

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

DPPP-LDL の細胞内での局在

共焦点顕微鏡を用いて細胞内局在の測定をおこなった。マウス腹腔マクロファージに 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DPPP=0-LDL を添加し、4 h インキュベート後、1 μM の lysotracker DND-26 および carbocyanine DiOC₄ を添加してさらに 30min インキュベートし、共焦点顕微鏡を用いてそれぞれの蛍光を測定した。得られたモノクロ画像に擬似カラーを着色した。しかし、DPPP=0 の蛍光は十分な強度得られず、局在までは測定できないことがわかった。

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

フィルター1は蛍光の絶対強度が低すぎること、フィルター2ではバックグラウンドがやや高いことからフィルター3がもっとも測定に適しているとの結論に達した。

次にTHP-1細胞に各種局在マーカーの蛍光を添加して蛍光顕微鏡像を調べた。核(青)、リソソーム(緑)、ER(赤)、DPPP=0(青)の4種類添加した場合、核とリソソーム、ERの染め分けは良好であったが、核の染色とDPPP=0の蛍光が重なってしまった。DPPP=0は核には局在しないことがわかっているため、Hoechst33342は今後

使用しないこととした。ゴルジ体(緑)、ミトコンドリア(赤)を添加した場合、ミトコンドリアの局在は明らかにDPPP=0と重ならないことがわかった。

DPPP=0はリソソームに局在する可能性があるため、その点を明らかにするためにHUVECをDPPP=0-LDLおよびLysotracker^Rと共染色した。0.1 μM のDPPP=0-LDLで6時間、1 μM のLysotrackerで0.5時間培養した後、細胞をPBSで洗浄し、HBSS(10% FBS)を添加した。これを上記のフィルター2の設定で蛍光顕微鏡で観察し、CCDカメラで取り込んだ。その結果、DPPP=0の細胞内染色パターンとlysosomeを特異的に染色する試薬であるLysotrackerの細胞内染色パターンが似ていることが明らかとなった(図3)。したがって、DPPP=0はlysosomeに局在している可能性が高い。これは、LDLがレセプターから取り込まれてendosomeからlysosomeに輸送されることを考えると妥当な結果だと思われる。

D. 結論

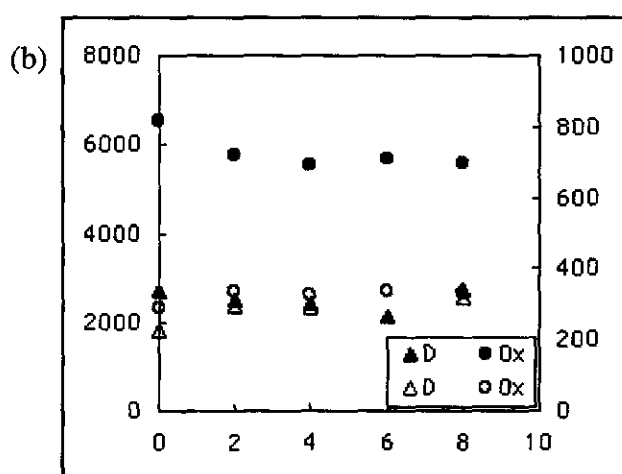
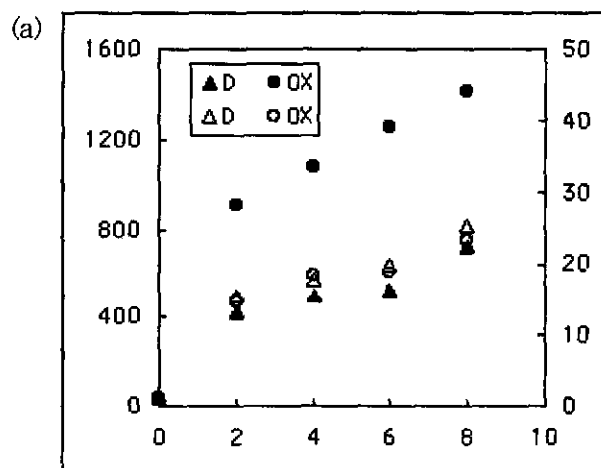
DPPPでLDLを染色することにより、*in vitro*においてLDLの酸化を非破壊・簡便に検出することが可能となった。経時的な測定が可能な本方法により初めてLDLが細胞内で酸化している可能性を示すことができた。DPPPの性

