

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

を呈しているのは、これ等諸条件によると考えられた。更に、最近アルツハイマー病、パーキンソン病、ビンスワンガー病等痴呆を伴う疾患の特異所見として脳毛細血管周辺の線維増生・基底膜の変化があげられ(Zarow ら 1997、Parkas ら 2000) 毛細血管硬化とする命名する研究者があるが、この所見は平滑筋の脱落し血管壁の薄化した細動脈を毛細血管と誤認したものであろう。以上のことから SHR-SP ラットの脳細動脈の血管構築の変化を研究するためには間藤細胞の脱分化の機序を分子生物学的に研究することが今後の課題である。

実験 2 については間藤細胞の単離法について前年報告したが（文献 2）、それを用いて作成した抗体は共染する細胞がある。高希釈抗体は間藤細胞のみ認識するが、ED1, ED2、その他の抗体との関連を明らかにすると共に各抗原蛋白の性質、分子量等の検討が必要である。更に同細胞のモノクローナル抗体の作成を試みる必要がある。

実験 3 より HexB 活性が間藤細胞の機能維持に重要であることが確認された（文献 3）。

## E. 結論

1) SHR-SP ラットの間藤細胞の経時

的变化から、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可能性が示され、その際同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が示された。

2) 単離した間藤細胞より作成されたポリクローナ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する。認識される蛋白の性状は分析中である。

3) 昨年度の補足的研究として Hexa(-/-), Hexb(+/-) マウスの間藤細胞について検討し、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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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) :

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

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) 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.

## マクロファージの泡沫化機構

分担研究者 内 藤 眞（新潟大学医学部 教授）

### 研究要旨

動脈硬化病変においてマクロファージはスカベンジャー受容体を介して変性低比重リポ蛋白を取り込み、泡沫細胞に変態する。近年動脈硬化に関連する遺伝子の検索が進められている。分担者は動脈硬化関連遺伝子の発現を免疫組織学的に検討し、CL 100, pim-1, adipophilin の遺伝子産物が動脈硬化病巣のマクロファージおよび泡沫細胞に発現することを見いだした。これら遺伝子はマクロファージの泡沫化機構の鍵をにぎる遺伝子である可能性が考慮される。

### A. 研究目的

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脂質取り込みと細菌性抗原の取込みに深く関与することを明らかにしてきた。化学修飾低密度リポ蛋白はマクロファージの種々のスカベンジャー受容体を介して取り込まれ、コレステロールエステルとして蓄えられる。しかし、スカベンジャー受容体による脂質取り込みに続く細胞内機序および遺伝子発現は不明である。本研究では、本プロジェクトのメンバーが gene chip によって抽出した膨大な数の遺伝子について動脈硬化病変を含めた組織内での発現を免疫組織学的に検討し、マクロフ

ージの泡沫細胞化機序を解析することを目的とする。

### B. 研究方法

剖検例 10 例の大動脈から種々の段階の動脈硬化病変を採取し、ホルマリン固定、パラフィン切片を作製した。一部は PLP 固定を行い、凍結切片でも検討した。

共同研究者の和田らはウサギ平滑筋の培養モデルで低酸素および低密度リポ蛋白投与時の遺伝子変化を gene chip を用いて解析し、発現の亢進が顕著である遺伝子を検出した。これらの遺伝子の抗体を用いてこれらヒト動脈硬化病変について免疫組織学的染色

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

を行い観察した。ヒトマクロファージや平滑筋の同定には抗マクロファージ抗体（CD68）、抗スカベンジャー受容体抗体（AE-1）、抗平滑筋抗体（SMA）などを用いた。

ホルマリン固定組織については、Oil red O と Sudan III による脂肪染色も行った。

### C. 研究結果

#### 1. 肝および大動脈のマクロファージの分布

肝のマクロファージ（Kupffer 細胞）は CD68, AE-1 が陽性であった。これは脂肪肝においても同様であった。大動脈では中膜平滑筋が SMA 陽性であった。しかし、正常の大動脈ではマクロファージは検出されなかった。

