

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

「各種動脈における泡沫細胞の遺伝発現解析」

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 児玉 龍彦

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

各種動脈における泡沫細胞の遺伝子発現解析	1
児玉 龍彦	

II. 分担研究報告

1. 脳内細動脈に於ける間藤細胞の泡沫化機序に関する研究	4
間藤 方雄	

2. スカベンジャー受容体による殺菌機構の研究	7
内藤 眞	

3. 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	10
土井 健史	

4. 低酸素下脂質負荷による冠動脈平滑筋由来泡沫細胞の遺伝子発現解析	12
児玉 龍彦	

5. 単球泡沫化の調節機構に関する研究	14
田中 良哉	

6. マクロファージ内でのリポタンパクの酸化の追跡	16
野口 範子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物別刷	別添
----------------	----

厚生科学研究補助金（長寿科学研究事業）

総括研究報告書

各種動脈における泡沫細胞の遺伝子発現解析

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

現代高齢化社会において、虚血性心疾患、脳血管障害等血管に生じた病態によって重篤な症状を示す疾患は、平成11年度においても死亡順位別死亡数の第二位、および第三位を占めており、高齢化社会の重要な問題である。泡沫細胞は初期動脈硬化病変を特徴づける典型的な所見であり、その形成過程を網羅的遺伝子発現解析によって明らかにすることは病変進展の機序を解明する上で重要であると考えられる。また大動脈、冠動脈および脳血管での泡沫細胞を6500個の遺伝子発現パターンを網羅的に解析、比較することによって動脈硬化病変の部位特異性の詳細を解明することが期待される。

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）
- 内藤 眞（新潟大学医学部教授）
- 土井健史（大阪大学大学院薬学研究科教授）
- 田中良哉（産業医科大学教授）
- 野口範子（東京大学先端研助手）

A.研究目的

現代高齢化社会において、虚血性心疾患、脳血管障害のように血管に生じた病態によって重篤な症状を示す疾患は、平成11年度においても死亡順位別死亡数の第二位、第三位を占め高齢化社会の重要な問題である。従来我々はマクロファージ、泡沫細胞を中心として動脈硬化研究を進めてきたが、昨年度Gene chipによる網羅的な遺伝子発現検討の結果、病変局所においても脂質代謝が重要であると考えた。そこでわれわれは、下記の4項目を目的とする研究計画を立案した。（1）in vitro のヒト泡沫細胞を用いてその発現遺伝子gene chipによって網羅的に検討し、抗体や欠損動物を併用して動脈硬化病変での泡沫細胞の機能を明らかにする。（2）上記混合培養系においては、低酸素分圧下においてより効率的な脂質蓄積が確認されており、酸素分圧の血管壁細胞に対する影響を、Transcriptome解析の手法によって検討する。（3）リポ蛋白中心部に分布し、酸化的变化を検出する蛍光マーカーを開発したので、これを混合培養系内で経時的に観察しLDL変性の部位、時期を明らかにする。（4）脳細血管では大動脈、冠動脈と異なり脂質負荷だけでなく、高血圧負荷が動脈硬化病変形成に必須であることを昨年度明らかにしたので、この過程を解析することにより、脳血管動脈硬化の特異性を明確にする。以上によって動脈

硬化現象をより詳細に記述し、今後の治療薬開発に資することを旨とする。

B.研究方および

C.研究結果

児玉は従来混合培養系を用いた実験から低酸素下で平滑筋が脂質蓄積することから、初代培養5代目の冠状動脈平滑筋を2%から20%までの種々の酸素分圧下で培養した。低比重リポ蛋白質（LDL）負荷群には終濃度3mg/mlにてLDLを添加した。72時間後にPBSにて洗浄、total RNAを調整し、うち5 μ gを用いてcRNAを合成しoligonucleotide chip(Gene Chip, Affymetrix, CA)にて6500遺伝子の発現量を比較した。同時に細胞の脂肪染色、脂質組成分析を行った。この結果、低酸素下でLDLを負荷すると、脂質染色にて陽性細胞数が増加し、cholesterylester(CE)の蓄積が増加した。adipophilin等細胞内脂質輸送蛋白の遺伝子は、脂質負荷によってそのmRNAレベルが2倍以上に増加した。一方、SREBPや、これによって転写調節を受けるLDL受容体、caveolin、さらにコレステロール合成経路の各酵素について転写レベルの抑制が認められた。

内藤は、リステリア感染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スカベンジャー受容体Class Aノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、大量のリステリア菌による感染死亡率はノックアウトマウスの方が有意に高かった。肝肉芽腫はノックアウトマウスの方が大きく、数も多かった。サイトカインの発現もノックアウトマウスのほうが顕著であった。菌の定量ではノックアウトマウスのほうが肝、脾とも1オーダー多く、ノックアウトマウスにおける殺菌能の低下が示された。腹腔マクロファージの菌の取り込みを比較するとノックア

総括研究報告書

ウトマウスマクロファージの取り込みは少なかったが、菌の増殖はノックアウトマウスのマクロファージの方が多かった。電顕的に観察すると、ノックアウトマウスのマクロファージでは菌がエンドソームから細胞質内へ脱出する像が多く認められた。死菌やリステリオリシンO非産生株を用いると、菌のエンドソームからの脱出は目立たなかった。エンドソームの酸性化をブロックするバフィロマイシンを加えると、ノックアウトマウスマクロファージのファゴゾームからの菌の脱出は有意に阻止された。

田中は、単球が酸化 LDL 刺激などによって増殖し、泡沫化マクロファージに分化する過程において、サイトカインや細胞接着をはじめとしてどのような周囲環境刺激に誘導または制御を受けるかを解明する事を目的として、単球を健康人末梢血より比重遠心法で得、その後エルトリエータを用いて分離し、スカベンジャーレセプターなどの細胞表面抗原を、抗体と蛍光標識二次抗体で染色し、フローサイトメータで検出した。その結果、エルトリエータで精製した静止期単球は、CD44 を高発現したが、スカベンジャーレセプターである CD36 と CD68 を発現しないこと、静止期単球は、酸化 LDL のみならず、CD44 刺激、HGF、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α も CD36 の発現を誘導した。CD36 の発現は、CD44 刺激が最速で 6 時間以内に誘導し、以降、酸化 LDL、HGF の順で誘導することを見いだした。また、CD44 刺激は、HGF レセプター c-Met の発現も誘導した。

土井は、スカベンジャー受容体の細胞質領域のアフニティカラムに親和性を示した因子が細胞内で受容体と相互作用していることを確認するために、GST プルダウンアッセイを行った。その結果、HSP70、HSP90、GAPDH のいずれもが、コントロールの GST には結合しなかったが、細胞質ドメインと GST との融合タンパク質には結合することが明らかになった。次に免疫沈降による相互作用の検出を行ったところ、いずれのタンパク質も抗 HA-1 tag 抗体によって受容体と共に沈降してくることが判明した。以上の結果より、HSP70、HSP90、GAPDH はいずれも受容体と相互作用し、さらにこの相互作用は細胞内でも生じていることが明らかとなった。

野口は、酸化生成物高感度検出蛍光プローブが混合培養系のマクロファージ内の酸化追跡に適用可能であることを確認することを目的として、DMSO に溶解した蛍光プローブ diphenyl pyrenyl phosphin oxide (DPPP=O) を添加し 37°C で 1 時間

培養し、マクロファージ内に DPPP=O をとりこませ、高感度冷却 CCD カメラによる観察を行った。その結果、レンズ面からすくなくとも 50 μm の深さ位置の細胞内の蛍光を観察することができることを確認した。

脳内血管は老化時、高血圧時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、高血圧時脳細血管の病理学的変化は大動脈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。間藤は、その要因を間藤細胞に求め、その泡沫化の機序の解明及びそれに伴う血管構築の変化を糖代謝・脂質代謝の面から行うことを目的として、光学顕微鏡、電子顕微鏡による脳細血管と間藤細胞の微細形態の観察を行った。さらに脳細血管より間藤細胞を分離し培養した。