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

質として第一に高感性が挙げられる。LDLの酸化については検出は100 nMで十分に行うことができ、その際10 nM～1000 nMの範囲の脂質過酸化物が測定できた。また、ごく微量の脂質過酸化物を定量したいという場合を除きLDLの濃度は10 nM程度でも測定できる。第二の性質は簡便性である。本法では細胞抽出液または培養液を蛍光セルに入れるだけで脂質過酸化が測定できる。これは抽出してHPLCで分析する方法と比較すると格段に操作が少ないため、操作中の酸化を最低限に抑えることができる。第三の性質は可視化できる点である。脂質過酸化を蛍光の増加により可視化できるため細胞を培養した状態のまま連続的に顕微鏡で観察することができる。系を破壊しないで脂質過酸化の様子を視覚的に表現できるということはより生理的な環境での脂質過酸化を検出できることにつながる。

このような性質から、本法の応用として第一に考えられるのは混合培養系、組織、個体での細胞膜またはLDLの脂質過酸化の可視化である。これらの系では細胞の遊走、LDLの細胞内や細胞外組織の滞留等の理由で対象物を単離することが困難であることが予想される。その場合非破壊的に蛍光を観測するという方法は非常に有効となろう。

動脈硬化モデルに本法を適用することにより動脈硬化の進展にLDLの酸化がどのように視覚的に捕らえることができるものと期待される。



(a) 細胞中の蛍光、(b) 培養液中の蛍光

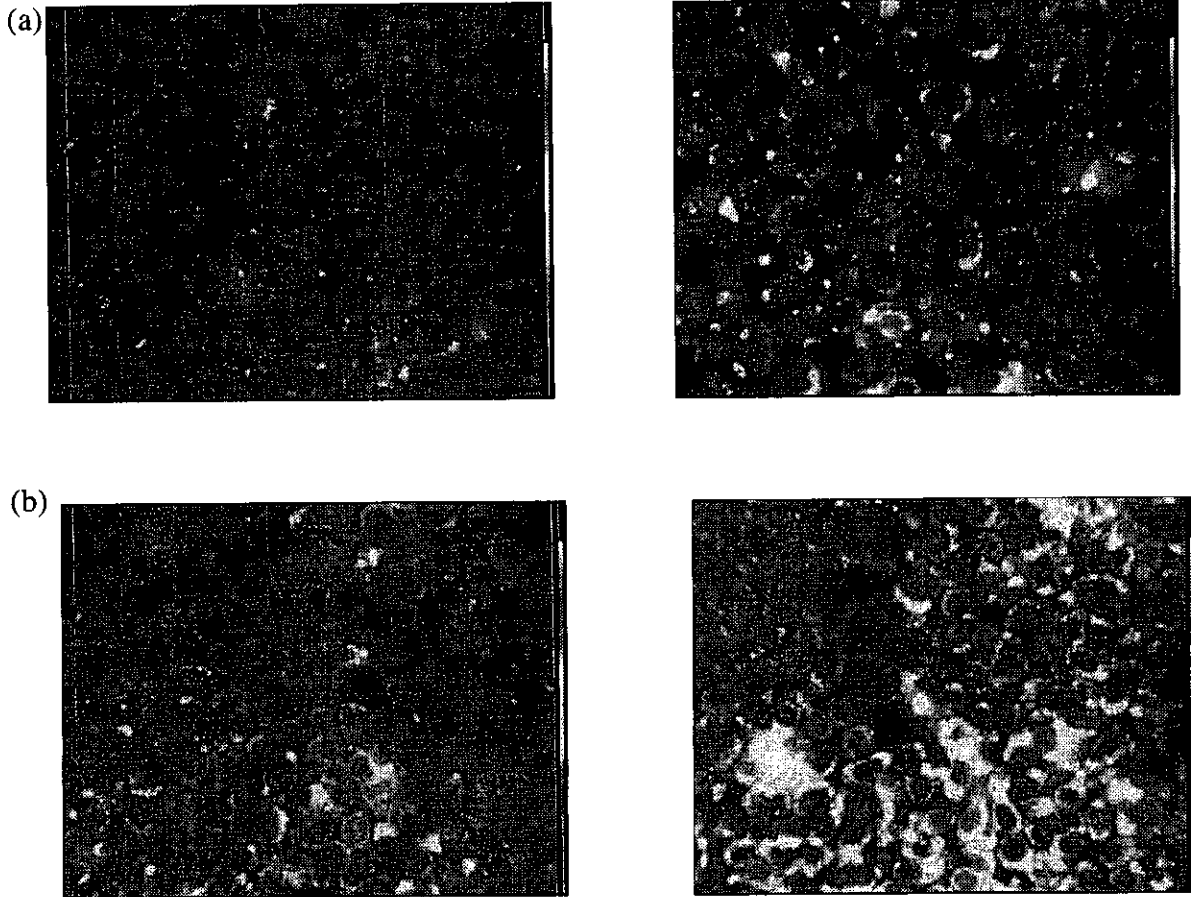
- ▲ DPPPP-LDL中のDPPPP=0の蛍光
 - △ DPPPP=0-LDL中のDPPPP=0の蛍光
 - DPPPP-LDL中のNBDの蛍光
 - DPPPP=0-LDL中のNBDの蛍光
- を示す

