

生に関与するなど、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることが強く示唆されている。すなわち、好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が好中球を活性化し、血管炎の発症に関わっているのではないかと指摘されている。

カンジダ菌成分 (*Candida albicans* derived substances (CADS)) の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与してことを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種して証明した (Inflammation 25:381,2001)。

一方、血管炎の病態には、活性化好中球や ANCA のクロナリティーが相関しており、γ グロブリンなどの治療法の有効性を検討する必要性があった。しかし、これまでの血管炎発症機構は、病理学的解析あるいは、*in vitro* での細胞機能やサイトカインの解析によっていた。そこで、本研究では、腎炎モデルマウスを作製して、イメージング観察する系 (*in vivo* イメージング) を確立するとともに、血管内皮細胞の apoptosis カスケードを解析することにより、血管炎発症機構を検討することにした。本年度は、特に、*in vivo* における好中球活性化による血管傷害機構の解明を目的とし、腎微小血管傷害の誘導とその血流動態について検討した。

B. 研究方法

- 1) 血管炎モデルマウスの調整: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質 (CADS および CAWS) を投与して誘導した。
- 2) *In vivo* イメージング: C57BL/6 マウス (オス、9 週齢) に CAWS (150 mg/mouse) を iv 投与し、その 3 時間後に anti-mMPO (1 mg/mouse) を iv 投与した。その 5 日後、同様に CAWS と anti-mMPO を投与した後、加えて fMet-Leu-Phe (FMLP, 10^{-8} mol/mouse, 細菌由来トリペプチド) を iv 投与し、その 3 日後に腎表面における血流状態を観察した。血流の可視化には FITC-dextran を用い、各マウスの腎表面における尿細管周囲毛細血管の血流を観察した。観察される血流動態は顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影し、DVD に録画した。
- 3) 血管内皮細胞 (HUVEC) apoptosis にかかわるシグナルの変動の解析: 抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により MAPK 活性および Caspase 活性を測定した。

C. 研究結果

1) CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100%近い値を示した。

2) *in vivo* イメージングにおいては、CAWS、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe の投与によって、腎微小循環が悪化してくる様子が観察された(図1)。

また、*in vivo* イメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた(図1)。



図1 CAWS 誘導の腎血管傷害の *in vivo* イメージング
CAWS + anti-mouseMPO + fMet-Leu-Phe の投与による状態

また、腎臓表面血管の流速の変化も CAWS + anti-mouseMPO + fMet-Leu-Phe の時に、悪化することがわかった(図2)。具体的には、血流速度の低下・血流停止・血液の逆流等の現象が観察され、CAWS または FMLP 単独投与の場合と比較し、両者に加えて anti-mMPO を投与した場合に血流停止が誘発され(観察した血管の約 10%)、

広範囲にわたる腎表面血流の悪化が観察された(約 30%)。さらに、この腎微小循環の悪化には血管内皮への白血球の接着を伴ったものも見られた。

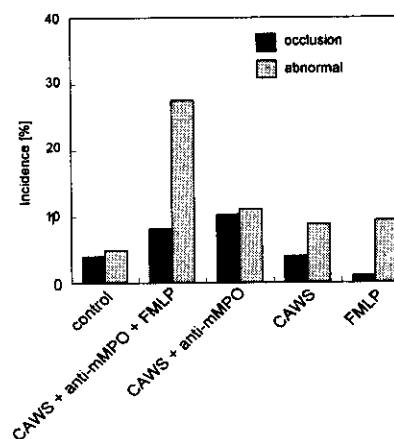


図2. 腎臓表面血管の流速の変化

さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードを検討した。その結果、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化は、Caspase8 と連動する p38MAPK が関与していた(図3)。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。

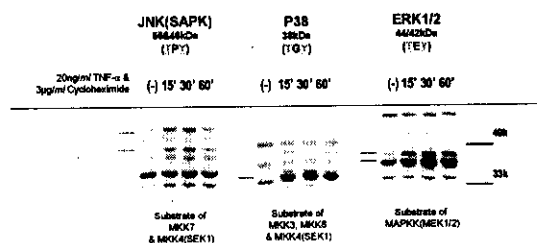


図3. 血管内皮細胞の MAP-kinase のリン酸化

D. 考察

CAWS によって、CADs 同様、冠状動脈炎が 100%近い値を示した。この血管炎誘導モデルにおいては、*C. albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であることから、CAWS などの真菌由来分子がサイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。その CAWS に加え、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe を投与し、in vivo イメージングすることにより、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた。この in vivo での現象が、腎血管傷害の誘導を説明できると思われるが、分子機構との関係を明らかにする必要があり、さらに検討する必要がある。CAWS および anti-mMPO によって誘導される腎微小血管傷害誘導モデルを用いた in vivo イメージングの解析から以下のような推論が得られた。まず CAWS によって好中球数の増加・好中球活性化が誘発される。この状態において投与された好中球自己抗体 (anti-mMPO) は、活性化によって細胞膜表面へ移行した MPO と複合体を形成し、更なる好中球の活性化・血管内皮細胞への接着・活性酸素種の産生を引き起こし、血管傷害に至るものと考えられる。このことから、白血球の中でも特に

好中球が炎症における重要な役割を担っているものと推察される。また、in vivo イメージングから、血管内皮細胞の関与が示唆されることから、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化を解析、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与が明らかとなった。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。このことは、好中球関与の内皮細胞固有のアポトーシスシグナルが存在することが示唆される。

以上から、本研究により開発された in vivo イメージングによる評価法は、IVIg など血管炎の治療の評価や、治癒機転を解析する上でも、新しい in vivo の評価系として有用であると思われる。

E. 結論

CAWS および anti-mMPO によって誘導される腎臓微小血管傷害を生体内で観察する系がほぼ確立できた。また、この in vivo イメージング解析から、白血球の関与が示唆された。CAWS により好中球数の増加・好中球活性化を誘発され、好中球自己抗体 (anti-mMPO) は、細胞膜表面へ移行した MPO と複合体を形成し、局所で好中球の活性化・血管内皮細胞への接着・活性酸素種の産生を引き起こし、血管傷害に至ることを推論させた。この in vivo イメージングに

よる評価法は、血管炎の治療法の評価や治療機構の解析として、新しい評価系として有用であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Mie Ito, Oda, Yamagoe S. Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. Protein Expression Purif. in press.
2. Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. J Biol. Chem. 277: 42136-43, 2002.
3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol. 40: 557-563, 2002.
4. Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kmeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. Free Radical Research in press.
5. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 185: 1833-1837, 2002:

6. A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001.

7. 鈴木和男:SCG/Kj マウスと ANCA 関連血管炎—血管炎病態に関与する好中球機能:動物モデルを用いた解析から— *リウマチ科* 28:560-577, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

微小循環イメージングと糖尿病性細小血管障害機構の解明

分担研究者 関塚 永一 国立埼玉病院副院長

研究要旨

近年、食生活の欧米化により、我が国においても糖尿病患者が年々増加している。慢性高血糖により生じる生体内の異常には、血管障害や血液レオロジー異常が複雑に関与し、血管障害を引き起こす。血小板、赤血球、血管内皮細胞に着目し、糖尿病における血栓形成性と赤血球変形能低下のメカニズムを検討した。光感受性物質フォトフリンを利用した *in vivo* 血栓モデルを使用し、糖尿病ラットにおいて血栓粘着開始時間および血栓成長時間において有意な短縮を認め、糖尿病微小循環における易血栓形成性を初めて示した。血栓形成の場である血管内皮細胞と血小板に注目し *in vitro* での検討を行い、まず血小板の検討では、血小板の凝集能に注目し、濁度法の欠点を改善すべく開発された、散乱光による血小板凝集能測定装置(LSPA)を用いて、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を示した。糖尿病患者の血小板においては GPIIb/IIIa の発現異常の可能性が示された。また内皮細胞の検討では、培養ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、糖尿病状態下 (高グルコース培養および高 CML-AGE 培養) にある内皮細胞と血小板の静止接触下での相互作用を検討し、光化学反応血栓モデルでは濃度依存的な血小板粘着を認め、糖尿病状態により内皮細胞は著しく機能障害を受けていることが確認された。高血糖培養および高 CML-AGE 培養した内皮細胞における機能障害は、活性酸素によるものであり、その影響は高血糖培養よりも高 CML-AGE 培養が著しいことが示唆された。糖尿病における慢性高血糖により誘発される血管障害は、グリケーションの亢進により過剰に産生される終末糖化産物 AGE によって誘導される活性酸素からの障害が著しいことが示唆された。また糖尿病性細小血管症においては、血管内皮細胞が剥離されなくとも、活性酸素による血管内皮細胞機能障害が誘発されて、血小板は直接内皮細胞に粘着し、易血栓形成性を助長していると考えられた。また、原子間顕微鏡を用い赤血球の *resealed ghost* を作成し赤血球膜のみに依存した弾性特性を計測するための手法を確立し、同手法により赤血球ヤング率は赤血球膜・内液の双方の影響を大きく反映していることが示唆された。糖尿病において赤血球膜弾性の上昇が赤血球変形能低下の一因であることが示唆された。