β -Hexosaminidase (Hex) A 及び B の欠損マウスを検討した結果、Hex A の欠損した Tay-Sacks 病モデルマウスでは、ニューロンに GM2 を含む小体 (MCB) が蓄積するが、間藤細胞により GM2 は処理され同細胞は泡沫化しないことが明らかになった。SHR-SP ラットでは、まず間藤細胞の機能に異常があり、それに続き血管平滑筋、内皮細胞が変性に陥ると考えられた。分離した脳細血管を酵素処理し、それより遊離した細胞（自家蛍光顆粒を含む）を一週間 MCSF 含有 RPMI 1640 培養液中にて培養し、Dil アセチル LDL を摂取し、酸性フォスファターゼ陽性・ED2 陽性の細胞を得ることができた。

D. 考察および

E. 結論

児玉は、脂質負荷による脂質代謝関連遺伝子の発現量は、20%酸素分圧下で予想された挙動を示した。一方、低酸素環境では、その発現レベルと、脂質による抑制効果が異なっており、実際脂質染色や、脂質組成分析で認められる CE の蓄積増加の一因と考えられた。平滑筋を低酸素下、脂質負荷することによって、特定の細胞外マトリックス、ケモカイン、angiogenic inducer の発現が著明に増加しており、生体内で動脈硬化病変が進展するにあたって重要な役割を果たすと考えその機能を検討している。

内藤は、スカベンジャー受容体は菌の受容体として機能するだけでなく、殺菌機構にも直接関与することが明らかにした。エンドソームからのリステリア菌のエスケープに LLO が必須であることも示された。しかし、スカベンジャー受容体を介した細胞内シグナルと LLO を介したシグナルがどのように関係するかは今後の検討課題である。

総括研究報告書

田中は、酸化LDLの機能を修飾する因子として、HGF等の増殖因子、単球ケモカインであるMCP-1、IL-1 α 等のサイトカインの他、ヒアルロン酸受容体であるCD44を介する刺激が認め、ことに、CD44刺激によるスカベンジャーレセプターCD36の発現誘導は6時間以内に生じ、c-Metの発現誘導を介してHGFによるCD36の発現増強を齎したので、CD44刺激、HGF、酸化LDL刺激によって、酸化LDLの単球への取り込みが最大限となり、恐らくその後のマクロファージ泡沫化を最も効率的に引き起こすものと考えた。

土井は、スカベンジャー受容体を認識する抗体によって、これらが受容体と一緒に沈降してきたことから、細胞内でも相互作用していることが明らかにした。HSPはシャペロンタンパク質として知られているが、ここでは細胞質領域の構造を保持し他の因子との相互作用を仲介している可能性が考えられる。また、HSP90が細胞内シグナル伝達に関与している報告もあり、これら因子の寄与を明らかにすることが今後の課題である。GAPDHについても、細胞内小胞輸送に重要な役割を果たしていることが報告され、スカベンジャー受容体のエンドサイトーシスの効率に影響している可能性が考えられた。

野口は、蛍光プローブは高感度CCDカメラとZ軸フォーカス制御を用いることにより蛍光顕微鏡で混合培養に適用可能であることを示したが、細胞内の分布を特定するには至らない。共焦点顕微鏡と高感度CCDカメラの組み合わせも考える必要がある。また、蛍光プローブを組み込んだLDLを混合培養に添加する実験を次のステップで行い、血管内イベントのモデルを作成することが課題となっている。

一般の血管-大動脈、冠状動脈-では老化・病態に伴い血管構築が変化するが、その過程は、高血圧・高脂血によって促進され、血管の粥状硬化への過程が進行するとされる。間藤は、間藤細胞は脳虚血時・老化時或いは糖代謝異常時、高脂血時に泡沫化することを示したが、そのような状況下では血管平滑筋細胞は不規則な形をとり、遂には変性に陥る。SHR-SPラット（若年）の間藤細胞にもまず中等度の泡沫化-幼弱化が認められ、次いで平滑筋が変性する。ヘキサミンダーゼ欠損症に於いても間藤細胞の活性維持が重要であった。脳実質内の血管細胞が、他の部位の血管細胞と各種条件下に於いて反応性が異なる点は今後とも課題であるが、構造的、機能的に脳血管の恒常性の保持にとって間藤細胞の役割は大きいと思われた。今回単離培養に成功したことは、間藤細胞の幼弱化・泡沫化及び変性現象を定性的、

定量的に扱う研究を可能にすると考えられる。

研究要旨

血管性痴呆、脳出血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虚血時、高脂血下、高血圧下に於いて、冠状動脈、大動脈と同様な病理変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、従来の虚血実験に加え（文献1）1) ガングリオシドおよび糖代謝に関連する β ヘキソサミニダーゼの欠損動物に於ける間藤細胞の泡沫化機序を探る。（横浜市立大・山中正二、ノースカロライナ大・K.Suzukiとの共同研究）とともに、2) 易脳卒中自然発症高血圧ラット（SHR-SP）の脳細血管を経時的に観察し、脳内血管の病変に際し、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の重要性を明らかにし、3) 間藤細胞を単離培養し、同細胞の特異抗体の作成及びin vitroに於ける諸性質の解明を可能にすることを旨とした。

A.研究目的

脳内血管は老化時、高血圧時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、高血圧時脳細血管の病理学的変化は大動脈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、その泡沫化の機序の解明及びそれに伴う血管構築の変化を糖代謝・脂質代謝の面から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う。昨年度に引き続き、SHRラットの2つのグループを追加し、所見の確実性を高めた。一方、脳細血管より間藤細胞を分離し培養した。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、Dil アセチル LDL を培養液に添加したもの及びHRP (horseradish peroxidase) の経静脈及び脳内投与をした動物を用いた。使用動物はWister系ラット、遺伝子ノックアウトにより得られた β ヘキソサミニダーゼ欠損マウス、及び高血圧（易脳卒中発症性・SHR-SPラット）動物である。動物実験に当たっては、その倫理面に充分配慮をした上、実験動物の苦痛を最小限にした。

C.研究結果

1. β .Hexosaminidase (Hex) A及びBの欠損マウスはYamanakaの作成したマウスを用いた。各

種ノックアウトマウスを検討した結果、Hex Aの欠損したTay-Sacks病モデルマウスでは、ニューロンにGM2を含む小体(MCB)が蓄積するが、間藤細胞によりGM2は処理され同細胞は泡沫化しない。この所見はTay-Sacks病モデルマウスがヒトと異なり症状を呈さないことと関連している可能性が大きい。しかし、Hex Bを欠損したSandhoff病モデルマウスはニューロン中にゼブラ小体を含み間藤細胞は泡沫化し症状が出現した。Hex AとHex Bのダブルノックアウトマウスでは更に間藤細胞の泡沫化が高度となり内皮細胞・平滑筋細胞も泡沫化した。即ち、 β ヘキソサミニダーゼ欠損症に於ける間藤細胞の泡沫化の機序の一つはSandhoff病モデルマウスの異常代謝産物であるGA2、オリゴ糖、グルコースアミノグリカンの可能性が示されるとともに、これ等の中間代謝産物の中でオリゴ糖が泡沫化に最も関連していると推定される成績を得た。ダブルノックアウトマウスの如く間藤細胞の高度障害・機能不全の際には血管壁細胞全体が異常代謝産物を含み、血管壊死をおこすことが明らかになった。この様な条件下では、間藤細胞は肥大し血管壁を圧迫し管腔は著しく狭小化した。なお、これらの動物の間藤細胞のエピトープ(BM8, F4/80)は対照マウスのそれに比し、著しく減弱したが、間藤細胞の大きさは数倍に達し、血管は蛇行し、分節状を呈した(論文投稿中)。

