

- Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building. *J. Biol. Chem.* **277**, 10173-10177 (2002)
- 2) Yoriko Sawano, Tomonari Muramatsu, Ken-ichi Hatano, Koji Nagata and Masaru Tanokura: Characterization of genomic sequence coding for bromelain inhibitors in pineapple and expression of its recombinant isoform. *J. Biol. Chem.* **277**, 28222-28227 (2002)
 - 3) Wakana Iwasaki, Hiroshi Sasaki, Akio Nakamura, Kazuhiro Kohama and Masaru Tanokura: Metal-free and Ca²⁺-bound structures of a multidomain EF-hand protein, CBP40, from the lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *Structure* **11**, 75-85 (2003)
 - 4) Masahiro Maeda, Kayoko Takeuchi, Masaki Kojima, Masaru Tanokura, Kazumoto Kimura, Yoshiyuki Amemiya, Hiroshi Kihara and Kenji Takahashi: Kinetic studies of unfolding process of aspergillopepsin II by pH-jump methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 745-750 (2003)
 - 5) Mie Ito, Yusuke Kato, Koji Nagata, Yoshifumi Oda, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki and Masaru Tanokura: Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Express. Purif.* **27**, 272-278 (2003).
 - 6) Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Masaru Tanokura and Nagasawa, H.: The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.*, in press (2003)
 - 7) Rintaro Suzuki, Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani M., Adachi, K., Maruyama, T. and Masaru Tanokura: Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase and chaperone-like activities. *J. Mol. Biol.*, in press (2003)
2. 学会発表
- 1) 鈴木倫太郎, 永田宏次, 川上将, 根本暢明, 古谷昌弘, 足立恭子, 丸山正, 田之倉優: 好熱古細菌の蛋白質折り畳み因子 FKBP の立体構造, 第 15 回日本 Archaea 研究会, 2002 年 7 月
 - 2) 胡芳宇, 降旗一夫, 伊藤三恵, 田之倉優: 牛乳の NMR による非破壊測定. 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 108, 2002 年 3 月
 - 3) 岡井公彦, 尾西裕文, 田之倉優: ニワトリ筋胃変異平滑筋ミオシンの結晶化. 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 249, 2002 年 3 月
 - 4) 本間康平, 李愚哲, 山中亜利, 中村裕彦, 安宅光雄, 田之倉優: モルフォドロムからみたニトロ還元酵素 NfsB の結晶成長. 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 249, 2002 年 3 月
 - 5) 竹下大二郎, 善野修平, 西郷薫, 田之倉優: RNAi 関連タンパク質の発現系構築, 結晶化. 日本農芸化学会 2002 年度大会

- 講演要旨集 249、2002年3月
- 6) 金子直美、加茂昌之、善野修平、西郷薫、田之倉優：発光細菌 *Photorhabdus luminescens* の脂肪酸還元酵素の結晶化. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 7) 加茂昌之、本島浩之、田之倉優：*Thermus thermophilus* HB 8 株由来 peptide deformylase の結晶構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 8) 長尾健児、伊藤三恵、工藤紀雄、澤野頼子、入本慶宣、加茂昌之、櫻井雅弘、李愚哲、吉川正人、田中俊充、田之倉優：超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の転写因子 ArsR の結晶構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 9) 牧野司、澤野頼子、伊藤三恵、工藤紀雄、櫻井雅弘、入本慶宣、加茂昌之、李愚哲、吉川正人、田中俊充、田之倉優：超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来のRNA 結合性タンパク質 PH0734 の構造機能解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 10) 小田佳史、李愚哲、工藤紀雄、澤野頼子、伊藤三恵、加茂昌之、櫻井雅弘、入本慶宣、田中俊充、吉川正人、田之倉優：*Pyrococcus horikoshii* 由来ウレアーゼのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 11) 古沢豊、Nagarajan V、宮内啓介、政井英司、田之倉優、福田雅夫、千田俊哉：PCB分解酵素 BphA1A2のX線結晶構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 12) 吉川正人、李愚哲、工藤紀雄、柳井秀元、小島修一、三浦謹一郎、田之倉優：ヒラタケ由来 POIAI と subtilisin BPN^oの複合体のX線結晶構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 13) 工藤紀雄、河原林裕、田之倉優：*Pyrococcus horikoshii* 由来キナーゼのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 250、2002年3月
- 14) 伊藤三恵、永田宏次、山越智、山本健二、鈴木和男、田之倉優：サイトカイン LECT2 の高次構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 251、2002年3月
- 15) 丸岡慎太郎、澤野頼子、工藤紀雄、加藤有介、加茂昌之、櫻井雅弘、入本慶宣、湯本史明、本間康平、李愚哲、田中俊充、金子直美、吉川正人、田之倉優：*Pyrococcus horikoshii* 由来タンパク質 PH1346 (hypothetical GMP synthase) の立体構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 251、2002年3月
- 16) 入本慶宣、永田宏次、阿部啓子、荒井綜一、田之倉優：オリザシスタチンのホモダイマーの機能構造解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 251、2002年3月
- 17) 澤野頼子、秦野賢一、村松知成、永田宏次、田之倉優：パイナップル(*Ananas comosus*)由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析. 日本農芸化学会 2002年度大会講演要旨集 251、2002年3月
- 18) 田中俊充、中村彰男、小濱一弘、岩崎わ

- かな、佐々木宏、田之倉優：カルシウム結合タンパク質 CBP40 の機能構造解析. 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 251、2002 年 3 月
- 19) 加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、田之倉優：表面プラズモン共鳴と分子モデリングに基づいたグループ IV WW ドメインのリガント特異性. 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 251、2002 年 3 月
- 20) 櫻井雅弘、善野修平、西郷薫、田之倉優：大腸菌ニトロ還元酵素 NfsA のランダム変異導入による反応特異性の解析. 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集 251、2002 年 3 月
- 21) Rintaro Suzuki, Koji Nagata, Masaru Kawakami, Fumiaki Yumoto, Nobuaki Nemoto, Masahiro Furutani, Kyoko Adachi, Tadashi Maruyama and Masaru Tanokura: NMR structural and functional studies of a FKBP from a thermophilic archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*, a dual functional protein as PPIase and chaperone. 43rd Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 2002 年 4 月
- 22) 本間康平、李愚哲、山中亜利、中村裕彦、安宅光雄、田之倉優：モルフォドロムからみたタンパク質の結晶成長. 日本蛋白質科学会第 2 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 80、2002 年 6 月
- 23) 李愚哲、松原俊之、大城隆、和泉好計、田之倉優：脱硫酸酵素 DszB の結晶構造. 日本蛋白質科学会第 2 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 80、2002 年 6 月
- 24) 湯本史明、奈良雅之、鍵裕之、岩崎わか、尾島孝男、西田清義、永田宏次、大槻磐男、田之倉優：アカザラガイ閉殻筋トロポニン C およびその変異体における FT-IR による Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 配位構造解析. 日本蛋白質科学会第 2 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 96、2002 年 6 月
- 25) 加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、田之倉優：グループ I, IV の WW ドメインの相互作用機構. 日本蛋白質科学会第 2 回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 103、2002 年 6 月
- 26) 鈴木倫太郎、永田宏次、川上将、根本暢明、古谷昌弘、足立恭子、丸山正、田之倉優：好熱古細菌の蛋白質折り畳み因子 FKBP の立体構造. 第 15 回日本 Archaea 研究会, 2002 年 7 月
- 27) 加茂昌之、工藤紀雄、李愚哲、本島浩之、田之倉優：*Thermus thermophilus* HB8 株由来 Peptide deformylase の結晶構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 2P-386、773、2002 年 10 月
- 28) 古沢豊、ヴェヌゴパランナガラジャン、宮内啓介、政井英司、田之倉優、福田雅夫、千田俊哉：ピフェニルジオキシゲナーゼの結晶構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-296、885、2002 年 10 月
- 29) 宮川拓也、秦野賢一、山村明夫、西山真、田之倉優：プレセニリン 1 第 6 親水性ループの精製とその活性発現の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 936、2002 年 10 月
- 30) 櫻井雅弘、善野修平、西郷薫、田之倉優：大腸菌ニトロ還元酵素 NfsA のランダム