#### 2. 動脈硬化病変におけるマクロファージの分布

内膜肥厚のみの初期動脈硬化病変においては泡沫細胞の出現はなく、単核球が散見された。CD68, AE-1 による免疫染色では小型円形および樹枝状の突起を伸ばしたマクロファージが肥厚内膜に散在していた。時にマクロファージの集簇巣に泡沫状陽性細胞も出現した。泡沫細胞には脂質蓄積が顕著であるが、小型マクロファージにも少

量の脂質蓄積がみられた。

アテローム斑においては泡沫状のマクロファージが集簇し、CD68, AE-1 を発現し、多量の脂肪蓄積が認められた。平滑筋は fibrous cap といわれる部分に出現、増生していた。

#### 3. 動脈硬化モデルにおける遺伝子発現

低酸素ないし低密度リポ蛋白添加によって培養平滑筋に発現が増強した遺伝子には CL 100, CD55, pim-1, adipophilin, NFkB2, VEGF, leptin, fibronectin receptor, Nip3 などがあった。これらの抗体を用いて免疫染色を行ったところ、パラフィン切片、凍結切片とも CL 100, pim-1, adipophilin が染色可能であることが判明した。

肝臓の染色では CL 100, pim-1 は肝細胞に陽性で、マクロファージは陰性であった。adipophilin は正常肝では少数の類道壁細胞（おそらく脂肪摂取細胞）の脂肪滴が陽性で、その他の細胞は陰性であった。しかし、脂肪肝では、肝細胞、ことに脂肪滴ないしは脂肪滴の膜が著明に陽性であった。

正常大動脈ではいずれの抗体でも陽性細胞は検出できなかった。しかし、内膜肥厚病変には形態的にマクロファ

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

ージと判断される細胞がいずれの抗体でも染め出された。CL 100 は一部平滑筋にも陽性所見を呈した。

#### D. 考察

動脈硬化モデルの培養平滑筋に発現の増強した遺伝子の中で、adipophilin、CL-100、pim10 の遺伝子産物がヒト動脈硬化病巣のマクロファージに強く発現することが明らかになった。もともとマクロファージには adipophilin、CL-100、pim10 の発現がみられないことから、これら遺伝子の発現は動脈硬化の進展に伴って増強したものと考えられる。興味深いことに肝脂肪蓄積肝細胞や脂肪摂取細胞（Ito cell, fat-storing cell）に adipophilin が発現していた。このことはこの分子は脂肪の蓄積に重要な役割を果たしていることを意味する。すなわち、CL-100、pim10 は動脈硬化に関連する何らかの因子によって発現が誘導されたのに対し、adipophilin は脂質蓄積によって直接発現が誘導されたものと考えられる。このことは adipophilin は分泌乳腺上皮など脂肪蓄積細胞に発現するという報告とも一致する。

もう一つ興味あることは、これらの遺伝子は平滑筋培養モデルで発現増強

を認めたのにもかかわらず、実際の動脈硬化病変ではマクロファージに発現したことである。このことは平滑筋におけるこれら遺伝子の発現を否定するものではないが、少なくとも内膜肥厚、アテローム形成という比較的初期の動脈硬化病変においてはマクロファージに強く発現することを意味するのであろう。また、これらの遺伝子発現は動脈硬化病巣においてマクロファージと平滑筋に共通してみられ、時期や条件によって発現強度が変化するのかも知れない。いずれにしても、和田らの動脈硬化培養モデルの gene chip による遺伝子解析は in vivo のヒト病変の解析に極めて有用であることが明らかになった。 \*

#### E. 結論

adipophilin、CL-100、pim10 は動脈硬化病変のマクロファージに発現し、脂質蓄積と泡沫細胞化に関与する遺伝子と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Jiang S, Naito M, Kaizu C,

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

- Kuwata K, Hasegawa G, Mukaida N, Shultz LD: Lipopolysaccharide-induced cytokine and receptor expression and neutrophil infiltration in the liver of osteopetrosis (op/op) mutant mice. *Liver* 20: 465-474, 2000
- 2) Yamashita J, Ito H, Hirasha M, Ogawa M, Nishawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S-I: Ilk-1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 (6808): 92-96, 2000
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H, Naito M, Iyoda T, Omasu Y, Shimoyama S, Letterio JJ, Nakabayashi T, Tagaya H, Yamane T, Ogawa M, Nishikawa S-I, Ryoike K, Inaba K, Hayashi S-I, Kunisada