2. SHR-SPラットはReavenらにより、インシュリン耐性を持つモデル動物と見なされるようになった。SHR-SPラットの血圧は、生後14週まではほぼ正常であり、生後16週まではそれ等動物の大脳皮質脳細動脈には大きな変化を認めがたい。それに

分担研究報告書

先立ち生後 10 週で、間藤細胞の HRP 摂取能は低下し、エプトープは低値を示し、6 週で既に間藤細胞は PAS 染色性に異常を呈し、中性脂質を蓄積し、一部の細胞では変性していた。この所見は、同ラットが、高トリグリセライド血症を呈することと対応している。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と少数の小型のライソソーム及び脂肪滴（トリグリセライド）を多量に含み、やや暗調となる。血管壁細胞である内皮細胞は扁平化し、平滑筋細胞はやや不規則な形をとるが、その配列に著変は示さない。またこの時期には電子密度の高い退行性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、リボソームに富み、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。24 週前後では平滑筋細胞の基底膜が肥厚し、筋細胞の配列が乱れ、血管周囲隙は拡大するとともに不規則な形態を呈する間藤細胞が多数出現する。血管透過性は著しく上昇し血漿成分の浸出があった。28 週乃至 38 週に至ると、平滑筋細胞の形は更に乱れ、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囲隙に増加し、その周辺に膠原線維出現し、血管壁は硬化像に近い像を呈する場合と、細胞変性物の集積により肥厚し、血管内腔の狭小化を呈する場合とがあった。これ等の所見は、脳内細動脈の梗塞像、破綻像の基礎を作る形態変化を示したものであり、これ等は数群の実験観察から実験群に普遍的にみられる変化であることが実証できた。しかし、非出血例では、単球性マクロファージの細血管内侵入は認められなかった。即ち、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、それに続き血管平滑筋、内皮細胞が変性に陥ると考えられる所見であった。

3. 間藤細胞の単離

間藤細胞の単離は同細胞の特異抗体の作成及び諸性質を明らかにするために必要である。共同研究者の中沢・相川は、分離した脳細血管を酵素処理し、それより遊離した細胞（自家蛍光顆粒を含む）を一週間 MCSF 含有 RPMI 1640 培養液にて培養し、Dil アセチル LDL を摂取し、酸性フォスファターゼ陽性・ED2 陽性の細胞を得ることができた。同細胞周囲は分裂能に乏しく、細胞相互は疎に結合している。同細胞の電顕像はほぼ間藤細胞に一致しているが、核の染色性が低く、顆粒の分布が周辺に限られる等の問題があり、培養液等更に検討を加えて

いる。また、将来の研究に備え、収量を向上させるための工夫が行われつつある。

D. 考察

脳の如き環境では、脳血管に沿って脳（神経）代謝産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ると思われるが、分化要因については、単離細胞を用いた研究が有用となる。従来所見および以上に述べた実験結果から、脳血管では高脂血下・高血圧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、所謂粥状硬化はみられなかった。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、正常時にもスカベンジャー機能を有する細胞を付属していることと関連する現象であろう。また、上述の実験結果は、脳虚血時、糖代謝の異常時、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、梗塞、血管壊死）に先立ち、間藤細胞に泡沫化、肥大化、異物摂取能低下、変性或いは幼弱化が出現することを示し、同細胞が生理的に脳血管の活性保持にとって重要な役割を有していることを立証している。即ち、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、後期には同細胞の線維芽細胞への脱分化が認められたが、これは同動物のインシュリン耐性に基づく代謝異常による間藤細胞の形質変化を示すものであり、これらの変化が血管変化に先立ち、間藤細胞に出現したことは興味深い（所見の一部は論文印刷中）。これ等の所見は、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、それに伴う脳血管病変を防ぐことが可能であることを示しているとも考えられる。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も付属血管壁は圧迫され、血管腔は著しく狭小化し、血流量は減少し、また同細胞の機能低下により血管壁細胞に異物が沈着し、代謝が阻害され変性に陥る。この現象は、粥状硬化により大動脈、冠状動脈内腔が内膜の肥厚により狭小化する秩序より、ある意味では単純である様にも思える。

E. 結論

一般の血管-大動脈、冠状動脈-では老化・病態に伴い血管構築が変化するが、その過程は、高血圧・高脂血によって促進され、血管の粥状硬化への過程が進行するとされる。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であろう。しかし、脳実質内の

分担研究報告書

血管では高脂血下においても所謂粥状硬化の像は得られない。間藤細胞は脳虚血時・老化時或いは糖代謝異常時、高脂血時に泡沫化することが示されたが、そのような状況下では血管平滑筋細胞は不規則な形をとり、遂には変性に陥る。SHR-SPラット（若年）の間藤細胞にもまず中等度の泡沫化-幼弱化が認められ、次いで平滑筋が変性する。ヘキシミニダーゼ欠損症に於いても間藤細胞の活性維持が重要である。脳実質内の血管細胞が、他の部位の血管細胞と各種条件下に於いて反応性が異なる点は今後とも課題であるが、構造的、機能的に脳血管の恒常性の保持にとって間藤細胞の役割は大きいと思われた。同細胞は、生理的に脳細血管に分布するマクロファージ系の細胞で、常に脳および血管壁からの糖質、脂質を含む代謝産物を摂取・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である。この事は、既に示した様に脳虚血に於ける間藤細胞の観察からも裏付けられている。間藤細胞の幼弱化・泡沫化及び変性現象を定性的、定量的に扱う研究のためには同細胞の培養が必須であろう。将来骨髄移植による血管系・マクロファージ系細胞の補充が脳血管傷害にとっても必要とされる可能性もあろう。

スカベンジャー受容体による殺菌機構の研究

分担研究者 内藤 眞（新潟大学医学部 教授）

研究要旨

動脈硬化発症におけるスカベンジャー受容体の役割が解明されつつある。一方、本受容体はマクロファージの生体防御に関わり、多種多様の病原体に対して、その取込みを介して抗菌作用を発揮することが明らかにされた。申請者らは、これまでの本研究事業においてスカベンジャー受容体が細菌性抗原や生菌の取込みに関与するのみでなく、殺菌機序に関与することを明らかにしてきた。本年度はスカベンジャー受容体の発現亢進による感染症に対する新たな戦略の可能性を示唆する所見を得た。また、スカベンジャー受容体の発現機構の検討をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)欠損大理石病モデルマウスを用いて行った。

A.研究目的

スカベンジャー受容体は化学修飾リボ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機能を有する受容体がクローニングされてスカベンジャー受容体ファミリー(Class A から Class F)が形成された。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。これまでの研究でスカベンジャー受容体 class A I,II 型や MARCO が lipopolysaccharide を認識する受容体であることを明らかにした。しかし、これら受容体が生菌に対してどのような生体防御の役割を果たしているかはほとんど解明されていない。

本研究では、リステリア感染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スカベンジャー受容体 Class A ノックアウト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の役割を明らかにした。

それとは別に、生体におけるスカベンジャー受容体発現機構にマクロファージコロニー刺激因子が重要であることから、大理石病モデルマウスである osteopetrotic mouse (op/op マウス)を用いてマクロファージの増殖因子がマクロファージの分化とスカベンジャー受容体ファミリーの発現に及ぼす影響を検討した。

B.研究方法

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野生型マウスにリステリア生菌を経静脈投与して感染させ、経時的に肝、肺、脾組織を採取、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、抗リンパ球抗体、抗スカベンジャー受容体抗体などを用いて免疫染色を行った。菌の定量は各組織のホモジェネートをそれぞれの寒天培地に塗布し、コロニー数を算定した。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。培養条件下で腹腔マクロファージへの感染投与を行い、菌の定量と電顕的観察を行った。

op/op マウスの Kupffer 細胞をリボソーム封入クロドネートで除去し、再生過程を観察した。また、再生過程で M-CSF、GM-CSF、IL-3 を投与して、マクロファージの再生とスカベンジャー受容体の発現を上記の方法で観察した。

