

厚生労働科学研究費補助金
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14年度 研究報告書
主任研究者 児玉 龍彦

平成15（2003）年 4月

目 次

I. 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	-----	1
児玉 龍彦		
II. 分担研究報告書		
1. マクロファージの接着潜り込み、分化機構		
一動脈硬化誘発因子を同定するための複合刺激混合培養系	-----	8
児玉 龍彦		
2. マクロファージの泡沫化機構	-----	13
内藤 眞		
3. マクロファージに於ける遺伝子調節、新規治療薬開発		
一マクロファージの分化、泡沫細胞形成に関与する転写因子の発生及び病態への関与	-----	17
土井 健史		
4. 単球泡沫化機構の調節に関する研究	-----	19
田中 良哉		
5. 血管壁に沈着する老廃物酸素ラジカルによる変性	-----	23
野口 範子		
6. 脳血管に於けるマクロファージ		
一脳卒中および脳浮腫モデル動物における間藤細胞の変化と役割	-----	28
竹内 公一		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別添 1~3

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 特任教授

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、網羅的発現解析によってマクロファージ分化と血管平滑筋細胞の脂質蓄積に伴う遺伝子発現変化を明らかにしてきたが、今年度は新規作成された各種核内受容体抗体を用い、病変での発現や動脈硬化発現における寄与を検討した。さらに、今年度は変性脂質構成分子による内皮細胞からのケモカイン誘導と、動員された単球細胞の挙動をさらに詳細に検討した。脳血管における泡沫細胞の役割については経時的变化があらたに明らかになった。in vitroでの泡沫細胞形成装置はさらに改良が進み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なが作成された。以上、本研究では大動脈、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した。

○児玉 龍彦

（東京大学先端科学技術研究センター特任教授）

内藤 眞（新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授）

土井 健史（大阪大学大学院薬学研究科 教授）

田中 良哉（産業医科大学第一内科 教授）

野口 範子

（東京大学先端科学技術研究センター 特任助教授）

竹内 公一（自治医科大学医学部 助手）

lysophosphatidylcholine (lysoPC), 4-hydroxynonenal (4-HNE) それぞれに対する内皮細胞の応答を遺伝子発現レベルで解析した。

2. 田中はケモカイン MCP-1 や細胞外基質ヒアルロン酸の受容体 CD44 を介する刺激が、単球に対して、スカベンジャー受容体の発現、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を報告したので、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 を介する刺激が単球の遊走、SCR の発現、酸化 LDL の取り込みをに及ぼす役割を検討した。一方 MCP-1 は動脈硬化組織で大量に産生されるが、血清 MCP-1 値は血清総コレステロール値、及び、血清中性脂肪値と良好な相関傾向を呈する。さらに健常人、耐糖能異常者、糖尿病患者の血清 MCP-1 値は、HbA1c 値、及び、グリコアルブミン値と良好な相関を示し、糖尿病を併発しない高脂血症患者よりも糖尿

A. 研究目的

1. 動脈硬化発症の重要な因子とされる低比重リポタンパク (low density lipoprotein; LDL) の酸化生成物は様々な生物学的活性をもち動脈硬化の進展に大きく寄与すると考えられる。野口はこれら酸化生成物が内皮細胞に及ぼす影響を DNA チップを用いて遺伝子発現レベルにおいて解析し、動脈硬化進展に重要な経路を明らかにするため、主要な酸化生成物である、7-ketocholesterol (7-keto), 22-hydroxycholesterol(22OHch), 25-hydroxycholesterol (25-OHch),

病患者に於いて、血清 MCP-1 値は有意に高い傾向を呈した。また、糖尿病患者の合併症重症度は、血管壁における後期糖化反応生成物 AGE（advanced glycation endproducts）の蓄積量と相関するので、無刺激のヒト単球を用いて AGE の SCR の発現と酸化 LDL 取り込みに及ぼす影響を検討した。さらに、脂肪組織由来の抗糖尿病、抗動脈硬化因子であるアディポネクチンが及ぼす影響を併せて検討した。

3. 内藤は、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。しかし、スカベンジャー受容体による脂質取り込みと蓄積に関わると考えられている核内受容体の組織発現については良い抗体が極めて少ないことから不明の点が多かった。そこで、本研究では、児玉による核内受容体すべてに対する抗体作製プロジェクトを基盤に、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、マクロファージの泡沫細胞化機序を解析した。

4. 核内受容体 PPARs（peroxisome proliferator-activated receptors）は、転写因子として作用するが、糖、脂質代謝、炎症等、生体制御に重要な役割を果たしていることが知られている。また最近、動脈硬化発症への関与において注目されている。本研究において土井は、この因子の発現による細胞内での遺伝子変動、標的遺伝子の探索を通じて、泡沫細胞形成、動脈硬化病変の伸展における新たな分子機構を明らかにし、新規な抑止策を見い出すことを目的とした。

5. 脳血管の病変において、脳細動脈周囲隙（Virchow-Robin 腔）に存在する perivascular macrophage（FGP 細胞；間藤細胞）が果たす機能は重要であるが、間藤細胞に注目した研究は未だ限られている。

そこで、竹内は老化や高血圧にみられる脳実質内の細動脈の血管壁の構築の変化を連続的に明らかにするため、SHR-SP ラットにおける血管破綻を示す前後の間藤細胞を中心に観察した。特に、血管周囲腔の拡大にともなう間藤細胞の移動と血管壊死および血管腔狭小化との関係を詳しく検討するため、細動脈分岐部を中心に形態学的に検討した。また、凍結障害による血管性脳浮腫モデルでの、間藤細胞の清掃細胞として機能について、特にライソソーム系の細胞内小器官に属する特徴的な細胞内顆粒の変化に焦点をあてて観察した。

6. 児玉は、ウサギ大動脈からの初代培養法を確立し、ヒト白血球を加えて動脈硬化病変を再現する混合培養系を確立し、システムにおいて変性 LDL を用いた動脈硬化モデルが形成されることを報告したが、生理的な LDL によってはどのような高濃度でも病変形成を認めなかった。さらに低酸素刺激によって平滑筋への脂質蓄積が促進すると、脂肪細胞で発現が認められる遺伝子群が誘導されることに加えて、動脈硬化病変進展プロセスに寄与すると考えられる遺伝子発現が認められたので、低酸素環境が動脈硬化促進因子であることが推察された。しかし、これら遺伝子の発現亢進が病変形成と直接関与していることを示すには、その作用対象である細胞が共存する培養系において泡沫細胞形成を直接観察する必要がある。そこで、生体内の血管壁で観察される低酸素、流体力学的刺激、および脂質負荷等複数の環境因子を従来の混合培養系に付加しつつ、血管壁の主要細胞を同時に培養するシステムを作成して、血管内と同様の泡沫細胞形成をより詳細に解析することを試みた。