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

T: Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- $\beta$  1-dependent cells. *Int Immunol* 13 (5): 695-704, 2001

8) Saiura A, Mataki C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Harihara Y, Hamakubo T, Yamaguchi T, Hasegawa G, naito M, Makuuchi M, Kodama T: A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means DNA microarray analysis. *Transplantation* 72 (2): 320-329, 2001

2. 学会発表

1) 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. 4.11~13

2) 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. 4.11~13

3) 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. 4.11~13

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

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

- 8) 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
- 9) 山本尚、内藤眞：大理石病マウス (op/op) における再生 Kupffer 細胞の多様性。第 90 回日本病理学会総会 (東京)、2001. 4.5~7 (東京)
- 10) 長谷川剛、内藤 眞：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
- 11) 山本 尚、内藤 眞：op/op マウスにおける Kupffer 細胞のスカベンジャー受容体発現と形態。第 41 回日本リンパ網内系学会総会 (秋田)、2001. 5.31~6.1
- 12) 鯨田和久：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
- 13) 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
- 14) 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



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

マクロファージに於ける遺伝子調節、新規治療薬開発

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、動脈硬化発症に大きく関与する受容体である。本研究では、はじめて受容体が変性 LDL を取り込む機能以外に、リガンドとの結合により、一酸化窒素を産生する働きを有することを見い出した。リガンド刺激に由来する細胞内シグナル伝達経路についての詳細な検討を行い、一酸化窒素の産生に関与する経路の特定、および受容体と相互作用するタンパク質が直接この経路に関与していることを明らかにした。

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、受容体が変性 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。

これまで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 を同定してきたが、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。

B. 研究方法

マクロファージスカベンジャー受容体に対する種々のリガンドを、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。

次に iNOS の発現を誘導する経路を調べるために、種々のシグナル伝達経路に対する阻害剤を加え、一酸化窒素産生がどのように変化するかを見た。

さらに、iNOS 遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につないだ

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

レポーター遺伝子を作製し、先と同様の実験におけるルシフェラーゼの発現を調べ、どのようなシグナルが iNOS 遺伝子を活性化するかを見た。

遺伝子の活性化に関与するエレメントについて、そのエレメントを用いたゲルシフトアッセイを行い、分子レベルにおけるその経路の確認と、どのような転写因子が関与しているのかについて、スーパーシフトアッセイを行うことにより確かめた。

C. 研究結果および

D. 考察

マクロファージスカベンジャー受容体のリガンドである、アセチル化 LDL、酸化 LDL、フコイダン、マレイル化 BSA、デキストラン硫酸をマクロファージ系細胞 RAW264.7 に加え、一酸化窒素産生を調べた結果、フコイダンを加えた時のみ有為な一酸化窒素産生が見られた。また、このフコイダンによるマクロファージ系細胞の一酸化窒素産生は、タイプ A のスカベンジャー受容体に特異的であることを、ノックアウトマウスを用いた同様の実験を行うことにより確認することができた。

そこで、フコイダンによるタイプ A のスカベンジャー受容体特異的な一酸化窒素産生経路について、そのシグナ

ル伝達経路の解明を試みた。

これまでに、フコイダンの刺激により PKC、p38 及び PI3 kinase が活性化されることが報告されており、また、これらの酵素の上流には、HSP90 と非受容体型チロシンキナーゼである pp60src 複合体が機能することが明らかにされている。このことより、フコイダンが誘導する一酸化窒素産生経路には HSP90、PKC、MEK1、p38 及び PI3 kinase が関与する可能性があると考えられ、これらに特異的な阻害剤である Geldanamycin、カルフォスチン C、PD98059、SB203580 及びウォルトマンニンを用い、フコイダンによる一酸化窒素産生への影響を見た。一方、iNOS プロモーターには NF- $\kappa$ B、AP-1、GAS の結合配列が存在し、それぞれ NF- $\kappa$ B、AP-1、Stat1 が結合し iNOS の転写活性を調節することが明らかにされている。そこで、フコイダンが誘導する一酸化窒素産生の経路には、NF- $\kappa$ B、p38 及び JAK2 の経路が関与する可能性が考えられるため、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を阻害する MG-132 及び JAK2 の阻害剤である AG490 も先と同様の阻害実験に用いた。

