

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究）

『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』

1999年度総括研究報告書

- 児玉龍彦（東大先端研分子生物医学部門）
- 間藤方雄（国際医療福祉大保健学部）
- 高橋 潔（熊本大学医学部第2病理学講座）
- 二木鋭雄（東大先端研生命反応化学分野）
- 内藤 眞（新潟大学医学部教授）
- 土井健史（大阪大学薬学部）
- 田中良哉（産業医科大学講師）

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

主任研究者 児玉龍彦(東大先端研分子生物医学部門)

研究要旨

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)
- 内藤 眞(新潟大学医学部教授)
- 土井健史(大阪大学薬学部教授)
- 田中良哉(産業医科大学講師)

A. 研究目的

血管壁で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)ファミリーと呼ばれる一群の遺伝子がクローニングされるに至った。本研究では、グループAのI型とII型受容体(SR-A I/II)が脳血管周囲間藤細胞やリステリア感染マクロファージにおいて果たす役割を検討し、同時にスカベンジャー受容体受容体の細胞質内情報伝達経路の同定を試みた。さらに動脈硬化におけるマクロファージの役割、とりわけスカベンジャー受容体と脂質蓄積の接点にある acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1)の局在を検討する一方で、混合培養系において泡沫細胞形成系を作成して細胞間、細胞リポ蛋白相互作用を含む動脈硬化現象の観察系を構築した。また、細胞による低比重リポ蛋白内での酸化的变化を可視化する試薬を開発するなど、従来から治療薬として用いられている抗酸化剤の作用をさらに検討することによって治療薬開発のターゲットを明確にする為に本研究班を組織した。

B. 研究方法

直径100 μ m以下であって、脳機能と直接関連する脳細動脈が高脂血下、高血圧下に於て、冠状動脈、

大動脈と同様な粥状硬化を呈するか否かについての検討は充分に行われていない。間藤はLDLレセプター欠損動物に高脂質食を付加したもの及びApoE欠損により高脂血を来した動物を用いて脳細動脈を観察した。

内藤はBCG感染における本受容体の役割を明らかにする為、MSR-Aノックアウトマウスと野生型マウスにBCG生菌(Pasteur strain)を投与して種々の臓器を採取し、免疫組織学的検討を行った。またRT-PCRやELISAにより組織における各種サイトカインの発現や血清サイトカイン濃度を検討した。また免疫染色と結核菌染色の二重染色を行った。各臓器の菌数をコロニー形成法で検出した。また、肝内リンパ球のFACS解析も行った。

土井はマクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域と相互作用する因子を同定するために、同受容体の細胞質領域をペプチド合成により作製して、その構造をCDスペクトル測定装置を用いて調べた。同時に、合成したペプチドを用いてアフィニティカラムを作製し、この分子と相互作用する因子の単離を試みた。

高橋は、生体内コレステロール代謝の中核的役割を担っているACAT-1の粥状硬化病巣ならびに正常各種臓器/細胞における局在を明らかにするために、ヒトACAT-1に対する特異抗体を用いて免疫組織化学的な検討を行った。

児玉は前年度より構築したウサギ大動脈血管壁細胞を重層して培養した混合培養系に、ヒト単球細胞を加えて、マクロファージ細胞への脂質蓄積が効率的に生じる条件を検討した。また、この混合培養系からRNAを回収して、脂質を蓄積したヒトマクロファージ細胞の遺伝子が含まれているかどうかを検討した。

田中はヒト臍帯静脈由来内皮細胞HUVECと皮膚細静脈由来内皮細胞株HMEC-1を用いて、単球細胞との接着効率を測定した。単球の構造変化は、細胞内骨格線維F-actinを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。単球のLFA-1 α 鎖(α L)、およびLFA-1の活性化エピトープの発現はフローサイトメータで検出した。単球の経内皮細胞遊走率は、皮膚細静脈由来内皮細胞株HMEC-1を播種した24穴チャンバー上にラベルした単球を添加して求めた。

二木は酸化を解析する新たな手段として、過酸化物質と反応することによりDPPP=Oとなりとなって蛍光を発するジフェニルピレニルフォスフィン(DPPP)を培養細胞系に導入するため、多核白血球(PMN)および低比重リポタンパク(LDL)の酸化の追跡を行った。PMNにDPPPをDMSO溶液として添加し、細胞に取り込ませた後、過酸化物質を添加あるいはフォルボールエステルで刺激して蛍光の変化を測定した。

さらにLDLに界面活性剤(Pluronic F-127)に溶解させたDPPPを添加することによりLDL内にDPPPを取り込ませた。このLDLをラジカル開始剤により酸化させ、DPPP=Oの蛍光を測定して、脂質過酸化物質および抗酸化物質の濃度を経時的に検討した。

C. 研究結果

LDLレセプター欠損マウスでは大脳皮質に分布する脳細動脈では間藤細胞には脂肪染色陽性の大型顆粒が認められたが、大動脈と異なり、大型の単球マクロファージは見当たらなかった。多数の大型の蜂の巣状の顆粒が大型化するに伴い、間藤細胞は肥大し血管壁を圧迫していた。

ApoE欠損動物の大脳皮質に分布する血管においては、間藤細胞は退行的なものと、変性を思わせるものを認めた。しかし淡蒼球、黒質の細血管においては、間藤細胞に取込まれている脂質より、むしろその外層の星状膠細胞に多量の脂質が見出された。視床、海馬采では一部の血管周辺に単球性マクロファージの侵入があり、この血管では間藤細胞及び平滑筋細胞は完全に変性に陥っていたものの、粥状硬化を呈さなかった。SHR-SPラットにおいて間藤細胞のHRP摂取能は低下し、28週目には間藤細胞は泡沫化した。変性した間藤細胞と共に脱分化した間藤細胞を認めた。しかし、すべての過程で単球性マクロファージの血管壁侵入はみとめられなかった。

内藤は、スカベンジャー受容体欠損マウス肺病変のBCG生菌(Pasteur strain)増殖は野生型マウスと比較して顕著であることを観察し、同時にin vitroでも

スカベンジャー受容体を欠損していると、菌の取り込みが減少することを確認した。

土井は、スカベンジャー受容体の細胞質内領域は一本鎖でも3本束ねても明確なヘリックスやシート構造をとり難いことが明らかにした。そこで一本鎖ペプチドを用いて相互作用する蛋白としてGAPDH、S-Adenosylhomocysteinase、Aminopeptidase、HSP70、HSP90を同定し、また90k付近のバンドに未知の蛋白を検出した。GAPDH、HSP70、HSP90についてはエンドサイトーシスとの関連が考えられたので大腸菌内で発現させ、先の細胞質領域ペプチドとの相互作用を調べた結果、HSP90については結合が認められたが、他の因子については検出できなかった。

高橋によって粥状動脈硬化病巣では内皮細胞、平滑筋細胞、内膜への浸潤マクロファージにACAT-1が発現していること、中でも泡沫細胞化マクロファージの強陽性像が示された。他の正常組織ではリポ蛋白アッセムリーに関わる細胞群、ステロイドホルモン合成に関わる細胞群、マクロファージとこれに関連する細胞群に高度の発現が認められた。免疫電顕によって培養ヒトマクロファージの粗面小胞体にACAT-1の局在が認められアセチルLDL添加によって細胞を泡沫化させると、約40%のACAT-1は直径100nm前後の小胞に移動した。小胞体の特異マーカーであるGRP78とACAT-1の局在を検討すると、アセチル化LDLの添加にかかわらず両者は共存していた。