B. 研究方法

野口はヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) に 5

～50 μM の 7-keto, 22OHch, 25-OHch, lysoPC, 4HNE それぞれを添加して酸化生成物の内皮細胞に対する毒性を検討した。また, HUVEC に 7-keto, 22OHch, 25-OHch はそれぞれ 10 μM , lysoPC は 30 μM は 4-HNE 5 μM を添加し, 1, 4, 24 時間後に細胞を回収, RNA を抽出した。Gene Chip (Affymetrix) を用いて遺伝子発現を解析した。Bioplex (Biolad) を用いて Interleukine 6 (IL6), Interleukine 8 (IL8), MCP-1 を含む 14 種類のサイトカインを同時定量した。

田中は, 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。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, 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。

内藤は, 抗体は RXR (Retinoid X Receptor) α , ROR (RAR-related Orphan Receptor) α , PXR (Pregnane X receptor) 2, PXR1, PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) γ , ER (estrogen receptor), PR (progesteron receptor), VDR (Vitamin D receptor) および MR (mineralocorticoid receptor) に対する抗体を使用し, 剖検例 10 例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。Isobe らの方法で内因性ペルオキシダーゼを阻害し, 免疫染色を行った。上記の一次抗体を使用し, 二次抗体には anti-mouse Ig-horseradish peroxidase-like F(ab)2 fragment (Amersham, Little Chalfont, UK) を用いた。3,3-diaminobenzine (DAB; Dojin chemical Co., Kumamoto, Japan) を用いて可視化した後ヘマトキシリンにて

核染を行い, 検鏡した。

土井は, PPARs (α , δ , γ) をそれぞれ発現誘導できる細胞株を Tet-Off の系を用いて作成し, その発現誘導, 及びリガンド添加により, どのような遺伝子変動が生じるかを, DNA チップを用いて解析した。さらに, これら PPARs がどのような応答配列に結合するかをランダム DNA 配列ライブラリーをスクリーニングすることにより調べた。以上より得られた情報を基に, 応答タンパク質のマクロファージや泡沫細胞における発現を調べ, また生理機能を探究した。

竹内は, 様々な週齢の SHR-SP ラットを用い, 主として透過電子顕微鏡で観察した。特に, 細動脈分岐部について詳細に観察した。また, 間藤細胞の機能を知るために, HRP (horseradish peroxidase) の経静脈投与を行いその摂取能調べるとともに, 膜抗原の変化を免疫組織化学的に検討した。また, ウィスターラットの頭頂骨をドリルで開き, ドライアイスによる凍結障害を 20 分加えた。凍結障害部から 2 から 4 mm の部位の間藤細胞を中心に, 凍結障害後 5 時間から 2 週間において観察した。通常の透過電子顕微鏡観察の他, 経静脈投与された HRP の取込み, および免疫組織化学染色について観察した。ライソソーム酵素であるカテプシン D に対する包埋後免疫電顕を金コロイド法で行い, 定量的に評価した。

児玉は 6-well chemotaxis chamber にウサギ大動脈から初代培養した平滑筋細胞, コラーゲンマトリックス, および内皮細胞を層状に培養して種々の実験を行っていたが, このシステムにおいて, 内皮細胞には層流および乱流刺激を加え, 平滑筋細胞には低酸素刺激を加える環境下で, 内皮細胞側から高濃度 LDL および単球細胞を添加する培養系を考案した。

（倫理面への配慮）

ヒト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た。

C&D.研究結果と考察

野口は、細胞に添加する酸化生成物の濃度条件を検討した後、酸化生成物それぞれによって、ストレス応答性の遺伝子、血管形成に関連する転写因子、血液凝固系の遺伝子などが特異的に誘導されることを明らかにした。数多くかつ強く遺伝子発現を誘導したのは lysoPC と 4-HNE であった。4-HNE で誘導される遺伝子の特徴は heat shock protein 70 を代表とするストレス応答蛋白が中心であったのに対して、lysoPC は血管形成に関連する転写因子など興味深い遺伝子の発現誘導が見られた。共通に誘導される遺伝子の中には solute carrier family の SLC7A5 と SLC3A2 があり、これらはヘテロダイマーを形成して中性アミノ酸を取り込む蛋白である。細胞内に取り込まれるがアミノ酸と競合して蛋白合成を阻害する 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH) を添加した実験から、HUVEC では取り込まれたアミノ酸は IL6 や IL8 などのサイトカイン産生に使われることが示された。さらにこのアミノ酸は接着分子の産生にも寄与している可能性がある。LDL の酸化生成物による内皮細胞の網羅的遺伝子解析により動脈硬化発症のあらな促進機序が明らかになった。この遺伝子の発現メカニズムや発現亢進と動脈硬化発症の関連については今後の検討課題である。

田中は、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 を介する刺激が単球の遊走、SCR の発現、酸化 LDL の取り込みをに及ぼす役割を検討したところ、いずれも増強して泡沫化マクロファージへの細胞分化を誘導することを明らかにした。AGE 刺激によりヒト無刺激単球上の SCR の発現、酸化 LDL や oil-red-O の取り込みが 24 時間以内に増強し、PKC を介する刺激伝達系の関与が示唆された。また、AGE 刺激による SCR 発現と酸化 LDL 取り込みは、CD44 刺激により更に増強し、脂肪細胞由来のアディポネクチン処理により、阻害された。糖尿病に併発する動脈硬化症は予後規定の最重要因子であるが、その形成過程には、MCP-1、AGE、細胞外基質による刺激により誘導された内膜下集積泡沫化マクロファージを中心とする炎症病態が関与する事が示された。AGE は単糖の産物で、ヒアルロン酸は 2 糖で構成されるオリゴ糖であり、血管壁に沈着した単糖生成物と細胞外基質のオリゴ糖が単球の泡沫化と粥状動脈硬化を相加的に齎す事という結果は、糖尿病に併発する動脈硬化の病態形成過程において極めて興味深い機構と考えられた。また、アディポネクチンにより CD44/AGE 刺激による単球泡沫化が軽減したので、アディポネクチンが減少している 2 型糖尿病患者では、CD44 刺激を介した単球の泡沫化が進み、粥状動脈硬化の形成が促進される機構の存在が示されたので、脂肪組織由来のアディポネクチンが抗糖尿病効果のみならず、動脈硬化、更には、血管障害を抑制する可能性も示唆された。

