

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子発現解析

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 児玉 龍彦

平成 14 (2002) 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. マクロファージの接着潜り込み、分化機構 -----	12
児玉 龍彦	
2. 脳血管におけるマクロファージ -----	16
間藤 方雄	
3. マクロファージの泡沫化機構 -----	21
内藤 眞	
4. マクロファージにおける遺伝子調節、新規治療開発 -----	27
土井 健史	
5. サイトカインによるマクロファージ活性化 -----	32
田中 良哉	
6. 血管壁に沈着する老廃物酸素ラジカルによる変性 -----	36
野口 範子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----	42
--------------------------	----

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

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
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、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。これは生活習慣の急速な変化によって、エネルギー貯蔵能が過剰に機能した結果生じる現象であり、とりわけ脂質代謝機能の改善が疾患予防の上で重要である。

本研究では平成12年度から本年度までに、Gene chip法による6500遺伝子の網羅的発現解析により、マクロファージ分化に伴ってアポ E, CI, LXR- alpha, Lipoprotein lipase 等脂質代謝関連遺伝子が、血管平滑筋細胞の脂質蓄積ともなっており、leptin, adipophilin, CL-100 などが誘導されることを見だし、病変局所でのマクロファージ、平滑筋による脂質代謝の重要性を示した。さらに in vitro での泡沫細胞形成装置を作成したので、生体内での動脈硬化発症の機序を細胞の挙動とリポ蛋白の変化の双方から解明可能となった。

以上によって大動脈、冠動脈および脳血管という重要臓器の動脈硬化現象をより詳細に記述し、治療薬開発に資することを目指す。

〔研究組織〕

○児玉龍彦
（東京大学先端科学技術研究センター教授）
問藤方雄（自治医科大学名誉教授）
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（産業医科大学教授）
野口範子（東京大学先端科学技術研究センター助教授）

A. 研究目的

単球・マクロファージ由来泡沫細胞の遺伝子発現：動脈硬化病変の特徴である単球・マクロファージ由来泡沫細胞の挙動を明らかにすることは動脈硬化現象を解明する上で必須である。児玉はすでに単球がマクロファージに分化する際特異的に誘導される遺伝子群を同定しているが、田中は、単球が酸化 LDL 刺激などによって泡沫化マクロ

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

ファージに分化する過程において、ケモカインや細胞外基質をはじめとする細胞周囲環境が齎す刺激、あるいは、調節機構を解明することを目的としてケモカイン MCP-1 とヒアルロン酸などの細胞外基質に対する受容体である CD44 の役割を検討した。さらに、児玉は血管壁を模した混合培養系によって効率的に泡沫細胞を形成することができる混合培養装置の作成を行った。平滑筋由来泡沫細胞の遺伝子発現：血管壁の酸素分圧は 2-5% であるが、混合培養系をこのような低酸素下で培養すると平滑筋由来の脂質蓄積細胞が著明に増加することを児玉は確認した。この現象は内膜肥厚によって生じる低酸素分圧が動脈硬化進展に重要な要素であることを示唆している。そこで低酸素下で発現し病変形成に関与する遺伝子を同定し、血管壁における発現を確認するために内藤は組織化学的検討を行った。蛍光試薬 DPPP によるリポ蛋白変性の検出：従来の動脈硬化進展仮説は酸化 LDL の存在に依拠しているが、その生成過程は明確に証明されていない。LDL の酸化的変性を経時的に観察するため、LDL 粒子内に留まって脂質酸化に伴って酸化され、蛍光を蓄積する試薬 (DPPP) を開発応用化した。野口は LDL

が血管壁のどこでどの細胞によっていつ酸化されるかという疑問点を明らかにするため、高感度 CCD カメラによって経時的に細胞を観察した。

変性 LDL によるマクロファージの新たな働き：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。土井は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して、この受容体の細胞質領域の機能を解析した。当受容体には、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があることを明らかにし、細胞質領域を用いたアフィニティカラムにより、受容体の細胞質領域と相互作用する因子として、GAPDH、HSP70 および HSP90 を同定した。今年度はリガンドとの結合から一酸化窒素産生に至る細胞内シグナル伝達経路についての詳細な検討を行った。

脳血管における泡沫細胞である間藤細胞の役割：脳細血管は動脈硬化性変化により血管性痴呆等、重大な機能障害を引き起こす血管であるが、いわゆるリスクファクターに対する反応性が大動脈、冠動脈と異なり、高血圧性の変