その結果、SB203580、MG-132 及び Geldanamycin で前処理した RAW 細胞において、フコイダンによる一酸化

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

窒素の産生が阻害された。このことから、タイプ A のスカベンジャー受容体を介してフコイダンが誘導するマクロファージからの一酸化窒素産生には p38、NF- $\kappa$ B 及び HSP90 が関与することが示唆された。

次に、この一酸化窒素の産生が iNOS 遺伝子の活性化と直接関係しているか否かを確認するため、iNOS 遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につないだレポーター遺伝子の発現を見た。

その結果、一酸化窒素産生測定の場合と同様、フコイダン刺激による RAW 細胞の活性化において、SB203580、MG-132 および Geldanamycine で前処理した場合に阻害効果が見られた。iNOS は、NF- $\kappa$ B、AP-1、Stat1 を介して活性化されるため、フコイダンが誘導する一酸化窒素産生には、NF- $\kappa$ B および AP-1 が関与することが考えられた。そこで、さらにこれらの因子が、iNOS 遺伝子のプロモーター上の結合配列に実際に結合しているのか否かを確認した。フコイダンで処理した RAW 細胞から抽出した核抽出液を用い、NF- $\kappa$ B および AP-1 の結合配列をプローブとしてゲルシフトアッセイ及びスーパーシフトアッセイを行った。

その結果、AP-1 の結合配列には、

フコイダン刺激によりタンパク質因子が結合することが示された。また、この結合は geldanamycine および SB203580 で前処理した際には阻害されたが、MG-132 で前処理した場合にはほとんど阻害が認められなかった。

このことから、フコイダン刺激により AP-1 が活性化され、その活性化の経路には HSP90 と p38 が重要であることが示唆された。さらに、AP-1 の主要な構成成分である c-Jun 及び c-Fos 抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行ったところ、いずれの抗体でもスーパーシフトしたバンドが観察され、フコイダンによる一酸化窒素産生には、c-Jun と c-Fos のヘテロダイマーが関与することが示唆された。

次に NF- $\kappa$ B の結合配列では、AP-1 の結合配列の場合と同様、フコイダン刺激によりタンパク質因子の結合が見られた。この結合は GA 及び MG-132 で前処理した際には阻害されたが、SB203580 で前処理した場合にはほとんど阻害が認められなかった。この結果は、フコイダン刺激による NF- $\kappa$ B の活性化の経路には HSP90 が重要な役割を果たしていること、また AP-1 と NF- $\kappa$ B の経路は互いに独立していることを示唆している。さらに、スーパーシフトアッセイにおいて、NF- $\kappa$ B

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

の結合配列には p50 と p65 のヘテロダイマー、あるいは p50 と c-rel のヘテロダイマーが結合していることが示された。

以上の結果から、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- $\kappa$ B 依存したシグナル経路により誘導されることが明らかとなった。また、この経路には HSP90 が必須であり p38 と NF- $\kappa$ B の経路がそれぞれ独立してシグナルを伝達することが示された。これらことから、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- $\kappa$ B の上流で機能していることが示唆された。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る。

#### E. 結論

マクロファージスカベンジャー受容体を介した細胞内シグナル伝達について、次のことを明らかにした。

- (1) タイプ A スカベンジャー受容体に特異的なリガンドであるフコイダンは、マクロファージからの一酸化窒素産生を誘導することを明らかにした。
- (2) 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- $\kappa$ B に依存することを明らかにした。また、p38 と NF- $\kappa$ 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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)

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)

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

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

(2002)

2. 学会発表

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

## 単球泡沫化機構の調節に関する研究

分担研究者 田中良哉（産業医科大学 教授）

### 研究要旨

粥状動脈硬化組織では、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（SCR）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。今回、ケモカイン MCP-1 は、単球に対して、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事が示された。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 CD44 は、単球表面に大量に発現し、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。