内藤は、動脈硬化病変における核内受容体の発現を検討したところ、マクロファージや平滑筋には RXRa(Retinoid X Receptor)、ROR α (RAR-related Orphan Receptor)、PXR(Pregnane X receptor)、

総括研究報告書

PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)、ER(estrogen receptor)、PR(progesteron receptor)、VDR (ビタミンD受容体)、MR (mineralocorticoid receptor)などの核内受容体が発現していることを明らかにし、脂質蓄積と泡沫細胞化に関与することを実証した。核内受容体の多くはリガンドが不明であり、その機能も不明な点が多い。RXR, ROR, PXR等レチノイン酸関連の受容体の動脈硬化における発現はまだ報告がなく、泡沫細胞に見いだされたことはマクロファージの脂質代謝とこれら受容体の関連を示唆するものであるPPAR γ は脂肪細胞分化やグルコース代謝に関連するが、PPAR γ が泡沫細胞と平滑筋の両者に発現していたことは、この受容体が両細胞の脂質代謝に重要な機能を発揮することの反映と思われる。ビタミンD受容体はマクロファージの殺菌機能を亢進することが知られており、泡沫細胞にも発現していることから、マクロファージの分化と機能に深く関与していることが伺われる。MRはaldosteron受容体であるが、本研究では血管平滑筋に発現することが確認された。また、ERとPRはそれぞれエストロゲン、プロジェステロンの受容体であるが、両者は生殖器組織の他に、種々平滑筋での発現が知られており、動脈硬化の平滑筋でも発現が認められ、動脈硬化とホルモンの密接な関係がこの事実からも示唆される。核内受容体の中で、動脈硬化病変のマクロファージ、泡沫細胞、血管平滑筋に脂質代謝に関連が深いと思われるPPAR,のみならず、レチノイン酸関連受容体やvitamin D receptorなど多くの核内受容体の発現が見いだされたのは動脈硬化病変の形成機序に新たな視点を与えるものと考えられる。

免疫染色上病変への発現が確認され、動脈硬化症をはじめ生活習慣病への関与が指

摘されているPPARについて、土井はこれらのサブタイプ (PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 2、PPAR γ 3) の発現を制御できるHepG2細胞株を樹立した。ドキシサイクリン (Dox) 含有の培地で培養している間は発現が抑えられるが、Doxを除去することにより、それぞれのサブタイプの発現が誘導されるHepG2細胞を樹立する事ができた。Dox除去後、5日目にはPPARの発現が十分量みられたため、この時点でリガンド (fenogibric acid、GW501516、ciglitizone) を加え、24時間後に細胞を集め網羅的に遺伝子発現を検討した。HepG2細胞においては、脂肪細胞分化に関わる遺伝子 (adipsin、FABP4、C/EBPなど) の顕著な発現上昇は見られなかったが、脂肪酸の動態に関わる遺伝子としてFABP1やADRPなどの発現上昇がみられた。今後、これらの遺伝子発現変化を検証すると共に、その意義を明らかにしていく予定である。さらに、PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 2、PPAR γ 3に対して、それぞれ特異的に誘導される遺伝子、また共通に誘導される遺伝子などを調べることによって、PPARの生理機能や病態への関与が解明されると考えられる。

高血圧症に伴う脳細動脈の構築変化は、脳血管の障害に重要な役割を果たし、間藤細胞の機能変化に深い関係がある。そこで竹内は、SHR-SPラットにおける血管構築変化と間藤細胞を検討したところ、SHR-SPラットは、通常のラットと異なり、未だ高血圧を発症しない出生後10Wに於いて、既に膜抗原変化、異物摂取能の低下、脂質の蓄積、及びライソソーム活性の低下が認められた (Stroke 投稿中)。即ち、SHR-SPラットでは血管壁細胞に何等の異常を認めない時期、既に間藤細胞には形態学的に、その機能の低下のサインが現れていた。また、血管破綻前後の細動脈分岐部を中心に、主として形態学的に調べた結果、

同分岐部には、通常の血管壁には見られない多数の巨大な間藤細胞が集積していることが明らかとなった。また、血管性脳浮腫における間藤細胞を観察したところ、凍結障害による血管性脳浮腫によって間藤細胞は腫大し、経静脈投与された HRP の取り込みは、凍結障害後 5 時間には増加し、障害後 1 週間まで継続した。ライソソーム酵素であるカテプシン D は、開頭のみ処置では量的変動がみられなかったが、凍結障害による血管性脳浮腫にともなって、障害後 5 時間から 10 時間にかけてカテプシン D は増加した。その後、カテプシン D は減少に転じ、2 週間後には回復した。また、カテプシン D が減少している期間には、MHC class II、B7（特に B7-2）の発現増加が観察された。

以上のように、SHR-SP ラットにおける膜抗原変化、異物摂取能の低下、脂質の蓄積、及びライソソーム活性の低下という間藤細胞の変化は、高血圧発症や他の血管壁細胞の変化の以前にすでに認められ、血管壁の病変が間藤細胞の変化に依存していることを示した。また、間藤細胞が、血管構築の変化にともなって移動することを検討するとともに、血管分岐部に集積することを明らかにした。間藤細胞は一方で強い異物摂取能をもち、清掃細胞として機能している。凍結障害による血管性脳浮腫モデルでは、病変の進行による異物摂取能の増加に伴い、細胞内顆粒のライソソーム酵素であるカテプシン D は、増加の後、減少に転じ、かわって、免疫調節に関与する分子の発現増加が観察された。このように間藤細胞は、血管性浮腫の進行において、清掃細胞としての機能に加え、病変の進行を調節する役割を担っていることが明らかになった。