児玉は混合培養の観察結果から低酸素下での培養により血管平滑筋とヒトマクロファージに脂質の蓄積が増加することを示した。ウサギおよびヒト平滑筋は単培養でも低酸素下でLDLを負荷すると効率的に細胞内に脂質を蓄積した。混合培養内に平滑筋と共培養したLDLを添加するとマクロファージ由来細胞への脂質蓄積が確認されたが、このLDLは酸化的変性を受けていないことが示された。

田中は無刺激単球を酸化LDLで刺激して、血管内皮細胞とのインテグリンLFA-1依存性の接着が著明に誘導されることを示した。また、単球を酸化LDLで刺激すると、単球のCD31発現とCD31依存性の経内皮細胞遊走率を誘導した。酸化LDL刺激により誘導されたこれらの単球機能は、 α -tocopherol、及びPKC阻害剤で阻害された。

二木はDPPPがDMSO溶液として添加するとPMNに良好に取り込まれ、PMNのフリーラジカル産生を引き起こすと、DPPP=Oの蛍光増加が蛍光分光光度計および蛍光顕微鏡で測定できることを示した。さらに、DPPPをLDL一粒子あたり10個以上取り込

ませることができた。LDLを酸化させると、ラジカル開始剤の濃度依存的・時間依存的に蛍光が増加することが確認できた。

D. 考察

間藤は脳細動脈では他の部位の大血管と異なり粥状硬化がみられないことを明らかにした。さらに易脳卒中自然発症高血圧ラット（SHR-SP）の脳細動脈の観察所見から、脳血管の病変に際し、脳細動脈に生理的に纏絡するマクロファージ系の間藤細胞の機能に異常が出現し、その結果血管平滑筋、内皮細胞が変性に陥ることが重要であると考えられた。

内藤はMSR-AノックアウトマウスマクロファージではBCG菌の取り込みは少ないこと、および抗体によって取り込みが抑制されることから、MSR-AはBCG受容体のひとつとして機能していると考えられることを示した。さらに、BCG感染ノックアウトマウスの生存率は低く、これは殺菌能が低いために菌の増殖がより活発となったためと考えられた。

土井によればマクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域に相当するペプチド分子は、1本鎖の時もまた3本に束ねたときも特徴的な3次構造をとっていなかった。したがって、この領域と相互作用する分子においては、アミノ酸配列を認識して結合するか、もしくは構造をとらせる因子が結合した上で結合する可能性が考えられた。実際この領域に結合する因子の探索を行ったところ、シャペロン分子であるHSPが結合することが判明した。

高橋によって単球由来マクロファージにおいてACAT-1の細胞内局在は細胞の泡沫化に伴って小胞体から小胞体由来する小胞に移動することが明らかとなった。ACAT-1陽性小胞体の小胞化は、ACAT-1と細胞内の遊離コレステロールとの接触の機会を増加させるものと推定された。

混合培養の結果、血管壁細胞は、本来の動脈壁内酸素分圧において脂質負荷に対して20%酸素分圧時と異なり脂質蓄積方向の挙動を示す。血管平滑筋とマクロファージは同様に脂質を蓄積するが混合培養に添加される平滑筋と共培養したLDLには酸化変成が認められなかったことから、血管壁での酸化変成またはそのほかの修飾によってマクロファージによる取り込みが亢進していると考えられる。

田中は、酸化LDLは、単球に於いてLFA-1の活性化とLFA-1依存性の血管内皮への接着、及び、CD31の発現とCD31依存性の経血管内皮遊出を誘導し、これらの作用は、PKCを介することが示唆され

た。即ち、単球の機能発現に於ける脂質代謝異常と細胞接着/遊走のクロストークが動脈硬化炎症部の病態形成に関与するものと考えられた。

二木が開発したDPPPは細胞に取り込ませると膜内に局在して、脂質過酸化物を特異的に検出する。同様にDPPPはLDL中の中心部付近に局在して粒子内での脂質過酸化反応を追跡することができる。このため培養細胞系での脂質酸化を直接リアルタイムで検討し得るプローブとして利用することができるので、従来のLDLの酸化的変性過程を証明する試薬になると考えられる。

E. 結論

脳血管における動脈硬化については大動脈の場合と異なり病変進行過程が不明であったが間藤は、脳皮質細血管においては大動脈における動脈硬化のような内皮下へのマクロファージ細胞の集積がおこらず、スカベンジャー受容体を発現している間藤細胞の変性が血管病変に進展に重要であることを示した。

このスカベンジャー受容体は感染において病原体を取り込む為の受容体としての機能が示唆されているが、内藤はMSR-AはBCG受容体のひとつとして機能していると考えられることを示した。

また、スカベンジャー受容体へのリガンド結合によって細胞内への情報が伝達されることが考えられるが土井は、これを介在する細胞質内領域結合蛋白を検索した。

スカベンジャー受容体を介して細胞質に取り込まれたスカベンジャー受容体によって取り込まれたコレステロールはACAT-1によってエステル化され蓄積されるが、高橋はこの酵素が細胞の泡沫化に伴って小胞体から小胞体由来する小胞に移動することにより、効率的に細胞内の遊離コレステロールと会合することを示した。

動脈硬化の進展について血管壁での細胞現象には不明の点が多いが、児玉は混合培養系の観察により、血管壁においてLDLが修飾され、平滑筋やマクロファージがこれを取り込んで脂質を蓄積するためには酸素分圧が重要な役割を果たしていることを示し、無変性LDLによる生体外での泡沫細胞形成再現系を構築した。今後形成される泡沫細胞の解析により動脈硬化治療のターゲットが見いだされる可能性がある。

一方生体内で形成されることが考えられる酸化LDLについて、田中は単球においてLFA-1の活性化とCD31の発現増強により血管局所への炎症細胞の集積を促進する働きを持つことを示した。

この混合培養系においてLDLがどのように修飾変

性するか検討するために、二木はLDL内での脂質過酸化を可視化するためDPPPという蛍光マーカをLDL内に導入することに成功した。今後混合培養など体外での血管壁モデルを利用してLDLの変性過程を経時的に観察し、脂質変性を抑制する薬剤のスクリーニング系としての応用が可能になると考えられる。

F. 研究発表

(間藤)

1. 益子敏弘, 大河原重雄, 間藤方雄. 実験的脳虚血における脳細血管およびFGP細胞の形態学的変化に関する電子顕微鏡的研究, BRAIN and NERVE, 51, 1999

2. 間藤方雄, 脳微小血管における泡沫細胞の形成と脳血管障害, The Lipid, 10:465(1999)

○Mato M, Ookawara S, Mashiko T, Sakamoto A, Mato TK, Maeda N, Kodama T. Regional difference of lipid distribution in brain of apolipoprotein E deficient mice. Anat Rec;256:165,(1999)

3. Mato M, Ischemic Blood Flow in the Brain, Perivascular cells of small cerebral vessels (FGP; Mato cells) and their permeability under pathological condition, Springer, in press

(高橋)

4. 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

5. 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 in mice.

Lab Invest, 78:423-434, 1998

6. Honda M, Akiyama H, Yamada Y, Kondo H, Kawabe Y, Takeya M, Takahashi K, Suzuki H, Doi T, Sakamoto A, Ookawara S, 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 Comm, 245:734-740, 1998

7. Takahashi K, Hagiwara S, Miyakawa K, Takeya M, Suzuki H, Kodama T

The role of macrophage scavenger receptors in Zymocel- 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

8. 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, 154:705-720, 1999

9. Takeya M, Tomokiyo R, Jinnouchi K, Sakaguchi H, Hagiwara S, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K. Macrophage scavenger receptors: Structure, Function and tissue distribution. (review)Acta Histochem et Cytochem, 32:47-51, 1999

10. Lehtolainen P, Takeya M, Yla-Herttuala S.

Retrovirus-mediated stable scavenger receptor gene transfer leads to functional endocytotic receptor expression, foam cell formation and increased susceptibility to apoptosis in rabbit aortic smooth muscle cells.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, in press.

11. Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, Horiuchi S, Chang CCY, Chang TY, Takahashi K.

Localization of Human Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase-1 (ACAT-1) in Macrophages and in Various Tissues.

Am J Pathol, in press.

(内藤)

12. Yamamoto T, Ebe Y, Hasegawa G, Kataoka M, Yamamoto S, Naito M:

Expression of scavenger receptor class A and CD14 in lipopolysaccharide-induced lung injury. Pathol Int 49: 983-992, 1999

13. 小林義昭 他: LPS肝障害におけるマクロファージスカベンジャー受容体の役割. 肝類洞壁細胞研究の進歩第11巻、谷川久一、内藤 眞、市田隆文編、アークメデア、東京、p. 22-25, 1999

14. Kobayashi Y, Nomura T, Takatsuka H, Umezu H, Hasegawa G, Kawamura I, Mitsuyama M, Arakawa M, Kamata N, Suzuki H, Kodama T, Naito M: Granuloma formation in scavenger receptor-deficient mice in response to BCG infection. In "Cells of the Hepatic Sinusoid" Vol. 7, Leiden, The Netherlands, E. Wisse, D.L. Knook, R de Zanger, R. Fraser, eds, p.243-244, 1999.

(土井)

15. K.Suzuki, T.Doi, T.Imanishi, T.Kodama & T.Tanaka. Oligonucleotide aggregates bind to the macrophage scavenger receptor. *Eur. J. Biochem.* 260, 855-860 (1999).

16. Y.Takakura, T.Takagi, M.Hashiguchi, M.Nishikawa, F.Yamashita, T.Doi, T.Imanishi, H.Suzuki, T.Kodama, & M.Hashida. Characterization of plasmid DNA binding and uptake by peritoneal macrophages from class A scavenger receptor knockout mice. *Pharmaceutical Research*, 16, 503 (1999)

(児玉)

17. Takaku M, Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo T, Kodama T. An In Vitro Coculture Model of Transmigrant

Monocytes and Foam Cell Formation *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 2330-2339. 1999.

(田中)

18. Tanaka, Y.: (2000) Integrin activation by chemokines: Relevance to inflammatory adhesion cascade during T cell migration. *Histology and Histopathology* (in press)

19. Tanaka, Y., Minami, Y., Mine, S., Hirano, H., Hu, C.-D., Fujimoto, H., Fujii, K., Saito, K., Tsukada, J., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., Kataoka, T., Eto, S.:H-Ras Signals to Cytoskeletal machinery in induction of integrin-mediated adhesion of T cells. *J. Immunol.* 163: 6209(1999)

20. Tanaka, Y.: Activation of leukocyte function-associated antigen-1 on adult T-cell leukemia cells. *Leuk. Lymphoma.* 36: 15(1999).

(二木)

21. H. Yamashita, A. Nakamura, N. Noguchi, E. Niki, H. Kuhn. Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals. *FEBS Lett.*, 445, 287-290(1999)

22. N. Noguchi, E. Damiani, L. Greci, E. Niki. Action of quinolinic and indolinic aminoxylys as radical-scavenging antioxidant. *Chem. Phys. Lipids*, 99, 11-19(1999)

23. N. Noguchi, K. Nishino, E. Niki. Antioxidant action of antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. *J. Biochem. Pharmacol.* in press(2000)

24. 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

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業） 分担研究報告書

脳細動脈の粥状硬化に関する研究

分担研究者 間藤方雄（国際医療福祉大学保健学部教授）

研究要旨

血管性痴呆、脳出血等脳細動脈の病変の研究は病理学的のみならず、また社会的にも重要であるが、直径100 μ m以下の脳機能と直接関連する脳細動脈が高脂血下、高血圧下に於いて、冠状動脈、大動脈と同様な粥状硬化を呈するか否かについての検討は充分に行われていない。本研究ではLDLレセプター欠損動物に高脂質食を付加したものと及びApoE欠損により高脂血を来した動物を用いて脳細動脈を観察し、脳細動脈では他の部位の大血管と異なり粥状硬化がみられないことを示すと共に、易脳卒中自然発症高血圧ラット（SHR-SP）の脳細血管を観察し、脳血管の病変に際し、脳細動脈に生理的に纏絡するマクロファージ系の間藤細胞の機能が重要であることを明らかにする。

A.研究目的

脳細血管は老化とともにその平滑筋細胞が変性し、壊死するといわれているが、その機序は明らかではない。また高脂血時、脳細血管の病理学的変化は大動脈等に比し軽度であると云われるが、その機序も明らかではない。本研究ではその要因を間藤細胞に求め、機序の解明を行うことを目的としている。

B.研究方法

形態学的検索のためには、標本作成法（血管伸展標本を含む）、固定法を吟味した上で、光学顕微鏡、電子顕微鏡による脳細血管と間藤細胞の観察を行い、所見の客観的分析を行なう。標本は糖、脂質、酵素を組織化学的に染色したものと各種抗体を用いた免疫染色を施したものを用意する。間藤細胞の摂取機能、分解能を研究するためには、HRP（horseradish Peroxidase）の経静脈血管及び脳内投与を用いる。使用動物は遺伝子ノックアウトにより得られたLDLレセプター欠損動物、アポE欠損動物及び高血圧（易脳卒中発症性・SHR-SPラット）動物などである。動物実験に当たっては、その倫理面に十分な配慮をした上、苦痛を最少限にした。

C.研究結果

1. LDLレセプター欠損マウス的大脑皮質に分布する脳細動脈を光学顕微鏡により観察すると、対照動物に比し間藤細胞には脂肪染色陽性の大型顆粒が認められる（図1）と共に、PAS染色に対して陽性度が減弱し泡沫化している像がある。しかし、大型の単球マクロファージは見当たらない。一方、

大動脈をみると、LDLレセプター欠損マウスでは大型の泡沫細胞が多数集簇している部分がしばしば出現し（図2）、内膜は構造がやや乱れ、平滑筋細胞は萎縮する。泡沫細胞は脂肪染色陽性である。電子顕微鏡の所見もこれを裏付け、大動脈壁ではほぼ正常な内皮細胞の下層に多数の単球性マクロファージが（内皮下に）侵入し、胞体内には中等大の多数の空胞（液胞）と小型の電子密度の高い小顆粒が散在性に均等にぎっしりと詰まっている。空胞は脂肪染色の所見から中性脂肪であろう。一方、大脳皮質の細動脈では（単球性マクロファージの侵入はなく）多数の大型の蜂の巣状の顆粒と、明るい中等大の顆粒が認められる。後者は対照動物にも観察されるライソソーム性の顆粒である。蜂の巣の顆粒が大型化するに伴い、間藤細胞は肥大し血管壁を圧迫した。細血管の内皮細胞では胞飲作用が目立つが、平滑筋細胞はほぼ正常である。