A. 研究目的

厚生労働省による「主要疾患の総患数」調査で、上位を占めるのは、高血圧症、糖尿病、脳卒中、がんなどの生活習慣病によるものが多い。特に糖尿病の患者数は、現在その予備軍を含めると 1400 万人にも及ぶ。糖尿病は、慢性の高血糖が原因となり、引き起こされる病気で、膵臓より生成されるインスリン量が減少したり、インスリン抵抗性が上昇することにより、体内の糖が代謝されず、慢性の高血糖を引き起こすと考えられている。

慢性高血糖により生じる生体内の異常には、血管障害や血液レオロジー異常がありこれらが、複雑に関与することにより、血栓症を引き起こすと言われている。血管障害は、その障害部位の違いにより細小血管障害と大血管障害に分類することができる。細小血管障害の例として、糖尿病の 3 大合併症である網膜症、腎症

神経障害がある。また大血管障害の例としては、脳梗塞、心筋梗塞、動脈硬化などが挙げられる。そして、血液レオロジー異常には、血球成分である血小板機能異常、赤血球変形能異常、白血球異常があり、また血漿成分自体の粘度が上昇していることも報告されている。

臨床における血小板凝集能の測定は、従来の透過光法で検出できない微小な血小板凝集塊を検出する散乱光を用いた血小板凝集計 (LSPA) を用いて糖尿病血小板の凝集能を評価してきた。糖尿病患者の血小板凝集能亢進と、高血糖状態との高い相関を証明した。糖尿病患者の血小板凝集能亢進における GPIIb/IIIa の関与についての検討を行った。血栓形成の場である血小板と血管内皮細胞に焦点を絞り、糖尿病においてどのような血管障害が誘発され、易血栓形成性に関与しているのかを検討するため、酸化ストレスの増加に注目した。高血糖状

態や高AGE状態における活性酸素の過剰産生による内皮細胞機能障害に注目し、検討を進めた。糖尿病における血液レオロジー異常として、赤血球弾性が健常者に比べ有意に大きいことが示されているが、赤血球膜のみの弾性を調べた例はない。原子顕微鏡を用い、赤血球の閉じたゴーストを作成し赤血球とゴーストの弾性を比較することにより赤血球膜弾性変化が赤血球変形能に与える影響について検討した。

B. 研究方法

1) 糖尿病ラットの血栓形成モデル

1-1) ラットの *in vivo* 血栓モデル

ラットの腸間膜細小動脈における *in vivo* 血栓モデルを作成した。このモデルは、ラットに光感受性物質フォトフリンを投与し、腸間膜に水銀ランプを照射することで血栓を誘発させる血栓モデルである (図1)。

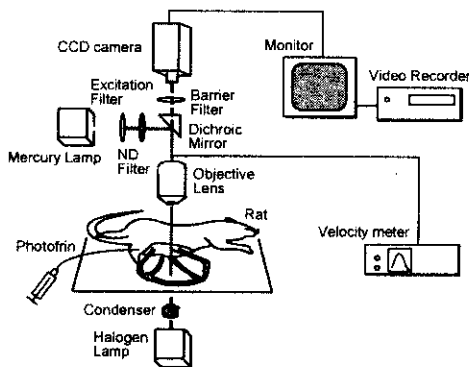


図1. *in vivo*血栓モデル

図2の血栓形成過程を示した画像において、光を照射してから血管壁に血小板が粘着するまでの時間を血小板粘着時間 (T_i)、光を照射してから血栓ができ血管が閉塞するまでの時間を (T_o)、血小板が粘着を開始し血管が閉塞するまでの時間を ($T_o - T_i$) とし、 T_i と $T_o - T_i$ について評価を行った。

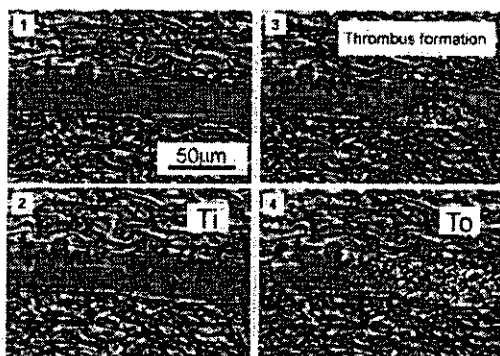


図2. 血栓形成過程

1-2) STZ 誘発糖尿病ラット

7週齢(180-200g)Wistar系雄性ラットに対し、streptozotocin(Sigma社)55mg/kgを大腿静脈より注入し3週間後、STZ誘発糖尿病ラットとして使用した。本実験ではこれを糖尿病群とした。コントロール群には10週齢(270-310g)ラットを使用し糖尿病群と週齢を合わせるようにした。

1-3) 透過型電子顕微鏡による血小板血栓の検討

ラット腸間膜に作成した血栓部位をマーキング固定し、よる電顕画像で観察した。

2) 散乱光法による糖尿病患者の血小板凝集能測定

2-1) 散乱光法による血小板凝集計の検出感度と臨床応用を目指した評価法の検討

まずサイズの異なるマイクロビーズを用いた検出感度の検討と、本装置の出力結果と顕微鏡観察から求め、凝集塊の径分布との比較検討した。凝集能凝集惹起物質の濃度と測定時間における独自の解析方法を実施し、臨床応用に耐えうる標準化の検討を行った。

2-2) 糖尿病患者の血小板凝集能亢進における GPIIb/IIIa の関与

クエン酸採血後、血液を遠沈させ、PRPを作成し、GPIIb/IIIa抗体を投与して30分間インキュベーションした。インキュベーション後、本装置を用いて測定を開始した。開始1分後に凝集惹起物質を投与し、その後4分間測定を行い、凝集惹起剤投与から2分間の小凝集塊からの散乱光強度の積算値を評価指標として用いた。凝集惹起剤としてADPとepinephrineを、GPIIb/IIIaの抗体としてFR144633(藤沢薬品工業)を用い、FR144633の凝集抑制効果から、糖尿病患者の血小板凝集能亢進におけるGPIIb/IIIaの関連について検討を行った。

3) 糖尿病状態下の培養内皮細胞と血小板の粘着

3-1) D-glucose および AGE 付加

糖尿病状態の内皮細胞を作成するために、D-glucose および終末糖化産物であるCML-AGEを、糖尿病における血中濃度を考慮した濃度に調整した。また、血小板PRPは健常者および糖尿病患者の血小板を用いた。そして、光照射範囲内における血小板粘着面積を用いて評価を行った (図3)。

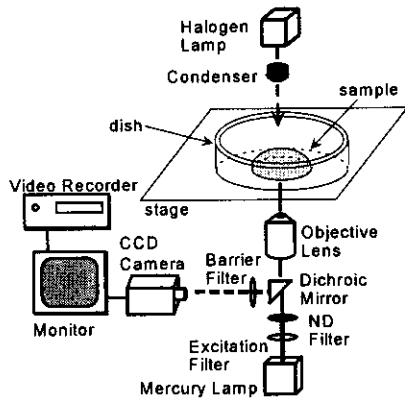


図3. *in vitro*血栓モデル

3-2)糖尿病と酸化ストレス

血栓形成における内皮細胞機能障害を検討するため、酸化ストレスの増加に注目した。酸化ストレスに関しては、高血糖状態や高AGE状態における活性酸素の過剰産生による増加が報告されている。そこで、本研究においてもこの活性酸素による内皮細胞機能障害に注目し、検討を進めた。用いた活性酸素消去剤は、スーパーオキシドの消去剤であるSOD、H₂O₂の消去剤であるカタラーゼ、ヒドロキシラジカルの消去剤であるDMSOを用いた。

4)糖尿病赤血球の変形能低下

4-1)毛細管を流れる赤血球の観察

高速度高感度ビデオカメラ顕微鏡システムを用い、毛細血管では個々の赤血球がわずかな血漿部分を挟んで並び、進行方向に頂部を突出したパラシュート型あるいは砲弾型に変形しながら移動する(図4)。



図4 微小血管を流れる赤血球^[15]

