

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 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究要旨

動脈硬化の病態形成過程に於いては、酸化 LDL 産生などの脂質代謝異常、並びに、単球の集積と泡沫化マクロファージへの分化が中心的に関与する。昨年度まで、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 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を報告した。今回、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。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、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。以上、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。また、脂肪組織由来のアディポネクチンは、抗糖尿病効果のみならず、抗動脈硬化作用を有する事が示唆された。

A. 研究目的

動脈硬化の病態形成過程に於いては、酸化 LDL 産生などの脂質代謝異常、並びに、単球の集積と泡沫化マクロファージへの分化が中心的に関与する。昨年度まで、ケモカイン MCP-1 が、単球に対して、細胞遊走活性のみならず、スカベンジャー受容体 SCR の発現を介して酸化 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て来た。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。

MCP-1 は、動脈硬化組織で大量に産生され、多数症例で検討したところ、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

呈した。一方、動脈硬化症と糖尿病は、生活習慣病の代表疾患であるが、近年、糖尿病に併発する動脈硬化症、その結果齎される大血管障害、並びに、小血管障害が重要な問題として取り上げられる。即ち、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、血管内膜下に集積したマクロファージの泡沫化を中心とする炎症病態が関与する。

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、興味深い事に、糖尿病を併発しない高脂血症患者よりも糖尿病患者に於いて、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と報告される。今回、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。

B. 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 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。
- ③ 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。

倫理面への配慮

臨床検体を使用する場合には、患者からインフォームドコンセントを得た上で、大学の倫理委員会規約を遵守し、学内の現有設備を用いて行った。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全のセキュリティシステムをもって厳重に管理した。患者は、経済的負担を始め如何なる不利益も被らない事を明確にし、研究結果を患者に報告することを基本的義務とした。

C. 研究結果

1. 末梢血中糖化蛋白 AGE 値は糖尿病患者で有意に高く、HbA1c および血糖値との正相関を認めた。
2. AGE 刺激によりヒト無刺激単球上の MSR-1 (SR-A)、CD36 (SR-B)、CD68 (SR-D) の発現が 24 時間以内に増強する事を確認した。
3. AGE 刺激による SCR 発現誘導は、PKC 阻害薬 H 7 による前処理にて減弱した。ま

た、AGE による PKC 活性化誘導を共焦点レーザー顕微鏡で認めた。

4. AGE 刺激で単球の放射線標識酸化 LDL 取り込みが 24 時間以内に増加し、また、oil-red-O の取り込みも 24 時間以内に増強した。
5. ヒト無刺激単球表面上に CD44 が強発現し、CD44 を架橋刺激すると SCR の発現が増強した。
6. AGE 刺激による SCR 発現と放射線標識酸化 LDL の取り込みは、CD44 刺激により更に増強した。
7. 単球をアディポネクチンで前処理すると、AGE/CD44 刺激しても放射線標識酸化 LDL の取り込みは増加しなかった。

D. 考察

糖尿病に併発する粥状動脈硬化症の発生が、他疾患に比し有意に高いことが報告されているが、その発症機構については不詳である。糖尿病症例に於いて、血清 MCP-1 値が HbA1c 値、及び、グリコアルブミン値と良好な相関を示し、さらに、糖尿病を併発しない高脂血症患者よりも糖尿病患者に於いて、血清 MCP-1 値は有意に高い傾向を呈したことから、血清 MCP-1 値測定は、新たな血管合併症のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

更に、糖尿病に伴う動脈硬化症の発症機転に於いて、MCP-1 に加えて、血管壁に蓄積するとされる後期糖化反応生成物 AGE が、強く関与する事が示唆された。即ち、AGE は単球に於いて SCR の発現と酸化 LDL 取り込みを増強し、単球の泡沫化を誘導した。更に、ヒアルロン酸受容体 CD44 を介する刺激は、AGE による SCR 依存性単球泡沫化を更に増強する事が示された。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る。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。