C.研究結果

1.リステリア感染実験

大量のリステリア菌による感染死亡率はノックアウトマウスの方が有意に高かった。肝肉芽腫はノックアウトマウスの方が大きく、数も多かった。サイトカインの発現もノックアウトマウスのほうが顕著であった。菌の定量ではノックアウトマウスのほうが肝、脾とも1オーダー多く、ノックアウトマウスにおける殺菌能の低下が示された。腹腔マクロファージの菌の取り込みを比較するとノックアウトマウスマクロファージの取り込みは少なかったが、菌の増殖はノックアウトマウスのマクロファージの方が多かった。電顕的に観察すると、ノックアウトマウスのマクロファージでは菌がエンドソームから細胞質内へ脱出する像が多く認められた。死菌やリステリオリシンO非産生株を用いると、菌のエンドソームからの脱出は目立たなかった。エンドソームの酸性化をブロックするバフィロマイシンを加えると、ノッ

分担研究報告書

クアウトマウスマクロファージのファゴゾームからの菌の脱出は有意に阻止された。

2. マクロファージ除去 opo/opo マウス肝におけるスカベンジャー受容体の発現

肝マクロファージ除去野生型マウスではマクロファージが再生し、2週後には完全に回復した。しかし、opo/opoマウスでは2ヶ月後でも全く回復しなかった。このマウスにM-CSFを投与すると、急激にマクロファージが増加・回復した。GM-CSF、IL-3でも約2割程度のマクロファージが回復した。これらのマクロファージの受容体発現を検討すると、M-CSF投与では、スカベンジャー受容体クラスA1,2、マクロシアリンが強く発現し、その他の増殖因子ではMARCOやマクロシアリンの発現が認められたものの、スカベンジャー受容体クラスA1,2の発現は見られなかった。

D. 考察

実験1の結果から、スカベンジャー受容体は菌の受容体として機能するだけでなく、殺菌機構にも直接関与することが明らかになった。エンドソームからのリステリア菌のエスケープにLLOが必須であることも示された。しかし、スカベンジャー受容体を介した細胞内シグナルとLLOを介したシグナルがどのように関係するかは今後の検討課題である。

実験2の成績から、スカベンジャー受容体ファミリーの発現誘導にマクロファージの増殖因子が重要であること、また、M-CSFはマクロファージの分化とスカベンジャー受容体クラスA1,2の発現誘導に必須の分子であることが明かにされた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito S, Naito M, Kobayashi Y, Takatsuka H, Jiang S, Usuda H, Umezu H, Hasegawa G, Arakawa M, Shultz LD, Elomaa O, Tryggvason K: Roles of Macrophage Receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. *Arch Histol Cytol* 62 (1): 83-95, 1999

2) Miyazaki T, Hirokami Y, Matsushashi N, Takatsuka H, Naito M: Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor

cysteine-rich superfamily. *J Exp Med* 189: 413-422, 1999

3) Ebe Y, Go Hasegawa G, Watanabe H, Takatsuka H, Umezu H, Mitsuyama M, Arakawa M, Mukaida N, Matsushima K, Naito M: The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol Int* 49 (6):519-532, 1999

4) Myint YY, Miyakawa K, Naito M, Shultz LD, Oike Y, Yamamura K, Takahashi K: Granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation. *Am J Pathol* 154(2): 553-566, 1999

5) Yamamoto T, Ebe Y, Kataoka M, Yamamoto S, Hasegawa G, Naito M: Expression of scavenger receptor class A and CD14 in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Pathol Int* 49:983-992, 1999

6) Kobayashi Y, Miyaji C, Naito M, Ebe Y, Watanabe H, Umezu H, Hasegawa G, Abo T, Arakawa M, Kamata N, Suzuki H, Kodama T, Naito M: Role of scavenger receptor in endotoxin shock. *J Pathol* 192: 263-272, 2000

7) Ishiguro T, Naito M, Yamamoto T, Hasegawa G, Gejo F, Mitsuyama M, Suzuki H, Kodama T: Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Am J Pathol* 158 (1): 179-188, 2001

2. 学会発表

1) 貝津智佳子 他：マクロファージ枯渇 op/op マウスにおける Kupffer 細胞再生過程の検討。第39回日本リンパ網内系学会、名古屋、1999. 5. 28~5. 29.

2) 平野謙一郎、小林隆、長谷川剛 他：ラット肝における heme oxygenase-1 (HO-1) 発現とビリ

厚生科学研究補助金 (長寿科学研究事業)

分担研究報告書

ルビン代謝の検討。第39回日本リンパ網内系学会、名古屋、1999. 5. 28~ 5. 29.

3) 石黒 卓朗 他: *Listeria monocytogenes* 誘発肝肉芽腫形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体 (MSR-A) の役割。第39回日本リンパ網内系学会、名古屋、1999. 5. 28~ 5. 29.

4) Ishiguro T, et al.: Hepatic granuloma formation in scavenger receptor-deficient mice in response to *Listeria monocytogenes* infection. 第8回国際マクロファージシンポジウム、東京、1999. 6. 18~ 6. 19

5) Yamamoto T, et al.: Roles for scavenger receptors in Lipopolysaccharide-induced Macrophage activation in the mouse lung The 6th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop (日韓リンパ網内系ワークショップ) 倉敷 1999. 3. 31~ 4. 1

6) 平野 謙一郎、小林 隆、長谷川 剛、内藤 眞 他 Expression of heme oxygenase-1 and bilirubin production in the rat liver The 6th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop (日韓リンパ網内系ワークショップ) 倉敷、1999. 3. 31~ 4. 1

7) 貝津智佳子 マクロファージ枯渇 op/op マウスにおける Kupffer 細胞再生過程の検討 第39回日本リンパ網内系学会 名古屋 1999. 5. 28~ 5. 29

8) 平野 謙一郎 Roles of heme oxygenase-1 for bilirubin production in the rat liver. 第8回国際マクロファージシンポジウム、東京、1999. 6. 18~ 6. 19

9) 平野 謙一郎 ラット肝におけるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO) の発現とビリルビン代謝の検討。第13回肝類洞壁細胞研究会 宇部市 1999. 12. 17~ 12. 18

10) 貝津 智佳子 Kupffer 細胞枯渇 op/op マウスにおける Kupffer 細胞の再生過程。第13回肝類洞壁細胞研究会 宇部市 1999. 12. 17~ 12. 18

11) 小林 隆、内藤 眞 ラット肝虚血再灌流モデルにおけるヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 の発現。第89回日本病理学会 大阪 2000. 4.11~4.13

12) 石黒 卓朗 *Listeria monocytogenes* 感染におけるマクロファージスカベンジャー受容体 (MSR-A) の役割。第89回日本病理学会 大阪 2000. 4.11~4.13

13) 平塚 素子、長谷川 剛、内藤 眞 M-CSF 欠損大理石病マウスの子宮におけるマクロファージの分化と子宮内膜上皮細胞のアポトーシス。第89回日本病理学会 大阪 2000. 4.11~4.13

14) 内藤 眞 Role of macrophage scavenger receptor in atherogenesis and host defense. IXth International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. Kyoto, 2000.6.5, 6

15) 内藤 眞: 教育講演 III マクロファージの分化とスカベンジャー機能。第40回日本リンパ網内系学会総会、浜松、2000. 8.17-18

16) 山本 尚、貝津智佳子、内藤 眞: op/op マウス Kupffer 細胞の再生、分化、機序における増殖因子の作用。第40回日本リンパ網内系学会総会、浜松、2000. 8.17-18