### 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。報告者らは、単球の動脈硬化性炎症部への遊出機構に関して、ケモカインの役割などを中心に研究してきた。本年度は、単球が酸化 LDL 刺激などによって泡沫化マクロ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。

### A. 研究方法

- ① 無刺激単球は、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。
- 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洋一郎博士担当）。CD44 抗原の刺激は、特異抗体と二次抗体による架

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

橋刺激により行った。ヒアルロン酸は、無処理のヒアルロン酸、および、酵素処理精製低分子量ヒアルロン酸を用いた（生化学工業東京研究所より供与）。

- ③ 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。
- ④ 酸化 LDL の取り込みは、<sup>125</sup>I 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。
- ⑤ 単球の細胞遊走活性は、ボイデンチンバー法を用いて行った。

（倫理面への配慮）

該当事項なし。

## B. 研究結果

### 1. 酸化 LDL と MCP-1 による単球泡沫化機構について

- ① CD36 と CD68 は、静止期単球には発現しないが、酸化 LDL のみならず、ケモカイン MCP-1 刺激によって、これらの発現が 12 時間以内に著明に誘導された。
- ② MCP-1 は、<sup>125</sup>I 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した。
- ③ MCP-1 のみならず酸化 LDL にも、

単球に対する細胞遊走活性が検出され、両者間には相乗作用も観察された。

- ④ MCP-1 や酸化 LDL は、単球増殖活性を有さなかった。
- ### 2. CD44 とヒアルロン酸による単球泡沫化機構について
- ① 静止期単球は、CD44 を細胞表面に高発現した。
  - ② 静止期単球における CD36 と CD68 の発現は、CD44 を特異抗体と二次抗体で架橋刺激する事により、12 時間以内に著明に誘導された。
  - ③ CD36 と CD68 の発現は、低分子量ヒアルロン酸刺激によっても誘導された。特に、6.9 kDa ヒアルロン酸フラグメントが強力で、この刺激は CD44 阻害抗体の添加により抑制された。
  - ④ CD44 の抗体による架橋形成刺激のみならず、低分子量ヒアルロン酸の添加によって、<sup>125</sup>I 標識酸化 LDL や Oil-red-O の単球への取り込みが誘導された。
  - ⑤ 低分子量ヒアルロン酸添加により、単球に対する細胞遊走活性が検出され、この活性は CD44 阻害抗体で抑制された。
  - ⑥ CD44 架橋刺激やヒアルロン酸は、単球増殖活性を有さなかった。

### C. 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、サイトカインや細胞外基質などの細胞周囲環境の酸化 LDL 機能発現に対する影響は不詳である。単球が血管内から動脈硬化組織に遊出する際、或いは、組織内に於いて単球が機能する部位へ移動する際、遊走活性因子が機能的役割を有し、ケモカイン MCP-1 は、最も代表的な単球の遊走活性因子である。本研究では、MCP-1 のみならず、酸化 LDL、さらには、代表的細胞外基質構成成分であるヒアルロン酸とその受容体 CD44 を介する相互作用が、単球に対して遊走活性を有する事が明らかとなった。

一方、単球が泡沫化する過程においては、酸化 LDL などの脂質が取り込まれる必要があるが、静止期単球には酸化 LDL などと結合する CD36 や CD68 などの SCR が全く発現していない。ケモカイン MCP-1 は、細胞遊走活性のみならず、SCR の発現誘導を介して酸化 LDL の取り込み、引いては、単球泡沫化を誘導することが示された。さらに、ヒアルロン酸などによる単球表面の CD44 刺激も、SCR の発現誘導を介して酸化 LDL の取り込みを引き起こすことが示された。その際、高分子量にヒアルロン酸ではなく、動脈硬化巣などの炎症部に大量に産生されるヒアルロニダーゼによって酵素