一方、AGE は単球などの炎症担当細胞上の受容体 RAGE と結合して、種々の遺伝子の転写調節や細胞のアポトーシスに関与する。また、AGE は酸化ストレスと関連性が高い事が報告され、AGE は、単球の泡沫化のみならず、単球の分化、細胞死、活性化という幅広い細胞特性の誘導が、粥状動脈硬化組織に於ける単球泡沫化を更に増強する可能性が示唆された。

さらに、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するという結果より、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、同時に、アディポネクチンが動脈硬化、更には、血管障害を抑制する可能性も示唆された。

E. 結論

動脈硬化の病態形成過程に於いては、酸化 LDL 産生などの脂質代謝異常、並びに、単球の集積と泡沫化マクロファージへの分化が中心的に関与する。今回、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。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 時間以内に増強した。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し、脂肪細胞由来のアディポネクチンにより、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唆された。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y: CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol*(2002) 17, 945-950
3. 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. *Immuno*(2002) 168, 1984-1991.
4. Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y: Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* (2002) 7, 143-149.
5. Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami

- Y: H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J Biol Chem*(2002) 277, 21446-21452.
6. Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y: β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Arthritis Rheum*(in press)
7. Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y: Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Letters*(in press)
8. 田中良哉, 辻村静代, 河野公俊. 膠原病に於けるステロイド薬抵抗性の分子機構とその対策. *内科*(2002) 89, 216-220.
9. 田中良哉, 辻村静代, 齋藤和義, 河野公俊. 膠原病・リウマチ性疾患に於けるシクロスポリン療法の理論と実際. *日本臨床免疫学会雑誌* (2002) 25, 110-114.
10. 田中良哉: 全身性エリテマトーデスとサイトカイン. 新・膠原病: 診断と治療の最新のポイント; 皮膚から内臓へ. 竹原和彦, 桑名正隆, 宮地良樹編, 診断と治療社: 14-15頁, 2002. 東京

2. 学会発表

1. 田中良哉: 炎症細胞の遊走機序. 第52回日本アレルギー学会総会（教育講演）横浜, 平成14年11月
2. Nakayamada S, Saito K, Nakano K,

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 特任助教授

研究要旨

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) を酸化酵素および酸素ラジカルによって酸化すると種々の酸化生成物が生じることが知られ、また、動脈硬化巣から検出されることも報告されている。これら酸化生成物は様々な生物学的活性をもち細胞を刺激してその増殖や遊走を促したり、サイトカインの産生や接着分子の発現を上昇させるなど動脈硬化の進展に大きく寄与すると考えられる。本研究では主要な酸化生成物である、7-ketocholesterol (7-keto), 22-hydroxycholesterol(22OHch), 25-hydroxycholesterol (25-OHch), 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。酸化生成物それぞれに特異的に誘導される遺伝子には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が、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。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た促進機序が明らかになった。

A. 研究目的

本研究は動脈硬化巣から検出される酸化 LDL 由来の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ことを目的とする。

それぞれ 10 μ M, lysoPC は 30 μ M は 4-HNE 5 μ M 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。変動の大きかった遺伝子については Northern blot 法により確認を行った。

B. 研究方法

酸化生成物の内皮細胞に対する毒性

ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) に 5 ~ 50 μ M の 7-keto, 22OHch, 25-OHch, lysoPC, 4HNE それぞれを添加し 24 時間培養後、0.1% クリスタルバイオレットを添加し、ホルムアルデヒドで固定し、染色された生細胞をカウントした。

DNA チップによる遺伝子解析

HUVEC に 7-keto, 22OHch, 25-OHch は

サイトカイン産生の測定

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。

C. 研究結果

細胞に添加する酸化生成物の濃度選択

In vitro における LDL の酸化実験結果および文献から得た情報をもとに添加の範囲を 5 ~ 50 μ M とし、それぞれ添加後 24 時間で viability を測定した。Viability の低下

は 7-keto, 22OHch, 25-OHch は 20 ~ 30 μ M から、4-HNE は 20 μ M から、そして LysoPC は 40 μ M からみられたため (data not shown)、細胞への添加濃度は 7-keto, 22OHch, 25-OHch, 4-HNE はそれぞれ 5 μ M, lysoPC は 30 μ M と決定した。この濃度における viability の測定結果を図 1 に示した。