図1. LDLR欠損マウスの脳細動脈病変。（F：MATO細胞内FGP顆粒）

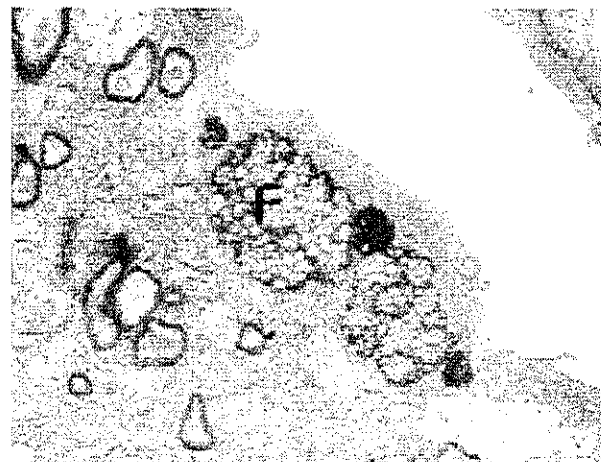
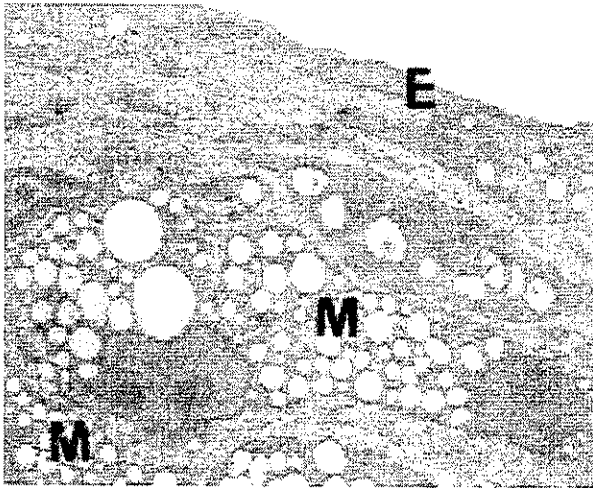


図2. LDLR欠損マウスの大動脈病変。(M: マクロファージ、E: 内皮細胞)



2. ApoE欠損動物の脳皮質に分布する血管においては、生後数カ月後には、高脂血により多くの内皮細胞は、その表面は平滑でなく暗調を示し軽度障害されていた。障害の度合は視床、海馬等に強く、内皮下腔は拡大し、平滑筋細胞内にも時に脂質性顆粒が出現した。間藤細胞は細胞内小器官に乏しく、ライソソーム性顆粒を殆ど含まない退行的なものと、大型の濃染した顆粒を含む場合とがあり、変性を思わせた。しかし、細血管構築はほぼ正常であった。しかし淡蒼球、黒質の細血管においては、間藤細胞に取込まれている脂質より、むしろその外層の星状膠細胞に多量の脂質が見出された。(視床、海馬采では一部の血管周辺に単球性マクロファージの侵入があった。この血管では間藤細胞及び平滑筋細胞は完全に変性に陥り、平滑筋細胞の一部はマクロファージにより貪食されていた。しかし、血管周辺に集積したマクロファージ周辺には平滑筋細胞及び線維芽細胞の増生はなく、線維化も認められず、細動脈は粥状硬化を呈さなかった。)

3. SHR-SPラットの血圧上昇は、生後4週まではほぼ正常であり、生後10週まではそれ等動物の脳皮質脳細動脈には大きな変化を認め難いが、間藤細胞のHRP摂取能は低下し、一部の間藤細胞は脂質を含み変性していた。20週では、間藤細胞のHRP摂取能は更に低下し、原形質には多数の小胞、小型のライソソーム及び脂肪滴を含み、やや暗調となるが、内皮細胞、平滑筋は扁平化すると共に、平滑筋細胞はやや不規則な形をとる。こ

の時期には電子密度の高い退行的の間藤細胞が増加する。それら変性間藤細胞の近くに、ライソソームに乏しく、ゴルジ層板に富み、時に発達した小胞体を有する未熟な間藤細胞が出現した。28週に至ると、平滑筋細胞の形は乱れ、萎縮像、変性像が明らかとなり、泡沫化の進んだ間藤細胞、変性した間藤細胞と共に未熟な間藤細胞、線維芽様細胞が血管周辺に増加し、線維化が進み、血管壁は肥厚し、血管内腔は狭小化した。これは、間藤細胞の脱分化であろう。しかし、すべての過程で単球性マクロファージの血管壁侵入はみとめられなかった。上述の変化はSHR-SPラットでは、まず間藤細胞の機能に異常があり、そのため血管平滑筋、内皮細胞が変性に陥ると考えられる所見であった。

D. 考察

脳の如き閉鎖空間では、脳血管に沿って脳老廃物の処理のため及び血行からの異物処理のため、間藤細胞の様な清掃細胞の分化が必要であったと思われる。以上に述べた実験結果から、脳血管では高脂血下に於いても単球性マクロファージの血管壁内遊走及び平滑筋細胞の増生が殆ど認められず、粥状硬化は起こらなかった。この事は、脳細血管が他の部位の血管と異なり、血液脳関門を有し(その内皮細胞が堅く結びつき、また糖蛋白を有すること)、間藤細胞の分布が必ずみられることと関連する現象であろう。また、上述の実験結果から、血管老化高脂血或いは高血圧下に於いて、脳血管壁細胞の変化(動脈硬化、アテローム形成、血管壊死)に先立ち、間藤細胞に泡沫化、肥大化、異物摂取低下或いは変性が出現することは、同細胞が脳血管病変惹起にとって重要な役割を有していることを示している。逆に云えば、老化時或いは病態時における間藤細胞の活性が十分に高ければ、脳血管病変は防ぐことが可能であることを示している。先に述べた如く、間藤細胞に泡沫化、肥大化がおこる場合には物理的に付属血管壁は圧迫され、内皮は突出し、血管腔は著しく狭小化する。この現象は、粥状硬化により大動脈、心冠動脈内腔が内膜の肥厚により狭小化する秩序と異なり、ある意味で単純である。しかし、apoE欠損マウスにみられる様な高脂血下においては、時に血中マクロファージが脳実質内血管壁の中に侵入し、血管周辺に集積するが、この場合には間藤細胞の機能はむしろ抑制され、泡沫化することは少なく、平滑筋及び間藤細胞の増生は認められず、

血管壁細胞は徐々に変性する。マクロファージ由来の蛋白分解酵素或いは酸化LDL、その他細胞障害性物質の蓄積のためであろう。SHR-SPラットにおいては、早期に間藤細胞の機能不全が示され、後期には同細胞の退分化が認められたが、これは脳動脈壁の微小環境の変化（血管透過性の変化）によるものかもしれない（論文作成中）。

E結論

一般の血管—大動脈、心冠状動脈—では老化に伴い血管構築も変化するが、その過程は血中脂質によって促進され、血管の粥状硬化への過程が進行する。この過程において主役を演じる物質は酸化脂質（LDL）であり、細胞はマクロファージであることは確かなことであろう。しかし、脳実質内の血管では高脂血下、高血圧下においても、粥状硬化の像は得られない。間藤細胞は老化時或いは高脂血では泡沫化するが、そのような状況下では血管平滑筋細胞が不規則な形をとり、或いは変性に陥る。SHR-SPラットの間藤細胞にも中等度の泡沫化が認められ、平滑筋が変性する。脳実質内の血管細胞が、他の部位の血管細胞と反応性において異なる点は今後の課題であるが、構造的には間藤細胞の存在が大きいと思われた。同細胞は、生理的に恒常的に脳細血管に分布するマクロファージ系の細胞で、一般の血管が病変時にのみマクロファージの侵入をみることと異なり、常に血管壁からの脂質（異物）を含む物質を摂取・消化し、脳細血管の微小環境の維持をその主役としている細胞だからである。

F. 研究発表

1997年

1. 論文発表

- 1) Mato. M., Ookawara, S., Sakamoto, A.: Growth retardation of Mato's fluorescent granular perithelial (FGP) cells in scavenger receptor knockout(SRKO)mice. *Anat. Rec.*, 247:307-316, 1997.
- 2) 間藤方雄、大河原重雄、小川剛、坂本 敦司、竹内公一：高コレステロール血症下における Probucolの変性抑制作用. *動脈硬化*, 24: 817-824, 1997
- 3) 間藤方雄、大河原重雄、坂本敦司：脳の血管系のマクロファージ (Mato cell) .血管と内皮、

7,285-294,1997.