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

化または糖代謝異常が必要である。従って、大動脈を用いた動脈硬化研究を敷衍することによっては見いだすことができない、この特異性を明らかにするために、各種モデル動物を用いた脳細血管の形態的観察を行った。脳内細動脈は老化時、高血圧時にその平滑筋が変性、萎縮し血管構築が変化し、同時に細動脈の周囲隙（平滑筋基底膜と星状膠細胞限界膜との間の腔）は著しく拡大するが、間藤はこの時の間藤細胞の役割を検討するために生後 50 週までの SHR-SP ラットを用い、主として電子顕微鏡による血管基底膜と血管周囲隙の間藤細胞の動態を解明することを目指した。

B. 研究方法

血管壁を模した培養系の構築するため、6-well の培養プレートにおいて filter 付きカップ内において、ウサギ大動脈平滑筋と内皮細胞を重層し、そこにヒト末梢血より回収した単球細胞を添加することによって動脈硬化初期病変モデルを構築した（目的 1）。田中は、単球を用いて CD36 や CD68 等の SCR などの細胞表面抗原は、抗体で染色し、フローサイトメータで検出した。また、QIFKIT (DAKO 社)を用いて細胞表面抗原量を算出した。酸化 LDL

の取り込みは、¹²⁵I 標識酸化 LDL の取り込み、および、Oil red-O の取り込みにて検討した。単球の細胞遊走活性は、ボイデンチャンバー法を用いて行った（目的 1）。

児玉は平滑筋由来泡沫細胞の挙動を検討するため、初代培養したウサギ大動脈平滑筋および、ヒト冠状動脈平滑筋を 2%から 20%までの種々の酸素分圧下で培養した。LDL を種々の濃度で添加し、LDL 受容体の関与を検討する実験には、トリチウムでラベルした後に負荷した。遺伝子発現解析には oligonucleotide chip (Gene Chip, Affymetrix, CA)にて 6500 遺伝子の発現量を比較した。クラスタ解析には、Gene Spring Software を使用した。抽出された遺伝子群について、内藤はヒトおよびウサギ大動脈組織を用いて免疫染色を行った（目的 2）。

脂質過酸化を可視化する蛍光試薬 DPPP (=O) を LDL 粒子に取り込ませるため野口は、DMSO 溶液を使用し、これを CHO 細胞に添加して培養した。細胞に DPPP を添加した場合、細胞内でどのような分布をしているか調べるために細胞内小器官を染める蛍光物質との共染色を行った。さらに、蛍光顕微鏡と CCD カメラによる画像取得も試みた（目的 3）。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

土井は、マクロファージスカベンジャー受容体を介したシグナル伝達経路を解析するために、種々のリガンドを、マクロファージ系細胞 RAW264.7 に加え、その一酸化窒素産生能について調べた。さらに iNOS の発現を誘導する経路を調べるために、種々の阻害剤を加えて検討した。iNOS 遺伝子活性化の調節はルシフェラーゼアッセイを行い、遺伝子の活性化に関するエレメントについてはゲルシフトアッセイ、スーパーシフトアッセイによって確認した（目的4）。

間藤は SHR-SP ラットの 50 週前後の脳出血例と非出血例の間藤細胞の観察用従来通りの方法で観察した。HRP (horseradish peroxidase) の経静脈注射を行いその摂取能と形態学的所見とを調べ間藤細胞の機能低下を検出した。同細胞の移動性については血管周囲隙（血管基底膜と星状膠細胞限界膜との間隙）の拡大と間藤細胞の細胞内小器官の変化、ラッフルの出現及び細胞突起の伸張との関係を調べた。また、単離間藤細胞を用いて polyclonal 抗体を咲く出した。ヘキソサニダーゼ活性と間藤細胞泡沫化の過程を検討するために Hex a(-/-), Hex b(+/-) のマウスを作成して免疫組織学的、形態学的検討を加えた。

（倫理面への配慮）

ヒト血液細胞の収集にあたっては、各施設の倫理規定に基づき、正規の基準に則って採血が行われている。病理解析に使用されるヒト検体については、各施設の倫理規定に基づき、本人または家族の同意のもとに提供を受けている。実験に供される動物は、使用にあたって pentobarbital sodium による十分な麻酔を施され、絶えず痛覚が消失していることが確認されている。

C&D. 研究結果と考察

田中は、単球泡沫化機構について MCP-1 が酸化 LDL と同様に CD36 と CD68 の発現が 12 時間以内に著明に誘導し、¹²⁵I 標識酸化 LDL や Oil-red-O の単球への取り込みを 24 時間以内に濃度依存性に誘導すること、また、単球に対する細胞遊走活性を有することを明らかにした。また、CD44 とヒアルロン酸による単球泡沫化機構について、CD44 を刺激することによっても、ヒアルロン酸特に低分子量のヒアルロン酸添加によっても CD36 と CD68 の発現や細胞遊走活性が誘導されることを明らかにした。