児玉は、より生理的な環境で泡沫細胞を生体外で再現するために、新規開発した培養装置を用いて、72 時間下室培養液に 3

mg/ml の終濃度で LDL を添加し、酸素分圧を 2% として前処理してから単球を添加し 7 日間培養を行った。終了後検体を固定し、HE 染色と CD68 染色を行った。この結果 LDL 負荷または低酸素培地を下室に使用した検体では内皮下に CD68 陽性細胞の蓄積が認められたが、LDL 負荷のみ、または低酸素培地のみを使用した検体ではこのような所見が認められなかった。また、同一検体を α -naphthyl butylate esterase によって染色したところ、CD68 陽性細胞が内皮下に蓄積していた検体では、陽性所見が認められ、マトリックス内での M ϕ 細胞の存在が確認された。現在までに得られる病理学的検討では、内皮下に蓄積する単球由来細胞の存在が確認されたが、フィルター上の平滑筋については細胞層を確認していない。切片作成においてフィルターと細胞という異なる硬度の物質を扱う際の技術的な課題によるものなのか、生体内でみられるように病変進展初期にみられる内膜肥厚後の平滑筋 apoptosis による細胞減少を反映しているのか、今後明らかにする必要がある。酸素分圧、力学刺激ともに生体内での状況を反映するために、多くの条件の検討がさらに必要である。とりわけ、shear stress と病変形成の因果関係は重要な課題でありシミュレーション情報と病理標本を比較することによって力学的刺激の寄与を検討することができると考えている。現在達成されている 1.18 dyn/cm² という値は一般的な動脈モデルの 15 dyn/cm² と比較すると少ない。病変易発生部位である血管分岐部でも数 dyn/cm² とされていることからこれを目標に構造上の改良を検討している。血管壁における LDL の変性過程も従来不明の点が多い。LDL が内皮層を通過する過程、マトリックスにおける変性過程についても本培養系による経時的観察が有用であると考えている。

E. 結論

動脈硬化発症との関係が強く疑われている LDL の酸化生成物の内皮細胞にたいする役割を明らかにするため、野口は内皮細胞の遺伝子発現について網羅的解析をおこなった結果、生成物の多くに共通してアミノ酸の取り込みを亢進してサイトカイン産生を上昇させることが明らかになり、動脈硬化促進における具体的な現象を確認することに成功した。

動脈硬化の病態形成過程に於いては、脂質酸化生成物の白血球に対する現象も同時に進行すると考えられるので、田中は無刺激のヒト単球を用いて AGE の SCR の発現と酸化 LDL 取り込みに及ぼす影響を検討したところ、AGE 刺激によりヒト無刺激単球上の SCR の発現、酸化 LDL や oil-red-O の取込みが 24 時間以内に増強し、AGE 刺激による SCR 発現と酸化 LDL 取込みは、CD44 刺激により更に増強することを明らかにし、その分子機序を解明した。糖尿病に併発する動脈硬化症は予後規定の最重要因子であるが、その形成過程には、MCP-1、AGE、細胞外基質による刺激により誘導された内膜下集積泡沫化マクロファージを中心とする炎症病態が関与する事が示された。さらに、脂肪細胞由来のアディポネクチンの動脈硬化進展における役割も示唆された。

血管壁内における泡沫細胞は脂質代謝に特徴があることはかねてより推測されていたが、内藤は動脈硬化病変のマクロファージや平滑筋には種々の核内受容体が発現していることを明らかにした。これは脂質蓄積と泡沫細胞化の関係を解明する上で今後重要な意義をもつと考えられる。

脳血管においては、通常の大動脈、冠動脈と異なり、間藤細胞の泡沫化を最大の特徴とする。竹内は SHR-SP ラットを用いて、高血圧発症や平滑筋細胞をはじめとする血管壁細胞の構築変化に先立って、間藤細胞

は変性が始まることを明らかにした。血管壁の構築変化に進むと、間藤細胞は移動能持つ他、血管分岐部に集積する。間藤細胞の変性による機能低下が、破綻や狭小化という脳細動脈の病変の出現に関与していると考えられ、間藤細胞を健全に維持することが、脳細動脈を正常に保つうえで重要であることを示した。

さらに凍結障害による血管性脳浮腫モデルでは、間藤細胞のエンドサイトーシス亢進と細胞腫大という変化にともなって、障害後早期に細胞内顆粒のライソソーム酵素が増加し、その後減少するが、減少に連動して免疫調節に関連する抗原が増加したので、間藤細胞は、脳血管性浮腫において、清掃細胞としての機能が早期に亢進することに加え、免疫調節細胞へと機能を変化させた。

本研究において各種動脈における動脈硬化形成過程を、脂質変性、内皮細胞の挙動変化、単球の動員から分化、泡沫化まで経時的に検討してきたが、さらにこれらの現象を血管壁システムにおいて再現し詳細に解明するために、児玉は低酸素下における平滑筋の動脈硬化誘発性遺伝子発現を導入した内皮細胞と単球マクロファージの混合培養装置を開発した。本培養装置は市販化を目指し現在特許申請中であるが、本研究によって明らかになった個々のプロセスを確認し、さらに介入的な実験を可能にすることによって今後新規治療薬の開発に寄与することができると考えている。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

動脈硬化誘発因子を同定するための複合刺激混合培養系

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 特任教授

研究要旨

- 成人死因の最大の原因の一つであるアテローム性動脈硬化の予防、治療法の開発は医学の最大の課題である。アテローム性病変の鍵となる細胞成分は脂質を蓄積した血液中の単球由来の泡沫細胞である。我々は1990年にマクロファージのスキャベンジャー受容体をクローニングし、泡沫細胞形成の分子生物学的研究の幕をあげ、発生工学とむすびつけてノックアウトマウスを用いた動脈硬化関連遺伝子の解析が進んだ。その後、血管生物学の進展から血管壁の内皮細胞と平滑筋細胞の起源、性質、相互作用からの動脈硬化研究が急速に進展した。今回の研究では、アテローム性病変の進展を血管の微小環境の内皮細胞と平滑筋細胞と血球の相互作用でシステムとして解明することを目標に、血管壁細胞の混合培養系による疾患モデル系のための機器開発を進め、またそのハイスループットでの情報取得系の検討を進めた。

A. 研究目的

我々は、ウサギ大動脈からの初代培養法を確立し、ヒト白血球を加えて動脈硬化病変を再現する混合培養系を確立し、システムにおいて変性LDLを用いた動脈硬化モデルが形成されることを報告したが、生理的なLDLによってはどのような高濃度でも病変形成を認めなかった。さらに低酸素刺激によって平滑筋への脂質蓄積が促進すると、脂肪細胞で発現が認められる遺伝子群が誘導されることに加えて、動脈硬化病変進展プロセスに寄与すると考えられるマトリックス蛋白、単球を呼び込むケモカイン、平滑筋の増殖を促す成長因子、内皮細胞に作用して血管新生を進める液性因子の産生亢進が認められた（図1）ので、低酸素環境が動脈硬化促進因子であることが推察された。しかし、これら遺伝子の発現亢進が病変形成と直接関与していることを示すには、その作用対象である細胞が共存する培養系において泡沫細胞形成を直接観察する必要がある。そこで、生体内の血管壁で観察される低酸素、流体力学的刺激、および脂質

負荷等複数の環境因子を従来の混合培養系に付加しつつ、血管壁の主要細胞を同時に培養するシステム（図2）を作成して、血管内と同様の泡沫細胞形成をより詳細に解析することを試みた。