17) 石黒 卓朗: マクロファージスカベンジャー受容体 (MSR-A) ノックアウトマウスにおけるリステリア感染の機序。第40回日本リンパ網内系学会総会、浜松、2000. 8.17,18

18) 小林 隆: ラット肝虚血再灌流モデルにおけるヘムオキシゲナーゼ I の発現。第40回日本リンパ網内系学会総会、浜松、2000. 8.17,18

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 教授）

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究するものである。

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機能を解析することにより、受容体の変性LDLを取り込む機能以外に細胞内にシグナルを伝える機構を明らかにし、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することを目的とする。

今年度は、以前細胞質領域のアフィニティカラムに親和性を示した因子が細胞内で受容体と相互作用しているか否かの確認、及び細胞質領域のリン酸化部位の同定を行った。

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基に作製したアフィニティカラムを用いて単離した因子の内、細胞内シグナル伝達に關与する可能性のあるHSP70、HSP90、GAPDHについて、これらの因子の結合を確かめるために、まずGSTプルダウンアッセイを行った。細胞質ドメインの配列をGSTに結合したタンパク質を大腸菌で発現させ、単離し、これをアッセイに用いた。さらに、細胞内で実際にこれらの因子が受容体と相互作用しているか否かを調べるために、免疫沈降実験を行った。細胞外ドメインの末端にHAタグ配列を付加した受容体を発現するプラスミドを作製し、これをCOS-7細胞に導入後免疫沈降を行った。

次にリン酸化によるシグナル伝達経路について調べた。マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域には、リン酸化を受けうるセリン、スレオニン残基が10カ所近く存在する。先のタグ配列が付加されたウシの受容体を基に、細胞質ドメインのセリン、スレオニン残基をそれぞれ一つずつアラニンに変換した受容体を発現するプラスミドを作製した。

これらのプラスミドをCOS-7細胞に導入し、細胞に放射標識されたリン酸を加え、タグを認識する抗体を用いて免疫沈降を行い、受容体がリン酸化されているか否かを調べた。

C. 研究結果

GSTプルダウンアッセイの結果、HSP70、HSP90、GAPDHのいずれもが、コントロールのGSTには結合しなかったが、細胞質ドメインとGSTとの融合タンパク質には結合することが明らかになった。次に免疫沈降による相互作用の検出を行ったところ、いずれのタンパク質も抗HA-1 tag抗体によって受容体と共に沈降してくることが判明した。以上の結果より、HSP70、HSP90、GAPDHはいずれも受容体と相互作用し、さらにこの相互作用は細胞内でも生じていることが明らかとなった。

次に細胞質ドメインのリン酸化部位を調べた結果、N末端より16番目に存在するセリンをアラニンに置換するとリン酸化がみられなくなることが判明した。

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を用いたアフィニティカラムにより精製した因子の内、細胞内シグナル伝達に關与する可能性のあるHSP70、HSP90、GAPDHについては、GSTプルダウンアッセイによってその結合が確認できた。また、スカベンジャー受容体を認識する抗体によって、これらが受容体と一緒に沈降してきたことから、細胞内でも相互作用していることが明らかになった。HSPはシャペロンタンパク質として知られているが、ここでは細胞質領域の構造を保持し他の因子との相互作用を仲介している可能性が考えられる。また、HSP90が細胞内シグナル伝達に關与している報告もあり、これら因子の寄与を明らかにすることが今後の課題であ

分担研究報告書

る。GAPDH についても、細胞内小胞輸送に重要な役割を果たしていることが報告され、スカベンジャー受容体のエンドサイトーシスの効率に影響している可能性が考えられる。

受容体の細胞質のリン酸化については、N 末端から 16 番目のセリンがリン酸化に関与していることが明らかになったが、この部位はカゼインキナーゼ(Ⅲ)のリン酸化部位に相当し、この酵素が関与していると予想される。今後、リガンドが存在したときに、どのようにリン酸化の状態に変化が生じるかについてさらに詳しく調べる予定である。またこの変異体は、スカベンジャー受容体のドミナントネガティブ分子として、シグナル伝達機構の解析に用いることができ、この分子を用いた解析を進めていきたい。

E. 結論

スカベンジャー受容体の細胞質ドメインに、HSP70、HSP90、GAPDH が相互作用することを明らかにした。

スカベンジャー受容体の細胞質ドメインに存在する N 末端より 16 番目のセリンがリン酸化を受けることを示した。

低酸素下脂質負荷による冠動脈平滑筋由来泡沫細胞の遺伝子発現解析

分担研究者 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

冠動脈平滑筋は、低酸素下において低比重リポ蛋白質を負荷することにより細胞内に cholesteryl ester を蓄積して泡沫細胞の形態を示す。脂質蓄積の機序は主に LDL 由来の cholesteryl ester の取り込みの増加であるが、この過程における遺伝子発現パターンを解析して泡沫細胞形成機序の検討を行った。

A.研究目的

血管壁内における酸素分圧は文献上も実際の測定値でも、2-5%酸素分圧であった。この環境で中等度高脂血症状態を模した LDL 負荷によって、冠動脈平滑筋に生じる現象を検討したところ、cholesteryl ester の蓄積が認められた。このような動脈硬化初期病変を反映した環境で平滑筋細胞の挙動を検討するために、oligonucleotide microarray を用いて遺伝子発現パターンを解析した

B.研究方法

初代培養5代目の冠動脈平滑筋を2%から20%までの種々の酸素分圧下で培養した。低比重リポ蛋白質 (LDL) 負荷群には終濃度3mg/mlにてLDLを添加した。72時間後にPBSにて洗浄、total RNAを調整し、うち5 μ gを用いてcRNAを合成し、oligonucleotide chip(Gene Chip, Affymetrix, CA)にて6500遺伝子の発現量を比較した。同時に細胞の脂肪染色、脂質組成分析、cholesterol合成および放出を測定した。

C.研究結果

低酸素下でLDLを負荷すると、脂質染色にて陽性細胞数が増加し、cholesteryl ester(CE)の蓄積が増加することがHPLCによって確認された。2%酸素分圧下において、cholesterol合成能は完全に抑制されており、細胞内にあらかじめ蓄積されていたcholesteryl esterの放出能にも低下は認められなかった。一方遺伝子発現解析においてmRNAレベルが顕著に変動する遺伝子群を同定した。このとき、SREBPや、これによって転写調節を受けるLDL受容体、caveolin、さらにコレステロール合成経路の各酵素について転写レベルの抑制が認められた。

D.考察

低酸素下においてtenascin-C、Cyr61など従来機能が明らかではないマトリックス成分の発現が誘導

されたが、他にもマトリックス間の架橋を行う酵素も誘導されており、低酸素下で平滑筋によってマトリックスが再構築されていることを示唆している。一方IL-8は低酸素下でLDLを負荷されると10倍程度の発現増加があり、好中球を中心とした白血球動員が動脈硬化初期病変で重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、同環境においてadipophilin, CL-100, osteonectin, prothymosin等の誘導が顕著だが、これらは従来酸化的ストレスによって発現が誘導される遺伝子として知られている。低酸素下でのLDL負荷によっても同様の誘導が確認されたことで、動脈硬化発症において酸化LDLを介さない経路があることが考えられる。

E.結論

20%酸素分圧下ではLDL負荷によって脂質代謝関連酵素遺伝子は予想通りの挙動をしめしたが、低酸素環境では、その発現レベルと、脂質による抑制効果が異なっており、実際脂質染色や、脂質組成分析で認められるCEの蓄積増加の一因と考えられた。さらに平滑筋を低酸素下、脂質負荷することによって、特定の細胞外マトリックス、ケモカイン、angiogenic inducerの発現が著明に増加しており、生体内で動脈硬化病変が進展するにあたって重要な役割を果たすと考えられた。さらに、従来酸化ストレスで発現が誘導されると考えられる遺伝子の誘導が同定され、その転写調節機序を解析することによって、病変進展における役割が明らかになると考えられる。

F.研究発表

1.論文発表

1. Kohro, T., Y. Wada, et al. (2000). "Comparison of gene expression profiles between THP-1 cells differentiated with phorbol 12-myristate 13-acetate and macrophage." Journal of Atherosclerosis and

厚生科学研究補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

Thrombosis in press.