児玉は、平滑筋が低酸素下において無変性 LDL から cholesteryl ester を細胞質に取り込んで泡沫化する現象が、

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

ヒトにおいてもウサギにおいても共通であり、これが LDL 受容体を介していないことを示した。さらに、内藤はこのとき細胞内で誘導される遺伝子群を同定し、ヒト大動脈組織における発現を検討した。この結果約 20 の遺伝子が同定され、特に CL100, pim-1 など MAPK 経路に関するものと、adipophilin, leptin など脂肪細胞に関わる遺伝子が生体内でも同定された。

野口は、DPPP 試薬と並んで 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3 β -ol (NBD) を LDL 粒子に取り込ませることによって DPPP 酸化によるシグナルの標準化が可能になることを確認した後 CHO 細胞へ取り込ませ、細胞内での酸化変性が視覚的に測定可能であることを示した。さらにマクロファージを使って細胞内への局在を観察したところ DPPP=0 が lysosome に局在している可能性が高いことを明らかにした。

土井は、フコイダンによるマクロファージからの一酸化窒素産生のシグナルは、p38 及び NF- κ B 依存したシグナル経路により誘導されることを示した。また、この経路には HSP90 が必須であり p38 と NF- κ B の経路がそれぞれ独立してシグナルを伝達していた。

これらのことから、HSP90 はスカベンジャー受容体の細胞質領域と結合し、AP-1 や NF- κ B の上流で機能していること示唆された。HSP90 は単独での酵素活性がないため、何らかのキナーゼと複合体を形成することで、タイプ A スカベンジャー受容体の細胞内シグナル伝達に関与していることが予想された。

間藤は SHR-SP ラットの間藤細胞の経時的変化から、脳細動脈の構築改変が同細胞の線維細胞への逆分化と移動能の亢進と異物摂取能の低下とに関連することを示し、その際の間藤細胞の膠原線維産生が証明された。従来、アルツハイマー病、ビンスワンガー病等の特徴ある所見として報告されている毛細血管の基底膜の肥厚或は周辺の線維化は細動脈の硬化性病変を誤認したものであることを示した。単離した間藤細胞より作成されたポリクロナール抗体は低倍希釈では間藤細胞の他星状膠細胞、内皮細胞を認識するが、高倍希釈では間藤細胞のみを認識した。Hexa(-/-), Hexb(+/-)マウスの間藤細胞について検討した結果、HexB 活性消失により間藤細胞は泡沫化し、HexB が間藤細胞の機能にとって重要であることを明らかにした。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

E. 結論

泡沫細胞形成の初期において、単球に作用すると考えられるケモカイン MCP-1 は、細胞遊走活性のみならず、SCR の発現を介して酸化 LDL の取り込みを誘導する機構が明らかになった。さらに、ヒアルロン酸などの細胞外基質に対する受容体である単球表面の CD44 を介する刺激は、単球の遊走、SCR の発現、酸化 LDL の取り込みを増強し、泡沫化マクロファージへの細胞分化を誘導することが示唆された。以上、単球の泡沫化過程に於いて、ケモカインや細胞外基質などの細胞周囲環境が酸化 LDL の取り込みを調節する事が示された。

一方混合培養実験で示された平滑筋細胞による低酸素下での泡沫化現象の存在が明らかになった。LDL 受容体を介さない機序が示されたがこの脂質動員メカニズムは今後検討が必要である。しかし、このとき動員される遺伝子群は、生体内でも血管壁に発現していることが確認され、動脈硬化発症初期には血管壁内酸素分圧低下が関与していることが示された。

平滑筋による native LDL の取り込みは、さらなる酸化 LDL の生成の可能性を示す。これを確認するために DPPP 試薬を LDL に取り込ませ、LDL の酸化

を非破壊・簡便に検出することが可能となった。経時的な測定が可能な本方法により LDL が平滑筋細胞内で酸化している可能性を検証することができると考えられる。

すでに病変での存在が示唆されている酸化 LDL はスカベンジャー受容体によって取り込まれるが、当経路においてリガンドであるフコイダンを使ってスカベンジャー受容体のシグナル伝達が p38 及び NF- κ B に依存することを明らかにした。また、p38 と NF- κ B の経路は独立し、両方の経路で HSP90 が必須であることを示した。