変異導入による反応特異性の解析. 第
75 回日本生化学会大会発表抄録集 984、
2002 年 10 月

- 31) 秦野賢一、前田充孝、永田宏次、田之倉
優、莊司顕：土壌主成分フミン酸の構造
活性相関. 第 75 回日本生化学会大会発
表抄録集 998、2002 年 10 月
- 32) 村松知成、伊藤三恵、湯本史明、足立恭
子、田之倉優：真核生物 eRF1 終止コド
ン認識ドメインの立体構造解析. 第 75
回日本生化学会大会発表抄録集 1008、
2002 年 10 月
- 33) 田之倉優、李愚哲、櫻井雅弘、
Murphy,M.E P.、善野修平、西郷薫：ピ
ロリ菌のニトロ還元酵素 RdxA の構造
と機能. 日本バイオイメージング学会
第 11 回学術集会要旨集 129-130、2002
年 10 月
- 34) 村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三
恵、田之倉優：真核生物ポリペプチド鎖
終結因子 eRF1 の構造と終止コドン認識
メカニズム. 日本バイオイメージング学
会 第 11 回学術集会要旨集 193-194、
2002 年 10 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

関節炎の発症および血小板機能における CD69 の役割

研究協力者：長谷川 明洋 千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学 研究員

研究要旨：CD69 分子は活性化したリンパ球の T 細胞や B 細胞の細胞表面に現れる分子で、早期活性化マーカーとしてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。また、血小板には恒常的に発現しており、活性化好中球にも発現がみられることから、炎症反応における役割が推測されている。そこで本協力研究では、CD69 ノックアウト (CD69-KO) マウスを樹立し、関節炎モデルおよび血小板血栓形成のイメージングシステムを用いて研究を行った。はじめに血小板機能における CD69 の役割を解析するために、光化学反応によって誘発される血小板血栓形成を指標として、腸間膜微小循環系細静脈・細動脈部位における血栓形成を解析した。その結果、CD69-KO マウスと wild type との間で血小板血栓によって血流が停止するまでの時間を比較したところ、明らかに CD69-KO マウスの方が血流停止により長い時間を要した。次にタイプ II コラーゲンに対するモノクローナル抗体のカクテルと LPS を注射して誘導する関節炎モデルを用いて、CD69-KO マウスでの発症の程度を調べた。その結果、CD69-KO マウスでは関節炎の発症が有意に抑制された。一方、関節炎を発症した wild type マウスでは、炎症部位に好中球の浸潤がみられ、これらの好中球は CD69 分子を発現していた。そこで、wild type マウスの好中球を CD69-KO マウスに移入して抗タイプ II コラーゲン抗体を投与したところ、関節炎の発症がみられ、関節炎の発症に関わる好中球の機能発現に CD69 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの結果から、生体内での血小板機能や関節炎の発症における CD69 分子の関与が明らかとなった。

A. 研究目的

CD69 分子は、c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、45kd の膜蛋白であるが、通常はホモダイマーとして存在している (図 1)。T 細胞や B 細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇し、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。また胸腺内で

分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現がみられる。コレセプターとして抗原レセプターからのシグナル伝達を増強する機能が推測されているが、詳細は不明である。リガンドは現在までのところ、同定されていない。一方、血小板には恒常的に発現しており、活性化した好中球や好酸球などにも発現がみられることから、血

血小板の機能発現や局所の炎症反応における役割が推測されている。

そこで本協力研究では、生体内での CD69 分子の役割を解析することを目的に CD69-KO マウスを樹立し、光化学反応によって誘発される血小板血栓形成モデルを用いて、血小板機能における CD69 分子の役割を検討した。また、局所炎症反応における役割を調べるために、抗タイプ II コラーゲン抗体と LPS で誘導される関節炎モデルを用いて、CD69-KO マウスでの発症の適度を検討した。

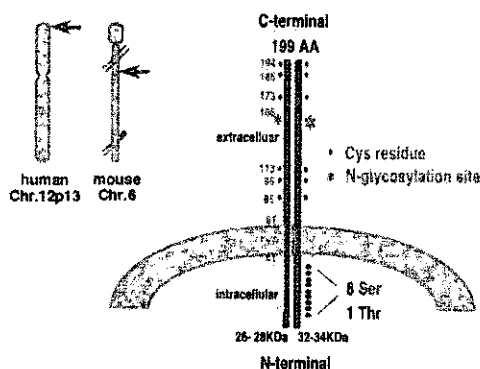


図1 CD69の分子構造

B. 研究方法

1) CD69 ノックアウトマウスの作製

CD69 遺伝子をコードするゲノムは、C57BL/6 マウスのゲノムライブラリーより得た。CD69 遺伝子は5つのエクソンからなっており、このうち開始コドンを含むエクソン1領域を neo 耐性遺伝子に組み換えることにより、CD69 を発現できない CD69-KO マウスを作製した。作製した CD69-KO マウスを BALB/c マウスに 11 回

戻し交配し、以下の研究に用いた。CD69-KO マウスでは、活性化した T 細胞上に CD69 の発現がみられないことをフローサイトメーターで確認した。これらのマウスでは、T 細胞や B 細胞の発生は正常であった。すべてのマウスは SPF 条件下で飼育し、動物実験は千葉大学の動物実験指針に従った。

2) 血小板血栓形成の誘導

光化学反応によって誘発される血小板血栓形成モデルを用いて、解析を行った。実験には8週齢のオスの CD69-KO マウスと CD69 を正常に発現する wild type の BALB/c マウスをコントロールマウスとして使用した。光化学反応には、光感受性物質として 5-aminolevulinic acid の投与によって生体内で産生される protoporphyrin IX を、励起光としてこの物質の吸収波長帯である顕微鏡水銀ランプの B 励起光を用いた。この系では、光化学反応により生ずる活性酸素が直接・間接的に血管の内皮細胞に障害を与え、血小板を活性化させることにより血栓が形成される (図2)。観察部位は腸間膜微小

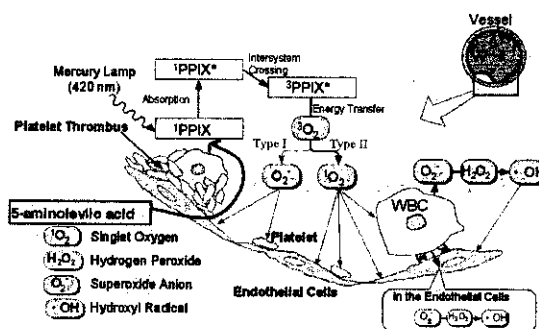


図2 光化学反応による血小板血栓形成機序

循環系細静脈・細動脈とし、FITC-dextranを用いて血流を可視化し、顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影した。

