Tom20 for protein import into mitochondria. *J Biol Chem* 273:26844-26851, 1998
- 13) Sakashita N, Ando Y, Marklund SL, Nilsson P, Tashima K, Yamashita T, Takahashi K. Familial amyloidotic polyneuropathy type I with extracellular superoxide dismutase mutation: A case report. *Hum Pathol* 29:1196-1174, 1998
- 14) Takahashi K, Takeya M, Miyakawa K, Hagiwara S, Wynn AA, Naito M, Yamada M. The multiple roles of macrophages in hepatic granuloma formation in mice.

Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells, Tanikawa K.(ed.), Springer Verlag, in press, 1998.

15) Miyakawa M, Mint YY, Takahashi K Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on proliferation, differentiation, and survival of Kupffer cells in the liver of adult mice. *Analyt Quant Cytol Histol*, in press, 1998

16) Sakashita N, Takeya M, Kishida T, Stacknouse TM, Zbar B, and Takahashi K Expression of von Hippel-Lindau disease gene product in normal and pathological human tissues. *Histochem J*, in press, 1998

17) Takahashi K, Hagiwara S, Miyakawa K, Takeya M, Suzuki H, Kodama T The role of macrophage scavenger receptors in zymcel- or Corynebacterium parvum-induced hepatic granuloma formation in mice. *Cells of Hepatic Sinusoids*, Vol. 7 (edited by Wisse E, Knook DL, Fraser R), Kupffer Cell Foundation, Leiden, in press, 1998

18) Ling X, Sakashita N, Takeya M, Hoiuchi S, Takahashi K.

Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structure of advanced glycation end products in human tissues. *Lab Invest*, in press, 1998

19) Hagiwara S, Takeya M, Suzuki H, Kodama T, van der Laan LJW, Kraal G, Kitamura N, Takahashi K Role of macrophage scavenger receptors in

hepatic granuloma formation in mice. *Am J Pathol*, in press, 1999

20) Myint YY, Miyakawa K, Naito M, Shultz LD, Oike Y, Yamamura K, Takahashi K Effects of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and/or interleukin-3 on age-related correction of osteopetrosis in osteopetrosis (op) mice defective in the production of functional macrophage colony-stimulating factor protein. *Am J Pathol*, in press, 1999

21) 高橋 潔. マクロファージの発生と分化 *アレルギー科* 6:70-78, 1998

22) 高橋 潔、竹屋元裕、坂口 尚、萩原正一郎 マクロファージ・スカベンジャー受容体 *臨床免疫* 30:1153-1160, 1998

23) 高橋 潔. マクロファージの発生、分化と成熟 *病理と臨床* 16:1056-1061, 1998

24) 竹屋元裕、坂口 尚、海北幸一、高橋 潔. 粥状動脈硬化とマクロファージ. *病理と臨床* 16:1095-1099, 1998

25) 高橋 潔. 指状嵌入細胞. 今井大、玉置邦彦、笠島武 編: 樹状細胞 免疫システムの司令塔 文光堂 (東京) pp108-112, 1998.

26) 竹屋元裕、高橋 潔. 樹状細胞の細胞マーカー -ヒトおよび動物- 樹状白血球-マクロファージとの鑑別も含めて-今井大、玉置邦彦、笠島武 編: 樹状細胞 免疫システムの司令塔 文光堂 (東京) pp132-135, 1998.

27) 竹屋元裕. マクロファージスカベンジャー受容体欠損マウス. *日本リンパ網内系学会誌* 38:227-231, 1998