高血圧に伴う脳細血管障害の経時的変化は従来不明だったが、高血圧下の脳細動脈の構築変化を間藤細胞の機能低下とする現在までの所見に基づき、同細胞の形態及び機能変化から、同細胞の線維細胞化（逆分化）と血管構築改変（細動脈の毛細血管化の過程を含めて）が関与していることを明らかにした。

以上のように本研究は主に大動脈においては平滑筋と単球・マクロファージについて検討を行った。つまり、単球の動員、分化から、変性脂質の生成過程、スカベンジャー受容体を介したシグナリングなどマクロファージからの泡沫細胞形成の機序について詳細な

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

検討を行った。同時に平滑筋由来の泡沫細胞形成についても、酸素分圧の低下が重要であることを検証した。一方脳細動脈においては間藤細胞を中心とした解析によって、脳血管病変進展の機序を説明できることが明らかになり、次年度の検討が待たれる。

F. 健康危険情報
該当事項なし。

G. 研究発表
論文発表

（主任研究者）

(1) Saiura, A., Mataki, C., Murakami, T., Umetani, M., Wada, Y., Kohro, T., Aburatani, H., Y., H., Hamakubo, T., Yamaguchi, T., Hasegawa, G., Naito, M., Makuuchi, M., and Kodama, T. (2001). A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means DNA microarray analysis. *Transplantation* 72, 320-329.

(2) Tomokiyo, R., Jinnouchi, K., Honda, M., Wada, Y., Hanada, N., Hiraoka, T., Suzuki, H., Kodama, T., Takahashi, K., and Takeya, M. Production, characterization, and

interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 2002;161(1):123-32.

(3) Mashiba, S., Wada, Y., Takeya, M., Sugiyama, A., Hamakubo, T., Nakamura, A., Noguchi, N., Niki, E., Izumi, A., Kobayashi, M., Uchida, K., and Kodama, T. (2001). In vivo complex formation of oxidized alpha-1-antitrypsin and LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. vol. 21, 1801-1808, 2001.

(4) Wada, Y., Sugiyama, A., Yamamoto, T., Naito, M., Noguchi, N., Yokoyama, S., Tsujita, M., Kawabe, Y., Kobayashi, M., Izumi, A., Kohro, T., Tanaka, T., Niki, E., Hamakubo, T., and Kodama, T. (2002). Lipid accumulation in human coronary artery smooth muscle cells by LDL loading under hypoxic conditions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, in press

(5) Hashimoto, K., Wada, H., Wada, Y., Kobayashi, M., Izumi, A., Sugiyama,

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

A., Kohro, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. (2002). Extensive oligonucleotide microarray transcriptome analysis of the rat cerebral artery and arachnoid tissue. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press.

（分担研究者）

(1) 間藤方雄、大河原重雄、益子敏弘、児玉龍彦、藍原由紀、坂本敦司. SHR-SP ラットにみられる脳細動脈の構築変化と MATO (FGP) 細胞の経時的変化に関する研究。動脈硬化 28 (6) : 137-141, 2001.

(2) Tomoko Nakazawa, Megumi Nishikawa, Eizo Aikawa, Masao Mato. In vitro characterization of Mato's FGP cells isolated from rat cerebrum. *Neuroscience Letters* 317 (2002) 127-130.

(3) 間藤方雄、竹内公一、児玉龍彦. 脳血管周囲細胞 (Mato cell). *内科* 88 (2) (2001年8月号)

(4) Masao Mato, Koichi Takeuchi, Shigeo Ookawara, Shoji Ymanaka, Toshihiro Mashiko, Ken-ichi Ogura. Inclusions in nobel perivascular macrophages (Mato's fluorescent granular perithelial cells) and

neurons in the cerebral cortex of Hex A- and Hex B-deficient mice. *Acta Neuropathol* (2002) 103: 119-130.

(5) Fujii K, Fujii Y, Hubscher S, Tanaka Y: CD44 is the physiological trigger of Fas up-regulation on rheumatoid synovial cells. *J Immunol* (2001) 167, 1198-1203.

(6) Yasuda M, Tanaka Y, Fujii K, Yasumoto K: CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol* (2001) 13, 1309-1319.

(7) Tanaka Y: The role of chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Drugs Today* (2001) 37, 477-484.

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

田中良哉: ケモカインと炎症性疾患. *現代医療* (2001) 33, 131-137.