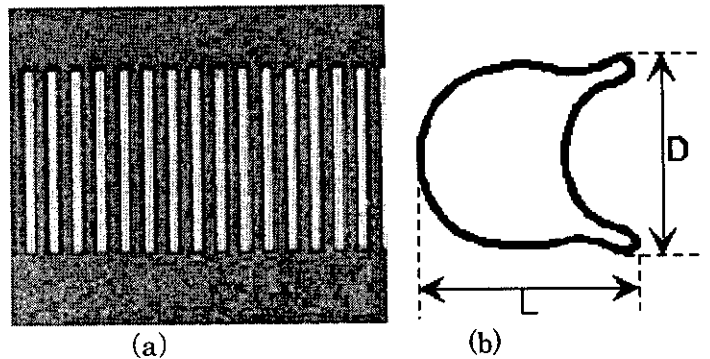
4-2) マイクロチャネル法

マイクロチャネル法は、狭い流路を通過する赤血球の個々の変形指数を求める方法である。水晶ガラス基盤上にドライエッチングを用い

て溝を作り光学研磨したガラス基盤を圧着させることで透過顕微鏡にて観察可能なマイクロチャネルアレイを用いて研究が行われている。図5(a)にマイクロチャネルアレイの一例を示す。

赤血球変形能の評価は、血流方向の赤血球長 L と血管方向の赤血球径 D の比を赤血球変形指数(Deformation Index; DI)として(図5(b)), 得られた赤血球画像より計算する。

$$DI = \frac{L}{D}$$



(a) マイクロチャネルアレイ

(b) マイクロチャネルを通過する赤血球形状

図5 マイクロチャネル法

4-3)原子間顕微鏡を用いた糖尿病 ghost の弾性率

resealed ghost は Nash ら^[2]の方法を参考に作成した。また, resealed ghost と膜の状態が同じになるように処理をした赤血球を作成し, 赤血球 2 とした。赤血球および Resealed ghost 懸濁液をディッシュ(IWAKI, poly-L-lysine コート)に滴下・静置後 PBS にて洗浄し, 付着したものを PBS 中で観察・計測した。硬化処理としては 1% glutaraldehyde に 30 分接触させた後 PBS にて洗浄した。観察の際, 試料は 2.5% glutaraldehyde により固定後 ethanol にて脱水し, 乾燥を行った。

透過照明一体型 AFM スキャナ(NBV100, Olympus)を用いた。AFM のフォースモジュレーションを用いて, フォースカーブ(Fig.1)を計測した。カンチレバープローブのたわみ量およびプローブの移動距離より, 試料にかかる力 F と試料の変形量 δ の関係を求め, 次式に示す Hertz model を用いて解析することにより赤血球のヤング率 E を求めた。

$$F = \frac{\pi \tan \alpha}{2(1-\nu^2)} E \delta^2$$

ここで α はチップ先端角の 1/2, ν はポアソン

比であり、非圧縮と等方性を考慮し 0.5 とする (図 6)。

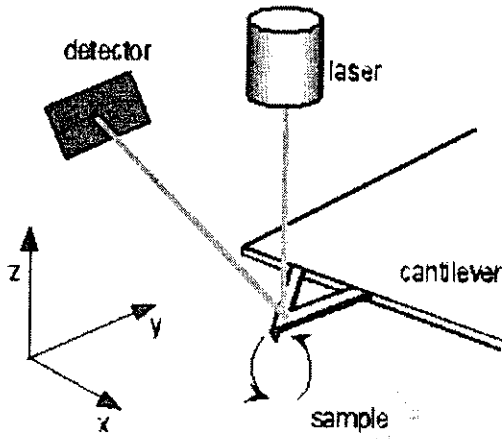


図 6 AFM の原理図

C. 研究結果

1) 血小板粘着開始時間、血栓成長時間ともに、糖尿病ラットにおいて有意に短縮されていることがわかった。このことから、糖尿病における易血栓形成性が示された(図7)。

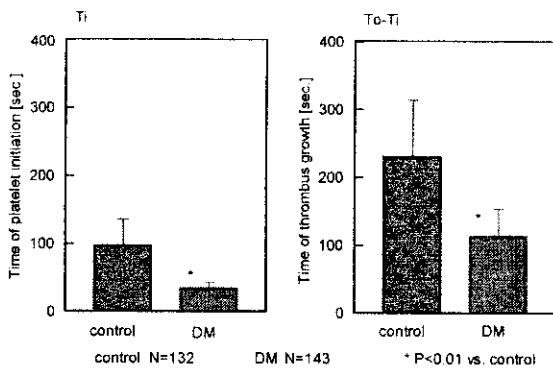


図 7. 糖尿病における易血栓形成性



図 8. ラットの腸間膜における血小板血栓の電顕画像

ラット腸間膜に作成した血栓部位を電顕画像で観察することにより、本モデルにおける血小板血栓は内皮細胞非剥離型血栓であり、その大部分が内皮細胞と血小板により構成されていることを確認した (図 8)。

2) 糖尿病患者の血小板凝集能亢進

2-1) サイズの異なるマイクロビーズを用いた検出感度の検討と、本装置の出力結果と顕微鏡観察から求めた凝集塊の径分布との比較の実験を通し、本装置の微小血小板凝集塊に対する高い検出精度を見出した。

2-2) 健常者の血小板、糖尿病患者の血小板ともに FR144633 による凝集抑制作用が、濃度依存的に確認された。また低濃度の FR144633 投与時には両群において有意な差が見られ、高濃度の FR144633 投与時には、両群ともにほぼ完全に凝集が抑制された。

3) 糖尿病の血管内皮細胞障害における活性酸素の関与

3-1) 同一条件下での内皮細胞では、各群ともに、健常者と糖尿病患者との血小板の違いによる粘着の差異は認められなかった。また健常者および糖尿病患者の血小板を個々に見てみると、内皮細胞の条件により、血小板の粘着面積に有意な差が認められた。このことから、本モデルにおける血小板と内皮細胞の粘着は血小板よりも内皮細胞の状態に依存することが示された (図 9)。

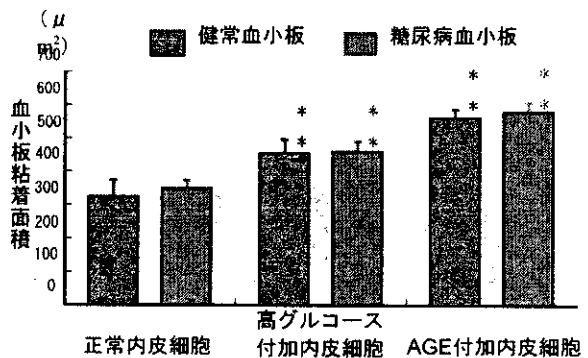


図 9. 内皮細胞と血小板の糖尿病モデルにおける粘着

3-2) 3種の活性酸素消去剤による血小板粘着抑制効果を観察することができた。また高 CML-AGE 培養において活性酸素消去剤による血小板粘着抑制率が高いことが示された。以上より、本モデルにおいて、糖尿病状態下における血管内皮細胞への活性酸素障害は著しく、その要因は、高血糖培養よりも高 CML-AGE 培養によるものが強いと考えられる (図 10)。

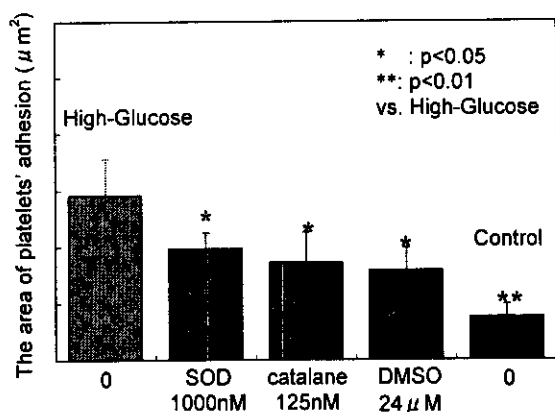


図 10. 血小板粘着能の活性酸素の関与

4) 赤血球変形能と膜弾性率

高速度高感度ビデオカメラ顕微鏡システムを用い、毎秒 1000 画面の速度でビデオ収録すると、個々の赤血球変形指数 (DI) が解析でき、ラット毛細血管やマイクロチャンネルレイの擬似毛細管でも、糖尿病赤血球のほうが DI が低下していた。

硬化処理を行った resealed ghost は無処理のものに比べてヤング率が有意に大きいことがわかった。これより赤血球膜のみのヤング率を計測可能であることが示された。すなわち、本手法は赤血球膜に関する新しい指標を提案するものであるといえる (図 1 1)。赤血球 2 は resealed ghost に比べてヤング率が有意に大きいことがわかった。これより赤血球細胞質が赤血球ヤング率に影響を与えていることがわかった。赤血球細胞質はヘモグロビンを含む粘性の高い液体であり、その粘度はヘモグロビン濃度(約 35g/dl) に依存している。一方 resealed ghost の内部は PBS で満たされている。血球内液の密度の違いが内部からの圧力の違いとなり、ヤング率の差として表れたと考えられる。すなわち、赤血球内部の状態が赤血球弾性および変形能に関わっていることが示唆された(図 1 2)。