- 4) 間藤方雄、坂本敦司、大河原重雄：各種条件下における間藤細胞. *日本臨床*, 55, 1845-1852, 1997.

2. 学会発表

- 1) 大河原重雄、鈴木弘毅、美馬達夫、南政博、森惟明、間藤方雄：水頭症モデル動物におけるMato細胞の変化. 厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究分科会 平成8年度研究報告書 (分科会長 森惟明) 1997、pp43-49.
- 2) 大河原重雄、益子敏弘、鈴木弘毅、増沢紀男、間藤方雄：一過性脳虚血後の海馬細血管の変化. 第102回日本解剖学会総会、1997年3月、名古屋.
- 3) 間藤方雄：脳清掃細胞 (CSC・Mato細胞) の形態と機能—特に病態時における—. 第16回日本蘇生学会、特別講演1997年10月、所沢.

1998年

1. 論文発表

- 1) Mato, M., Sakamoto, A., Ookawara, S., Takeuchi, K., Suzuki, K.: Ultrastructural and immunohistochemical changes of fluorescent granular perithelial cells and the interaction of FGP cells to microglia after lipopolysaccharide administration. *Anat. Rec.* 251: 330-338, 1998.
- 2) Honda, M., Akiyama, H., Yamada, Y., Kondo, H., Kawabe, Y., Takeya, M., Takahashi K., Suzuki H., Doi, T., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mato, M., Gough, P.J., Greaves, D.R., Gordon, S., Kodama, T., Matsushita M.: Immunohistochemical evidence for a macrophage scavenger receptor in Mato cells and reactive microglia and Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:734-740, 1998.
- 3) 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10年度研究報告書 (分科会長

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

森惟明) 1998、pp76-80

- 4) 間藤方雄：Mato細胞の形態と機能—特に病態時における—。日本蘇生学会雑誌、第17巻1号pp13-22
- 5) 間藤方雄。脳の血管周囲細胞。脳と神経、50：965-976、1998。

2. 学会発表

- 1) 間藤方雄：FGP細胞(MATO)の分化・構造および機能について。第25回日本電顕皮膚生物学会(特別講演)、1998年9月、東京。
- 2) 間藤方雄、大河原重雄：脳血管の透過性昂進に対するFGP細胞(MATO)の反応について。第35回日本臨床生理学会総会サテライト研究会 第2回分子生理研究会。1998年10月、那須。
- 3) 坂本敦司、間藤方雄:LPS(lipopolysaccharide) 投与によるFGP細胞(MATO)の変化。第35回日本臨床生理学会総会サテライト研究会 第2回分子生理研究会。1998年10月、那須。

1999年

1. 論文発表

- 1) 益子敏弘、大河原重雄、間藤方雄：実験的虚血における脳細血管およびFGP細胞(蛍光性顆粒周囲細胞；Mato細胞の形態学的変化に関する電子顕微鏡的研究、BRAIN and NERVE、第51巻10号1999年
- 2) Masao Mato, Shigeo Ookawara, Toshihiro Mashiko et al.:Regional Difference of Lipid Distribution in Brain of Apolipoprotein E Deficient Mice, THE ANATOMICAL RECORD 256:165-176,1999
- 3) Masao Mato: Perivascular Cells of Small Cerebral Vessels (FGP;Mato Cells) and Their Permeability under Pathological Condition, Ischemic Blood Flow in the Brain, The Keio Journal of medicine vol.48 supplement 2 ,Nov.1999 A3
- 4) 間藤方雄：脳微小血管における泡沫細胞の形成と脳血管障害、The Lipid Vol.10,No.5, pp51-57

2. 学会発表

- 1) 益子敏弘、大河原重雄、間藤方雄：脳虚血時におけるFGP細胞(Mato)に関する研究、日本解剖学雑誌、第74巻1号、p54
- 2) 大河原重雄、益子敏弘、間藤方雄：apolipo E 欠損マウスにおける脳内脂質の分布に関する研究、日本解剖学雑誌、第74巻1号、p36

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

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に関する研究

分担研究者 高橋 潔（熊本大学医学部病理学第二講座教授）

研究要旨

細胞内におけるコレステロールエステル合成に重要な役割を果たす acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) の局在について、ヒトACAT-1に対する特異抗体を用いて検索した。その結果、ACAT-1は粥状動脈硬化病巣では血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ由来泡沫細胞に陽性であった。正常ヒト臓器では、(1) リポ蛋白アッセンブリーに関わる細胞群、(2) ステロイドホルモン合成に関わる細胞群、(3) マクロファージとその関連細胞群などに陽性となり、ACAT-1は粥状硬化病巣におけるマクロファージの泡沫細胞化に深く関わる一方、リポ蛋白アッセンブリー、ステロイドホルモンの合成に際しても重要な役割を演じていることが明らかになった。

A. 研究目的

粥状硬化の形成初期には、血液単球が動脈内皮下に侵入してマクロファージに分化し、泡沫細胞化する。マクロファージの泡沫細胞化は、スカベンジャー受容体による変性脂質の取り込みと細胞内でのコレステロールエステル合成によっておこり、後者の反応は acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) によって触媒される。コレステロールエステルは細胞内のコレステロール貯蔵形態である一方、細胞間のコレステロール輸送形態でもあるため、ACAT-1は生体内コレステロール代謝の中核的役割を担っている。そこで、粥状硬化病巣ならびに正常各種臓器/細胞におけるACAT-1の局在を明らかにするために、ヒトACAT-1に対する特異抗体を用いて種々の検討を行った。

B. 研究方法

ヒト剖検症例8例について、遺族の了解のもとに諸臓器をPLP固定液で固定後、凍結保存した。凍結切片を作製し、抗ACAT-1抗体を用いて免疫組織化学的に検討を加えた。ヒト単球は健常ボランティアより提供を受けた。静置培養によって7-10日培養し、免疫電顕、免疫蛍光二重染色、ウェスタンブローディングを行った。

C. 研究結果

粥状動脈硬化病巣では内皮細胞、平滑筋細胞、内膜への浸潤マクロファージにACAT-1の発現が見られ、中でも泡沫細胞化マクロファージに強い陽性像が観察された。正常諸臓器でのACAT-1の発現は、(1) 消化管粘膜上皮や肝細胞などのリ

ポ蛋白アッセンブリーに関わる細胞群、(2) 副腎皮質細胞、精巣ライディッヒ細胞、卵巣顆粒膜細胞などのステロイドホルモン合成に関わる細胞群、(3) マクロファージとこれに関連する細胞群、(4) その他（神経細胞、皮脂腺、腎尿細管など）に認められた。免疫電顕では培養ヒトマクロファージの粗面小胞体にACAT-1の局在が認められたが、アセチルLDL添加によって細胞を泡沫化させると、約40%のACAT-1は直径100nm前後の小胞に移動した。小胞体の特異マーカであるGRP78とACAT-1について免疫蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると、AcLDLの有無に拘わらず両者の局在は一致していた。イムノブロットによる検討では、マクロファージが含有するACAT-1蛋白量は泡沫細胞化の有無に拘わらず一定であることが明らかになった。

D. 考察

ACAT-1は粥状硬化病巣におけるマクロファージの泡沫細胞化に深く関わる一方、リポ蛋白アッセンブリー、ステロイドホルモンの合成に際しても重要な役割を演じていることが明らかになった。さらに全身に分布するマクロファージとその関連細胞群にもACAT-1が陽性であった。単球由来マクロファージを用いた検討では、ACAT-1蛋白量は泡沫細胞化によって変化を示さなかったが、その細胞内局在は細胞の泡沫化に伴って小胞体から小胞体に由来する小胞に移動することが明らかとなった。ACAT-1陽性小胞体の小胞化は、ACAT-1と細胞内の遊離コレステロールとの接触の機会を増加させるものと推定された。