図1. 泡沫細胞形成過程の細胞間相互作用

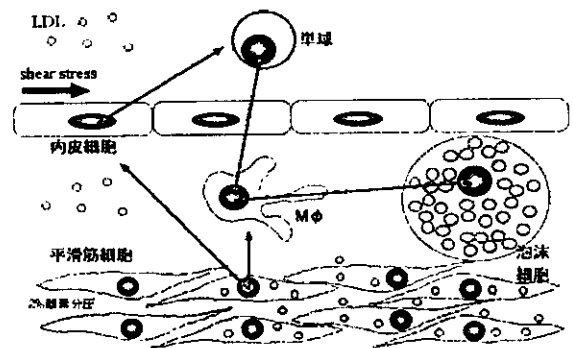


図 2. 3つの細胞を含み低酸素、高濃度 LDL、力学的刺激を併せた培養系の概念図。

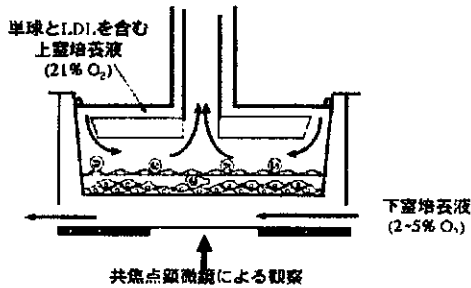
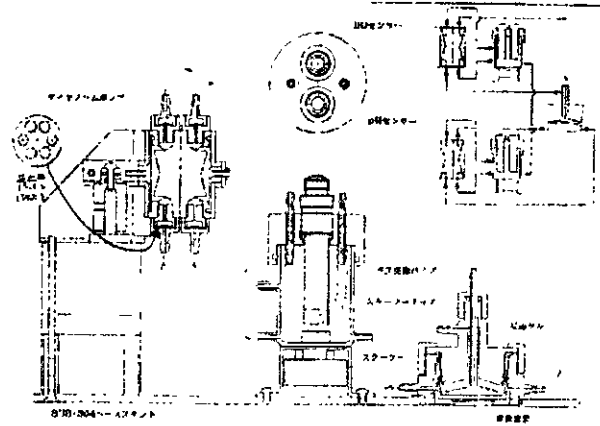


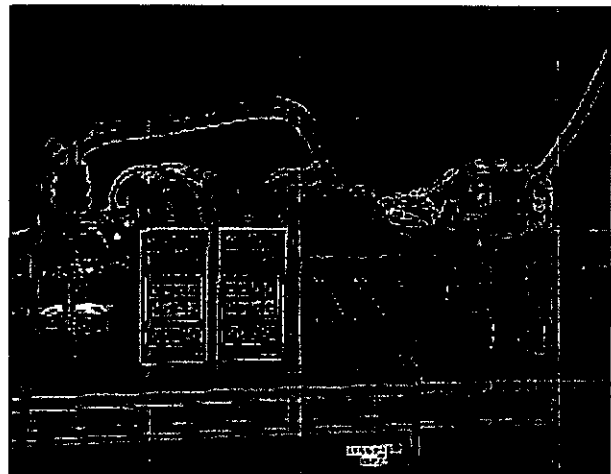
図 3. MK-2000 システム



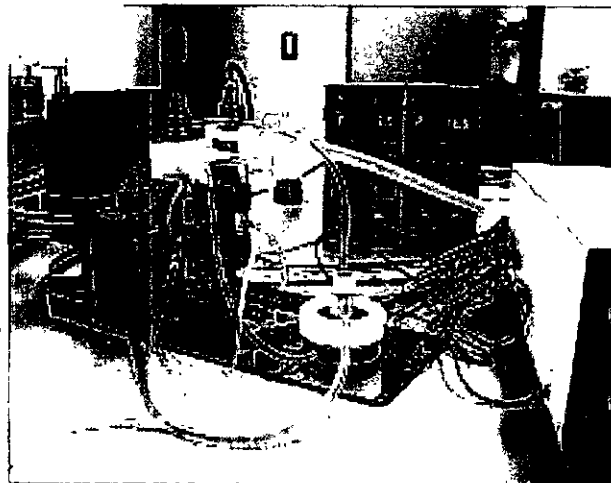
a; 設計図

B. 研究方法

従来我々は 6-well chemotaxis chamber にウサギ大動脈から初代培養した平滑筋細胞，コラーゲンマトリックス，および内皮細胞を層状に培養して種々の実験を行っていたが，このシステムにおいて，内皮細胞には層流および乱流刺激を加え，平滑筋細胞には低酸素刺激を加える環境下で，内皮細胞側から高濃度 LDL および単球細胞を添加する培養系を考案し（図 3a），設計した（図 3b, c）．下室側の培養液の酸素分圧を下げるために，培養液の貯留槽に多孔チューブを導き，窒素またはアルゴンガスを灌流し内皮細胞を灌流する上室側には 12-15% の酸素分圧が，平滑筋側の下室培養液は 1-3% の酸素分圧を示すことができた．また，内皮細胞面に加わる力学的刺激をシュミレーションソフトによって計算したところ，chamber 中心部分から培養液を吸い上げる部分の周辺に渦流の形成を示唆する結果を得た（図 4）．このとき開口部から観察された，培養面の中心付近の内皮細胞は中心に向かって紡錘状に配列することが CCD カメラによる微速度撮影から示された．培養液の流体力学的情報は培地に墨汁を添加して側面から撮像することによって可視化することができた．この装置を用いて，血管壁混合培養系の培養を行った．

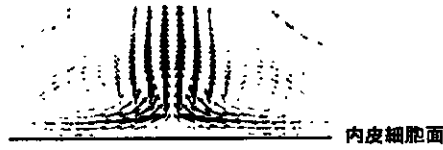


b; 右から培養部，制御部，酸素分圧測定装置，および窒素ガス加湿装置．



c; 培養部分の拡大．赤は下室を培養する培養液．上室を還流する PBS は無色のまま．奥に見える酸素分圧センサーは下室が 3%，上室が 16.5%であることを示している．

図 4. 混合培養装置内のシュミレーション



共培養装置内部，培養部分の底面の直径 28.45mm，全体の高さ 38.5mm，培養部の高さ 4.2mm，流入口および流出口の直径 1mm である。流体（培養液）の物性値は質量密度：1.06E3 [Kg/m³]，粘性係数：4.71E-3 [Pa・s]，体積弾性率：2.06E9 [Pa] を与えた。境界条件は，流入口に脈動を考慮した最大 0.23m/s となる流速，流出口に一定の圧力値 106600Pa を与えた。レイノルズ数は約 500 である。