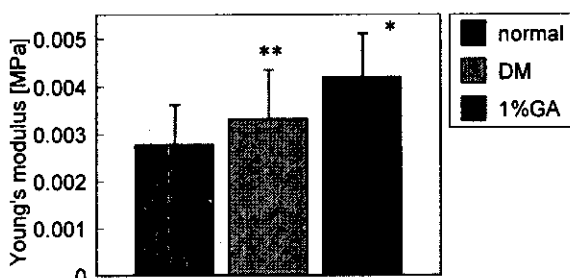


図 1 1. 赤血球のヤング率

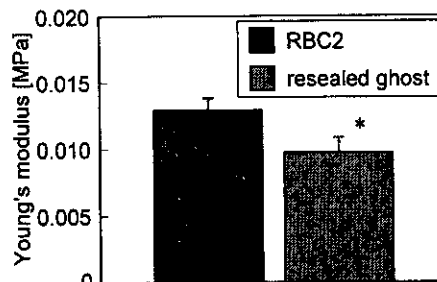


図 1 2. 赤血球および resealed ghost の比較

D. 考察

1) 糖尿病ラット細動脈における易血栓性
糖尿病群において血小板粘着開始時間(Ti)、血栓形成時間(To-Ti)の時間短縮が認められた。これは同程度の傷害を与えた際に糖尿病群ではコントロール群に比し、血栓形成が促進されていることを意味し、糖尿病における易血栓形成を示唆しているものと考えられる。このことは糖尿病状態では血栓形成における一次凝集、二次凝集が共に亢進しているという事を示唆している。血小板血栓形成過程には血小板膜状に存在する血小板膜糖蛋白(GP)が重要な働きを担っている。血栓形成の一次凝集には vWF に対するレセプターである血小板膜糖蛋白 GPIb、二次凝集には主にフィブリノーゲンに対するレセプターである血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa が関与している。糖尿病では 2 つの膜糖蛋白が過剰に発現している可能性が考えられた。

2) 散乱光血小板凝集計を用いて、解析領域を実験開始後 1 分～2 分の間における 1 分間の積分値に限定することで、惹起物質投与後の 1 分間の血小板凝集過程における初期の鋭敏な凝集反応に焦点を絞り検討を行なった。本実験で用いた 3 種類の凝集惹起物質において、小凝集領域において糖尿病血小板における重篤度を示す HbA1c に依存して、散乱光強度が有意に上昇している事が分かる。この結果から糖尿病血小板は、健常血小板に比べ、放出反応により生じる ADP、Epinephrine や血管内皮細胞構成要素の一つである Collagen に刺激され、容易に凝集する事が考えられる。

健常者の血小板、糖尿病患者の血小板ともに GPIIb/IIIa に対する抗体 FR144633 による凝集抑制作用が、濃度依存的に確認された。また、低濃度の FR144633 投与時には両群において有意な差が見られ、高濃度の FR144633 投与時には、両群ともにほぼ完全に凝集が抑制された。これより、糖尿病患者の血小板においては GPIIb/IIIa の発現異常の可能性が示された。

3) 糖尿病下の活性酸素による内皮細胞障害については、種々の活性酸素消去剤による血小板

粘着抑制効果を観察することができた。また、高 CML-AGE 培養において活性酸素消去剤による血小板粘着抑制率が高いことが示された。以上のことより、本モデルにおいて、糖尿病状態下における血管内皮細胞への活性酸素障害は著しく、その因子は、高血糖培養よりも高 CML-AGE 培養によるものが強いと考えられる。これにより、糖尿病における易血栓形成性は、慢性高血糖により亢進されるグリケーションにより、過剰に蓄積される終末糖化産物 AGE からの活性酸素による内皮細胞機能障害が深く関与していることが示唆された。

E. 結論

慢性高血糖により生じる生体内の異常には、血管障害や血液レオロジー異常が複雑に関与し、血栓症を引き起こす。このような糖尿病における障害を踏まえ、ラットに光感受性物質フォトプリンを投与した後に、水銀ランプを用いて光を照射することにより血栓を誘発する *in vivo* 血栓モデルを使用し、糖尿病ラットにおいて血栓粘着開始時間および血栓成長時間において有意な短縮を認め、糖尿病微小循環における易血栓形成性を初めて示した。次に糖尿病における易血栓形成性を誘発している要因を明らかにするために、血栓形成の場である血管内皮細胞と血小板に注目し *in vitro* での検討を行なった。糖尿病患者の血小板においては GPIIb/IIIa の発現異常の可能性が示された。

まず血小板においての検討では、血小板の凝集能に注目し、濁度法の欠点を改善すべく開発された、散乱光による血小板凝集能測定装置 (LSPA) を用いて、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を示した。また内皮細胞における検討では、培養ヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC を用いて、糖尿病状態下 (高グルコース培養および高 CML-AGE 培養) にある内皮細胞と血小板の静止接触下での相互作用を検討した。この検討によれば、光化学反応血栓モデルでは、内皮細胞に取り込まれたものよりも、血清中における光感受性物質が、内皮細胞に障害を与えていることが示唆された。糖尿病状態として高血糖培養および高 CML-AGE 培養した内皮細胞を用いて、血小板の粘着面積を評価した結果、濃度依存的な血小板粘着を認めたことから、これらの糖尿病状態により内皮細胞は著しく機能障害を受けていることが確認された。高血糖培養および高 CML-AGE 培養した内皮細胞における機能障害は、活性酸素によるものであり、その影響は高血糖培養による影響よりも高 CML-AGE 培養による影

響が著しいことが示唆された。

糖尿病における慢性高血糖により誘発される血管障害は、グリケーションの亢進により過剰に産生される終末糖化産物 AGE によって誘導される活性酸素からの障害が著しいことが示唆された。また糖尿病性細小血管症においては、血管内皮細胞が剥離されなくとも、活性酸素による血管内皮細胞機能障害が誘発されて、血小板は直接内皮細胞に粘着し、易血栓形成性を助長していると考えられた。

赤血球の resealed ghost を作成し赤血球膜のみに依存した弾性特性を計測するための手法を確立し、同手法により赤血球ヤング率は赤血球膜・内液の双方の影響を大きく反映していることが示唆された。また、糖尿病において赤血球膜弾性の上昇が赤血球変形能低下の一因であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mami Ishikawa, Ejichi Sekizuka, Chikara Oshio, Shuzo Sato, Noriyuki Yamaguchi, Satoshi Terao, Kosuke Tsukada, Haruyuki Minamitani, Takeshi Kawase : Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows Journal of the Neurological Sciences 194:59-69,2002
- 2) Mami Ishikawa., Eiichi Sekizuka., Boris Kricshek, Ulrich Sure., Raif Becker, Helmut Bertalanffy : Role of nitric oxide in the regulation of spinal arteriolar tone Neurosurgery 50(2):371-378,2002
- 3) K. Hatanaka, R. Hokari, K. Matsuzaki, S. Kato, A. Kawaguti, S. Nagao, H. Suzuki, K. Miyazaki, E. Sekizuka, H. Nagata, H. Ishii & S. Miura : Increased expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) and lymphocyte recruitment in murine gastritis induced by Helicobacter pylori Clin Exp Immunol 130:183-189,2002
- 4) Kosuke Tsukada, Yosataka Ogata, Noriyuki Yamaguchi, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, and Haruyuki Minamitani Blood flow analysis in cerebral microcirculation during exchange blood transfusion with hemoglobin-encapsulated liposome, Microcirculation Annual 2002, pp.41-42, 2002, October
- 5) Tadas Ozawa, Eiichi Sekizuka, Kosuke Tsukada, Tomohiro Uchida, Hiromiti Nakadate, Chikara