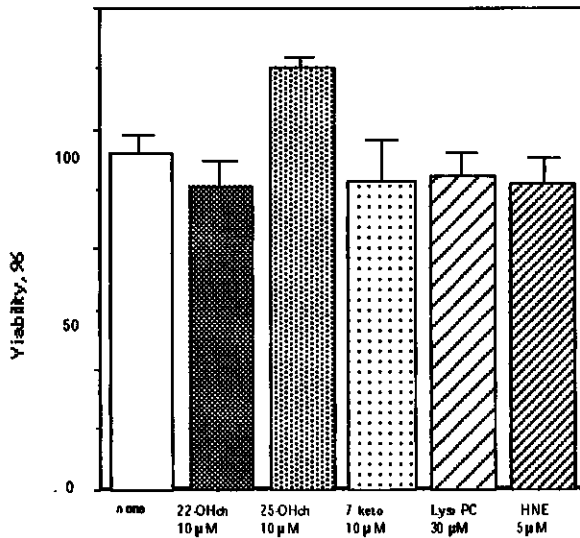


図 1 HUVEC における酸化生成物の細胞毒性

酸化生成物に対する HUVEC の遺伝子発現応答

解析した遺伝子 8974 個について 7-keto, 22OHch, 25-OHch, lysoPC, 4-HNE 添加後 1, 4, 24 時間後に発現が 2 倍以上に上昇する遺伝子の数を表 1 に示した。いずれの酸化物に対しても HUVEC の遺伝子は数時間で強く発現応答することがわかった。

表 1 酸化生成物による HUVEC の遺伝子誘導

	Number of Up-regulated Genes			
		1	4	24 hr
7-keto	1 回目	6	2	
	2 回目		4	0
22-OHch	1 回目	12	8	
	2 回目		5	3
25-OHch	1 回目	11	2	
	2 回目		8	9
LysoPC	1 回目	26	58	
	2 回目		120	39
4-HNE	1 回目	2	15	
	2 回目		52	7

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。

本研究では用いた酸化物に共通して誘導される遺伝子に注目してその詳細に関して検討した。最も発現誘導に関して共通性の高いものを表 2 に示した。

表 2 5 つの酸化生成物共通に発現誘導率が高い遺伝子

Description	hr	Ave Diff					
		EtOH	Keto	22 R	25 4HNE	EtOH Lyso	
solute carrier family 7, member 5 (SLC7A5)	4	140	160	157	293	74	404
	24	38	37	51	47	47	24
solute carrier family 3, member 2 (SLC3A2)	4	182	352	195	521	191	327
	24	86	103	178	93	156	107
solute carrier family 7, member 11 (SLC7A11)	4	433	548	476	1505	496	746
	24	304	359	328	385	480	230

DNA チップで得られた結果を Northern blot 法により確認を行ったところ、22OHch, lysoPC, 4-HNE に関して再現性が得られた (data not shown)。チップ解析の追試結果と比較するとこの 3 種の酸化物については再現性が高いことが示された。

SLC7A5 と SLC3A2 はヘテロダイマーを形成し細胞膜表面に位置して中性アミノ酸を細胞内に取り入れる役割を担う蛋白質で

ある。細胞増殖が盛んな細胞でこの遺伝子、蛋白質の発現が上昇することが知られている。しかしながら、本研究の細胞、実験条件では図1に示すように顕著な細胞増殖はみられないので、取り込まれたアミノ酸がサイトカイン産生に使用されている可能性を考え、lysoPC 添加による HUVEC のサイトカイン産生量を測定した。また、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、同時に添加し lysoPC 添加による HUVEC のサイトカイン産生に対する影響を調べた（図2）。LysoPC の添加により IL6 と IL8 が有意に産生が上昇し、アミノ酸拮抗試薬によりその上昇は阻害された。