共培養装置の細胞の剥離は，培養面の流出口付近の大きな流速が要因であることが推測されたため，培養面上部壁面に曲率を持たせた形状について解析した。培養面での最大流速は，曲率のない形状と比較して約 1/2 の 0.62m/sec，培養面での最大せん断応力は 1.18dyn/cm² となった。培養面中央部付近には，渦が発生した。渦の位置および大きさは，周期を通じてほとんど変動しない。圧力勾配は 1500 ~ 4300dyn/cm であった。

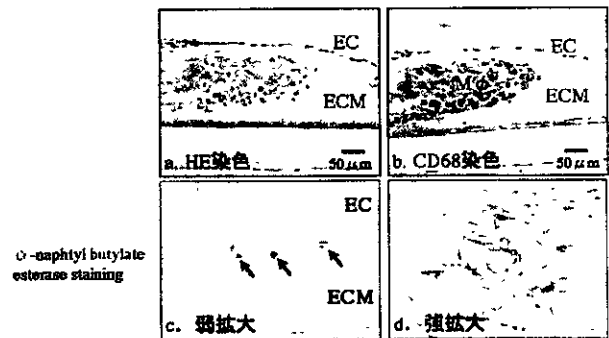
倫理面への配慮

遺伝子発現解析に使用するヒト白血球は，東京大学先端科学技術研究センターで定める採血指針に添い，供血者からの同意に基づいて安全に万全を期す環境で採取された。また，オリゴヌクレオチドチップを用いたヒト遺伝子発現解析実験は，東京大学先端科学技術研究センターにおける倫理審査委員会において審査を受け，所定の手続きによって平成 12 年 3 月 29 日付けで承認を得た。また，データの発表にあたってはその匿名性を守るべく守秘義務が果たされた。

C. 研究結果

72 時間下室培養液に 3 mg/ml の終濃度で LDL を添加し，酸素分圧を 2% として前処理してから，方法 2-5 と同様の方法で調整した単球を添加し 7 日間培養を行った。終了後検体を固定し，HE 染色と CD68 染色を行った（図 5）。この結果 LDL 負荷または低酸素培地を下室に使用した検体では内皮下に CD68 陽性細胞の蓄積が認められたが，LDL 負荷のみ，または低酸素培地のみを使用した検体ではこのような所見が認められなかった。また，同一検体を α -naphthyl butylate esterase によって染色したところ，CD68 陽性細胞が内皮下に蓄積していた検体では，陽性所見が認められ，マトリックス内での M ϕ 細胞の存在が確認された。

図 5. MK-2000 による混合培養検体



72 時間下室培養液に 3 mg/ml の終濃度で LDL を添加し，酸素分圧を 2% として前処理してから，単球を添加し 7 日間培養を行った。終了後検体を固定し，HE 染色 (a) と CD68 染色 (b) を行った。さらに α -naphthyl butylate esterase 染色によってマトリックス内の細胞がマクロファージであることを確認した (c, d)。スケールバーは 50 μ m。

D. 考察

今回静的混合培養系を発展させ，低酸素下 LDL 負荷によって示された平滑筋の役割を反映するために内皮細胞には力学的刺激，

平滑筋には酸素勾配刺激を加える培養システムを構築した。現在までに得られる病理学的検討では、内皮下に蓄積する単球由来細胞の存在が確認されたが、フィルター上の平滑筋については細胞層を確認していない。切片作成においてフィルターと細胞という異なる硬度の物質を扱う際の技術的な課題によるものなのか、生体内でみられるように病変進展初期にみられる内膜肥厚後の平滑筋 apoptosis による細胞減少を反映しているのか、今後明らかにする必要がある。

酸素分圧、力学刺激ともに生体内での状況を反映するために、多くの条件の検討がさらに必要である。とりわけ、shear stress と病変形成の因果関係は重要な課題でありシミュレーション情報と病理標本を比較することによって力学的刺激の寄与を検討することができると考えている。現在達成されている 1.18 dyn/cm² という値は一般的な動脈モデルの 15 dyn/cm² と比較すると少ない。病変易発生部位である血管分岐部でも数 dyn/cm² とされていることからこれを目標に構造上の改良を検討している。

血管壁における LDL の変性過程も従来不明の点が多い。LDL が内皮層を通過する過程、マトリックスにおける変性過程についても本培養系による経時的観察が有用であると考えている。

生体内で単球細胞に由来する泡沫細胞が動脈硬化進展の初期マーカーであるが、この系によって単球細胞の内皮下集積、分化および泡沫細胞形成の再現性を確認している。添加する脂質や白血球をウサギやマウスから調製することによって各種遺伝子改変モデル動物の使用できるシステムに改良している。実際に単球成分に混入するリンパ球、好中球との識別のため、fms 上流に

GFP を結合した遺伝子を持つマウス（クイーンズランド大学、David A. Hume 博士より供与、106）に由来する白血球を使用する実験系の確立を進めているところである。

E. 結論

低酸素下における平滑筋の動脈硬化誘発性遺伝子発現を導入した内皮細胞と単球マクロファージの混合培養装置を開発した。本培養装置は市販化を目指し現在特許申請中である。各種化合物を持つ製薬企業における病変形成阻害薬の開発に寄与することが期待される。

F. 研究危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Galina K. Sukhova, Yaou Zhang, Jie-Hong Pan, Yoichiro Wada, Tatsuhiko Kodama, Sotirios Tsimikas, Joe Witztum, Peter Libby, Guo-Ping Shi. (2003) Targeted Disruption of Cathepsin S Protects Atherogenesis In Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice, *J.C.I.*, 111(6):897-906
- 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*, 22(10):1712-9.
- Wada, H., Hashimoto, K., 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*, 9(5):224-32.

4. Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Kanke T, Itoh T, Wada Y, Izumi A, Saito Y, Hamakubo T, Kodama T. (2002). The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 9(4):178-83.

5. Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, Makuuchi M. (2002). Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray. *Transplantation*. 15;73(9):1480-6.

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2001-101144.