- Oshio and Haruyuki Minamitani : Mechanism of increased platelet aggregation in Diabetes Mellitus -Newly-devised investigation with laser scattering platelet aggregometer, Microcirculation Annual 2002, pp.53-54, 2002,October
- 6) Haruyuki Minamitani, Kosuke Tsukada, Eiichi Sekizuka, and Chikara Oshio : Measurement of blood flow and oxygen tension using fluorescent and phosphorescent molecular probes in organ microcirculation, Microcirculation Annual 2002, pp.13-14, 2002,October
- 7) Tomomi Uchida, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Kousuke Tsukada, Tadashi Ozawa Hiromiti Nakadate and Haruyuki Minamitani : Investigation on the thrombus formation of diabetes mellitus, Microcirculation Annual 2002, pp.67-68, 2002, October
- 8) Hiromiti Nakadate, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Kousuke Tsukada, Tomomi Uchida, Tadashi Ozawa and Haruyuki Minamitani : Fundamental study of a particle counting method using laser-light scattering in detection of platelet aggregation under diabetes mellitus, Microcirculation Annual 2002, pp.129-130, 2002,October
- 10) 南谷晴之, 高橋未帆, 長尾朋和, 関塚永一, 今関善晴, 大塩力: 血栓形成過程における白血球動態と活性酸素産生 日本バイオレオロジー学会誌 16(1):29-31, 2002
- 11) 南谷晴之, 川村友美, 塚田孝祐, 飯島淳彦, 関塚永一, 大塩力 原子間力顕微鏡による赤血球弾性の計測 電子情報通信学会論文誌 122-C(9): 1664-1671-7, 2002
- 12) 山口則之, 小野塚聡, 関塚永一, 赤路和則 糖尿病における脳微小循環障害の特徴と外科的治療 Complication(糖尿病と血管)、特集糖尿病と微小循環, 7(2):68-74, 2002.11
- 3) 小澤正, 関塚永一, 大塩力, 中樞浩康, 広瀬耕徳, 南谷晴之 光化学反応血栓モデルにおける糖尿病状態下の内皮細胞・血小板の相互作用の検討 第9回日本ヘモレオロジー学会学術集会、埼玉 2002、11/21-11/22
- 4) 新井達也, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力, 長谷憲多朗, 南谷晴之 血液希釈時の脳微小循環細動脈の血行動態・酸素分圧計測 第9回日本ヘモレオロジー学会学術集会、埼玉 2002、11/21-11/22 当院主催, 学会長関塚永一
- 5) 泉田太郎, 関塚永一, 石井主税, 末次麻里子, 大塩力 超高速高感度ビデオカメラシステムを用いた自然発症高血圧ラットにおける微小循環速度分布の検討 第9回日本ヘモレオロジー学会学術集会、埼玉 2002、11/21-11/22

H. 知的財産権の出願/登録状態
特許申請なし。

2. 学会発表

- 1) Koji Miyazaki, Ejichi Sekizuka, Kazuhiko Ooya, Chikara Oshio, Haruyuki Minamitani, Kazuo Suzuki Phagocytic effect of LECT2 on kupffer cells Workshop on Dysfunction of Host-Defence-2002-, Kyoto, Kyoto, 2002, November 8-9
- 2) 西村俊彦, 高橋未帆, 長尾朋彦, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之 ALA-PDT の血流遮断効果における光感受性物質動態の解析 第11回日本バイオイメーキング学会学術集会、名古屋 2002、10/31-11/1

心筋・肝細胞・内皮細胞等のマルチカラーイメージングと分子機能解析

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長
研究協力者 大幡久之 昭和大学薬学部薬理学教室助教授

研究要旨

組織細胞障害の解析研究に応用可能な細胞内生化学現象の画像化法の開発を行った。第一に細胞死に係るシグナルトランスダクションに関係するカスパーゼ活性化の画像化法を検討した。カスパーゼ3あるいはカスパーゼ8/9により特異的に切断されるペプチド配列を ECFP と EYFP の間に結合させた融合タンパク質を細胞内で発現させ、蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) の変化を利用してカスパーゼの活性化を蛍光の色の変化として捉えた。カスパーゼ3とカスパーゼ8/9の活性化を比較すると、細胞死誘発性刺激の種類の違いによってタイミングの違いが観察された。第二に細胞内カルシウムイオン、pH、NO 産生等を同時にイメージング可能なマルチカラーイメージング解析法を確立し、細胞障害とこれらパラメータ間の関係の解析を開始した。

A. 研究目的

細胞内で生じる生命現象を蛍光プローブを用いて光の変化に変換し、蛍光顕微鏡で画像解析する手法が生物学、医学領域の研究に利用され、様々な新知見を生んでいる。この解析法の利点は、生命現象を、生じている場で、二次元、三次元、さらには時間経過もあわせて四次元的に解析することが可能な点にあり、また観察の非侵襲性という特徴とあわせて、組織細胞障害の解析研究においても極めて有用な手法と考えられる。そこで本研究では、組織障害に関係すると考えられている細胞内生化学現象のイメージング解析法の開発を行う。研究は2つの方向から開始する。その一つはカスパーゼ活性化画像化用蛍光プローブの開発であり、二つめは細胞障害に係る複数の因子のマルチカラー同時イメージング技術の開発改良である。

B. 研究方法

1. カスパーゼ活性化のイメージング

蛍光特性の異なる2つの GFP 変異体の ECFP 及び EYFP の間にカスパーゼ8/9あるいはカスパーゼ3の基質となるペプチド配列(それぞれカスパーゼ3由来の配列 (LDCGIETDSGVD)、および poly-(ADP-ribose)-polymerase 由来の配列 (KRKGDEVDGVDE))を挿入した融合タンパク質をカスパーゼ活性検出プローブとして作製した。この融合タンパク質は ECFP と EYFP が近接しているため蛍光共鳴エネルギー遷移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) を起こすが、カスパーゼによりペプチド配列部分が切断され CFP と YFP が離れると FRET が起こらなくなる。そこで 458nm 励起によって生じる 467.5-497.5 nm および 515-545nm の蛍光の蛍光強度比画像からカスパーゼ活性をイメージングした。

ミトコンドリア膜電位を測定する場合には tetramethylrhodamine methyl ester (50 nM)を添加した。He/Ne レーザーによる 543 nm の励起光を用い、560 nm 以上の蛍光を測定した。カスパーゼ活性とミトコンドリア膜電位は、マルチスキャンモードにより同時に測定した。画像処理、データ解析には MetaFluor (Universal Imaging) を用いた。

2. 細胞内 Ca^{2+} 応答、 pH_i 変化及び NO 産生のマルチカラーイメージング

カバーガラス上に培養したウシ大動脈内皮細胞に蛍光プローブを取り込ませ、同時測定のために設定したフィルターをセットした共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (RTS 2000MP, Bio-Rad) を用いてマルチカラーイメージングを行った。 Ca^{2+} 蛍光プローブとして fluo 4/AM 及び Fura Red/AM、NO 蛍光プローブとして DAR-4M/AM、 pH 蛍光プローブとして BCECF/AM を用いた。

1) $[Ca^{2+}]_i$ と NO 産生あるいは pH_i と NO 産生の同時測定： fluo-4(BCECF) と DAR-4M は Kr/Ar レーザーの 488 nm と 568 nm 波長によって各々励起され、fluo-4 の蛍光 (503~553 nm) と DAR-4M の蛍光 (580~700 nm) を同時にデジタル画像記録し、解析時に目的としない蛍光の漏れ混みによる影響を補正した。

2) $[Ca^{2+}]_i$ 、 pH 及び NO 産生の 3 重同時測定：細胞内の BCECF、DAR-4M 及び Fura Red は Kr/Ar レーザーの 488 nm 及び 568 nm 波長により励起され、図 5 に示すフィルター条件で、BCECF、DAR-4M 及び Fura Red の蛍光を各々同時にデジタル画像記録し、解析時に目的としない蛍光の漏れ混みによる影響を補正した。

流れ刺激は細胞の上方向に 25 μm 、水平方向に 300 μm の位置に固定した直径 500 μm の流出口から peristaril pump を用いて 250 mm/sec の流速で水平方向に栄養液を持続的に灌流することにより与えた。

C. 研究結果

1. カスパーゼ活性化の画像化

方法に記した融合タンパク質発現用プラスミドを作製、HeLa 細胞に発現させ、TNF- α (200 ng/ml) もしくは staurosporine (3 μM) を添加して細胞死を誘発し、6 時間後細胞より融合タンパク質を抽出した。抗 GFP 抗体を用いてウェスタンブロットを行なったところ、細胞死刺激による融合タンパク質の切断が確認された (図 1)。また、蛍光スペクトルより FRET 効率の低下が確認され、融合タンパク質が意図した通り機能していると考えられた (図 2)。活性化リコンビナントヒトカスパーゼ 1-10 を用いて、これらのプローブがどのカスパーゼの基質となるか調べた。IETD を含むプローブはカスパーゼ 8 及びカスパーゼ 9 による切断活性が高く、カスパーゼ 5、カスパーゼ 6 によっても弱い切断活性が認められた。DEVD を含むプローブはカスパーゼ 3 による切断活性が高く、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9 に非常に弱い切断活性が認められた。このように両プローブはそれぞれカスパーゼ 8 及び 9、カスパーゼ 3 の活性を主にモニターすると考えられる。

このカスパーゼ活性測定プローブを HeLa 細胞に発現させ、さらに 50 nM tetramethylrhodamine methyl ester (TMRME) を添加しミトコンドリア膜電位のイメージングを行ない、細胞死刺激時のカスパーゼ活性とミトコンドリア膜電位の変化の同時測定を試みた。共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Zeiss, LSM510) を用い 2 分間隔で画像化したところ、TNF- α 、staurosporine 添加 1-2 時間後からカスパーゼ活性の上昇及びミトコンドリア膜電位の低下を示す細胞が現れ始めた (図 3)。変化を示すまでの時間は細胞個々で異なっており、6 時間以上経過しても変化を示さないものも存在した。TNF- α 刺激時は、カスパーゼ活性上昇とほぼ同時かそれより遅れてミトコンドリア膜電位の低下が観察され、カスパーゼプローブ間で大きな違いは認められなかった。一方 staurosporine 刺激時では、ミトコンドリア膜電位低下がカスパーゼ 8/9 活性の上昇より遅く観察される細胞が多く、