E. 結論

ヒト組織における ACAT-1 の局在の検討から、ACAT-1 は粥状硬化病巣におけるマクロファージの泡沫細胞化に深く関わる一方、リポ蛋白アッセンプリー、ステロイドホルモンの合成に際しても重要な役割を演じていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ling X, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K.: Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structure of advanced glycation end products in human tissues.: *Lab Invest* 75:1591-1606, 1999

2. Hagiwara S-I, 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* 154:705-720, 1999

3. Takeya M, Tomokiyo R-I, Jinnouchi K, Sakaguchi H, Hagiwara S-I, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K.: Macrophage scavenger receptors: structure, function and tissue distribution (review).: *Acta Histochem Cytochem* 32:47-51, 1999

4. Kaikita K, Takeya M, Ogawa H, Suefuji H, Yasue H, Takahashi K.: Colocalization of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in coronary atherosclerosis.: *J Pathol* 188:180-188, 1999

5. Takaku M, Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo T, Kodama T.: An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2330-2339, 1999

6. Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, Horiuchi S, Chang CCY, Chang TY, Takahashi K.: Localization of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT-1) in macrophages and other various cell types of human tissues.: *Am J Pathol* 156:227-236, 2000

7. Lehtolainen P, Takeya M, Yl-Herttuala S.: Retrovirus-mediated, stable scavenger receptor gene transfer leads to functional

endocytotic receptor expression, foam cell formation, and increased susceptibility to apoptosis in rabbit aortic smooth muscle cells.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:52-60, 2000

8. Usui M, Egashira K, Tomita H, Koyanagi M, Katoh M, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Matsushima K, Takeshita A.: Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats.: *Circulation* 101:305-310, 2000

2. 学会発表

1. Takeya M, Tomokiyo R, Jinnouchi K, Matsumoto U, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K.: Production and characterization of monoclonal antibodies against human macrophage scavenger receptors.: 1999 Keystone Symposium, Macrophage Biology (Keystone, USA), 1999.1

2. Takeya M, Hagiwara S-I, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K.: Macrophage scavengers play an important role in *Corynebacterium parvum*-induced hepatic granuloma formation in mice.: The Sixth Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, Kurashiki, Japan, 1999.3

3. Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K.: Distribution and localization of advanced glycation end products (AGE) in human lymphoreticular tissues.: The Sixth Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, Kurashiki, Japan, 1999.3

4. Sakashita N, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Lee O, Chang CCY, Chang T-Y, Takahashi K.: Localization of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in various tissues and macrophages.: The Sixth Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, Kurashiki, Japan, 1999.3

5. 坂口 尚、北村信夫、堀内正公、竹屋元裕、高橋 潔: アポE欠損マウスでのVLDL/IDLによるマクロファージの泡沫細胞化形成—アポE非依存性経路の存在: 第36回日本循環器学会総会・学術集会(東京) 1999.3

6. 坂口 尚、北村信夫、竹屋元裕、高橋 潔、

堀内正公、鈴木宏志、児玉龍彦:ノックアウトマウスを用いた動脈硬化症におけるマクロファージスカベンジャー受容体の役割の検討:第36回日本循環器学会総会・学術集会（東京）1999.3

7. 竹屋元裕、萩原正一郎、鈴木宏志、児玉龍彦、高橋 潔:マクロファージスカベンジャー受容体欠損マウスではCorynebacterium parvumによって誘発される肝肉芽腫形成が遅延する:第88回日本病理学会総会（東京）1999.4

8. 凌 霞、坂下直実、永井龍児、堀内正公、高橋 潔:加齢および実験的糖尿病にともなうラット全身諸臓器での免疫組織学的AGE局在について
第88回日本病理学会総会（東京）1999.4

9. 陣内克紀、竹屋元裕、高久幹夫、和田洋一郎、児玉龍彦、内藤 眞、高橋 潔:Coculture systemによるin vitro血管モデルの作製と単球分化の解析:第39回日本リンパ網内系学会総会（名古屋）1999.5

10. 坂下直実、竹屋元裕、高橋 潔、宮崎 章、堀内正公、Cathrine CY Chang、Ta-Yuan Chang :Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase - 1 (ACAT- 1) の組織および細胞内局在:第40回日本組織細胞化学会総会・学術集会（京都）1999.12

G. 知的所有権の取得状況

無し。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

スカベンジャー受容体による細菌性抗原処理機構の研究

分担研究者 内藤 眞（新潟大学医学部病理学第2教室教授）

研究要旨

スカベンジャー受容体の感染免疫における役割を検討するため、MSR- Aノックアウトマウスと野生型マウスを用いて、BCG感染における本受容体の役割を検討した。その結果、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の産生や殺菌機構に関与し、生体防御に有利に機能することが確認された。

A. 研究目的

スカベンジャー受容体は兎玉によって1990年に化学修飾リポ蛋白の取り込みを司る受容体として発見され、その後幾つかの類似受容体がクローニングされ、スカベンジャー受容体ファミリーが形成された。その中でもスカベンジャー受容体class Aの1型、2型（MSR- A）はある種の細菌性あるいはウイルス性抗原を認識する。前年度の研究で分担者は本受容体がLPS受容体の一つとして機能すること、スカベンジャー受容体を介する細胞内シグナルはサイトカインやケモカインの産生制御に関与することを明らかにした。しかし、この受容体が実際の感染免疫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。本年度は、MSR- Aノックアウトマウスと野生型マウスを用いて、BCG感染における本受容体の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

MSR- Aノックアウトマウスと野生型マウスにBCG生菌（Pasteur strain）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MSR- A抗体（2F8）、抗リンパ球抗体（Thy1.2、B220）などを用いた免疫染色を行った。またRT-PCRやELISAにより組織における各種サイトカインの発現や血清サイトカイン濃度を検討した。また免疫染色と結核菌染色の二重染色を行った。各臓器の菌数をコロニー形成法で検出した。また、肝内リンパ球のファックス解析も行った。

C. 研究結果

BCG（ 3×10^5 ）を経静脈的に投与すると、60日後の生存率はMSR- Aノックアウトマウスは野生型の半分以下であった。ノックアウトマウス肝の肉芽腫数と大きさをみると、野生型マウスに比較して少数で、小さかった。しかし、ノックアウトマ

ウスの肺病変は始めは小さいが、途中から急激に拡大した。Ziehl-Neelsen染色ではノックアウトマウス肺病変の菌増殖は野生型マウスに比較して顕著であった。コロニー形成法でもノックアウトマウス臓器内のBCG菌の増殖は野生型より1~2桁多かった。in vitroでの菌の取り込みを観察すると、ノックアウトマウス腹腔マクロファージの菌取り込みは野生型より少なかった。野生型マウスマクロファージの培養液にMSR- Aの抗体（2F8）を添加すると、菌のとりこみの抑制が認められた。酵母菌と熱固定赤血球の取り込みもノックアウトマウスマクロファージと野生型マウスマクロファージとは同様の差異が認められ、スカベンジャー受容体はこれらの物質の取り込みに関与することが示された。

BCG感染マウスの組織のサイトカインmRNA発現や血清サイトカインを測定すると、ノックアウトマウスと野生型マウスに有意の差異は確認できなかった。ファックス解析では、ノックアウトマウスと野生型マウスの肝ではリンパ球分画に多少の差はみられ、ノックアウトマウスではNK細胞の動員が少ない傾向が認められた。