出願人：和田 洋一郎，エイブル株式会社，
ヤマト科学株式会社。

出願日：2001年03月30日。

発明者：和田 洋一郎

生体細胞観察方法とその装置

マクロファージの泡沫化機構

分担研究者 内藤 眞 新潟大学大学院医歯学総合研究科 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。分担者は泡沫化機構の鍵をにぎる因子の一つである核内受容体の発現について検討した。動脈硬化病変のマクロファージや平滑筋にはRXRa、ROR α 、PXR、PPAR γ 、ER、PR、VDR、MRなどの核内受容体が発現し、脂質蓄積と泡沫細胞化に関与すると考えられる。本研究成果は核内受容体の脂質代謝での役割解明や、核内受容体のリガンド探索にも有用と思われる。

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。しかし、スカベンジャー受容体による脂質取り込みと蓄積に関わると考えられている核内受容体の組織発現については良い抗体が極めて少ないことから不明の点が多い。本研究では、本研究班のメンバーが注力している核内受容体すべてに対する抗体作製プロジェクトを基盤に、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、マクロファージの泡沫細胞化機序を解析することを目的とした。

B. 研究方法

抗体はRXR (Retinoid X Receptor) α 、ROR (RAR-related Orphan Receptor) α 、PXR (Pregnane X receptor) 2、PXR1、PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) γ 、ER (estrogen receptor)、PR (progesteron receptor)、VDR (Vitamin D receptor) およびMR (mineralocorticoid receptor) に対するである。これら抗体は本研究の班員である児玉らが作製したものである。

剖検例10例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。泡沫化マクロファージの対照として、黄色腫性肉芽腫を形成したリンパ節を用いて検討した。

パラフィン切片を作製、Isobeらの方法で内因性ペルオキシダーゼを阻害し、免疫染色を行った。上記の一次抗体を使用し、二次抗体には anti-mouse Ig-horseradish peroxidase-liked F(ab)2 fragment (Amersham, Little Chalfont, UK) を用いた。3,3-diaminobenzine (DAB; Dojin chemical Co., Kumamoto, Japan) を用いて可視化した後ヘマトキシリンにて核染を行い、検鏡した。

(倫理面への配慮)

解剖例の組織は本人ないし遺族の承諾を得た組織を用いた。

C. 研究結果

動脈硬化病変における核内受容体の発現
アテローム斑においては泡沫状のマクロファージが集族し、それらの核にはRXRa、ROR α 、PXR2、PXR1、PPAR γ 、VDRの発現が認められた。リンパ節の泡沫状マク

ロファージでも同様の結果が得られた。平滑筋の核には PPAR γ 、ER、PR、VDR、MR の発現がみられた（表1）。

（表1）ヒト泡沫細胞と平滑筋の免疫染色結果

	RXR α	ROR α	PXR2	PXR1	PPAR γ	ER
泡沫細胞	++	++	++	+	+	-
平滑細胞	-	-	-	-	+	+

	PR	VDR	MR
泡沫細胞	-	+	-
平滑細胞	+	-	+

D. 考察

核内受容体の多くはリガンドが不明であり、その機能も不明な点が多い。RXR (Retinoid X Receptor) は 9-cis retinoic acid との親和性が高く、RAR/RXR α 、LXR α /RXR α などヘテロダイマーを形成し、多くの組織で発現が見られる。ROR (RAR-related Orphan Receptor) は retinoic acid response element と結合し、ROR α 1 と α 4 は小脳の Purkinje cell に多く発現し、ROR β は脊髄、小脳網膜など、ROR γ ノックアウトマウスはリンパ節を欠損する。PXR (Pregnane X receptor) は CYP3A4 の Rifampicin/ dexamethasone response element に結合する核内受容体で、肝、腸管に発現する。リガンドは Paclitaxel (Taxol)、rifampicin、hyperforin などで、薬物代謝において解毒機能を発揮すると考えられている。これらレチノイン酸関連の受容体の動脈硬化における発現はまだ報告がなく、泡沫細胞に見いだされたことはマクロファージの脂質代謝とこれら受容体の関連を示唆するものである。PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) α は肝、心、腎、筋肉、 γ 1 は広範な組織に、 γ 2 は脂肪組織、 γ 3 は脂肪組織とマクロファージ、および δ は種々組織に発現し、RXR α 、RXR β 、RXR γ などとヘテロダイマーを

形成する。機能としては PPAR γ は脂肪細胞分化やグルコース代謝に関連する。PPAR γ が泡沫細胞と平滑筋の両者に発現していたことは、この受容体が両細胞の脂質代謝に重要な機能を発揮することの反映と思われる。

ビタミン D 受容体は皮膚扁平上皮、軟骨、副甲状腺などに発現するほか、マクロファージに発現し、マクロファージの殺菌機能を亢進することが知られている。泡沫細胞にも発現していることから、マクロファージの分化と機能に深く関与していることが伺われる。

MR (mineralocorticoid receptor) は aldosterone 受容体であり、電解質代謝に重要であり、心血管系での作用が注目されている。本研究では血管平滑筋に発現することが確認された。また、ER (estrogen receptor) と PR (progesteron receptor) はそれぞれエストロゲン、プロジェステロンの受容体であるが、両者は生殖器組織の他に、種々平滑筋での発現が知られており、動脈硬化の平滑筋でも発現が認められ、動脈硬化とホルモンの密接な関係がこの事実からも示唆される。核内受容体の中で、動脈硬化病変のマクロファージ、泡沫細胞、血管平滑筋に脂質代謝に関連が深いと思われる PPAR のみならず、レチノイン酸関連受容体や vitamin D receptor など多くの核内受容体の発現が見いだされたのは動脈硬化病巣の形成機序に新たな視点を与えるものと考えられる。

以上、これらの研究成果は核内受容体の脂質代謝での役割解明はもとより、それら核内受容体のリガンドの探索にも重要と思われる。

E. 結論

動脈硬化病変のマクロファージや平滑筋

には種々の核内受容体が発現し、脂質蓄積と泡沫細胞化に関与すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, makuuchi M: Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon- γ by means of DNA microarray. *Transplantation* 73 (9): 1480-1486, 2002
- 2) Tanaka T, Takeno T, Watanabe Y, Uchiyama Y, Murakami T, Yamashita H, Suzuki A, Aoi R, Iwanari H, Jiang S-Y, Naito M, Tachibana K, Doi T, Shulman AI, Mangelsdorf DJ, Reiter R, Auwerx J, Hamakubo T, Kodama T: The generation of monoclonal antibodies against human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). *J Atheroscl Thromb* 9 (5): 233-242, 2002
- 3) 内藤 眞、辺見弘明、吉野三世、林 眞一：皮膚のマクロファージと樹状細胞。新潟医誌 116: 348-351, 2002
- 4) Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, Tsjita M, Kawabe Y, Kobayashi M, Izumi A, Kohro T, Tanaka T, Taniguchi H, Koyama H, Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y, Niki E, Hamakubo T, Kodama T: Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor

pathway and enhanced by hypoxic conditions. *Thromb Vasc Biol*, 22:1712-1719, 2002