カスパーゼ 3 活性の上昇より早く観察される細胞が多かった。以上の結果、細胞死を誘発する薬物の種類によってカスパーゼ活性化、ミトコンドリア膜電位低下の動態が異なることが明らかとなった。

2. 胞内 Ca^{2+} 応答、 pH_i 変化及び NO 産生のマルチカラーイメージング

(2-1) LPA 存在下流れ刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、 pH_i 酸性化及び NO 産生の関連性

$[Ca^{2+}]_i$ 及び NO の同時測定の結果、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び NO 産生は、流れ刺激 (250 mm/sec) により LPA 濃度依存的 (1~10 μ M) に上昇した。この上昇は常に $[Ca^{2+}]_i$ が先行した (図 6)。また、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は反復的及び持続的なパターンが観察され、NO は持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の場合に大きく産生された。同一条件下で、NO synthase (NOS) の阻害剤である N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 mM) を 30 分間前処置したところ、10 μ M LPA 存在下、流れ刺激による NO 産生の抑制は軽度であったことから、LPA 存在下、流れ刺激によって NOS 以外の経路を介して NO が産生する可能性が示唆された。そこで、「酸性条件下で NO_2^- の還元による NO 産生」という経路が関与しているかについて細胞内 pH (pH_i) 低下及び NO 産生を同時測定することにより検討を行なったところ、 pH_i 低下と NO 産生の間に強い相関性が認められた。さらに、 $[Ca^{2+}]_i$ 、 pH_i 及び NO の 3 重同時測定を行なった結果、LPA 存在下流れ刺激により、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、その後、 pH_i 低下及び NO 産生が観察され、特に持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の場合に高く変化した。NO は pH_i 低下が大きいほど産生量は増大した。また、NO 産生の開始時間は pH_i 変化とほぼ同時か遅れて観察された。さらに、 Ca^{2+} free 条件下で LPA 存在下流れ刺激を与えたところ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、 pH_i 低下及び NO 産生は認められなかった (図 7)。

これらの結果により、10 μ M LPA 存在下、流れ刺激による NO 産生には、初期 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が

起こり、その後生じる pH_i 低下が深く関与していることが明らかとなった。また、10 μ M LPA 存在下、流れ刺激誘発 Ca^{2+} 応答は反復性及び持続性のパターンが観察され、そのパターンの違いによって次の細胞応答に異った影響を与えることが示唆された。本研究では特に持続性のパターンを示す細胞に注目して検討した結果、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がその後の pH_i 低下を介した大きな NO 産生に密接に関連することが示唆された。

(2-2) LPA 存在下、流れ刺激による NO 産生と細胞障害

10 μ M LPA 存在下で 10 分間の流れ刺激を与えると蛍光指示薬の漏出が認められ、同時に核への propidium iodide (PI) の集積が促進したことから細胞障害が示唆された。この細胞障害は NO 産生の大きさと相関し、NO 産生のピーク値は、刺激後剥離した細胞で高く、PI による染色が軽度な細胞では低かった (図 8)。3 重同時測定の結果、反復性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の場合、 pH_i 低下は小さく NO 産生も無いか低かったのに対して、持続性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の場合には、 pH_i 低下及び NO 産生が大きく、 pH_i 低下が大きいほど NO 産生も高かった。従って、NO は持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、高いレベルの pH_i 低下の場合に大きく産生され、細胞障害に関連することが示唆された。

D. 考 察

カスパーゼは細胞死が起こる際、細胞内で順次活性化され、情報を伝達すると考えられている一群のシステインプロテアーゼである。例えば細胞死を誘発する Fas-L や TNF- α などは受容体を介してカスパーゼ 8 を活性化し、活性化カスパーゼ 8 はカスパーゼ 3 等の下流のカスパーゼを切断、活性化して細胞死を誘発すると考えられている。また、Bcl-2 ファミリープロテインの一つである Bid の切断を介してミトコンドリアへ情報を伝達し、膜電位の低下、シトクロム c、AIF (apoptosis inducing factor) の放出、カスパーゼ 9 を活性化し

て細胞死を誘発する経路も存在するといわれている。したがって、一群のカスパーゼは細胞障害メカニズムの研究においても、解析の中心となるパラメーターの一つである。本研究では、この情報伝達システムの中心ともいえるカスパーゼ3およびカスパーゼ8/9活性化に成功した。特にカスパーゼ8/9活性の画像化は初めての報告である。今後特異性の改善、さらには複数のカスパーゼのマルチカラー同時観察をめざす予定である。

一方 $[Ca^{2+}]_i$ 、 pH_i 及びNOのマルチカラーイメージングは、本研究グループの確立した極めてユニークな解析系であり、この方法により、LPA存在下流れ刺激によるNO産生に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び pH_i 低下が密接に関わることを明らかにした。また、高濃度(10 μ M) LPA存在下流れ刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、 pH_i 変化及びNO産生は細胞障害に密接に関与しており、循環器系疾患の病態開明への新たな手がかりを与える可能性が示唆された。

E. 研究成果

- 1) Hikaru Tanaka, Eichi ISHII, R. FUJISAKI, Y. Miyamoto, Yoshio TANAKA, T. Aikawa, Toru KAWANISHI, and Koki SHIGENOBU, Effect of manganese on guinea pig ventricle. Initial depression and late augmentation of contractile force, *Biol. Pharm. Bulletin*, **25**, 323-326 (2002)
- 2) Tetsu Kobayashi, Shingo Niimi, Toru Kawanishi, Masamichi Fukuoka, and Takao Hayakawa, Changes in peroxisomes proliferator-activated receptor g-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate, *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003)
- 3) S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi, T. Hayakawa, Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res.*

Comm. **300**, 770-774 (2003)

- 4) H. Tanaka, K. Nishimaru, R. Makuta, W. Hirayama, T. Kawamura, T. Matsuda, Y. Tanaka, T. Kawanishi, and K. Shigenobu, Possible Involvement of prostaglandins $F_2\alpha$ and D_2 In acetylcholine-induced positive inotropy In Isolated mouse left atria, *Pharmacology* (In press)
- 5) 百瀬和享、松田武久、大池正宏、小原一男、Ismail Laher、杉浦清了、大幡久之、中山貢一 (2003) メカニカルストレス応答による細胞機能制御 —創薬と再生臓器開発への応用— 日本薬理学雑誌 **121**,103-111 (2003)
- 6) Hashimoto, T., M. Yamashita, H. Ohata and Kazutaka Momose: Lysohosphatidic acid enhances *in vivo* infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/ROCK-mediated pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **91**: 8-14 (2003)
- 7) Yamada, M., K. Takahashi, M. Tsunoda, G. Nishioka, K. Kudo, H. Ohata, K. Kamijima, T. Higuchi, K. Momose, M. Yamada: Differential expression of VANP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. *Pharmacogenomics J.* **2**: 377-382 (2002)
- 8) Hashimoto, T., Y. Nakano, M. Yamashita, H. Ohata and K. Momose: Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol.*, **88**, 256-261(2002)