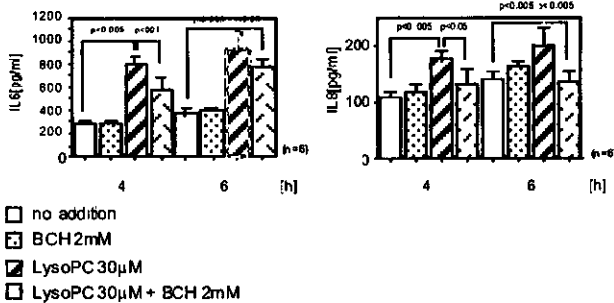


図2 LysoPC による HUVEC のサイトカイン産生促進とその阻害

D. 考察

本研究において動脈硬化発症に重要な役割を果たすとされる LDL の酸化生成物の主要なものによって内皮細胞の多くの遺伝子発現が上昇することがしめされたが、なかでも lysoPC の遺伝子誘導能が顕著であった。本実験で細胞に添加した濃度は他のものより多いが in vitro の酸化においても桁ちがいで高濃度生成し、生体中にもやはり高濃度存在することから今回の結果は生体での現象を見る上でも relevant であると考えられる。LDL の主要な酸化生成物が内皮細胞の solute carrier protein の発現を介し

てアミノ酸を積極的に細胞内に取り込んでいることが示唆された。この蛋白質は癌細胞など増殖がさかんな細胞に発現亢進していることが知られているものであるが、内皮細胞では増殖は顕著ではなく、取り込んだアミノ酸をサイトカイン産生に使っていることが示唆された。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。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。また、その他の転写因子など注目される遺伝子に関する解析も今後すすめる予定である。

E. 結論

血管壁の老廃物としても存在する LDL の酸化生成物による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により動脈硬化促進に寄与するという新たにメカニズムが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

N. Noguchi, A. Nakada, Y. Itoh, A. Watanabe, E. Niki

Formation of active oxygen species and lipid peroxidation induced by hypochlorite., Arch. Biochem. Biophys., 397, 440-447, 2002

Y. Nakamura, Q. Feng, T. Kumagai, K. Torikai, H. Ohigashi, T. Osawa, N. Noguchi, E. Niki, K. Uchida, Ebselen, a glutathione peroxidase mimeric seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant: Implication for inflammation-associated

carcinogenesis..., *J. Biol. Chem.*, 277, 2687-2694, 2002
and Side Chain., *Free Radical Res.*, 36, 1171-1178, 2002

S. Mine, T. Tabata, Y. Wada, T. Fujisaki, T. Iida, N. Noguchi, E. Niki, T. Kodama, Y. Tanaka: 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.

N. Noguchi, H. Yamashita, J. Hamahara, A. Nakamura, H. Kuhn, E. Niki
The specific of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation and the effects of radical scavenging antioxidants. *Biol. Chem.*, 383, 619-626, 2002.

M. Kondo, T. Shibata, T. Kumagai, T. Osawa, N. Noguchi, K. Uchida
15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandins J2: The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7367-7372, 2002.

N. Noguchi: Novel insights into the molecular mechanisms of the anti-atherosclerotic properties of antioxidants; the alternatives to radical scavenging., *Free Radical Biol. Med.*, 33, 1480-1489, 2002.

Y. Yoshida, N. Noguchi, A. Watanabe, Y. Iwaki, M. Yanagisawa, T. Kodama, O. Cynshi, E. Niki: Antioxidant Action of 2,2,4,6-Tetra-Substituted 2,3-Dihydro-5-Hydroxybenzofuran against Lipid Peroxidation: Effects of Substituents

T. Ogihara, T. asano, K. Ando, Y. Chiba, H. Sakoda, M. Anai, N. Shojima, H. Ono, Y. Onishi, M. Fujishiro, H. Katagiri, Y. Fukushima, M. Kikuchi, N. Noguchi, H. Aburatani, I. Komuro, T. Fujita:
Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling., *Hypertension*, 40, 872-879, 2002.