5) 内藤 眞、長谷川 剛：樹状細胞とマクロファージの発生と分化。医学のあゆみ 200: 455-459, 2002

6) Kobayashi T, Hirano K-I, Yamamoto T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M: The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperfused rat liver. *Arch Histol Cytol* 65: 251-261, 2002

7) Kuwata K, Watanabe H, Jiang S-Y, Yamamoto T, Miyaji C, Abo T, Miyazaki T, Naito M: AIM inhibits apoptosis of T cells and NKT cells in *Corynebacterium*-induced granuloma formation in mice. *Am J Pathol* 162(3): 837-847, 2003

2. 学会発表

1. 大理石病マウス (op/op) における再生クッパー細胞の phenotype の解析
山本 尚、第 91 回日本病理学会総会 横浜 2002.3.26-28
2. ヒト卵黄嚢造血初期の免疫組織化学的検討、長谷川剛、第 91 回日本病理学会総会 横浜 2002.3.26-28
3. ラット胎生肝マクロファージにおけるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現
渡辺隆興、長谷川剛、内藤眞、第 42 回日本リンパ網内系学会総会 岡山 2002.7.11,12
4. *Corynebacterium parvum* 誘発マウス肝肉芽腫形成過程におけるマクロファージ由来アポトーシス抑制因子 (AIM) の機能解析、鍛田和久、渡部久実、姜 淑英、山本 尚、安保 徹、内藤 眞
第 42 回日本リンパ網内系学会総会 岡山

2002.7.11,12

5. BCG感染マウス肝肉芽腫形成過程におけるマクロファージの動態について

櫻田潤子、山本 尚、内藤 眞

第42回日本リンパ網内系学会総会 岡山

2002.7.11,12

6. 動脈硬化病変におけるCL100、Pim-1、Adipophilinの発現

山本 尚、姜 淑英、内藤 眞、和田洋一郎、児玉龍彦

第42回日本リンパ網内系学会総会 岡山

2002.7.11,12

7. ヒト胎生造血初期の免疫組織化学的検討、長谷川剛、内藤 眞

第42回日本リンパ網内系学会総会 岡山

2002.7.11,12

8. AIM Expression and

Corynebacterium-induced Granuloma Formation in Mice : Kazuhisa Kuwata, Hisami Watanabe, Shu-Ying Jiang, Takashi Yamamoto, Toru Abo, Toru Miyazaki, and Makoto Naito

11th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2002, Niigata, Japan, 2002, 6.20,21, 2002

9. Expression of AIM and

Corynebacterium-induced Granuloma Formation in Mice : Kazuhisa Kuwata, Takashi Yamamoto and Makoto Naito

The 11th International Symposium on the Cells of the Hepatic Sinusoid & Their Relation to Other Cells, Tucson, USA, 2002, 8. 25 - 29

マクロファージの分化、泡沫細胞形成に関与する転写因子の発現及び病態への関与

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

核内受容体 PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) は、転写因子として作用するが、糖、脂質代謝、炎症等、生体制御に重要な役割を果たし、動脈硬化発症への関与においても注目されている。本研究において、PPARs (α 、 δ 、 γ) をそれぞれ発現誘導できる細胞株を作成し、その発現誘導、及びリガンド添加により、どのような遺伝子変動が生じるかを、DNA チップを用いて解析した。その結果、脂肪細胞分化に重要な役割を果たしている PPAR γ について HepG2 細胞では、脂肪細胞分化に関わる遺伝子の顕著な発現上昇は見らず、脂肪酸の動態に関わる遺伝子の発現上昇がみられた。

A. 研究目的

核内受容体 PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) は、転写因子として作用するが、糖、脂質代謝、炎症等、生体制御に重要な役割を果たしていることが知られている。また最近、動脈硬化発症への関与において注目されている。本研究においては、この因子の発現による細胞内での遺伝子変動、標的遺伝子の探索を通じて、泡沫細胞形成、動脈硬化病変の伸展における新たな分子機構を明らかにし、新規な抑止策を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

PPARs (α 、 δ 、 γ) をそれぞれ発現誘導できる細胞株を Tet-Off の系を用いて作成し、その発現誘導、及びリガンド添加により、どのような遺伝子変動が生じるかを、DNA チップを用いて解析する。さらに、これら PPARs がどのような応答配列に結合するかをランダム DNA 配列ライブラリーをスクリーニングすることにより調べる。以上より得られた情報を基に、応答タンパク質のマクロファージや泡沫細胞における発現を調べ、また生理機能を探究する。

C. 研究結果

動脈硬化症をはじめ生活習慣病への関与が指摘されている PPAR について、これらのサブタイプ (PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 2、PPAR γ 3) の発現を制御できる HepG2 細胞株を樹立した。ドキシサイクリン (Dox) 含有の培地で培養している間は発現が抑えられるが、Dox を除去することにより、それぞれのサブタイプの発現が誘導される HepG2 細胞を樹立する事ができた。Dox 除去後、5 日目には PPAR の発現が十分量みられたため、この時点でリガンド (fenogibric acid、GW501516、ciglitizone) を加え、24 時間後に細胞を集め RNA を調製した。このようにして、これらの細胞株にリガンドを加えた時に誘導される遺伝子を、DNA チップを用いて調べた結果、多くの興味ある知見を得る事ができた。PPAR γ は脂肪細胞分化に重要な役割を果たしているが、HepG2 細胞においては、脂肪細胞分化に関わる遺伝子 (adipsin、FABP4、C/EBP など) の顕著な発現上昇は見られなかった。一方、脂肪酸の動態に関わる遺伝子として FABP1 や

ADRPなどの発現上昇がみられた。このチップに因る解析結果を確かめるために、リアルタイム PCR 法によって発現を調べた結果、同様の発現上昇がみられた。これ以外の現象については現在、詳細を解析中である。

D. 考察

PPARs の発現を誘導できる細胞株を樹立し、これらの標的遺伝子の解析を DNA チップにより開始したが、予想された遺伝子群の発現誘導に加え、全く予想されなかったものも観察された。リガンドを加えずに発現が誘導された遺伝子も観察され、今後、これらの遺伝子発現変化を検証すると共に、その意義を明らかにしていく予定である。さらに、PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 2、PPAR γ 3 に対して、それぞれ特異的に誘導される遺伝子、また共通に誘導される遺伝子などを調べ、PPAR の生理機能や病態への関与について明らかにしていきたい。

E. 結論

PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 2、PPAR γ 3 の発現誘導細胞株 (HepG2) を作成し、リガンドにより誘導される (変動する) 遺伝子の網羅的解析情報を得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)