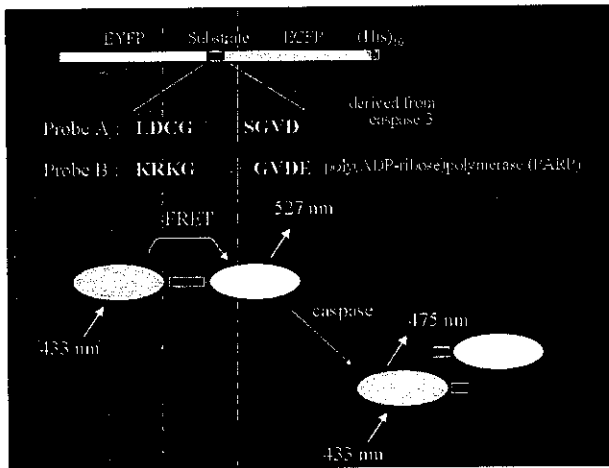


図1. 作製したカスパーゼ活性化イメージングのための融合タンパク質蛍光プローブ

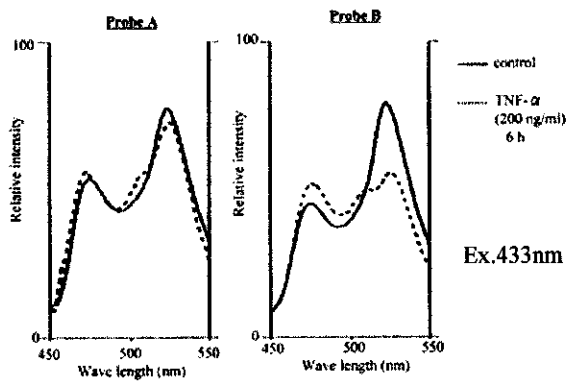


図3. TNF- α を作用されたHeLa細胞中におけるカスパーゼ活性化イメージング用プローブの蛍光スペクトルの変化

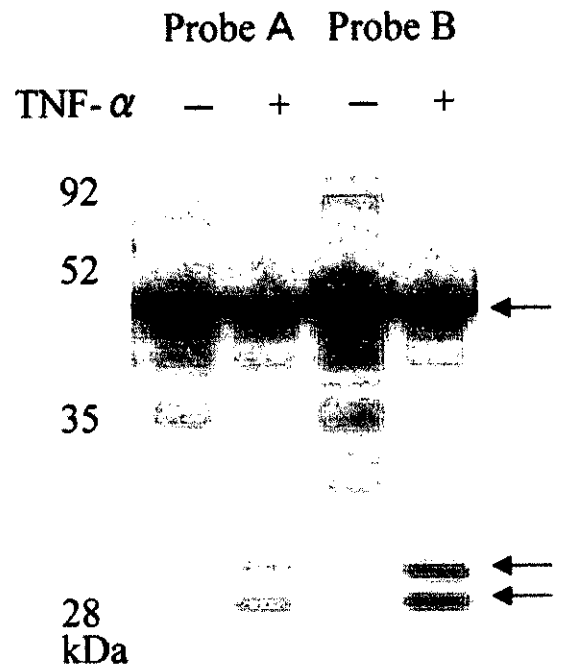


図2. TNF- α を作用させたHeLa細胞中におけるカスパーゼ活性化イメージング用プローブの切断のウェスタンブロットによる確認

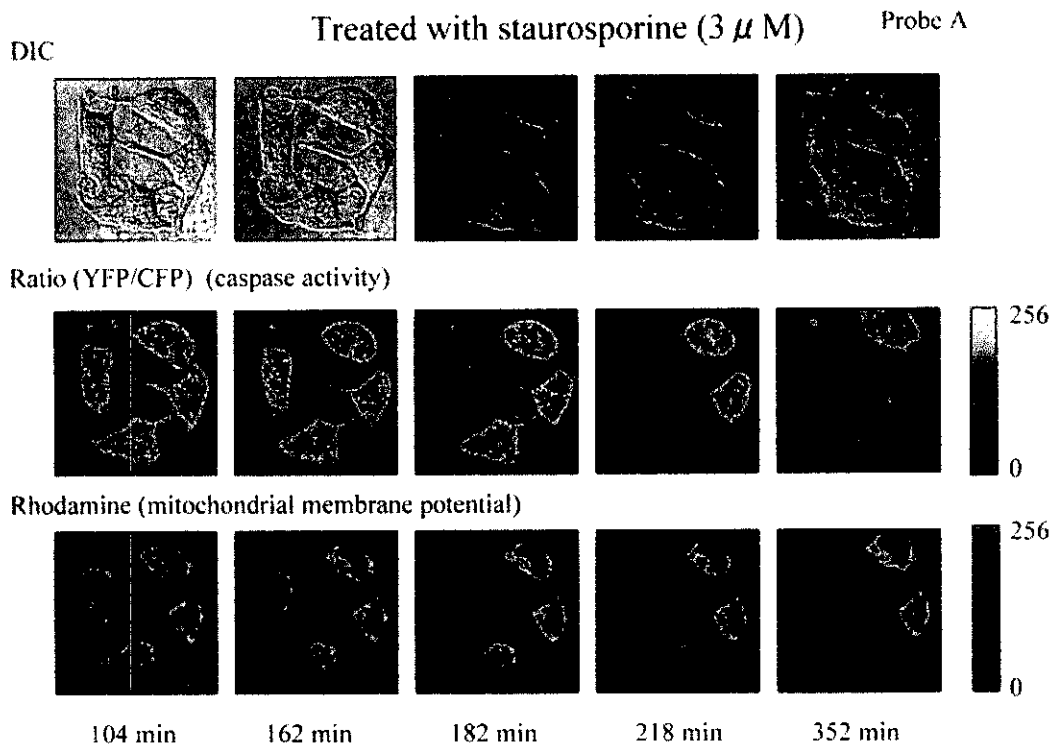


図4. Staurosporine によって誘発された細胞死におけるカスパーゼ活性化およびミトコンドリア膜電位変化のイメージング
カスパーゼ活性は、作製した融合タンパク質蛍光プローブProbeAを用いてイメージングし、蛍光強度比変化を擬似カラーで示した。右の緑バーは蛍光強度比x100である。

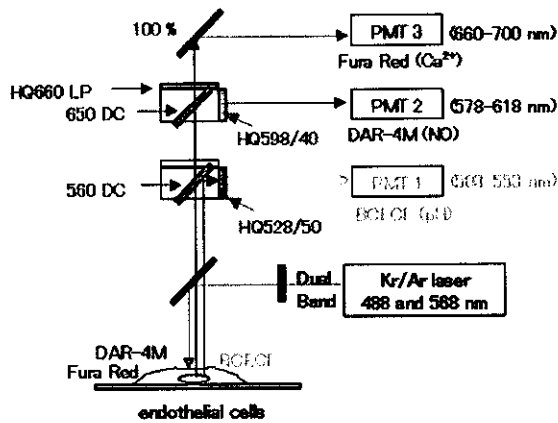


図5. $[Ca^{2+}]_i$, pH変化及びNO産生の同時測定条件
Fura red, DAR-4M及びBCECFは, Kr/Arレーザーの488 nm及び568 nmにより励起され, 560 DC及び650 DCによって分けられ, PMT1でBCECFの蛍光, PMT2でDAR-4Mの蛍光, PMT3でFura redの蛍光を検出した。PMT1ではフィルターHQ528/50を通した503-553 nm, PMT2ではフィルターHQ598/40を通した578-618 nm, PMT3ではフィルターHQ660LPを通した660-700 nmの蛍光が測定された。

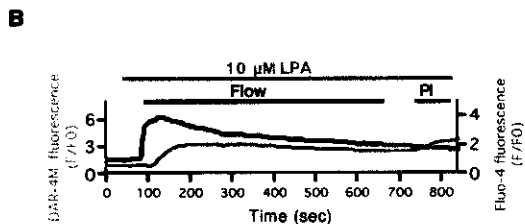
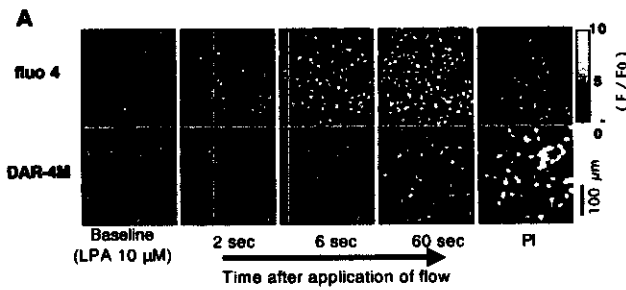


図6. LPA存在下, 流れ刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及びNO産生の同時測定の典型例

fluo 4及びDAR-4Mを同時に取り込ませたBAECを用い, LPA存在下に流れ刺激(250 mm/sec)を負荷し, 各々の蛍光強度変化(F/F0)を同時に観察した。A. 10 μ M LPA存在下, 流れ刺激によるfluo 4及びDAR-4Mの蛍光画像(F/F0)の経時変化を示した。最左側の画像(Baseline)は, 流れ刺激の適用前の画像を示し, その右側は, 流れ刺激を適用してから2, 6, 60秒後の画像を示している。最右側の画像は, 流れ刺激を止めてから5 μ M propidium iodide (PI, Ex. 568 nm, Em. 580-700 nm)適用し, 2分後の画像を示した。B. A画像中の個々の細胞蛍光(F/F0)の経時変化を示した。グラフは画像A中の任意の26個の細胞の経時変化を平均値として示した。

図8. 10 μ M LPA存在下, 流れ刺激による Ca^{2+} 応答, NO産生及び細胞障害

A. 10 μ M LPA存在下, 流れ刺激(250 mm/sec, 10 min)後, fluo 4, DAR-4M及びPI蛍光の経時変化についてPIによる染色の有無として分類した(細胞数 n=26)。a) 剥離した細胞の蛍光の平均値(n=5), b) PI適用後2分以内にF/F0上昇度が2以上であった細胞の蛍光の平均値(n=7), c) PI適用後2分以内にF/F0上昇度が1以下の細胞の蛍光の平均値(n=14)。a, b, cのDAR-4Mの蛍光ピーク値は, 各々5.61, 4.61, 2.28であった。B. 同様の実験(n=4 experiments, 細胞数: 5*106個の中で111個)からAと同一条件で分類した細胞の割合をpercentage (%)として示した。a, b, cはAのa, b, cと同一である。