Y. Wada, A. Sugiyama, T. Yamamoto, M. Naito, N. Noguchi, S. Yokoyama, M. Tsujita, Y. Kawabe, M. Kobayashi, A. Izumi, T. Kohro, T. Tanaka, H. Taniguchi, H. Koyama, K. Hirano, S. Yamashita, Y. Matsuzawa, E. Niki, T. Hamakubo, T. Kodama: Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1712-1719, 2002

Y. Yoshida, E. Niki, N. Noguchi,
Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects., *Chem. Physic. Lipid*, in press, 2002

2. 学会発表

1. Takehide Ogihara, Tomoichiro Asano, Katsuyuki Ando, Yuko Chiba, Masatoshi Kikuchi, Noriko Noguchi, and Toshiro Fujita

- Oxidative Stress Increment with Angiotensin II-Infusion induces Insulin Resistance via Unique Enhancement of Insulin-Signaling.
Keystone Symposium, Jan. 2002
- 野口 範子
運動生理学学会、Jul. 25-27, 2002 (Tsukuba)
野口 範子
遺伝子解析からみたビタミン E
ビタミン E Update forum, Aug. 24, 2002 (Tokyo)
- 野口 範子、新井洋由、柴田亮行
 α -TTP ノックアウトマウスの子宮胎盤における酸化傷害、ビタミン E 研究会、Jan. 24-25 (Hiroshima)
- Noriko Noguchi
Regulation of gene expression of proteasome subunits by anti-atherogenic antioxidants
Gordon Conference, Feb. 10-14 (USA)
- 野口 範子
和田洋一郎、島川修一、吉田康一、二木鋭雄、児玉龍彦
低酸素下 LDL 負荷による平滑筋細胞内の脂質蓄積:日本過酸化脂質フリーラジカル学会、Oct. 31-Nov. 1, 2002 (Tokushima)
- Noriko Noguchi
Regulation of gene expression of endothelial cell by phenolic antioxidants.
Redox Kyoto, Nov.6-8, 2002 (Kyoto)
- 野口 範子
ビタミン E 同族体の構造特異的な遺伝子発現制御、ビタミン学会、Apr. 25-26, 2002 (Tokyo)
- 野口 範子
ラジカル捕捉型抗酸化剤 BO653 の抗動脈硬化作用:レドックス生命委員会シンポジウム、Dec. 18, 2002 (Kyoto)
- 野口 範子
ゲノム解析による抗酸化物の新規機能の探究、フレグランスセミナー、Jun. 24, 2002 (Tokyo)
- 野口 範子
動脈硬化と遺伝子発現:京都健康フォーラム、Jan. 10-11, 2003 (Kyoto)
- 野口 範子
AOB の抗酸化活性とアポトーシス抑制作用
AOB 研究会、Jun. 21, 2002 (Kyoto)
- Noriko Noguchi, Wakako Takabe, Tatsuhiko Kodama
CHEMICAL STRUCTURE-SPECIFIC GENE EXPRESSION BY PHENOLIC COMPOUNDS
SFRRI, Jul. 16-20, 2002(Paris)
- 野口 範子
抗酸化物と運動

脳血管にお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

分担研究者 竹内 公一 自治医科大学医学部 助手

研究要旨

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。本研究では、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。一方、間藤細胞は、最近内外の多くの研究者が認めるように、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。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。

A. 研究目的

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、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する。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する。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する。

B. 研究方法

①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。

②ウイ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。

（倫理面への配慮）

動物には、エーテル、ペントバルビタールによる麻酔を施し、痛覚消失を確認して実験に供した。

C. 研究結果

① SHR-SP ラットにおける血管構築変化と間藤細胞

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。

② 血管性脳浮腫における間藤細胞

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、B 7（特に B7-2）の発現増加が観察された。

D. 考察

① 間藤は、脳細動脈の破綻（出血）と狭小

化（梗塞）に先行する脳細動脈壁の構築変化に間藤細胞（蛍光顆粒性血管傍細胞）の機能変化、あるいは機能低下が深い関係を有することを示してきた。即ち、同細胞の機能低下は血管壁のスカベンジャー機能の低下を招き、平滑筋変性を促し、血管壁を弱化させ、破綻を招くが、一方、同細胞の幼弱化（線維芽細胞化）は、血管壁の肥厚をもたらし、梗塞を招く可能性があることを報告した。（その一部は、動脈硬化 28(6):137-147, 2001）。