3) 関節炎の誘導

8週齢のメスの CD69-KO マウスおよび wild type の BALB/c マウスに抗タイプ II コラーゲンモノクローナル抗体カクテル 2 mg を静注し、2日後に LPS 0.5mg を腹腔内投与して関節炎を誘導した。抗体投与6日後に関節炎の発症の程度を観察した。関節炎の発症の評価は、各マウス四肢の関節部位について、炎症に伴うはれの程度を0—3の4段階で評価し、その合計を clinical score とした。

4) 組織標本の作製と観察

関節部位を切り取り、4%paraformaldehyde/PBS で固定した後、10%EDTA で処理し、エタノール、プロパノール、キシレンを用いて水分を除いた後、パラフィン中に包埋した。これを薄切して組織標本を作製し、hematoxylin/eosin(H&E)染色を行った後、光学顕微鏡で組織像を観察した。

5) In situ hybridization

マウスの膝関節パラフィンブロックを4 μm の厚さで薄切し、切片を作製した。ジゴキシングニン標識 CD69RNA プローブを in vitro transcription 法により作製し、in situ hybridization 染色を行った。発色基質には NTB/BCIP を使用し、染色後ケルネヒトロ

ートにより核染色を行った。

6) CD69-KO マウスへの細胞移入実験

6-1) T細胞の調製と投与

wild type BALB/c マウスの脾臓より CD4 陽性 T 細胞をソーティングにより精製し、 1×10^8 個の細胞を day-1 に CD69-KO マウスに静注した後、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を投与して関節炎を誘導した。

6-2) 脾臓細胞の調製と投与

赤血球を除去した BALB/c マウスの脾臓細胞 1×10^8 個を day-1 に CD69-KO マウスに静注した後、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を投与して関節炎を誘導した。

6-3) 好中球の調製と投与

BALB/c マウスに 4%thioglycolate 2 ml を腹腔内投与し、4時間後に生理食塩水で腹腔内洗浄することにより好中球を回収した。この方法により得られた細胞を好中球のマーカー分子である Gr-1 に対する抗体で染色してフローサイトメーターで確認したところ、80%以上の細胞が好中球であった。得られた好中球を 5×10^6 個ずつ day0 および day2 に CD69-KO マウスに静注し、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を投与して関節炎を誘導した。

C. 研究結果

1) イメージング技術を用いた血小板血栓形成における CD69 機能の解析

CD69-KO マウスと wild type との間で血小板血栓によって細静脈での血流が停止するまでの時間を比較したところ、あきらか

に CD69-KO マウスの方が血流停止により長い時間を要した (図 3)。また wild type では、細静脈・細動脈ともに血流が停止した。一方 CD69-KO マウスでは、形成された血小板凝集が血流によって流されやすく、細静脈では長時間の光照射によって最終的に血流が停止したが、細動脈では 30 分以上の光照射を行った場合においても血流は停止しなかった。

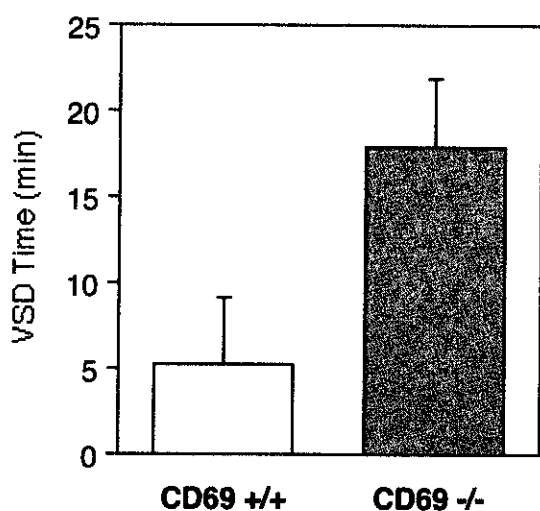


図 3 光化学反応によって誘発される血小板血栓によって血流が停止するまでの時間

2) 関節炎の発症における CD69 分子の役割

2-1) 抗タイプ II コラーゲン抗体投与による関節炎の発症

関節炎の発症における CD69 分子の役割を解析するために、CD69-KO マウスと wild type の BALB/c マウスに対して抗タイプ II コラーゲン抗体と LPS を投与し、関節炎を誘導して比較をおこなった。その結果、CD69-KO マウスでは関節炎の発症が有意に抑制されていた (図 4)。関節部位の組

織標本を作製し、病理組織を観察したところ、wild type マウスでは滑膜への顕著な炎症細胞の浸潤がみられ、滑膜、軟骨、骨組織が破壊されていた。浸潤していた細胞の 95% 以上は好中球で、マクロファージもわずかに観察された。一方、CD69-KO マウスでは関節部位への好中球の浸潤はごくわずかで、目立った組織の破壊はみられなかった。

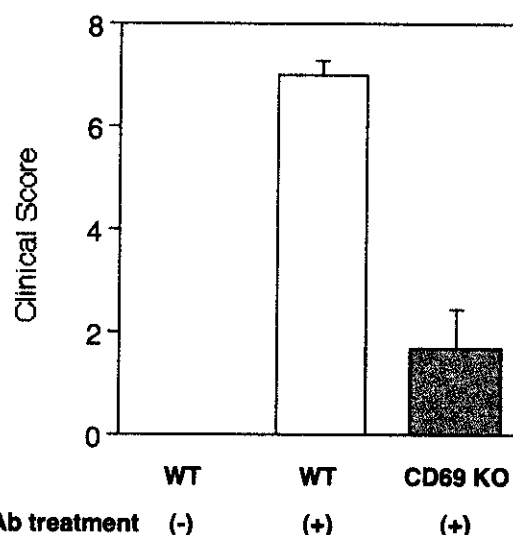


図 4 抗タイプ II コラーゲン抗体投与による関節炎の発症

2-2) 関節部位へ浸潤した好中球での CD69 分子の発現上昇

抗タイプ II コラーゲン抗体投与により関節炎を発症した wild type のマウスでは、関節部位への好中球の目立った浸潤がみられたことから、次にこの浸潤した好中球での CD69 の発現の有無を検討した。標識した CD69RNA プローブを用いて in situ hybridization 染色を行い、CD69mRNA の発現レベルを調べたところ、浸潤した好中球では高い発現が認められた。それに対し、

抗体を投与していないマウスの滑膜組織では CD69mRNA の発現は見られなかった。

2-3) CD69-KO マウスへの好中球移入実験

関節炎の発症における好中球上の CD69 分子の重要性を検討するために、wild type マウスの好中球を CD69-KO マウスに静注移入し、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を用いて関節炎を誘導した。その結果、好中球を移入した CD69-KO マウスでは、wild type マウスと同程度に関節炎が誘導され、好中球を移入しなかった CD69-KO マウスに比べ、有意に clinical score が上昇した (図 5)。一方、好中球の代わりに T 細胞や T 細胞・B 細胞を含む脾臓細胞を移入した場合には、有意な変化はみられなかった。これらの結果から、関節炎の発症において好中球上の CD69 分子が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