2. Sugiyama, T., H. Kumagai, et al. (2000). "A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro." *Biochemistry* 39: 15817-15825.

3. Abe-Dohmae, S., S. Suzuki, et al. (2000). "Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation induced by cAMP in a murine macrophage cell line." *Biochemistry* 39: 11092-11099.

4. Takabe, W., N. Noguchi, et al. (2000). "Gene expression induced by BO-653, probucol and BHQ in human endothelial cells." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* in press.

5. Wada, Y., A. Sugiyama, et al. (2000). "In vitro model of atherosclerosis using coculture of arterial wall cells and macrophage." *Yonsei Medical Journal* 41: 740-55.

6. Kohro, T., T. Nakajima, et al. (2000). "Genomic structure and mapping of human orphan receptor LXR alpha: upregulation of LXR alpha mRNA during monocyte to macrophage differentiation." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 7: 145-151.

7. Mataki, C., T. Murakami, et al. (2000). "A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor- α ." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 7: 97-103.

8. Ishii, M., S. Hashimoto, et al. (2000). "Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis." *Genomics* 68: 136-143.

9. Murakami, T., C. Mataki, et al. (2000). "The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor alpha using DNA microarray analysis." *Journal of*

Atherosclerosis and Thrombosis 7: 39-44.

2.学会発表

1. 国際動脈硬化学会, 2000年6月, スtockホルム

AN IN VITRO COCULTURE MODEL OF TRANSMIGRANT MONOCYTE AND FOAM CELL FORMATION

Y. Wada*, A. Sugiyama*, T. Kohro*, K.

Jinnouchi**, M. Takeya**,

M. Naito***, T. Hamakubo* and T. Kodama*
Department of Molecular Biology and Medicine,
RCAST, University of Tokyo*, University of
Kumamoto**, University of Niigata***,
Japan

2. 日本分子生物学会総会, 2000年12月, 神戸.
低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈および
大動脈平滑筋における遺伝子発現検討

○和田洋一郎1, 杉山暁1, 興梠貴英1, 沖本優子
2, 野口範子2, 児玉龍彦1 (1 東大・先端研・分
子生物医学, 2 東大・先
端研・ゲノムサイエンス)

3. 日本分子生物学会総会, 2000年12月, 神戸.
培養ヒト大動脈平滑筋細胞と冠動脈平滑筋細胞
におけるTranscriptome比較

○杉山暁1, 和田洋一郎1, 興梠貴英1, 沖本優
子2, 野口範子2, 児玉龍彦1 (1 東大・先端研・
分子生物医学, 2 東大・先
端研・ゲノムサイエンス)

4. 微小循環学会, 2001年2月, 倉敷
低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈平滑筋
における遺伝子発現
東京大学先端科学技術研究センター
分子生物医学部門
和田洋一郎

5. Frontier Science Forum, 2001年3月, 東京
動脈硬化再現モデルにおける遺伝子発現解析
東京大学先端科学技術研究センター
分子生物医学部門
和田洋一郎

単球泡沫化の調節機構に関する研究

分担研究者 田中 良哉（産業医科大学 教授）

研究要旨

動脈硬化初期病変の特徴は、血管障害と胞体内にコレステロールエステルを蓄積した泡沫化マクロファージの血管内皮下での集積である。末梢血管内から遊出した単球は、種々の刺激を受けてスカベンジャー受容体経路で酸化 LDL を取り込み、泡沫化マクロファージに分化するが、今年度は、単球の分化誘導刺激を伝達するサイトカインや接着分子を解析した。一方、動脈硬化性炎症部では組織低酸素状態が齎されるが、低酸素下特異的転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 の血管障害に及ぼす役割を検討し、組織低酸素状態が病態形成に重要な役割を担う事を示した。

A. 研究目的

動脈硬化の病態は、脂質代謝異常と血管障害に対する修復反応に単球/マクロファージを初めとする炎症性細胞による慢性炎症の要因が加わったものである。平成12年度は、単球が酸化 LDL 刺激などによって増殖し、泡沫化マクロファージに分化する過程において、サイトカインや細胞接着をはじめとしたどのような周囲環境刺激に誘導または制御を受けるかを解明する事を第一目的とした。また、これらの結果を基に、単球から泡沫化マクロファージに至るまでの種々の分化段階の細胞における遺伝子発現スコアリングを行い、データベースの構築によって如何なる異なる遺伝子が発現するかを検討し、より効率的な制御の標的を把握する予定である。一方、動脈硬化炎症部では、血管障害と和田らの報告のように低酸素下で誘導される平滑筋細胞や単球の脂質蓄積が観察され、組織低酸素状態が病態形成に重要な役割を担う事が示唆されている。そこで第二に、血管障害の機構を、特に低酸素下特異的転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 の役割を中心に解明する事を目的とした。

B. 研究方法

1. 単球は健常人末梢血より比重遠心法で単核球を得、その後エルトリエータを用いて分離した。血管内皮細胞として、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 を用いた。
2. 酸化 LDL は、従来の方法を用いて健常人血清から分離精製した（東京大学先端科学技術研究センター 和田担当）。
3. HIF-1 α は、リポフェクチン法によって、細胞内に遺伝子導入した。
4. スカベンジャーレセプターなどの細胞表面抗原

は、抗体と蛍光標識二次抗体で染色し、フローサイトメータで検出した。

C. 研究結果

1. 単球の分化に関与する分子について
1. エルトリエータで精製した静止期単球は、CD44 を高発現したが、スカベンジャーレセプターである CD36 と CD68 を発現しなかった。
2. 静止期単球では、酸化 LDL のみならず、CD44 刺激、HGF、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α も CD36 の発現を誘導した。CD36 の発現は、CD44 刺激が最速で 6 時間以内に誘導し、以降、酸化 LDL、HGF の順で誘導した。また、CD44 刺激は、HGF レセプター-c-Met の発現も誘導した。
3. CD44 刺激は、¹²⁵I 標識酸化 LDL や Oil-red-O の単球への取り込みを誘導し、HGF はさらにそれを増強した。
2. 血管内皮細胞における HIF-1 α による細胞死の誘導について
1. 血管内皮細胞に HIF-1 α を遺伝子導入すると細胞増殖が阻害され、付着した細胞は培養液中に浮遊した。
2. 血管内皮細胞に HIF-1 α を遺伝子導入すると、p21 の発現誘導、annexinV^{high}PI^{low} の早期細胞死細胞の増加、DNA のラダー形成が誘導された。

D. 考察

酸化 LDL が、マクロファージの泡沫化の過程において重要な役割を担うことは周知であるが、酸化 LDL が機能発現する際に、サイトカインや細胞接着などの細胞外環境、および、転写調節因子や細胞周期関連分子などの細胞内環境が如何なる影響を及ぼすかに付いては、不詳である。本研究では、酸化