(10) Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, Niki E, Kodama T, Tanaka Y: Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transmigration of monocytes via the

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

- protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* (2002) 160, 281-288.
- (11) Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y: Autocrine induction of the human prointerleukin 1 β gene promoter by interleukin 1 β in monocytes. *J Immunol* (2002) 168, 1984-1991.
- (12) S. Obika, W. Yu, A. Shimoyama, T. Uneda, K. Miyashita, T. Doi, & T. Imanishi:
Symmetrical cationic triglycerides: An efficient synthesis and application to gene transfer. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 245-254 (2001)
- (13) S. Obika, T. Uneda, T. Sugimoto, D. Nanbu, T. Minami, T. Doi, & T. Imanishi:
2'-O, 4'-C-Methylene bridged nucleic acid (2', 4'-BNA): Synthesis and triplex-forming properties. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 1001-1011 (2001)
- (14) T. Nakamura, J. Hinagata, T. Tanaka, T. Imanishi, Y. Wada, T. Kodama, & T. Doi: HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, 858-864 (2002)
- (15) 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
- (16) Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K: Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 193 (1): 35-49, 2001
- (17) Hirano K-I, Kobayashi T, Watanabe T, Yamamoto T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M: Role of heme oxygenase-1 and Kupffer cells in the production of bilirubin in the rat liver. *Arch Histol Cytol* 64: 111-120, 2001
- (18) Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H, Naito M, Iyoda T, Omasu Y, Shimoyama S, Letterio JJ, Nakabayashi T, Tagaya H, Yamane T, Ogawa M,

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

Nishikawa S-I, Ryoike K, Inaba K, Hayashi S-I, Kunisada T: Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- β 1-dependent cells. *Int Immunol* 13 (5): 695-704, 2001

Meriden, NH

(5) Youichiro Wada, et. al., "Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition." *SFRR*, Dec, 2001, Sydney.

学会発表

(1) 代表発表者：和田洋一郎. 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. 日本動脈硬化学会（東京），2001年6月.

(6) 太幡敬洋, 峯信一郎, 飯田武, 中野和久, 齋藤和義, 田中良哉: CD44刺激による単球のスカーベンジャー受容体発現と酸化 LDL 取り込み増強機構. 第31回日本免疫学会総会（大阪）平成13年12月

(2) 代表発表者：和田洋一郎. Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition. 第74回日本生化学会大会（京都），2001年10月.

(7) 中村肇伸, 日永田純一, 田中俊樹, 今西武, 和田洋一郎, 児玉龍彦, 土井健史: マクロファージスカーベンジャー受容体の細胞質領域に結合するタンパク質の同定: 第74回日本生化学会大会（京都）平成13年10月

(3) 代表発表者：和田洋一郎. 低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈平滑筋の脂質蓄積. 分子生物学会（横浜），2001年12月.

(8) 長谷川剛、内藤真：ヒト卵黄嚢造血初期の免疫組織化学的検討。第41回日本リンパ網内系学会総会（秋田）、2001. 5.31~6.1

(4) Youichiro Wada, et. al., "Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition". Gordon conference, June, 2001, Kimball Union Academy,

(9) 山本尚、内藤真：op/opマウスにおけるKupffer細胞のスカーベンジャー受容体発現と形態。第41回日本

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

リンパ網内系学会総会（秋田）、2001.
5.31~6.1

(10) 鎌田和久：Corynebacterium
parvum 誘発肝肉芽腫形成におけるマ
クロファージ由来アポトーシス抑制因
子 (AIM) の役割。第41回日本リン
パ網内系学会総会（秋田）、2001.
5.31~6.1

(11) Naito M: Macrophage scavenger
receptors in host defense against
Listeria monocytogenes infection.
15th Annual Meeting of the European
Macrophage Society (EMS) (Wien,
Austria), 2001. 8.30~9.1

(12) Yamamoto T: Repopulation of
Kupffer cells in osteopetrotic
(op/op) mice after macrophage
depletion. VII Korean-Japanese
Lymphoreticular Workshop (Seoul,
Korea), 2001.10. 7~8

マクロファージの接着潜り込み、分化機構

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。この過程における遺伝子発現パターンを解析し、特に誘導される遺伝子群を同定した。実際にヒト血管壁での発現を検討し、これらが生体内での病変進展に寄与している可能性を明らかにした。

A. 研究目的

前年度までに、ウサギ大動脈およびヒト冠動脈平滑筋に LDL を負荷すると、血管壁内部の酸素分圧とされる 2-7% 酸素分圧下では LDL 粒子の取り込みが増加して、平滑筋内への脂質蓄積が生じることを見いだした。さらに、このとき特徴的に発現誘導される遺伝子群を同定した。本年度は、(1)この脂質蓄積における LDL 受容体の関与の有無を検討した。(2)3回の遺伝子発現解析結果からクラスタ解析を行い、発現誘導される遺伝子群を同定した。(3)この遺伝子群の *in vivo* における大動脈壁での発現を検討した。