D. 考察

MSR- AノックアウトマウスマクロファージではBCG菌の取り込みは少ないこと、および抗体によって取り込みが抑制されることから、MSR- AはBCG受容体のひとつとして機能していると考えられる。さらに、BCG感染ノックアウトマウスの生存率は低く、これは殺菌能が低いために菌の増殖がより活発となったためと思われる。MSR- Aからのシグナルは殺菌機構の上で重要と推測されるが、殺菌に直接関与するサイトカインは同定できなかった。興味あることに、BCG感染ノックアウトマウスの方が野生型に比較して菌数は多いのに肝では肉芽腫病変が少なく、肺では病変がより拡大した。今後、菌側と生体側の諸因子を考慮してMSR- Aの機能について

て検討が必要である。スカベンジャー受容体の生体防御機能解析は、感染症対策を考慮する上で新たな視点を提供するものと期待される。

F. 結論

MSR-Aは変性LDLの他に種々の陰性荷電を持った巨大分子を結合する。進化論的に考えると、スカベンジャー受容体は本来マクロファージの根源的機能の一つである異物や老廃物の処理、微生物の取り込みと殺菌に重要な働きを発揮してきたもので、多様なリガンド特異性の故に動脈硬化に関連するようになったと思われる。昨年度の研究で、スカベンジャー受容体class AはLPSなどの細菌性抗原の取り込みに重要な受容体とみなされた。本年度のノックアウトマウスを用いたBCG感染実験成績から、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の産生や殺菌機構に関与し、生体防御に有利に機能するものと考えられた。

マクロファージスカベンジャー受容体の細胞内シグナル伝達機構の解明

分担研究者 土井 健史(大阪大学大学院薬学研究科)

研究要旨

マクロファージスカベンジャー受容体は、主にマクロファージでその発現が認められ、変性 LDL の取り込みや細胞接着に重要な役割を果たしている受容体であり、動脈硬化発症に大きく関与している。本研究では、この受容体の細胞質領域の構造と機能を解析することにより、マクロファージの動脈硬化発症における分子機構を明らかにし、新規治療法の新たな標的を探索するものである。

A. 研究目的

マクロファージスカベンジャー受容体は、主にマクロファージでその発現が認められ、変性 LDL の取り込みや細胞接着に重要な役割を果たしている受容体であり、動脈硬化発症に大きく関与している。本研究では、この受容体の細胞質領域の構造と機能を解析することにより、マクロファージの動脈硬化発症における分子機構を明らかにし、新規治療法の新たな標的を探索するものである。今年度においては、マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域と相互作用する因子の探求を目的として研究を行った。

B. 研究方法

マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域をペプチド合成により作製し、この領域の構造を調べるとともにこの分子と相互作用する因子の単離を試みる。

相互作用する因子の単離には、合成したペプチドを用いてアフィニティカラムを作製し、これと相互作用する細胞内成分を単離する。さらに同定した細胞内因子のスカベンジャー受容体を介するシグナル伝達経路等における役割について調べる。

C. 研究結果

スカベンジャー受容体の細胞質領域（50アミノ酸）をペプチド合成機により合成し、その構造をODスペクトル測定装置を用いて調べた結果、1本鎖分子では明確なヘリックスやシート構造をとり難い（トリフルオロエタノール存在下、わずかにヘリックス構造を示す）ことが明らかとなった。スカベンジャー受容体は3本鎖を形成しているため、先に合成した1本鎖ペプチドをC末端側で3本に束ねた分子を作製し、同様に構造を調べたが、1本鎖の場合と比較しわずかにヘリックス

含量が増加したが、大きな変化は見られなかった。そこで、スカベンジャー受容体の細胞質ドメインは、3本鎖による特定の構造をとっていないことが示唆されたため、大量調製が可能な1本鎖ペプチドを用いてアフィニティカラムを作製し、これと相互作用する因子の単離を試みた。牛の肺から調製した細胞抽出液をこのカラムにかけ、特異的に結合したタンパク質を溶出したところ、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約40k、50k、60k、70k、90k付近にバンドが検出された。これらのバンドを切り出し、その部分アミノ酸配列を決定したところ、それぞれ、GAPDH、S-Adenosylhomocysteinase、Amino-peptidase、HSP70、HSP90であることが判明した。また90k付近のバンドには、未だ明らかになっていない配列を有する未知のタンパク質が含まれることがわかった。次に、このうち受容体のエンドサイトーシスやシグナル伝達に関与する可能性のあるGAPDH、HSP70、HSP90についてさらに検討を加えた。これらタンパク質を遺伝子操作により大腸菌内で発現させ、先の細胞質領域ペプチドとの相互作用を調べた結果、HSP90については結合が認められたが、他の因子については検出できなかった。このことより、HSP90は単独で相互作用することができるが、他のGAPDH、HSP70については単独では非常に弱く相互作用するか、作用するには他の因子が必要であることが示唆された。

D. 考察

マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域に相当するペプチド分子は、1本鎖の時もまた3本に束ねたときも特徴的な3次構造をとっていなかった。したがって、この領域と相互作用する分子においては、アミノ酸配列を認識して結合

するか、もしくは構造をとらせる因子が結合した上で結合する可能性が考えられた。実際この領域に結合する因子の探索を行ったところ、シャペロン分子であるHSPが結合することが判明した。この因子が受容体の機能にどう関わっているか現在検討中であるが、構造をとらせることにより他の因子との相互作用を可能にしていることが予想される。

本研究により、スカベンジャー受容体の細胞質領域と相互作用する因子に関する情報が得られたが、これを基にマクロファージ特有の情報伝達機構を調べ、動脈硬化抑制の作用点を探求し、新たな作用点を標的とした新規な薬物の開発を目指したい。

またこれらのアプローチにより、未だ明らかにされていないマクロファージ特有の細胞内分子機構が明らかにされ、種々の血管病変でのマクロファージを標的とした新たな治療法が生まれることを期待したい。

E 結論

マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質ドメインは、その配列のみでは明らかな3次構造をとらないが、HSPなどの因子が結合することによって他の因子との結合が可能になり、生理的機能を果たす分子機構を示した。

主任研究者 児玉龍彦（東京大学先端科学技術研究センター教授）

研究要旨

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、低酸素分圧下でLDLを負荷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。

A. 研究目的

動脈硬化病変で観察される脂質蓄積細胞は、その形態的特徴から泡沫細胞と呼ばれる。しかし、病変の進展におけるその役割に加え、その形成過程には不明の点が多い。マクロファージスカベンジャー受容体やアポE欠損マウスやWHHLウサギなどの動脈硬化易発症動物モデルにおいて観察される病変から泡沫細胞を回収することは不可能ではないが、経時的かつ簡便に、しかも種々の介入が可能な培養系で泡沫細胞を作成することができれば、その本態の同定や、薬剤の有効性の検討に極めて有用であると考えられる。そこで、体外で血管壁細胞を層状に混合培養して血管壁環境を再現し、そこに単球細胞を添加、種々のリポ蛋白を負荷しつつ泡沫細胞形成を再現し、そこで観察される細胞の作用、遺伝子発現様式を解析することによって泡沫細胞の定義付けを行うことが本研究の目的である。

B. 研究方法

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。さらに、末梢血から単離した単球をここに添加すると、内皮細胞層を通過して内皮下に集積する過程が再現されるので、酸化された低比重リポ蛋白（LDL）を負荷することによって、動脈硬化初期病変に特徴的な泡沫細胞形成過程を再現することが可能になった。

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。

昨年度までに我々が構築した血管壁混合培養系は、ウサギ大動脈から平滑筋、内皮細胞をそれぞれ独自に開発した方法で初代培養し、細胞外マトリックスをはさんでこれらを層状に混合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。またヒト末梢血由来単球は、磁気ビーズで標識されたCD14抗体を用いて単核球分画より調製した。