分担研究報告書

LDLの機能を修飾する因子として、HGF等の増殖因子、単球ケモカインであるMCP-1、IL-1 α 等のサイトカインの他、ヒアルロン酸受容体であるCD44を介する刺激が認められた。ことに、CD44刺激によるスカベンジャーレセプターCD36の発現誘導は6時間以内に生じ、c-Metの発現誘導を介してHGFによるCD36の発現増強を齎した。その結果、CD44刺激、HGF、酸化LDL刺激によって、酸化LDLの単球への取り込みが最大限となり、恐らくその後のマクロファージ泡沫化を最も効率的に引き起こすものと考えられる。これらの刺激因子は、治療を考えた場合の格好の標的となり得る。今後は、これらの刺激によって単球から泡沫化に至るまでの種々の分化段階のマクロファージよりRNAを抽出し、DNAチップ法によって遺伝子発現の相違を検討し、効率的な制御の標的を把握する。一方、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、単球の細胞増殖（不死化/細胞死）、サイトカイン産生や脂質代謝は、種々の核内転写因子によって調節される。動脈硬化炎症部では、血管障害と同時に、和田らの報告のように低酸素下で誘導される平滑筋細胞や単球の脂質蓄積が観察され、組織低酸素状態が病態形成に重要な役割を担う。そこで、血管障害における低酸素下特異的転写因子HIF-1の役割を解析したところ、HIF-1 α の遺伝子導入によって、細胞周期阻害分子p21の発現と、細胞周期の停止、さらに、細胞死が誘導された。即ち、動脈硬化に認められる血管障害には、低酸素下で誘導される転写因子が関与し、斯様な現象も動脈硬化制御の標的の一つになりうる事が示唆された。

E. 結論

酸化LDL存在下に於ける単球の泡沫化マクロファージへの分化は、CD44刺激とHGFなどの増殖因子刺激によって最も強く誘導され、また、低酸素下特異的転写因子HIF-1 α は血管内皮細胞の細胞死を誘導し、血管障害を齎すものと考えられた。即ち、動脈硬化性病態の形成過程には、サイトカインや細胞接着などの細胞外環境と転写調節因子や細胞周期関連分子などの細胞内環境の関与が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表：

(1) Tsukada J, Toda Y, Misago M, Tanaka Y, Auron PE, Eto S: Constitutive activation of LIL-Stat in adult T cell leukemia cells. Blood 95: 2715-2718, 2000.

(2) Tanaka Y, Nomi M, Fujii K, Hubscher S, Maruo A, Matsumoto S, Awazu Y, Saito K, Eto S, Minami Y: ICAM-1 distinguishes functional heterogeneity of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43: 2513-2522, 2000.

(3) Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M, Fujii K, Sugaya M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K: Stimulation of β 1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. Cancer Res. 61: 2022-2030, 2001.

(4) 藤井幸一, 田中良哉: CD44・ヒアルロン酸と炎症反応. 臨床免疫 35: 299-307, 2001

(5) 太幡敬洋, 峯信一郎, 田中良哉: 酸化LDLとマクロファージ機能. 臨床免疫 34: 605-610, 2000

(6) 藤井幸一, 田中良哉: CD44による細胞機能調節機構. 臨床免疫 33: 751-755, 2000.

(7) 田中良哉: 免疫担当細胞とケモカイン. 内科 86: 262-267, 2000.

(8) 峯信一郎, 田中良哉: HGFの免疫系における役割. 臨床免疫 33: 354-360, 2000.

2. 学会発表

(1) 峯信一郎, 田中良哉, 太幡敬洋, 飯田武, 和田洋一郎, 児玉龍彦, 野口紀子, 二木鋭雄, 江藤澄哉: 酸化LDLによる単球上LFA-1の活性化機能とビタミンEによる抑制効果. 第21回日本炎症学会（東京）平成12年7月

(2) 田中良哉: ケモカインの臨床研究に於ける魅力. 第28回日本臨床免疫学会総会（東京）平成12年9月

(3) 太幡敬洋, 田中良哉, 峯信一郎, 野口範子, 和田洋一郎, 二木鋭雄, 江藤澄哉: 酸化LDLの単球の血管内皮細胞との接着と血管外遊出における役割. 第28回日本臨床免疫学会（東京）平成12年9月

(4) 飯田武, 峯信一郎, 藤崎丈詞, 太幡敬洋, 南康博, 田中良哉: 血管内皮細胞におけるHypoxia-inducible factor-1 α によるインテグリン α 5とアポトーシスの誘導. 第30回日本免疫学会総会（仙台）平成12年11月

G. 知的所有権の取得状況：該当なし

マクロファージ内でのリポタンパクの酸化の追跡

分担研究者 野口 範子（東京大学先端科学技術研究センター 助手）

研究要旨

動脈壁でリポタンパクの酸化がどこで開始され、また進行するのかを知ることは動脈硬化の発症機序を明らかにするうえで重要な課題である。本研究は動脈を構成する細胞で構築した混合培養系を動脈壁モデルとして、酸化生成物との選択性が高く、かつ感度がよい diphenyl-pyrenylphosphine (DPPP) をプローブとして動脈内でのリポタンパクの酸化変性の場所を特定する条件を検討した。混合培養用チャンバーのフィルター上に平滑筋細胞を播種し、平滑筋からの分泌物により形成されたマトリックス上に diphenyl-pyrenylphosphine oxide (DPPP=O) でラベルしたマクロファージを添加して培養し、マトリックス内に潜り込んだところを蛍光顕微鏡で観察した。共焦点顕微鏡のレーザーによる蛍光退色を避けるため、超高感度冷却 CCD カメラを導入し、蛍光顕微鏡で捉えた蛍光を画像化することにより感度の不足を克服した。混合培養の重層幅を薄く作成し、Z フォーカス制御を用いて各層の蛍光を観察することが可能であることがわかった。このシステムを様々な培養条件に応用することにより、動脈壁でおこる酸化に関する多くの情報が得られると期待される。

A.研究目的

動脈壁でリポタンパクが酸化変性を受ける場合、どこで酸化が開始され、また進行するのかを知ることは動脈硬化の発症機序を明らかにするうえで重要な課題である。本研究の目的は酸化生成物高感度検出蛍光プローブが混合培養系のマクロファージ内の酸化追跡に適用可能であることを確認することを目的としている。

B.研究方法

1.マクロファージの DPPP=O 標識

マウスマクロファージは 23-28 g のメス ICR (Charles River) に 2ml の 4% チオグリコレート (Difco Laboratories) 溶液を i.p. した 72 時間後、PBS で腹腔から回収した。細胞を 3 回 PBS で洗浄し 5×10^5 個/ml に調整後、培養ディッシュに付着させた。そこに DIMSO に溶解した蛍光プローブ diphenyl pyrenyl phosphin oxide (DPPP=O) を添加し 37℃ で 1 時間培養し、マクロファージ内に DPPP=O をとりこませた。

2.混合培養の構築

混合細胞培養用チャンバーのフィルター上にヒト平滑筋細胞を播種し、平滑筋細胞からの分泌によるマトリックスを形成させた。DPPP=O をとりこませたマクロファージをマトリックス上に添加し、3 日間培養を続けた。

3.CCD カメラ設置蛍光顕微鏡による観察

Z 軸フォーカス制御装置を用いて 5 μm ほどの蛍光顕微鏡像を高感度冷却 CCD カメラで取り込んだ。観察および画像取り込みの条件は以下のとおりである。

蛍光顕微鏡 + 40 \times , 1.3 N.A., oil immersion
励起フィルター 351 nm (slit width 16 nm)
ダイクロイックミラー 365 nm
バリアフィルター 380 nm (slit width 20 nm)
冷却 CCD カメラ
1s 画像蓄積 \rightarrow 14 bit TIFF \rightarrow 8 bit TIFF
Adobe Photoshop, NIH image でコントラスト

C.研究結果

混合培養系マクロファージ内の蛍光観察
明視野観察によりマトリックス内のマクロファージ上表面からフィルターまでの距離は約 50 μm であることを確認し、その位置を 0 に設定して、Z 軸フォーカス制御を用いてフィルター面に向かい 5 μm 刻みで蛍光画像を取り込むことができた。レンズ面からすくなくとも 50 μm の深さ位置の細胞内の蛍光を観察することができることを確認したことになる。ただし、細胞外のマトリックスからの蛍光もあり、その由来は不明である。