図1 CHO細胞にDPPPP(=0)-LDLを添加した際の細胞中および培養液中の蛍光強度の変化

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

DPPP-LDL

DPPP=O-LDL

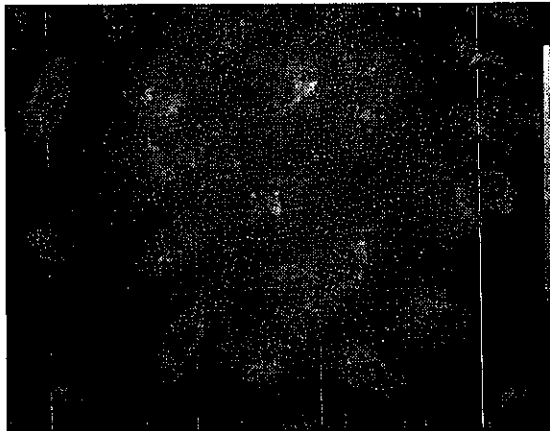


(a) 細胞中の蛍光、(b) 培養液中の蛍光

▲ DPPP-LDL中のDPPP=Oの蛍光

図2 CHO細胞にDPPP(=O)-LDLを添加した際の細胞中の蛍光像

DPPP=Oの蛍光



Lysotrackerの蛍光

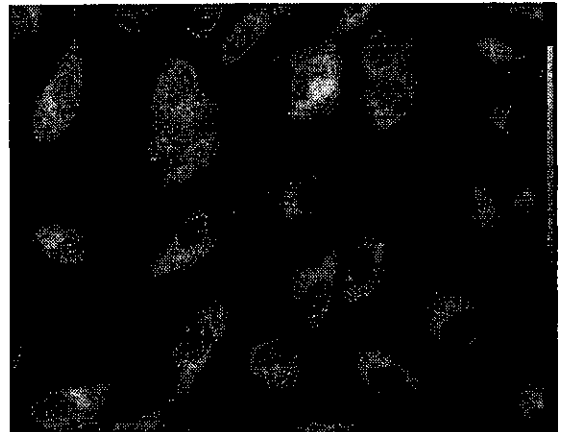


図3 HUVECにDPPP=O-LDLおよびLysotrackerを添加した際の細胞中の蛍光像

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
間藤方雄、竹内公一、 児玉龍彦	脳血管周囲細胞 (Mato cell)	内科	第88巻 第2号	376 -378	2001
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ラットに見られる脳細動脈の構築変化とMTO(FGP)細胞の経時的変化に関する研究	動脈硬化	28 (6)	137 -141	2001
Tomoko Nakazawa, Megumi Nishikawa, Eizo Aikawa and Masao Mato	In Vitro characterization of Mato's FGP cells isolated from rat cerebrum	Neuroscience Letters	317	127 -130	2002
Masao Mato,Koichi Takeuchi,Shigeo Ookawara,Ken-ichi Ogura et al.	Inclusions in novel perivascular macrophages(Mato's fluorescent granular perithelial cells) and neurons in the cerebral cortex of Hex A- and Hex B-deficient mice	Acta Neuropathol	103	119 -130	2002
Toshinobu Nakamura, Jun-ichi Hinagata, Youichiro Wada, Tatsuhiko Kodama , Takefumi Doi et al.	HSP90,HSP70 and GAPDH Directly Interact with the Cytoplasmic Domain of Macrophage Scavenger Receptors	Biochemical and Biophysical Reserch Communications	290	858 -864	2002
Shinichiro Mine, Takahiro Tabata , Youichiro Wada. Takeshi Fujisaki,et.al	Oxidized low density lipoprotein -induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway	Atherosclerosis	160	281 -288	2002
Shinichi Mashiba.Youichiro Wada,Motohiro Takeya	In vivo Complex Formation of Oxidized α 1-Antitrypsin and LDL	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	21	1801 -1808	2001
Ryu-ichiro Tomokiyo, Katsunori Jinnouchi, Makoto Honda et al.	Production,characterization,and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors	Atherosclerosis	161	123 -132	2002