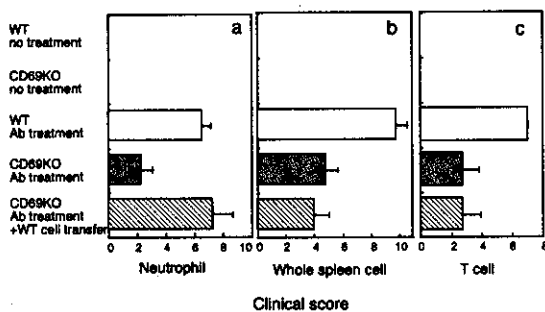


図 5 wild type マウスの細胞を移入した場合の関節炎の発症

D. 考察

1) 血小板血栓形成における CD69 機能の解析

生体内の血小板血栓形成において、CD69

が重要な役割を果たしていることが示唆された。CD69-KO マウスにおける血小板血栓の観察結果から、細静脈・細動脈の両方で血小板凝集自体は形成されていた。しかしながら、その凝集が強固な血栓とはなりにくいことから、CD69 分子は血小板凝集における役割よりも、血栓をより強固にする二次血栓形成における役割を担っているものと考えられた。

2) 関節炎の発症における CD69 分子の役割

CD69-KO マウスでは、抗タイプ II コラーゲン抗体誘導性の関節炎モデルにおいて、その発症が有意に抑えられたことから、関節炎の発症に CD69 が関与することが明らかとなった。CD69 は活性化した T 細胞や B 細胞に高発現されるが、抗タイプ II コラーゲン抗体と LPS で誘導される関節炎は、T 細胞や B 細胞の活性化に依存しない系と考えられており、他の細胞上に発現された CD69 分子が関節炎の発症に関わっていると考えられた。さらに wild type の細胞を CD69-KO マウスに移入して関節炎を誘導した実験では、T 細胞や脾臓細胞を移入した場合には有意な変化は認められなかったが、好中球を移入した場合には CD69-KO マウスでも wild type と同程度に関節炎を発症した。したがって、関節炎の発症には CD69 分子に依存した好中球の役割が重要であることが明らかとなった。関節炎の発症において好中球上の CD69 分子が果たす役割については、2つの可能性が考えられ

る。1つは、CD69 が c-type lectin family に属する糖蛋白で、接着分子としての役割が示唆されていることから、好中球が抗体の結合したコラーゲン部位へ接着するのに重要な役割を果たしているという可能性である。またもう1つの可能性として、CD69 がコレセプターとして T 細胞の細胞応答に関与するという報告があることから、好中球が関節部位において活性化するのに CD69 を介したシグナルが必要であるという可能性が考えられる。関節炎の発症における CD69 分子の役割については、そのリガンド分子の発見も含め、さらなる研究が望まれる。

E. 結論

本協力研究により、微小循環障害に関わる生体内の血小板機能に CD69 分子が関与することが明らかとなった。

また、関節炎の発症における CD69 分子の関与が明らかとなり、特に浸潤している好中球での役割が示唆された。将来的に CD69 の作用を制御することにより、慢性関節リウマチなどの関節炎を治療できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 学会発表

1. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲 関節炎および

血管炎の発症における CD69 分子の役割
バイオイメージングとナノテクノロジー公開シンポジウム 東京 2.10-12、2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

脳微小循環の血流・代謝イメージングシステム

主任研究者 南谷 晴之 慶応義塾大学大学院 理工学研究科基礎理工学専攻 教授
研究協力者 塚田 孝祐 川崎医科大学 生理学教室 助手

研究要旨： 脳血管疾患は悪性新生物・心疾患に次ぐ死因にあげられており、病態モデルおよび脳循環代謝の実験的評価法の確立が急務である。本研究では脳軟膜の微小循環のマイクロ・ナノスケールにおける血流動態・酸素拡散に着目し、局所脳循環代謝を評価可能なシステムを開発した。血流動態解析は循環赤血球の2%を蛍光色素(FITC)でラベルし、血流マーカとして機能させ、その血流ダイナミクスを可視化した。一方、脳軟膜局所酸素代謝の評価は酸素感受性物質の光化学反応を利用し、微小血管内および組織内の組織酸素分圧を計測する手法を確立した。さらに脳組織酸素代謝を時系列的に評価するために、細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用されるNADHの紫外線蛍光特性に着目し、組織酸素代謝レベルのイメージングを試みた。以上の計測手法を統合することによって脳微小循環血流と組織代謝を定量的かつ連続的に評価する実験系を確立した。最後にラット虚血モデルから脳軟膜の微小循環系を対象に生体計測から有効性を示した。

A. 研究目的

微小循環はエネルギーを得るための酸素やその他栄養物の運搬を行い、生命現象の恒常性維持に非常に重要な役割を担っている。従って微小循環における血流障害は直接組織への酸素供給に影響を及ぼすことになる。脳循環代謝の研究分野においては、臨床や実験レベルで脳血管疾患に関するマクロ的情報はfMRIやSPECTを利用することで得られるが、マイクロ・ナノスケールの微小循環レベルの血流動態や酸素代謝の計測は方法論の欠如のため不可能である。

本研究では局所脳微小循環における血球動態観察と微小血管・組織における酸素分圧の計測を行い、また脳神経細胞内ミトコンドリアにおける好気性酸素代謝の指標としてNAD⁺/NADH redoxを時系列解析し、脳虚血に

における局所脳循環・酸素代謝の可視化解析法を開発した。

B. 研究方法

B-1 血流の可視化・解析法

Wistar ラット（約300-320 g）を α -chloralose (60 mg/kg), urethane (600 mg/kg)の腹腔内投与下に麻酔し、頸部を切開し気管挿管後、調節呼吸とした。ラットの大腿動静脈にカニューレーションを行い、それぞれ血圧測定および薬品投与に使用した。脳表を露出後、約4 mm径のclosed cranial windowを作成した。window内は人工髄液(Na⁺ 147.8 mEq/L, K⁺ 3.0 mEq/L, Mg²⁺ 2.3 mEq/L, Ca²⁺ 2.3 mEq/L, Cl⁻ 135.2 mEq/L, HCO³⁻ 19.6 mEq/L, lactate 1.7 mEq/L, phosphate 1.1 mM, and glucose 3.9 mM)を灌流した。その後、円形カバーガラスでラバーリングを覆い密閉し

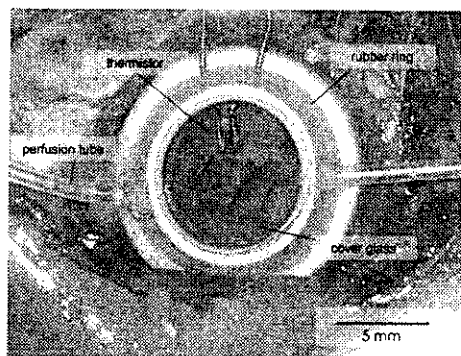


図1 左頭頂骨に作成した closed cranial window

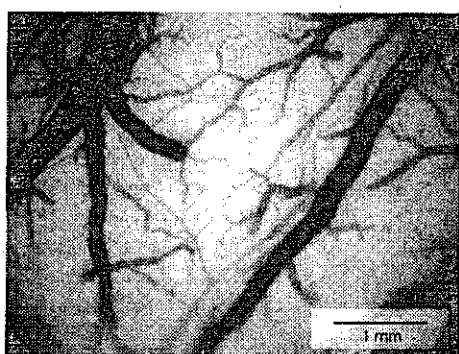


図2 window 内で観察される微小血管構造

た(図1, 2). 脳微小循環血流は赤血球を蛍光色素FITCで標識することで可視化した(図3). また血流画像の解析にはパターンマッチングを応用した画像処理システムを利用した.