D.考察

蛍光プローブは高感度 CCD カメラと Z 軸フォーカス制御を用いることにより蛍光顕微鏡で混合培養に適用可能であることがわかったが、細胞内の分布を特定するには至らない。共焦点顕微鏡と高感度

分担研究報告書

CCDカメラの組み合わせも考える必要がある。また、蛍光プローブを組み込んだLDLを混合培養に添加する実験を次ぎのステップで行い、血管内イベントのモデルを作成することが課題となる。

F.研究発表

1.論文発表

1.H. Yamashita, A. Nakamura, N. Noguchi, E. Niki, and H. Kuhn;

Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals.; FEBS Letters, 445, 287-290, 1999

2.N. Noguchi, E. Damiani, L. Greci, and E. Niki;Action of quinolinic and

indolinonic aminoxylys as radical-scavenging antioxidant. ;Chem. Phys. Lipids, 99, 11-19, 1999

3.H. Shi, N. Noguchi, and E. Niki;

Dynamics of antioxidant action of ubiquinol: a reappraisal.;BioFactors, 9, 141-148, 1999

4.N. Yoshida, T. Yoshikawa, H. Manabe, Y. Terasawa, M. Kondo, N. Noguchi, and E. Niki;Vitamin E protects against polymorphonuclear leukocyte-dependent adhesion to endothelial cells.;J. Leukocyte Biol., 65, 757-763, 1999

5.K.Nishino, N. Noguchi, and E. Niki;Dynamics of action of bisphenol as radical-scavenging antioxidant against lipid peroxidation in solution and liposomal membranes;Free Rad. Res., 31, 535-548, 1999

6.M. Takaku, Y. Wada, K. Jinnouchi, M. Takeya, K. Yakahashi, H. Usuda, M. Naiti, H. Kurihara, Y. Yazaki, Y. Kumazawa, Y. Okimoto, M. Umetani, N. Noguchi, E. Niki, T. Hamakubo, and T. Kodama;An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation;Arterioscler. Thromb. Vascr. Biol., 19, 2330-2339, 1999

7.N. Noguchi, K. Nishino, and E.

Niki;Antioxidant action of antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation;Biochem. Pharmacol., 59, 1069-1076, 2000

8. A. Watanabe, N. Noguchi, S.

Fujisawa, T. Kodama, K. Tamura, O. Cynshi, and E. Niki;Stability and reactivity of aryloxy radicals derived from a novel antioxidant BO-653 and related compounds. Effects of substituent and side chain in solution and membranes;J. Am. Chem. Soc., 122, 5438-5224, 2000

9.Y. Okimoto, A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita, and N. Noguchi;A novel fluorescent probe diphenyl-1

-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membrane;FEBS Letters, 474, 137-140, 2000

10. N. Noguchi, K. Nakano, Y. Aratani, H. Koyama, T. Kodama, and E. Niki;

Role of myeloperoxidase in the neutrophil-induced oxidation of low density lipoprotein as studied by myeloperoxidase-knockout mouse;J. Biochem., 127, 971-976, 2000

2.学会発表

1.N. Noguchi, H. Yamashita, A. Nakamura, E. Niki, and H. Kuhn;

Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals Oxygen Club of California, Mar. 1999 (Santabarbara, USA)

2. 野口範子、山下裕雅、中村明朗、二木鋭雄、H. Kune;15-リポキシゲナーゼによるLDLの酸化;動脈硬化学会, Jun, 1999、宮崎

3 .N. Noguchi, A. Watanabe, M.

Yanagisawa, and E.niki;Study of effects of substituent and side chain of BO-653;SFRR Europe Summer Meeting, Jul. 1999 (Dresden, Germany)

厚生科学研究補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

- 4.E. Gelphi, N. Noguchi, and E. Niki;SFRR Europe Summer Meeting, Jul. 1999 (Dresden, Australia)
- 5.野口範子、E. Gelphi、二木鋭雄;LDLの酸化におけるリゾホスファチジルコリンの生成とコレステロールの酸化;日本生化学会、第72回、Oct. 1999、横浜
- 6.渡辺 亮、野口範子、二木鋭雄;LDL粒子内における新規抗酸化物 BO-653 由来ラジカルの挙動に関する研究;日本生化学会 第72回、Oct. 1999、横浜
- 7.中野和美、野口範子、二木鋭雄;ミエロペルオキシダーゼによるLDLの酸化について;日本油化学会、Oct. 1999、名古屋
- 8.柳沢 真、渡辺 亮、野口範子、二木鋭雄;(BO-653)の抗酸化効果に及ぼす置換基と側鎖の影響;日本油化学会、Oct. 1999、名古屋
- 9.野口範子、中村明朗、二木鋭雄、Hutmut Kuhn;15-リポキシゲナーゼによるLDLと血漿の酸化生成物の特性;動脈硬化学会、Nov. 1999、大阪
- 10.渡辺 亮、野口範子、高橋希之、中井 由美、二木鋭雄;stopped-flow ESR法を用いたフェノキシラジカルの反応性の評価;ESR討論会、Nov. 1999、横浜
- 11.渡辺 亮、野口範子、高橋希之、二木鋭雄;一酸化窒素のフェノール系抗酸化物に対する反応性;日本過酸化脂質、フリーラジカル学会、Nov. 1999、神戸
- 12.二木鋭雄、野口範子、渡辺 亮、児玉龍彦;新規抗酸化薬物 BO-653 の設計、活性、および作用機序;酸化反応討論会、第32回、Nov. 1999、倉敷
- 13 .E. Niki, M. Takahashi, N. Noguchi, H. Shi, Y. Xu, and A. Watanabe;Action and role of vitamin E and ubiquinol as antioxidant ;Int. Symp. Oxidative Stress, Redox Regulation and Signal Transduction; Clinical Implications, Nov. 1999 (Kyoto)
- 14.A. Watanabe, N. Noguchi, M. Takahashi, H. Shi, and E. Niki; Reactivity and stability of antioxidant -derived phenoxyl radical;6th Annual Meeting of the Oxygen Society, Nov. 1999 (New Orleans)
15. E. Niki, H. Shi, and N. Noguchi; Dynamics of antioxidant action of polyphenols;SFRR Europe Winter Meeting " Bio-flavonoids & polyphenols in health & disease, Dec. 1999 (Dinard, France)
16. N. Noguchi;Interaction and competition of α -tocopherol and γ -tocopherol: A reappraisal; International Conference of Food Factors, Dec.1999 (Kyoto)
- 18野口範子、石 紅総、二木鋭雄; α -対 γ -トコフェロールの抗酸化活性;ビタミンE研究会、Feb. 2000、岡山
19. N. Noguchi;Diverse functions of antioxidants;International Conference of "Free Radicals in Life Science", Mar. 2000 (Tokyo)
- 20.野口範子;ハイポクロライトの関与する一重項酸素、酸素ラジカルの生成ストップフロー化学発光装置を用いた検討;化学発光研究会、Jun. 2000、東京
- 21.野口範子、中野和美、荒谷康昭、二木鋭雄;LDLの酸化変性に対するミエロペルオキシダーゼの関与:ミエロペルオキシダーゼノックアウトマウスを用いた研究;SFRR Japan, Jul. 2000、東京
- 22.中田 晃弘、渡辺 亮、野口 範子、二木 鋭雄;ハイポクロライトと過酸化物の反応による活性酸素の生成;SFRR Japan, Jul. 2000、東京
23. 沖本優子、和田洋一郎、児玉龍彦、二木鋭雄*、野口範子;新規蛍光プローブを用いたLDL脂質過酸化反応の追跡;日本過酸化脂質フリーラジカル学会大会、Oct. 2000、京都
- 24.沖本 優子、和田 洋一郎、児玉 龍彦、二木 鋭雄、野口 範子;ジフェニルピレニルフォスフィ