B. 研究方法

初代培養したウサギ大動脈平滑筋お

よび、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。ウサギは日本白色ウサギおよび、LDL 受容体変異系である Kusanagi ウサギを使用した。低比重リポ蛋白質 (LDL) はヒト平滑筋には終濃度 3 mg/ml にて、ウサギ平滑筋には 1 mg/ml にて添加した。LDL 受容体の関与を検討する実験には、トリチウムでラベルした LDL を負荷した。培養開始 72 時間後に PBS にて洗浄して細胞を回収した。放射性ラベルした LDL を添加した平滑筋細胞は、サイトスピンにて調整し、オートラジオグラフィーを実施した。遺伝子発現解析の為に、total RNA を調整し、うち 10 μ g を用いて oligonucleotide chip (Gene Chip,

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

Affymetrix, CA)にて 6500 遺伝子の発現量を比較した。クラスタ解析には、Gene Spring Software を使用した。抽出された遺伝子群について、抗体を購入してヒト大動脈組織における免疫染色を行った。

C. 研究結果

平滑筋に放射性ラベルした LDL を負荷した後オートラジオグラフィおよび脂質染色を行うと、脂質染色部位と一致した grain が観察される。この個数を定量したところ、21%酸素分圧下では一細胞あたり 10 個だったが、2%酸素分圧下では、25 grains/cell と有意差をもって増加していた。この方法によって LDL 粒子の取り込みを検討したところ、LDL 受容体の機能喪失性変異ウサギの平滑筋でも野生型と同様の脂質染色性があり、LDL 粒子取り込みについても 25 grains/cell を認め、野生型との相違はなかった。平滑筋が低酸素下で脂質蓄積するにあたって誘導される 22 遺伝子群をクラスタ解析によって 6500 遺伝子から抽出した。このうち、18 遺伝子について抗体を購入してヒト大動脈の免疫染色をおこなったところ、adipophilin, CL-100, pim-1 が血管壁において強陽性となった。

D. 考察

LDL 受容体を欠いても平滑筋内への脂質蓄積、および LDL 粒子取り込みに違いがないことから、この現象には LDL 受容体が関与していないことが示唆された。平滑筋への脂質の詳細に機序についてはさらに検討が必要と考えられるが、発現が誘導される遺伝子群を同定した。ここには、VEGF, GLUT3, Nip3 など低酸素との関連が知られている遺伝子が含まれており、酸素分圧の影響を反映していることが判った。さらに、Leptin, adipophilin, など脂肪細胞で誘導される遺伝子があり、脂質蓄積の影響を示唆していた。また CL-100, pim-1 等 リン酸化経路に関わる遺伝子も含まれており、そのターゲットの同定が必要と考えられた。この現象が動脈硬化の生体外モデルになるかどうかを検討するため、入手可能な 18 遺伝子について免疫染色を実施したところ、adipophilin CL-100, pim-1 等について陽性像が確認され、in vivo においても平滑筋が内膜肥厚による低酸素および高脂血症による LDL 負荷に曝されている可能性が示された。

E. 結論

平滑筋の低酸素下での LDL 負荷によって生じる脂質蓄積には LDL 受容体が

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

関与していないことがわかった。また、このとき誘導される遺伝子には、生体内の内膜肥厚病変で実際に発現しているものが確認された。このような遺伝子については、現在上流配列の解析を行い、転写調節機序を検討している。また内膜肥厚病変で認められた遺伝子群の経時的な発現様式を明らかにするために、種々の月齢の高脂血症ウサギの大動脈を使った免疫組織学的検討を進めている。このようにして同定された病変関連遺伝子が、病変形成にどのように関与しているかどうか引きつづき明らかにする必要があると考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saiura, A., Matakai, C., Murakami, T., Umetani, M., Wada, Y., Kohro, T., Aburatani, H., Y., H., Hamakubo, T., Yamaguchi, T., Hasegawa, G., Naito, M., Makuuchi, M., and Kodama, T. (2001). A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means DNA microarray analysis. *Transplantation* 72, 320-329.

Tomokiyo, R., Jinnouchi, K., Honda,

M., Wada, Y., Hanada, N., Hiraoka, T., Suzuki, H., Kodama, T., Takahashi, K., and Takeya, M. Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 2002;161(1):123-32..