B-2 微小血管内酸素分圧計測法

FITC 蛍光標識赤血球を観察する一方で, 脳表微小血管内の酸素分圧は光励起されたポルフィリン分子から発光するリン光の酸素消光作用を利用することで計測を行った. 酸素プローブとして Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)-porphyrin (以下 Pd-TCPP) を用いた. 予め対象動物に Pd-TCPP を静脈内投与し, 落射光学顕微鏡の対物レンズを通して対象臓器の微小血管に励起光 (Q-switched Nd:YAG laser-SH, 波長 532 nm) を照射する. 血管内酸素濃度に依存して発光するリン光は 620 nm のロングパスフィルターを介して光電子増倍管を用いて光電変換し, 電圧信号は AD 変換器 (NR-2000,

KEYENCE) を用いてサンプリング周波数 200 kHz, サンプリング数 500 点で取得した. リン光寿命を算出する波形処理では, 出力信号の波形取り込み開始から 10 サンプリング分 (時間になると 50 μ s に相当) および最大電圧値に対する 1% 以下の範囲のデータを棄却した. その他の有効データを最小二乗法により指数関数でフィッティングすることでリン光寿命 τ を算出した (図 5). 酸素分圧値への変換はリン光寿命を Stern-Volmer 式(1)に代入することで定量化した.

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot pO_2 \dots\dots\dots (1)$$

ここで I_0 と I は酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光強度, τ_0 と τ は同様に酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光寿命, K_q は Stern-Volmer 定数である.

B-3 NADH 蛍光による虚血指標の取得



図3 FITC 標識赤血球による血流動態可視化

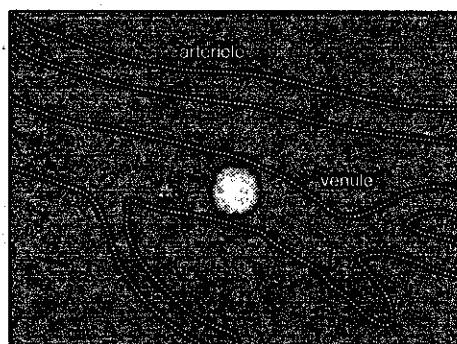


図4 レーザ照射による微小血管内酸素分圧計測

脳微小血管の血流動態および血管内の酸素分圧の変化に対し、組織酸素代謝を定量評価するために、NADH 蛍光を利用した。Hg-Xenon ランプからバンドパスフィルタ (370 nm) を用いて UV 光を脳表に照射し、蛍光 (420~570 nm) を検出した。脳表の NADH 蛍光画像を撮影する際には冷却 CCD カメラを用い、特定領域の NADH 蛍光輝度を検出する場合には光電子増倍管を利用した。

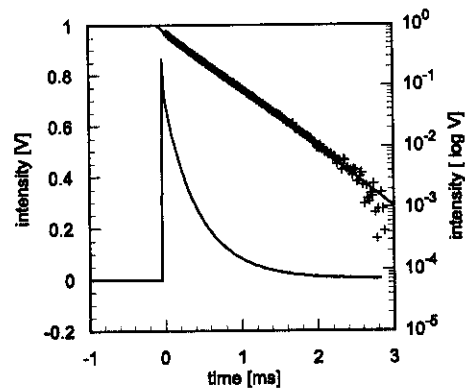


図5 Pd-TCPP のリン光減衰曲線

C. 研究結果

C-1 血流・酸素分圧計測における励起光照射

図3は FITC 蛍光標識赤血球による血流実画像、図4は対象血管にレーザを照射した画像である。計測の手順は図3で示したように血流を観察しながら計測対象とする血管を決定し、その対象血管を図4のレーザスポットに合わせるように顕微鏡ステージを移動させる。酸素分圧計測の空間分解能はレーザ照射径により決定されるが、レーザ装置から顕微鏡に導光している光ファイバー径を変えるか、または顕微鏡の対物レンズの倍率を変えることで自在な分解能が選択可能である。血流速度や血管径、酸素分圧変化は実験後、画像解析およびリン光波形解析を行うことで定量化した。

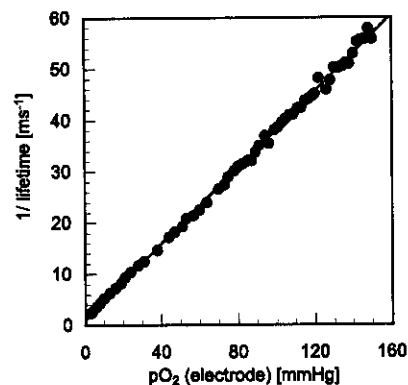


図6 酸素分圧とリン光寿命の関係

C-2 微小血管内酸素分圧計測法

図6に校正用 Pd-TCPP 試料 (1 mg/ml) を用いて、生体計測用酸素電極 (Inter Medical, Japan) から得られた各酸素分圧値に対するリン光寿命の逆数値を示した。これより 37 度、pH 7.4 の条件下において τ_0 が 0.74 ms, Stern-Volmer 定数 K_q は $374 \text{ mmHg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ が得られた。酸素電極の出力値と比較した結果、両者には良好な相関が得られ ($r^2 = 0.998$)、生体計測に必要な酸素分圧値の範囲において本計測法の有効性が示された。

C-3 NADH 蛍光による虚血指標の取得

さらに脳組織における酸素代謝を時系列的に評価するために、細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用される NADH の紫外吸光特性に着目し、組織の代謝レベルをイメージングした。酸素供給の低下に伴い ATP 産生の前駆物質である NADH は NAD^+ に変換されずにミトコンドリア内に蓄積される。NADH の蛍光輝度を画像化することによって局所領域における虚血の指標を時系列的にイメージングすることが可能となった。

図7はラット大腿動脈より脱血・返血を行うことによって作製した急性出血モデルにおける脳組織の NADH 蛍光画像である。それぞれ (a)はコントロール、(b)は脱血時、(c)は返血蘇生における蛍光画像である。コントロールに比

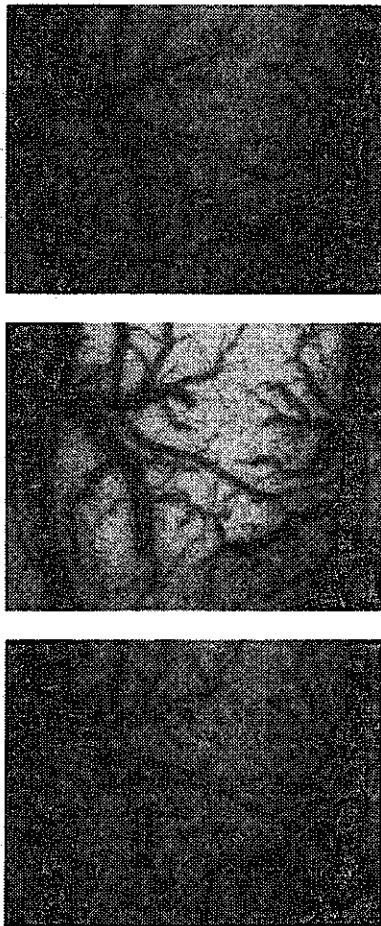


図7 急性出血性ショックモデルにおける NADH 蛍光輝度の変化

べ、脱血による低血圧時 (40 mmHg) では組織の蛍光輝度が上昇しているのが分かる。画像の取得は冷却 CCD カメラを使用し、光蓄積時間を長くすることによって NADH 蛍光輝度の変化をイメージングすることが可能となった。