さらに、本研究では、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、脳細動脈の構築変化が間藤細胞の機能に大きく依存していることを示した。この事実は、従来、高血圧時、脳実質血管の血管壊死、血管壁の lipohyalinosis が特異的な所見として報告されているが、その所見は間藤細胞の機能低下と密接な関係のあることを示している。

ところで、Mato 等は既に間藤細胞の泡沫化、それに伴う巨大化が老齢ラットの脳細動脈血管壁を圧迫し、血管内腔を狭小化し、脳循環不全を惹起する可能性を明確に指摘した（Anat Rec 215:413-419, 1986）。昨年度明らかにした様に高血圧時、血管平滑筋細胞が変性に陥り、その周囲隙には浮腫が生じると、間藤細胞は移動能を持つに至る。最近、中沢らは同細胞が MCP-1 レセプターを有すること示し（私信）、同細胞の走化性に対する根拠を明らかにした。

今年度は、高血圧下にみられる血管構築の変化に伴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、脳出血前後あるいは一側出血後の細動脈分岐部を中心に、主として形態学的

に調べた。その結果、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。
元来、間藤細胞は ICAM（1994）、
scavenger receptor（1996）を有し、互い
に接着する可能性が大きい。集積した大
型の間藤細胞が血管壁を圧迫し、既報の如
く、血管の狭小化、更には脳循環不全にあ
づかることが考えられた。従って、間藤細
胞の形態・機能を健全に維持できれば、血
管構築は正常に保たれると推論される。

今後は、この集積した分岐部の間藤細胞
の免疫組織学的、組織化学的解析を行い、
脳細動脈の破綻、および脳梗塞の機序の解
明に努めると共に、間藤細胞の変性の抑制、
骨髄細胞移植等による変性間藤細胞の補充
の可能性について研究を進める必要がある。

②血管性脳浮腫では、血管から脳への浸出
が増加し、脳脊髄液が増加する。この時、
浮腫液増加に伴って、間藤細胞のエンドサ
イトーシスが亢進し、細胞の腫大が観察さ
れることは、間藤らおよび福田・間藤によ
って報告されている。この変化に伴う細胞内
顆粒のライソソーム酵素の変化については、
酸性フォスファターゼの酵素組織化学的な
検討が行われてはいるが、その結果は一致
していなかった。これは、上述の時間経過
を反映したものであると考えられる。

間藤細胞の細胞内顆粒は、摂取した物質
の分解を行っていると考えられている。細
胞内顆粒の変化としては、老化によって泡
沫化していくという変化がよく知られてい
る。また、ライソソーム酵素欠損において
は、顆粒が大型化し、泡沫化することを？
ヘキソサミニダーゼノックアウトマウスに
おいて観察し報告した。この時、間藤細胞
に発現するエピトープが減少し、ライソソ
ーム酵素がこの細胞の機能維持に重大な役割

を果たしていることを確認している。さら
に、間藤細胞においては、細胞内顆粒が減
少した変性像を観察することができる。こ
のような変化は、上述の SHR-SP ラットに
おいても観察される他、エンドトキシンに
対する反応においても観察されている。以
上のような多彩な細胞内顆粒の変化は、間
藤細胞の機能を考える上で重大な手がかり
となる。

一方、細胞内顆粒の機能については、間
藤細胞の抗原提示能と関連している。既に
示したように、間藤細胞は中枢神経におい
て最も強力な抗原提示細胞と考えられてい
る。細胞内顆粒は抗原プロセッシングに
重要であり、ライソソーム酵素の変化は、
この機能に影響していると考えられる。

凍結障害による血管性脳浮腫では、早期
には、強力なプロテアーゼであるカテプシ
ン D が増加しており、これは、間藤細胞の
清掃細胞としての機能亢進によるものと考
えられた。その後のカテプシン D 減少に連
動して、抗原提示をふくめた免疫調節に関
わる分子の発現が観察され、単なるライソ
ソーム機能の低下ではなく、清掃細胞から
免疫調節細胞へと変化しているものと考え
られた。間藤によれば、このモデルにおい
て血液由来の細胞の侵入が観察されるのは
障害後 3 日以降であるというが、ここで観
察された間藤細胞の免疫調節能との関係が
示唆される。