Mashiba, S., Wada, Y., Takeya, M., Sugiyama, A., Hamakubo, T., Nakamura, A., Noguchi, N., Niki, E., Izumi, A., Kobayashi, M., Uchida, K., and Kodama, T. (2001). In vivo complex formation of oxidized alpha-1-antitrypsin and LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. vol. 21, 1801-1808, 2001.

Wada, Y., Sugiyama, A., Yamamoto, T., Naito, M., Noguchi, N., Yokoyama, S., Tsujita, M., Kawabe, Y., Kobayashi, M., Izumi, A., Kohro, T., Tanaka, T., Niki, E., Hamakubo, T., and Kodama, T. (2002). Lipid accumulation in human coronary artery smooth muscle cells by LDL loading under hypoxic conditions. *Arteriosclerosis*,

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

Thrombosis, and Vascular Biology, in press

Hashimoto, K., Wada, H., Wada, Y., Kobayashi, M., Izumi, A., Sugiyama, A., Kohro, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. (2002). Extensive oligonucleotide microarray transcriptome analysis of the rat cerebral artery and arachnoid tissue. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press.

(4) Youichiro Wada, et. al., "Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition". Gordon conference, June, 2001, Kimball Union Academy, Meriden, NH

(5) Youichiro Wada, et. al., "Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition." SFRR, Dec, 2001, Sydney.

2. 学会発表

(1) 代表発表者：和田洋一郎. 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. 日本動脈硬化学会（東京），2001年6月.

(2) 代表発表者：和田洋一郎. Lipid accumulation of coronary artery smooth muscle cell under hypoxic condition. 第74回日本生化学会大会（京都），2001年10月.

(3) 代表発表者：和田洋一郎. 低酸素下低比重リポ蛋白質負荷による冠動脈平滑筋の脂質蓄積. 分子生物学会（横浜），2001年12月.

脳細動脈の構築変化における間藤細胞の役割

分担研究者 間藤 方雄（自治医科大学 名誉教授）

研究要旨

高血圧に伴う脳細血管障害の経時的変化は必ずしも明らかでない。近年血管性痴呆のみならずアルツハイマー病の脳実質血管の変化の所見として、毛細血管基底膜の変化が注目されているが、脳細動脈の硬化時の血管構築の変化の形態学的研究はより慎重に行われる必要がある。本研究では、高血圧下の脳細動脈の構築変化を間藤細胞の機能低下とする現在までの所見に基づき、同細胞の線維細胞化（逆分化）と血管構築改変（細動脈の毛細血管化の過程を含めて）の係わり合いを同細胞の形態及び機能変化から明らかにした。なお昨年度中沢により間藤細胞の単離法が確立されたのでこれ等を抗原として作成したポリクロナール抗体の間藤細胞に対する染色性について検討し、同抗体が間藤細胞を認識しうる分画を含むことを示した。更にヘキササニダーゼ活性と間藤細胞泡沫化の過程の分析に於いては Hex a (-/-), Hex b (+/-) マウスを追加し、Hex B と間藤細胞泡沫化の関係を確かめた。

A. 研究目的

脳内細動脈は老化時、高血圧時にその平滑筋が変性、萎縮し血管構築が変化する。それと同時に細動脈の周囲隙（平滑筋基底膜と星状膠細胞限界膜との間の腔）は著しく拡大する可能性がある。その周囲隙の拡大は、高血圧による血管透過性の上昇と、間藤細胞の機能低下による脳脊髄液循環不全がその要因と考えられる。このような条件下での間藤細胞の役割を検討するために生後 50 週までの SHR-SP ラットを用い、

主として電子顕微鏡による血管基底膜と血管周囲隙の間藤細胞の動態を解明することを目指した。

更に前年度、単離した培養間藤細胞を用いて得られた抗体の特性を明らかにすること及び Hex B の間藤細胞泡沫化に対する役割を確かめことを計画した。

B. 研究方法

①形態学的検索のためには主に SHR-SP ラットの 50 週前後の脳出血例

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

と非出血例の間藤細胞の観察を本研究で従来用いた固定法、固定液を用いて行った（文献1）。

間藤細胞の機能低下を知るためにはHRP (horseradish peroxidase)の経静脈注射を行いその摂取能と形態学的所見とを調べた。同細胞の移動性については血管周囲隙（血管基底膜と星状膠細胞限界膜との間隙）の拡大と間藤細胞の細胞内小器官の変化、ラッフルの出現及び細胞突起の伸張との関係を調べた。