図 8 に急性出血性ショックおよび返血蘇生時の脳表微小循環動態と NADH の変化を示した。計測開始 5 分後から 1 分間で血圧が 40 mmHg に低下するまで脱血を行い、その 5 分後から返血蘇生を行った。脳血流の低下は血圧とほぼ同様に低下し、全脳虚血に従って NADH 蛍光輝度が血圧の変化に対してやや緩やかに変化し、NADH 蛍光の計測から虚血の指標を得ることが可能であることが示された。

D. 考察

脳神経細胞は虚血侵襲にきわめて脆弱であり、脳虚血は脳血管障害のみならず心肺蘇生時や外傷時などでも見られる病態である。本研究で提案した末梢循環・組織酸素代謝イメージング法により、脳微小循環の血流動態を可視化し、微小血管・組織の酸素分圧変化および NADH 蛍光から脳細胞の酸素代謝レベルを評価する必要がある。また微小循環において血流動態と血中酸素濃度は密接な関係にあり、両者を同時に計測することは極めて重要である。

微小循環血流は赤血球を FITC 色素で蛍光標識し、血管内において血流マーカーとして機能させ、落射光学顕微鏡下で蛍光標識赤血球を観察することで臓器血流を可視化することが可能となった。標識した赤血球の投与量は体重 300g ラットの場合、全身血液量は約 21 ml と見積もられるので、その内の赤血球量は約 10 ml

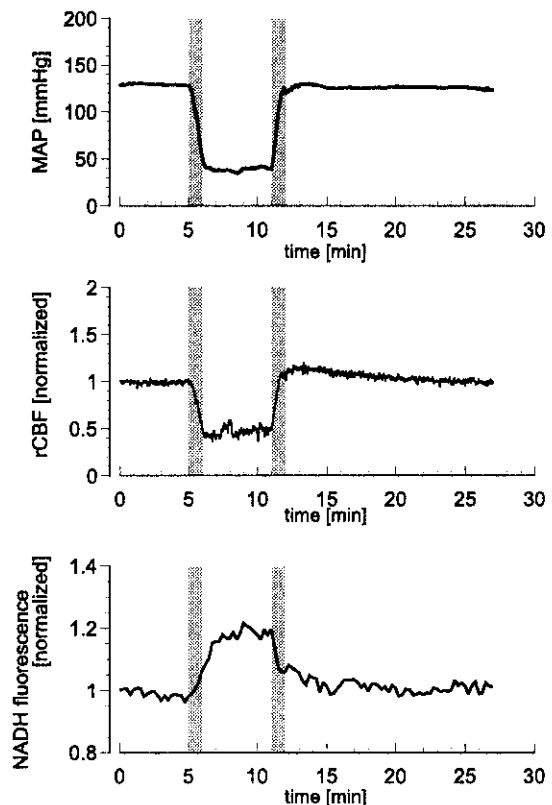


図 8 急性出血性ショックモデルにおける局所脳血流と NADH 蛍光の計測

であり、蛍光標識赤血球を 0.2 ml 灌流すれば循環赤血球の約 2 %が蛍光赤血球として流れることになる。血管内の血流動態を評価する量としてはこれで十分であり、投与による血圧の変動は認められなかった。

一方、微小血管内の酸素分圧は接触型の電極法ではなく、レーザー励起によるポルフィリン色素の光化学反応を利用した酸素分圧計測法を利用した。非接触・無侵襲かつ局所的な酸素計測が可能であり、また酸素濃度を分圧値として絶対値計測が可能な本法は、近赤外分光法とは決定的に差別化される特徴である。組織酸素代謝は NADH 蛍光を計測することによって虚血の指標とした。生体には NADH と同様の吸収帯を有する物質がヘモグロビンを含め複数存在すると考えられ、蛍光輝度から組織中の NADH 濃度を推定することは困難である。しかし、虚血実験で示されたように、正常状態から蛍光輝度が上昇した増加分は明らかに組織低酸素によって NADH が増加したことを示しており、NADH 蛍光を計測することで虚血状態を推測することが可能である。

脳微小循環系を対象とした本研究において、血流速度や血管径、酸素濃度はそれぞれ異なる物理量である、従来はこれら複数のパラメータを同一個体で計測する場合、それぞれ独立した計測装置を使用することになり、計測系が複雑化した原因である。本研究で提案した計測システムは、血流動態計測は光励起した FITC から発する蛍光から、酸素分圧計測では光励起した Pd-TCPP から定量化した。ここで、全てのパラメータの計測に光励起による発光現象を利用することに着目し、異なる波長の励起光源を利用した光学系をシステムアップすることで双方の情報を連続的かつ簡便に取得可能となった。

E. 結論

脳微小循環の血流速度、血管径、血中酸素分圧、組織 NADH 蛍光の連続計測が可能なシステムを構築し、その有効性を検討した。また脳細胞内ミトコンドリアにおける好気性酸素代謝の指標として NAD^+/NADH redox を時系列解析することで、脳虚血における局所脳循環・酸素代謝の可視化が可能になった。またラットを用いて急性出血性ショック・返血蘇生実験を行い、システムの有効性を示した。

本計測システムは糖尿病や高血圧等の病態モデルにおける微小循環障害、および障害により二次的に引き起こされる組織障害の検討に有効であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Tsukada K., Sakai S., Hase K. and Minamitani H.: Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation, *Biosensors and Bioelectronics*, in press.
- 2) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 辻岡克彦, 南谷晴之: 人工酸素運搬体 Neo Red Cell 交換輸血時の脳微小循環動態および酸素分圧計測, 脳循環代謝, 印刷中
- 3) 塚田孝祐, 酒井修平, 長谷憲多朗, 南谷晴之: 医用カテーテル型光学式酸素センサ, 医工学治療, 14(3), pp. 163-167, 2002.
- 4) Tsukada K., Ogata Y., Yamaguchi N., Sekizuka E., Oshio C., Minamitani H., Blood flow analysis in cerebral microcirculation during exchange blood transfusion with hemoglobin-encapsulated liposome, *Microcirculation Annual*, vol. 18, pp. 41-42, 2002

- 5) Minamitani H., Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Measurement of blood flow and oxygen tension using fluorescent and phosphorescent probes in organ microcirculation, *Microcirculation Annual*, vol. 18, pp. 13-14, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

G-2 学会発表

- 1) 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力, 南谷晴之, 辻岡克彦: 脳虚血における微小循環血流と局所酸素代謝の可視化解析, 厚生労働科研公開シンポジウム (バイオイメージングとナノテクノロジー), 2003-2 (東京)
- 2) 長谷憲多朗, 塚田孝祐, 酒井修平, 南谷晴之: カテーテル型酸素センサによる血中酸素分圧の連続計測, 電気学会医用生体工学研究会, 2002-11 (早稲田)
- 3) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 辻岡克彦, 南谷晴之: 人工酸素運搬体 Neo Red Cell 交換輸血時の脳微小循環動態および酸素分圧計測, 第 14 回脳循環代謝学会総会, 2002-10 (大宮)
- 4) 長谷憲多朗, 酒井修平, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力, 南谷晴之: 光ファイバ型酸素センサによる動脈血酸素分圧の連続計測, 第 41 回日本エム・イー学会大会, 2002-5 (京都)
- 5) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 山口則之, 関塚永一, 大塩 力, 南谷晴之: リボソーム封入ヘモグロビン交換輸血時の脳微小循環動態解析, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)
- 6) 南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力: 蛍光・燐光プローブによる臓器微小循環の血流動態と酸素分圧計測, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)