単球は終濃度3nMのMCP-1によって効率的に内皮細胞内に誘導され、九日間の混合培養を行った。

2. 低酸素培養

無変性LDLだけを添加することによって脂質蓄積細胞を形成するために、酸素分圧を5%に低下した環境をつくることのできる培養器を使用した。このとき、培地内の酸素分圧が設定通り35mmHgとなることを酸素分圧モニター（Intermedical社、PO2-100DW）によって確認した。

3. 混合培養系の観察

(1) 混合培養マトリックスの乾燥

多数の検体を効率的に検索して、脂質蓄積細胞を見いだすため、従来の凍結切片の脂質染色に加え、乾燥ゲルを使った染色を行い、脂質蓄積細胞の出現する条件を検索した。つまり、混合培養マトリックスをそのまま乾燥し、その後Oil red O染色を行った。陽性細胞の検出された検体については、引きつづき下記の方法により詳細な検討を行った。

(2) 細胞の脂質蓄積検討と、細胞種の同定

このとき脂質を蓄積している細胞の種類を同定するために、単球添加後九日間培養された混合培養系を、2mg/mlのcollagenase Dによって37°C、30分処理の後、内皮下マトリックスを分解した。酵素反応を停止した後、細胞懸濁液を40μm径のメッシュに通してマトリックス残滓を除去。細胞成分を遠心して回収した後、サイトスピンで調製し、各種細胞染色を行った。

サイトスピンで調製された標本と、同時に凍結切片において、脂質蓄積はOil red O, Sudan III, およびコレステロール特異的なNile blue染色を行い、コレステロールの蓄積を観察した。また、混合培養の検体において、ヒトマクロファージの同定にはCD68, 平滑筋細胞の同定にはHHF35, 抗Smooth muscle actin抗体を用いた。

4. 平滑筋と共培養することによってLDLに酸化変性が生じているかどうかを検討するため、平滑筋と共培養したLDLを回収して、HPLCによって脂質分析を行い α -Tocopherol/Free cholesterol(FC), 20:4 cholesteroxy ester(CE)/FC, 18:2CE/FC, -OH/FC, -OOH/FCを測定して酸化変性の有無を検討した。

5. ウサギ細胞との混合培養から回収されるヒト遺伝子解析の可能性

混合培養系をISOGEN添加後直接ホモジナイズしてtotal RNAを回収した。ヒト単球からマクロファージへの分化時に高度に誘導される遺伝子群からMMP9, Apo-CI, CD9, tartrate-resistant acid phosphatase type 5, Neuromedin Bの5つを選択し、回収されたtotal RNAを用いてRT-PCRを行った。

C. 研究結果

1. 低酸素培養による脂質蓄積細胞の増加。

無変性LDL添加後、5%の低酸素培養器において培養した混合培養系において単球添加後から九日目に、脂質蓄積を示す細胞が検出された。脂質染色と細胞マーカーを併用して検討したところ、平滑筋細胞とマクロファージの双方に脂肪滴の蓄積が生じていることが観察された。

2. 平滑筋細胞の低酸素下脂質蓄積現象。

平滑筋が低酸素下でLDLを負荷することによって脂質蓄積を起こすことを確認するため、ウサギ平滑筋細胞を5%の酸素分圧で培養し、3mg/mlのnative LDLを負荷し、脂肪の蓄積を観察した。その結果、5%酸素分圧で培養しつつLDLを負荷した細胞において、Oil red OおよびSudan III染色、そしてコレステロールに対する特異性の比較的高いNile blue染色により著しい脂質、特にコレステロールの蓄積が認められた。一方20%酸素分圧下では同濃度のLDL負荷によってほとんど脂質蓄積が認められなかった。

3. 平滑筋との共培養によるLDLの酸化変性の有無

上記に示した通り、低酸素下での混合培養系ではマクロファージ由来の脂質蓄積細胞も著明に増加しており、混合培養系の内部でLDLの変性が進行しているためにマクロファージによる取り込みが増加していると推測された。酸化変性の有無を検討したところ、平滑筋と共培養したLDLにおいては、native LDLと比べてビタミンEの消耗、コレステロールエステルに関して明らかな減少は認められず、一方アルコール、アルデヒドなど酸化変成に伴って生成する物質の増加も検出されなかった。

4. 混合培養からのtotal RNA回収とヒトマクロファージマーカー遺伝子の発現確認

混合培養系で形成される泡沫細胞の網羅的な遺伝子発現解析にあたっては、Gene Chipなどのoligonucleotide chipを使用する予定である。この為、混合培養系からのヒトMφ由来するtotal RNAの回収が必要である。混合培養系からヒトマクロファージ由来RNAが回収されているかどうかを検討するために、すでにヒト単球からマクロファージへの分化にあたり、高度に発現が誘導される遺伝子についてRT-PCRを行った。この結果、ウサギ細胞だけの培養系では検出できなかったものの、ヒトマクロファージを含む培養系からはバンドが検出された。

D. 考察

従来の大気中と同一の20%酸素分圧時の培養と異なり、低酸素下において血管壁細胞では通常の培養条件と異なり脂質蓄積に向かう変化が生じていると考えられた。

その結果、従来のように銅酸化LDLを用いずとも、3mg/mlのLDL濃度でも低酸素下で血管壁細胞と混合培養することにより、無変性(native LDL)からの平滑筋およびマクロファージへの脂質蓄積現象を体外で再現することができるようになった。

特に平滑筋においては、単培養時にも低酸素下でLDLが高濃度に存在すると、細胞質内にコレステロールの蓄積が起こることが示された。従来低酸素下では血管平滑筋細胞からの増殖因子産生が増加したり、細胞外マトリックス増生するなど盛んな生理活性が報告されていることから、低酸素下での平滑筋の挙動を検討する必要があると考えられる。現在我々は、ヒト血管由来の平滑筋細胞を用いて、上記現象を再現し、遺伝子発現を網羅的に検討することによってその変化を解明する作業を進めている。

マクロファージ由来の細胞への脂質蓄積は、従来酸化変性によりスカベンジャー受容体を介して進展するとされている。低酸素下での平滑筋との共培養によってLDLは酸化変性を受けていないことが明らかになり、他に報告されているように細胞外マトリックスや、血清タンパク質との複合体形成によって貪食細胞への取り込みが亢進している可能性があり、現在回収されたLDLを用いて検討している。

ウサギとヒトの細胞を混合培養した系から、ヒトマクロファージ由来の泡沫細胞について遺伝子発現解析を行いたいと考えている。しかし、FACS等による細胞の分別には1時間程度要するため細胞内での遺伝子発現を正確に捉えるためには、迅速に培養系からRNAを回収する必要がある。実際にこのようにして回収したRNAからヒトマクロファージに特異的な遺伝子の発現がRT-PCRによって確認できた。この

とき、RT-PCRで使用したPCRprimerはマウス遺伝子配列と異なる部分を選択しており、Gene Chip上の oligonucleotide probeのヒト特異性があれば、混合培養から直接回収されたRNAを用いて泡沫細胞の遺伝子発現解析が可能であると考えられた。

E. 結論

血管壁混合培養系において低酸素下LDLを負荷することによって、マクロファージ、および平滑筋由来の脂質蓄積細胞が確認された。このとき、LDL粒子は酸化変成を受けていなかった。また、混合培養系から回収されるRNAを用いて、ヒトマクロファージ由来の遺伝子発現が確認され、同培養系による泡沫細胞の網羅的遺伝子発現解析への可能性が示唆された。

F. 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. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:2330-2339, 1999.

（学会発表）

2) Keystone symposium, 1999, January, Keystone symposium

G. 知的所有権の取得状況

なし。