②前年度の方法により得られた単離間藤細胞を4回にわたってウサギに注射し、(フロインドアジュバントを加え)、寒天拡散法によって216倍以上に抗体値が上昇した時点でポリクローナル抗体として利用した。同抗体を4%パラフォルムアルデヒドによって固定したクリオスタット及びビブラトーム切片に作用させ、ABC法によって抗原の分布を調べた。また、ED2陽性細胞との異同についても検討を加えた。

③Hex a(-/-), Hex b(+/-)のマウスを作成し、前年度のTay-Sacksマウス、Sandhoffマウス同様免疫組織学的、形態学的検討を加えた。

C. 研究結果

1. 易脳卒中発症性 SHR-SP ラットで

は対照ウイスター系ラットと異なり、生後3~4月から間藤細胞の異物摂取能の低下、PAS染色性の低下、脂質の蓄積がみられる。血管壁を構成する内皮細胞及び平滑細胞の間隙は6ヶ月例ではかなり増加する。

また、間藤細胞の周囲隙 (Virchow-Robin 腔に相当する) も平滑筋細胞の萎縮性変化と共に著しく増大する。間藤細胞は大型のライソーム性顆粒が減少し、小型となり飲小胞は減少し、小胞体が増加する。この変化に続き2つの過程がある。その1つは、平滑筋の変性が高度となり、内皮下の広い空隙には典型的な疎面小胞体に富む線維芽細胞が出現する。この血管像は毛細血管の硬化症と誤認する可能性が高い。他方、変性筋細胞を層状に線維細胞が取り巻き血管腔は狭くなり血管壁の肥厚を思わせる像を呈する。この像は穿通枝に多い。

2. 前年次に述べた如く（文献2）単離した間藤細胞を用いて得られた間藤細胞のポリクローナル（ウサギ）抗体を用いて染色を行なった。50倍以下の希釈では星状膠細胞、或いは内皮細胞が共染する場合があります、問題を残した。上記寒天拡散法によっても3本の沈降線を認める。100倍に希釈したものでは間藤細胞がかなり特異的に染ま

る場合があり、染色条件の確立に努めている。同抗体は、ED2 とは異なるエピトープを認識していた。一方ウエスタンブロッティング法により抗原蛋白の同定も試みている。

3. なお、前年度に続き補足的に HexB の間藤細胞に対するヘキササミニダーゼの役割を調べるため Hexa(-/-), Hexb(-/+) マウスの研究を行い HexB の間藤細胞の泡沫化に対する役割を確定した（文献 3）。

D. 考察

実験 I に於いて脳細動脈の（血管）構築の変化が見られない時期、或いは血圧の上昇する時期に先がけ間藤細胞の組織化学的、構造的・機能的変化のみられることは先年報告した（文献 1）。将来、これ等の細胞内の変化を定性的、定量的に扱うため、酵素活性、膜受容体の変化等に注目する必要がある。

血管壁の浮腫性変化としての基底膜の厚さ、細胞間隙の拡大（特に血管平滑筋と間藤細胞の間隙の拡大）或いは Virchow-Robin 腔の拡大は、Hazama らが報じている様に、血圧上昇に伴う血管透過性の上昇がその一因と考えられるが、間藤細胞の異物摂取機能とその低下の所見を考慮すると、脳脊髄液

の貯留も無視できない。同液の通路としての所謂 Virchow-Robin 腔の役割には注意すべきであろう。血管浮腫の結果、平滑筋細胞の変性は高度となり間藤細胞は遊走能を獲得すると考えられる。この様な条件下では間藤細胞は線維細胞化が促進され、エラスチンを含む線維性成分を増生するが、膠原線維形成は血管腔に面する部分だけでなくその反対側の面についても同様に進むことから血圧に対する反応性の線維形成とは考えにくい。出血例には間藤細胞の線維細胞化が必ずしも明らかでないが膠原線維の増生が著しい例もあった。

この様に、間藤細胞の脱分化により脳細動脈壁に於ける膠原線維形成が証明され、脳細動脈硬化の実体が明らかとなった。それに伴う或いは原因をなす現象として、血管壁浮腫、血管平滑筋の萎縮、変性等がみられるが、その基礎には早期よりの間藤細胞の細胞内小器官の変化及びマクロファージ機能の低下がある。

なお、脳細動脈壁の破綻による出血及び血管壁の肥厚による梗塞は、同血管の浮腫及び平滑筋細胞の変性と間藤細胞の脱分化線維細胞化の程度の差によると考えられる。また、血管構築の変化が脳の部位により異なり、多様性