今後、細胞内顆粒の変化については、他
の酵素、特に抗原プロセッシングに関わる
酵素の変化についても明らかにする必要が
ある。また、観察された間藤細胞の機能の
変化が病変の進展にどのように関わってい
るのかを詳細に研究する必要がある。現在、
血管性脳浮腫におけるフリーラジカルの関
与という観点から、治療的に抗酸化剤投与
を行って、間藤細胞の変化を観察を試みて

いる。

E. 結論

① SHR-SP ラットの観察されたように、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。血管壁の構築変化に進むと、間藤細胞は移動能を持つ他、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。

②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する。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て、病変に関与している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi, M., Ogata, Y., Okazaki, H., Takeuchi, K., Kobayashi, E., Ikeda, U., Shimada K.: Fluvastatin Enhances Apoptosis in Cytokine-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells. J Cardiovasc Pharmacol. 39, 310-317, 2002

Takahashi, M., Okazaki, H., Ogata, Y., Takeuchi, K., Ikeda, U., Shimada, S.: Lysophosphocholine induces

apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen activated protein kinase-dependent mechanism. Atherosclerosis 161, 387-394, 2002

Ogata, Y., Takahashi, M., Takeuchi, K., Ueno, S., Mano, H., Ookawara, S., Kobayashi, E., Ikeda, U., Shimada, K.: Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. J Cardiovasc Pharmacol. 40, 907-915, 2002

Mato, M., Takeuchi, K., Ookawara, S., Yamanaka, S., Mashiko, T., Ogura, K.: 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 Neuropathologica 103, 119-130, 2002

2. 学会発表（発表誌名巻号、ページ、発行年等も記入）

Wang, J., Takeuchi, K., Ookawara, S.: Immuno-histochemistry of the Inclusion Bodies in the Perivascular Macrophage under the Cerebral Injury. The 3rd Asian Pacific International Congress of Anatomists. April 2002, Hamamatsu, Japan. (Acta Anat Nippo 77: APICA45)

Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Intramuscular injection of

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

AAV vector- expressing IL-10 for prevention of atherosclerosis. American heart association scientific sessions November 2002. Chicago, USA.

Wang, J., Takeuchi, K., Ookawara, S.:Changes of perivascular cells in the process of brain edema induced by cold injury. Brain edema 2002. November 2002, Hakone, Japan.