分解された低分子量ヒアルロン酸がより、有効な刺激を齎す事が示唆された。

以上、単球が血管内から動脈硬化組織へ遊出し、泡沫化マクロファージに分化する過程において、酸化 LDL のみならず、ケモカイン MCP-1 による刺激、さらに、細胞外基質ヒアルロン酸と細胞表面 CD44 を介する刺激によって、調節される事が明らかとなった。すなわち、MCP-1、CD44、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。

### D. 結論

ケモカイン MCP-1 は、単球に対して、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事が示された。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。



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

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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Tanaka Y: The role of chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Drugs Today* (2001) 37, 477-484.
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* (2001) 35, 299-307.
5. 田中良哉: ケモカインと炎症性疾患. *現代医療* (2001) 33, 131-137.
6. 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 protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* (2002) 160, 281-288.

7. Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y: Autocrine induction of the human prointerleukin 1  $\beta$  gene promoter by interleukin 1  $\beta$  in monocytes. *J Immunol* (2002) 168, 1984-1991.

2. 学会発表

1. 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

## 血管壁に沈着する老廃物の酸素ラジカルによる変性

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 助教授）

### 研究要旨

動脈硬化に低比重リポタンパク (low density lipoprotein; LDL) の酸化が関与しているとの仮説は一般的に受け入れられているが、その機構は明らかにされていない。dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) や dihydrorhodamine 123 (DHR 123) などの蛍光色素は細胞中の酸化状態を解析する手段として非常によく用いられているが、これらのプローブは選択性が低くまた、水溶性であるため、両者とも LDL 中で起こる脂質過酸化反応の追跡には適さない。

ジフェニルピレニルフォスフィン (DPPP) は無蛍光の脂溶性物質であるが、過酸化物質と特異的かつ量論的に反応して蛍光を発する性質を有する。そのため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた脂質過酸化物質の分離定量の検出試薬として使用された。また、細胞を DPPP で標識してマウス好中球または U937 の細胞膜の酸化を測定するのに用いられた。DPPP は量論的反応により蛍光を発するので特異性が高く、蛍光の減少ではなく増加により脂質過酸化を評価できるので、培養細胞系など、多くの物質が共存している系でも検出できるという利点がある。本研究では DPPP を LDL に組み込むことに成功し、培養細胞内外の酸化の追跡に有用であることを示した。また、細胞内小器官に特異的な蛍光プローブとの共染色により酸化 LDL がリソソームに局在することを示した。

### A. 目的

本研究は低比重リポタンパク (low density lipoprotein; LDL) の酸化が動脈硬化巣の進展に深く関わるという仮説に注目し、培養細胞中における LDL の酸化を DPPP を用いて非破壊的・視覚的に検出することを目的に行った。

### B. 研究方法

#### LDL への NBD, DPPP (=0) の取り込み

DPPP と 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3 $\beta$ -ol (NBD) は 2.5 mM、Pluronic F-127 (Molecular Probe) は 10% となるように DMSO 溶液を調整し、それを 2 mg/ml LDL PBS (pH=7.4) 溶液

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

それを 2 mg/ml LDL PBS (pH=7.4) 溶液に 2 % 加えた。37°C, 20 min インキュベートして取り込ませた後、上記と同じ方法で超遠心分離し、LDL バンドを回収した。PD-10 カラムにより LDL の溶媒を PBS, 100  $\mu$ M EDTA に置換し、Ultra free 4 (Millipore) を用いて 10-20 mg/ml まで濃縮した。DPPP を添加してからのすべての作業は遮光して行った。目的によっては DPPP の代わりに DPPP=0 を同様の方法で LDL に取り込ませた。

CHO 細胞中での NBD, DPPP (=0)-LDL の酸化測定

NBD および DPPP (=0) で標識した LDL (0.1  $\mu$ M) を CHO 細胞に添加し、F-12 medium で 0 ~ 8 時間培養した。2 時間おきに培養液および細胞中の DPPP=0 と NBD の蛍光を蛍光分光光度計で測定した。