脳への選択的物質移送システムを用いて脳梗塞や脳虚血による傷害の画像化

主任研究者 南谷 晴之 慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 教授
分担研究者 鈴木 弘美 藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門 研究技術員

研究要旨：脳疾患は腫瘍、感染症、変性疾患、脳血管障害などそれぞれが多岐にわたるにもかかわらず決定的に有効な治療法がないため、脳疾患の治療においては摘出などの外科的手術のほか、薬物療法や放射線治療法などの補充療法より対処されている。脳は血液脳関門（Blood Brain Barrier）が存在するため、脳疾患を治療するために薬物や生理活性物質を血液中から脳へ非傷害的、しかも脳特異的に導入することができない。脳内存在するグリア細胞の一種であるミクログリアが脳障害において活性化され、障害部位に集積する能力があり、さらに実験動物の末梢血管から注入されると脳組織に対して非常に特異的に侵入する性質があることが本研究の過程で明らかになった。これらの事実に基づき検討した結果、1) ミクログリアが脳に特異的な親和性をもっていること、2) 遺伝子を導入したミクログリアを血中投与すると、遺伝子の転写産物の酵素や生理活性物質を脳に発現させることができること、3) 脳虚血によって障害を受けたと思われる海馬の CA1 領域への遊走能があり、ミクログリアが[脳-障害部位]を二次ターゲティングでき、虚血による遅発性神経細胞死に対して保護的作用があることが明らかになった。以上の研究結果からミクログリアを用いて脳を標的とした遺伝子導入や特異的な物質輸送（ドラッグデリバリー）を行うための Cell Therapy への可能性について期待できることがわかった。

A. 研究目的

近年の発生工学的手法の進歩によりジーンターゲティング法が確立され、染色体遺伝子への欠失の導入や変異遺伝子の正常遺伝子による置換が可能になり、遺伝病などに対する遺伝子治療の可能性が一步前進した。しかしヒトを対象とする発生工学的手法の導入には倫理的問題等の難問があり、特定の臓器に限った遺伝子導入が現実的である。ところで神経系に関する遺伝性の疾患は非常に多いが、未だに原因がわからないものまでいろいろな疾患があり、多くは

補充療法により対処されているのが現状である。ところが、臓器の中で脳は血液脳関門が存在するため、補充療法や有効な薬物の導入が困難である。最近我々は精製ミクログリアからウイルス遺伝子などを使わずに不死化細胞株を単離することに成功しその性質を調べたところ株化ミクログリア細胞が脳に特異的に移行するのを見いだした。本研究は株化ミクログリアの脳特異的な親和性やその有用性について検討し、その責任分子または活性ペプチド断片を単離して脳を標的としたバイオターゲティング

法を確立することをめざして行った。

B. 研究方法

- (1) 細胞の調製と注入：ミクログリアは新生スナネズミ脳より調製した混合グリア培養から既報の方法で分離精製した。LPS や IFN γ による刺激は、培地交換後にそれぞれを添加して規定の時間培養して行なった。ミクログリアをプラスチックシャーレに接着させた状態で貪食細胞染色液で調製した蛍光色素 PKH26 を 10%血清を含む培地に 1 : 1 で混合して 37°C で 30 分間染色したのち回収し、 2×10^6 cells を 10-12 週齢のスナネズミ (体重 70g) のスナネズミの腋動脈に注入した。
- (2) 一過性前脳虚血の作製：細胞注入して 24 時間後にハロセン麻酔下でスナネズミの両側総頸動脈を 5 分間クリップで挟み一過性前脳虚血を作成した。偽手術は総頸動脈を露出するのみとした。脳虚血処理後 3, 5, 7 日に麻酔下生理食塩水で灌流し、各臓器を摘出、OCT 液中で凍結した。
- (3) 凍結切片での注入細胞の同定：連続したおよそ 7 ミクロンの 3 枚の凍結切片

をそれぞれ蛍光顕微鏡による PKH26 陽性細胞を同定観察後、Nissel 染色、TUNEL 染色、抗サイモシン抗体染色を行い、海馬 CA1 領域の錐体細胞の遅延性神経細胞死と導入したミクログリアの動態を観察した。

C. 研究成果

[1] 脳特異的な細胞移入の調節メカニズムの検討

ラット個体を用いてミクログリアの脳特異的侵入の条件を検討し、外来遺伝子を脳に特異的に発現させることに成功した。また、導入した遺伝子産物の活性測定によって細胞の移入量を定量することができるようになった。

1. マクロファージ注入の場合、脳にはほとんど蛍光細胞が見られないが肝臓には多く見られた。(図 1) ミクログリア注入の場合には脳には多く、肝臓にはわずかしか見られなかった。
1. lacZ 発現ベクターを導入した細胞を注入したラット脳切片で lacZ 陽性細胞が確認できた。(図 2 左)
2. 2 と同様の切片での β -galactosidase 活性が検出できた。(図 2 右)