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
G. K. Sukhova, Y. Zhang, J.H. Pan, Y. Wada, T. Kodama,	Targeted Disruption of Cathepsin S Protects Atherogenesis In Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice,	J.C.I.	111(6)	897-906	2003
Wada, Y., Sugiyama, A., Yamamoto, T., Kodama, T,et al	Lipid accumulation in human coronary artery smooth muscle cells by LDL loading under hypoxic conditions.	Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	22(10)	1712-9.	2002
Wada, H., Hashimoto, K., Wada, Y, Kodama, T,et al	Extensive oligonucleotide microarray transcriptome analysis of the rat cerebral artery and arachnoid tissue	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	9(5)	224-32	2002
Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Kanke T, Kodama, T,et al	The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC.	J Atheroscler Thromb	9(4)	178-83	2002
Saiura A, Kohro T, Yamamoto T,Kodama T,et al	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	May 15;73(9)	1480-6	2002
Tanaka T, Takeno T, Watanabe Y, Naito M,et al	The generation of monoclonal antibodies against human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).	J Atheroscler Thromb	9 (5)	233-242	2002
内藤 眞、辺見弘明、吉野三也、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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Takahashi, M., Ogata, Y., Okazaki, H., Takeuchi, et al	Fluvastatin Enhances Apoptosis in Cytokine-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells	J Cardiovasc Pharmacol	39	310-317	2002
Takahashi, M., Okazaki, H., Ogata, Y., Takeuchi, et al	Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen activated protein kinase-dependent mechanism	Atherosclerosis	161	387-394	2002
Ogata, Y., Takahashi, M., Takeuchi, K., et al	Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy	J Cardiovasc Pharmacol	40	907-915	2002
Mato, M., Takeuchi, K., Ookawara, 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 Neuropathologica	103	119-130	2002
Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, Tanaka Y, et al	Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transmigration of monocytes via the protein kinase C pathway	Atherosclerosis	160	281-288	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	168	1984-1991	2002
Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y	Hypoxia-inducible factor-1 _α induces cell cycle arrest of endothelial cells	Genes Cells	7	143-149	2002
Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, Okada Y, Umehara H, Kataoka T, Minami Y	H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts	J Biol Chem	277	21446-21452	2002
Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y	β 1 integrin-mediated signaling induces ICAM-1 and Fas and Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells	Arthritis Rheum			In press
Fujii Y, Fujii K, Nakano K, Tanaka Y	Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1	FEBS Letters			In press
田中良哉, 辻村静代, 河野公俊	膠原病に於けるステロイド薬抵抗性の分子機構とその対策	内科	89	216-220	2002
田中良哉, 辻村静代, 齋藤和義, 河野公俊	膠原病・リウマチ性疾患に於けるシクロスポリン療法の理論と実際	日本臨床免疫学会雑誌	25	110-114	2002
N. Noguchi, A. Nakada, Y. Itoh, A. Watanabe, E. Niki	Formation of active oxygen species and lipid peroxidation induced by hypochlorite	Arch. Biochem. Biophys.	397	440-447	2002
Y. Nakamura, Q. Feng, T. Kumagai, K. Torikai, H. Ohigashi, T. Osawa, N. Noguchi, et al	Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant: Implication for inflammation-associated carcinogenesis.	J. Biol. Chem.,	277	2687-2694	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. Noguchi, H. Yamashita, J. Hamahara, A. Nakamura, H. Kuhn, E. Niki	The specific of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation and the effects of radical scavenging antioxidants.	Biol. Chem.,	383	619-626	2002
M. Kondo, T. Shibata, T. Kumagai, T. Osawa, N. Noguchi, K. Uchida	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandins J ₂ : The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis.	Proc. Natl. Acad. Sci.	99	7367-7372	2002
N. Noguchi	Novel insights into the molecular mechanisms of the anti-atherosclerotic properties of antioxidants; the alternatives to radical scavenging.	Free Radical Biol. Med.	33	1480-1489	2002
Y. Yoshida, N. Noguchi, A. Watanabe, Y. Iwaki, M. Yanagisawa, T. Kodama, O. Cynshi, E. Niki	Antioxidant Action of 2,2,4,6-Tetra-Substituted 2,3-Dihydro-5-Hydroxybenzofuran against Lipid Peroxidation: Effects of Substituents and Side Chain	Free Radical Res.	36	1171-1178	2002
T. Ogihara, T. asano, K. Ando, Y. Chiba, H. N. Noguchi, et al	Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling.	Hypertension	40	872-879	2002
Y. Yoshida, E. Niki, N. Noguchi	Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects	Chem. Physic. Lipid		In press	2002
T.Nakamura, J.Hinagata, T.Tanaka, T.Imanishi, Y.Wada, T.Kodama, & T.Do	HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors.	Biochem. Biophys. Res. Commun	290	858-864	2002
M.Uchida, N.Hino, T.Kodama, T.Do, et al	Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase.	Hepatolog	22	297-306	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T.Yamanaka, M.Uchida, & T.Doi	Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein.	Biochem. Biophys. Res. Commun	294	521-527	2002
T.Yamanaka, T.Kodama, & T.Doi	Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression.	Biochem. Biophys. Res. Commun	294	528-534	2002
A.R.Ball Jr., J.A.Schmiesing, C.Zhou, H.C.Gregson, Y.Okada, T.Doi, & K.Yokomori	Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7.	Mol. Cell. Biol.	22	5769-5781	2002

- 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中良哉	全身性エリテマト ーデスとサイトカ イン	竹原和彦, 桑名正隆, 宮地良樹編	新・膠原病： 診断と治療の 最新のポイン ト；皮膚から 内臓へ。	診断と治 療社	東京	2002	14-15