DPPP-LDL の細胞内での局在の調査

細胞に DPPP を添加した場合、細胞内での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。細胞の内部を十分に観察するため対物レンズは 40 倍の油浸レンズを用いた。細胞を培養するには安価なプラスチックが多用されているが、UV を吸収してしまうという難点があるため、本研究ではプラスチックの底が一部くりぬかれて、クォーツになっている glass-

base dish (Iwaki) を用いることとした。共染色の試薬として以下の蛍光プローブを用いた。

リソソーム ; LysoTracker Green DND-26  
ミトコンドリア ; Rhodamine 123  
ゴルジ体 ; BODIPY FL C<sub>5</sub>-ceramide  
核 ; Hoechst 33342  
小胞体 ; carbocyanine DiOC<sub>4</sub>

蛍光顕微鏡と CCD カメラによる画像取得も試みた。励起・バリアフィルターおよびダイクロイックミラーの選択についてであるが、以下の 3 パターンで標識 LDL 添加細胞での蛍光および無添加細胞でのバックグラウンドを比較検討した。

1. 励起フィルター BP350 / ダイクロイックミラー 365 / 蛍光フィルター BP390
2. 励起フィルター G365 / ダイクロイックミラー 395 / 蛍光フィルター LP420
3. 励起フィルター BP350 / ダイクロイックミラー 365 / 蛍光フィルター LP420

蛍光顕微鏡の画像はモノクロ CCD カメラで 1s 蓄積した後デジタル化し、パソコンに取り込んだ。それで得られたモノクロ画像は Adobe Photoshop を用いて画素数・明るさ・コントラストを調整した。コントラスト処理によってもわかりにくい場合はさらに、NIH image をもちいて蛍光強度に応じて擬似カラーを着色した。

C. 結果

LDL 中の蛍光プローブの蛍光測定

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

LDL に NBD および DPPP または DPPP=0 を取り込ませた後、LDL の蛍光強度を測定した（表 1）。また、これらの標識 LDL 0.1  $\mu$ M を 10  $\mu$ M MeLOOH と 37°C, 15 min 反応させると DPPP を取り込ませた LDL で DPPP=0 の蛍光強度が増加した。DPPP=0 を取り込ませた LDL ではほとんど変化がなかった。両 LDL において NBD の蛍光強度はほとんど変化がなかった。また、DiI と比べて NBD の蛍光は大きいため、充分測定に用いることができると考えられた。このことから、NBD の蛍光を指標にすることで、酸化と無関係な LDL の量を測定できること、DPPP を取り込ませた LDL の DPPP=0 の蛍光を測定することで酸化の度合いを評価できることがわかった。

表 1 NBD, DPPP(=0)標識 LDL の MeLOOH 酸化前後の蛍光強度

標識の種類	酸化前	
	DPPP=0	NBD
NBD, DPPP	3030	468
NBD, DPPP=0	8015	467

酸化後	
DPPP=0	NBD
9743	426
9475	454

CHO 細胞中での NBD, DPPP(=0)-LDL の酸化測定

CHO 細胞中および培養液中における NBD の蛍光量は DPPP-LDL と DPPP=0-LDL で差がないことがわかった。このことから標識の種類により細胞に取り込まれる LDL の量は変化がないということが結論できた（図 1）。

また、2, 4 時間後の細胞内の蛍光を蛍光顕微鏡で観察し、CCD カメラで取り込んだ（図 2）。この時の細胞内の DPPP=0 の蛍光が時間的に増加すること、DPPP=0-LDL を添加した細胞での蛍光は DPPP-LDL を添加したものより大きいことなど、図 7 の蛍光強度での結果と対応する視覚的像が得られた。したがい、DPPP=0 の蛍光像は細胞内の実際の DPPP=0 の量と対応しており、半定量的に取り扱えるということがわかった。また、貪食細胞ではない CHO 細胞では取り込まれた LDL は細胞内であまり酸化がすすまないことがこの結果から伺われる。

昨年報告したとおりマウス腹腔マクロファージに DPPP-LDL および DPPP=0-LDL を添加した際、添加 2 時間後では細胞の蛍光が大きく違うにもかかわらず、4 時間後ではほぼ同等となっている。細胞内に取り込まれる両者の量が変わらないことを鑑みると DPPP=0 の蛍光が増加するのは、マクロファージ細胞内で酸化が進行しているのを反映していると考えられることができる。