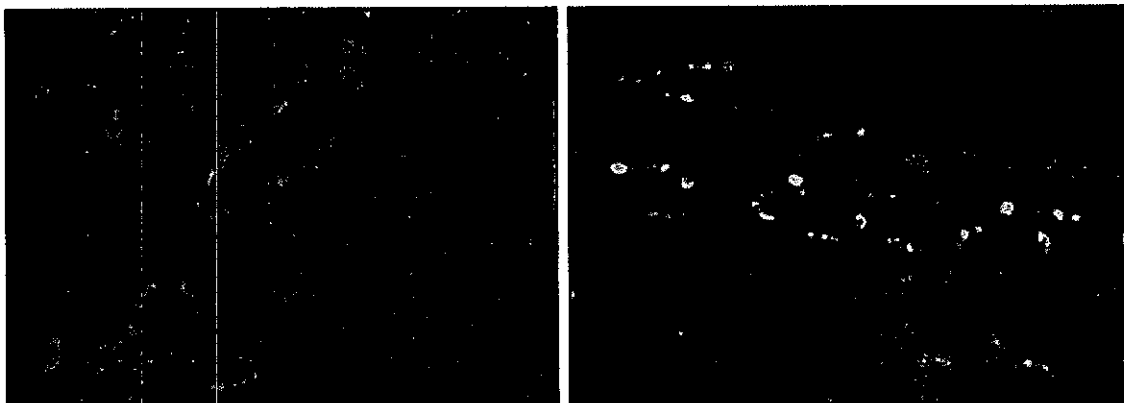


図 1 蛍光色素で標識したミクログリアを動脈に注入して 2 時間後に作成した脳標本には脳血管内皮細胞に付着した多数の蛍光細胞が観察できる。

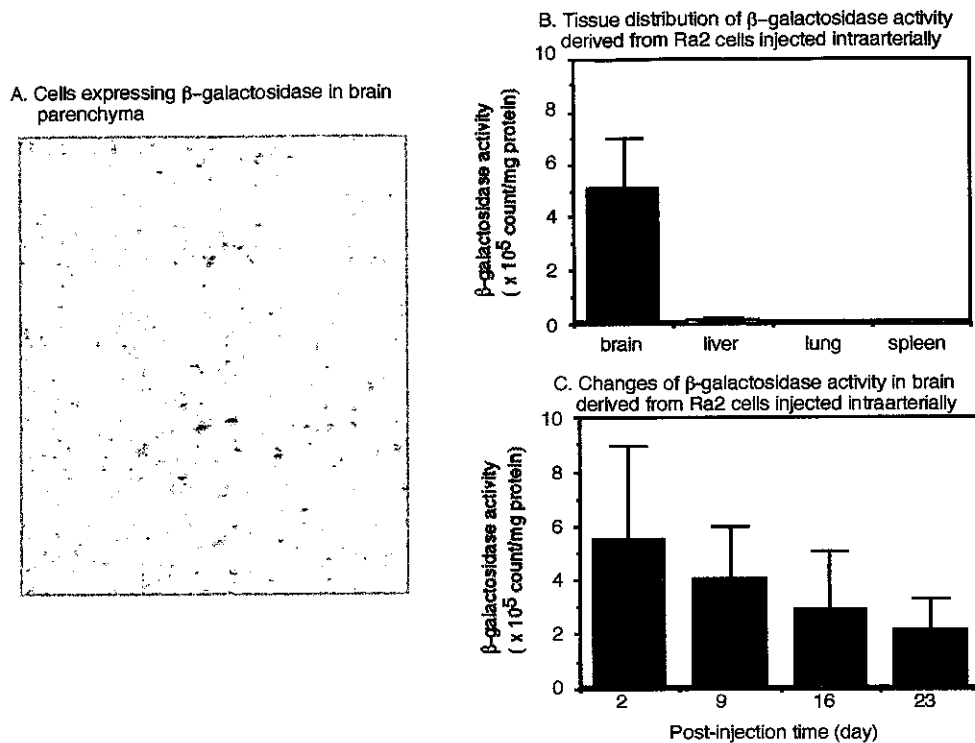


図2 LacZ遺伝子導入したミクログリアの脳内での検出

- A). 大腸菌由来LacZ遺伝子導入ミクログリアは脳実質内で確認できた。
- B). 大腸菌由来LacZ遺伝子導入ミクログリアをラットの鎖骨下動脈より注入し、48時間後各々の臓器を採取し、組織別に遺伝子の発現量を検出したところ、脳の発現量が多いことを確認した。
- C). LacZ遺伝子導入ミクログリアをラットの鎖骨下動脈より注入し、2、9、16、23日後に脳を採取し、遺伝子の発現量を定量したところ導入して約3週間経過しても導入して2日後に検出できる活性値の約半分程度の酵素活性の発現量を示した。

[2] 外来性ミクログリアによる脳虚血のターゲティングと神経細胞死保護作用

ミクログリアはマクロファージとは異なり末梢血管に直接注入した場合にも脳に特異的な親和性をもち、脳に侵潤する能力を持った細胞であること、この親和性を利用すれば末梢血流中から特定物質や遺伝子を脳に特異的に導入できることを明らかにした。そこで、脳虚血による遅延性神経細胞死を誘導したときのミクログリアの動態を調べた。一過性前脳虚血を起こした砂ネズミで遅延性神経細胞死が見られる海馬CA1領域の錐体細胞層に標識ミクログリアを集積させることができることを見いだした。

(図3) この時、内在するミクログリアも海馬の広範囲に渡って集積活性化し、一過性脳虚血処理をしたが遅延性細胞死が見られなかった例においても内在ミクログリアの集積活性化が観察できた。さらに、活性化ミクログリアを脳内導入した場合や虚血再還流直後にミクログリアを注入した場合においては有意にCA1錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった(図4)。したがって、このシステムで調べる限りにおいてはミクログリアは海馬CA1錐体細胞の虚血後にみられる遅延性神経細胞死に対して保護的であると考えられる

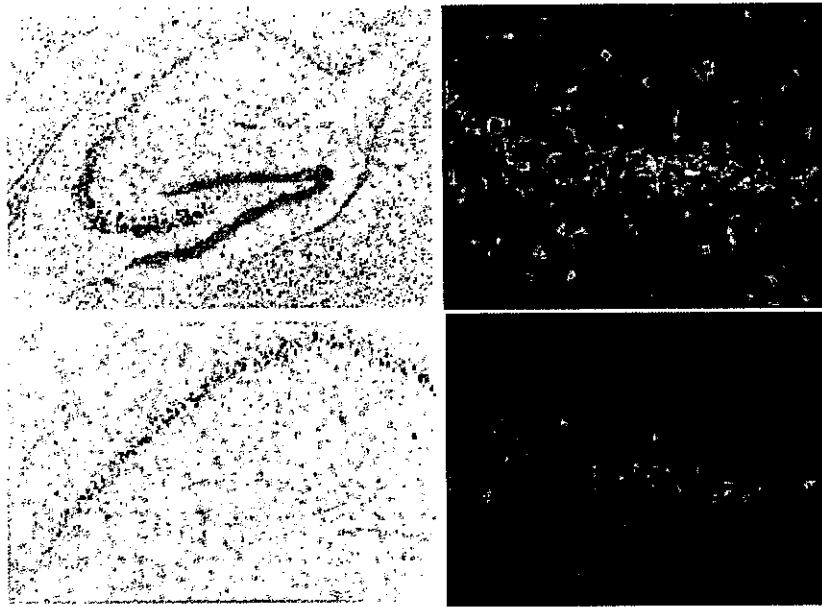


図3 外来性ミクログリアは虚血による神経細胞死層に集積する
 (左上)虚血脳での海馬領域のNissel染色
 (左下)同領域のTUNEL染色
 (右上)サイモシン抗体による活性化ミクログリアの免疫染色
 (左下)同領域に集積したPKH陽性外来性ミクログリア

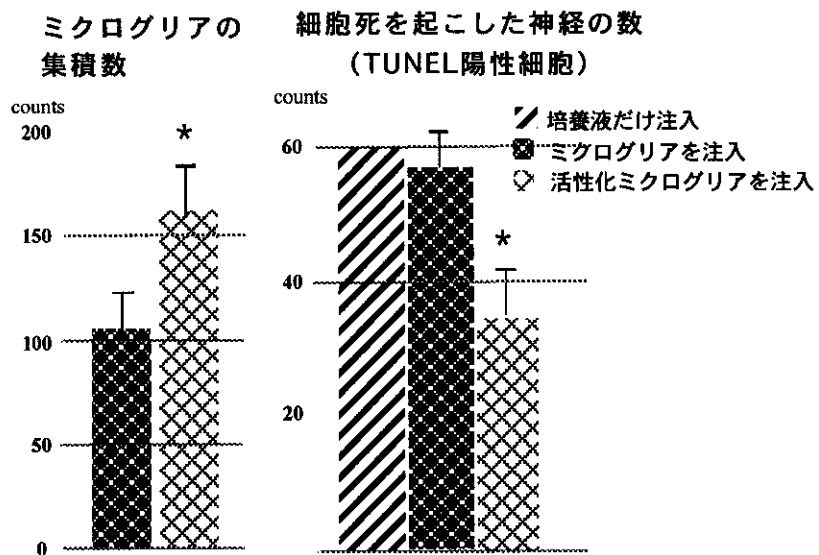


図4 活性化ミクログリアは神経細胞死を抑制する

D. 考察

ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働い

たり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である(3-5)。また最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現