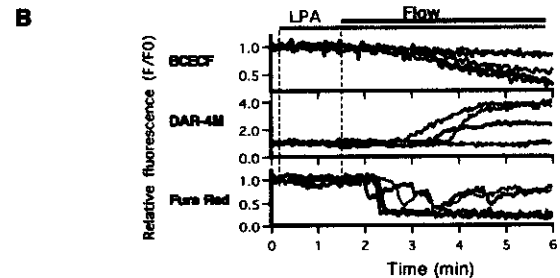
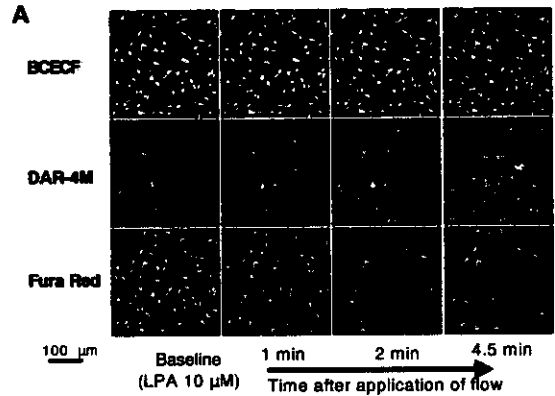
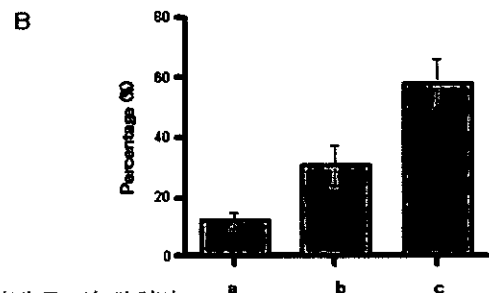
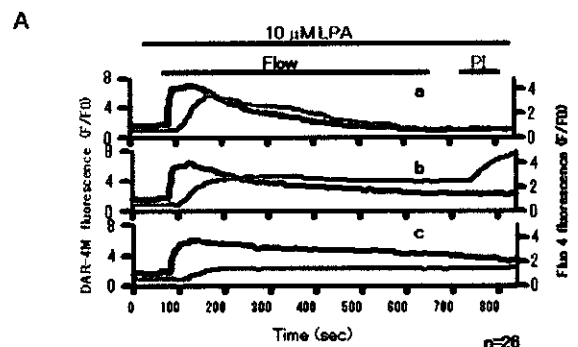


図7. LPA存在下, 流れ刺激の負荷による $[Ca^{2+}]_i$, pH変化及びNO産生の同時測定

BAECにBCECF, DAR-4M及びFura Redを取り込ませ, 10 μ M LPA存在下に流れ刺激(250 mm/sec)を負荷し, $[Ca^{2+}]_i$, pH変化及びNO産生を同時に測定した。A. 共焦点顕微鏡を用いて観察した蛍光画像を示す。左側の画像(Baseline)は無刺激時, その右側は各々流れ刺激を与えてから1, 2, 4.5分後の画像を示している。10 μ M LPA適用した時はBaselineの画像と変わらなかった。流れ刺激の流れ方向は画像の上側から下側へであった。B. 個々の細胞の経時変化を無刺激時に対する蛍光の変化率(F/F0)として示した。同一色の線グラフは, 同一細胞の $[Ca^{2+}]_i$, pH_i及びNOの変化を示している。



腫瘍・消化器系組織障害の分子機構の解析と診断治療への応用

分担研究者 村松 知成 国立がんセンター研究所生物物理部量子化学研究室 室長

研究要旨

細菌の胃腸粘膜への感染に重要とされる ATP 依存性プロテアーゼ Lon の基質特異性と活性発現機構に関する研究を行った。その結果、P₁ 部位は Leu、P₁' 部位は Ser、P₂ 部位から P₅ 部位の間に Gln が少なくとも 1 つ含まれる箇所が切断箇所として好まれることがわかった。また、活性発現機構としては His-Lys-Ser を活性中心とする、全く新しい機構が示唆されただけでなく、26S プロテアソームなどの他の ATP 依存性プロテアーゼでは見られない、ATP アーゼドメインとプロテアーゼドメインの直接的な接触が示唆される結果を得た。これらは、サルモネラ菌などによる胃腸粘膜への感染による食中毒、胃腸炎などの発症を予防・治療するための Lon プロテアーゼ阻害剤の開発につながることを期待される。

本研究は、西井亘（東京薬科大学生命科学部）、渡部暁（国立がんセンター研究所生物物理部）、高橋健治（東京薬科大学生命科学部）の各博士との共同研究である。

A. 研究目的

食中毒の原因となるサルモネラ菌などの細菌は胃腸粘膜に感染し、胃腸炎を引き起こす。これらの感染力を規定するものとしてはマクロファージによる食食作用への抵抗性が大きな要因となっているが、ごく最近になって、サルモネラ菌の *lon* 遺伝子がそれに大きく関与していることが報告された。これはマクロファージによる殺菌作用が細菌の *lon* 遺伝子により損なわれるためである。ところが、どのようなメカニズムによってそのような抵抗性を示すことができるのか、詳細は明らかではない。

lon 遺伝子の産物は ATP 依存性プロテアーゼ（Lon プロテアーゼ）で、大腸菌、サ

ルモネラ菌などの原核生物に存在するだけでなく、酵母、ヒトなどの動物細胞、植物細胞などの真核生物でもミトコンドリア内に存在する。ところが、この分子の立体構造はもちろんのこと、活性発現機構、基質認識機構、基質特異性にいたるまで、詳しいことはほとんどわかっていない。

Lon プロテアーゼ構造と機能の解析は、サルモネラ等細菌の感染機構ならびに胃腸炎発症のメカニズムの解明にも重要であり、その予防法の開発にもつながると考え、本研究では細菌の Lon プロテアーゼの基質特異性と変異体タンパク質を用いた反応機構の解析を行った。

B. 研究方法

1. 大腸菌 Lon プロテアーゼ

大腸菌 *lon* 遺伝子のコード領域全長を T7 RNA ポリメラーゼプロモーター (P_{T7}) ならびにリボソーム結合配列 (SD 配列) の下流に配したプラスミドを作成し、IPTG で誘導可能な T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を染色体上に挿入された大腸菌 BL21(DE3)pLysS に導入した。これを 37°C で培養し、対数増殖期において、IPTG を添加することにより Lon プロテアーゼを誘導し (1.5 時間)、集菌した。超音波破碎により細胞内容物を抽出し、ホスホセルロース、陰イオン交換、ゲルろ過のカラムクロマトグラフィーにより精製した。

2. 高度好熱菌 Lon プロテアーゼ

1.と同様な発現系・精製系を用いた。ただし、高度好熱菌 Lon プロテアーゼの熱安定性を利用し、ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーのかわりに熱処理 (70°C、20 分処理の後、遠心分離により上清を得る) を行いた。

3. 大腸菌 SulA タンパク質

マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌 SulA タンパク質を大腸菌内で発現し、菌破碎抽出物をアミロース樹脂に結合させ洗浄した後、ファクター Xa で切断した (マルトース結合タンパク質と SulA タンパク質の間にはファクター Xa による切断箇所が設けられている)。この発現・精製系は曾根崎修司博士 (九州工業大学) より供与された。

4. 変異体作成

高度好熱菌 Lon の変異体は、QuickChange site directed mutagenesis kit (Stratagene)を用い、プラスミド上の *lon* 遺伝子を鋳型とする PCR 反応により作成した。

5. ペプチド解析

Lon プロテアーゼによる切断で得られた SulA 断片の解析ならびに AP1 切断により得られた修飾 Lon プロテアーゼ断片は、LC/MS/MS システムにより解析し、それぞれの断片の配列ならびに SH 修飾試薬による修飾箇所の同定を行った。

6. SH 修飾剤による化学修飾

SH 修飾試薬ヨードアセトアミド (IAAm) ならびにモノメチルピマン (mBBBr) による修飾反応は 25°C、1 時間行い、DTT を加えた後、透析 (あるいは希釈) により修飾試薬を除き、酵素活性測定、修飾部位の同定に用いた。

7. ペプチダーゼ活性の測定

基質として Suc-Phe-Leu-Phe-MNA (succinyl-phenylalanyl-leucyl-phenylalanyl-methoxynaphthylamine)を用い、切断反応 (大腸菌 Lon では 37°C、高度好熱菌 Lon では 50°C) により生じる MNA の蛍光を測定した (励起波長 335 nm、蛍光波長 410 nm)。

8. ATP アーゼ活性の測定

ATP の加水分解で生じる無機リン酸の濃度を測定した。これは、溶液にモリブデン酸アンモニウムを加え、溶液中に含まれる無機リン酸と反応して生じた錯体を塩化