

どに見られるような血管壁損傷によって血管内皮細胞が剥離し、内皮下組織であるコラーゲン層が露出した部位に血小板が粘着し凝集して血小板血栓が形成されるのではなく、血管内皮細胞は剥離しないで血管内皮細胞上に血小板が粘着、凝集する、血管内皮細胞非剥離型血小板血栓であり、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電子顕微鏡で確認した。我々は、糖尿病微小循環における易血栓形成機序をより深く検討するため、血栓形成の構成要素である血小板と血管内皮細胞に着目し、*in vitro* 実験を行っている。血小板については、散乱光法による血小板凝集能測定装置 (Laser-light Scattering Platelet Aggregometer: LSPA) を用いて、糖尿病患者では血小板凝集能が亢進していることを示している。その他にもアスピリンやプロサイリンなどを使った糖尿病患者における抗血小板薬のモニタリングも行なっている。また、血小板と血管内皮細胞との相互作用の検討においては、現在までに、血小板と血管内皮細胞の静止接触系において、糖尿病モデルを想定した高血糖および高 CML-AGE 培養の血管内皮細胞において血小板粘着面積が増大している。活性酸素消去剤である SOD, カタラーゼ, DMSO を用いて血小板粘着を検討した。その結果、糖尿病状態下の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ことが示唆された。

しかし、実際の生体内における血栓部位では、シェアストレスが高く、易血栓性に何らかの影響を与えている可能性がある。そこで、本研究では、シェアストレスを考慮に入れた血流のあるより血管内に近い議論をするため、シェアストレスを考慮に入れた内皮細胞非剥離型血小板血栓モデルを構築し、更に低シェアおよび高シェアストレス下の糖尿病易血栓性における接着因子の関与について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験システム

図 1 に示すような灌流システムを用いて、実験を行なった。倒立顕微鏡 (ECLIPSE TE300, Nikon) ステージ上には parallel plate flow chamber (CIRCULAR Parallel Plate Flow Chamber Kit, GlycoTech) を設け、シリンジポンプ (Genie, Kent Scientific Corporation) で血液を吸引し、灌流させる。顕微鏡からの画像は、高速度ビデオカメラ (REDLAKE MotionXtra HG-100K, NIPPON ROPER) を用いてコンピューターにデジタル画像として取り込んだ。コン

ピューターに画像を取り込む際には、専用ソフト MotionCentral Ver 2.0.9. AVI 1.04 J を用いた。また、flow chamber からの血液の漏れを防ぐために、真空ポンプ (Linicon LV-140, NITTO-KOHKI.CO.,LTD) を用いた。更に、実験中の試料温度を保つために、顕微鏡内をサーモスタットで、flow chamber と接する蛇の目リングをサーモプレートに変え、それぞれ 37°C に保った。

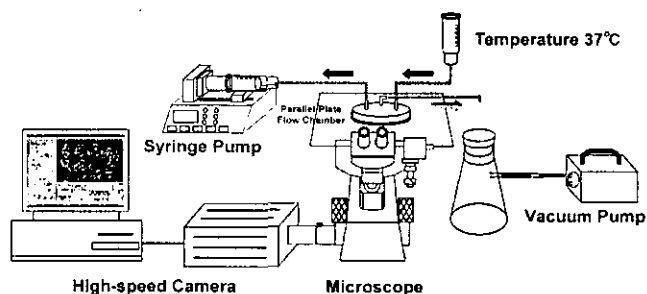


図 1 高速度ビデオカメラ顕微鏡と灌流システム

### 2. Parallel Plate Flow Chamber

具体的な Parallel Plate Flow Chamber の構造は図 2 のようになっており、培養血管内皮細胞を播種した 35mm プラスチックディッシュを底面に、流路になるガスケット、血液の出入り口となるフローデッキの順に組み合わせ、流路の周りを真空にすることで固定した。

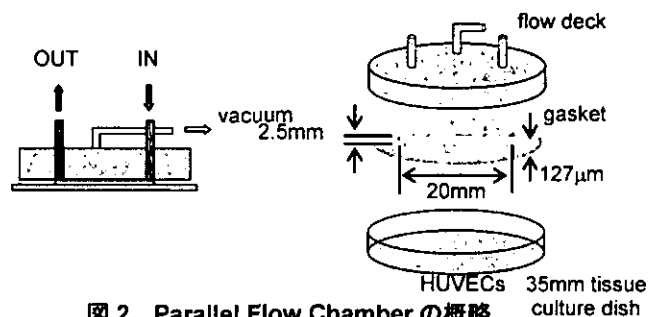


図 2 Parallel Flow Chamber の概略

また、流路内における血液の流れは、平板ポアズイユ流れになっており、流路のサイズと流路に流れる液量から、式 (1) より任意のずり速度を設定することができる。

$$\tau = 6Q / a^2 b$$

$\tau$ : shear rate [ $s^{-1}$ ],  $Q$ : volumetric flow rate [ml/min],  $a$ : gasket thickness [cm],  $b$ : gasket width [cm] . . . . . (1)

### 3. 実験試料

培養血管内皮細胞には、ヒト臍帯静脈血管内

皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs, 旭テクノガラス) を培養液 (Endothelial cell Basal Medium: EBM に 10ng/ml hEGF, 1mg/ml Hydrocortizone, 3mg/ml BBE, FBS, GA-10001 を添加した, 旭テクノガラス) で培養し, 4 代目から 15 代目のものを 0.24mg/ml I 型コラーゲンを固相化した 35mm プラスチックディッシュに 5000cells/cm<sup>2</sup> で播種し, 5~7 日目に細胞が confluent になったものを使用した。また, 高血糖培養血管内皮細胞においては, 80-90%程度 confluent になった HUVECs を 25mM D-glucose を添加した培養液で 48hous 培養し, 実験に用いた。血液は, 健康人の肘静脈より 21G でクエン酸採血した。

#### 4. 実験プロトコル

**実験 1:** 正常培養した HUVECs を flow chamber に組み込み, 培養液を 100s<sup>-1</sup> で 5 分間灌流した後, 血液を灌流しながら徐々に任意の shear rate 100s<sup>-1</sup>, 300s<sup>-1</sup>, 500s<sup>-1</sup>, 700s<sup>-1</sup>, 900s<sup>-1</sup>, 1100s<sup>-1</sup>, 1300s<sup>-1</sup>, 1500s<sup>-1</sup> まで上げ, 更に 10 分間灌流した。その後, 再び培養液を灌流し血液を洗浄した後, 透過光観察を行なった。

**実験 2:** 正常培養および高血糖培養した HUVECs を flow chamber に組み込み, 培養液を 100s<sup>-1</sup> で 5 分間灌流した後, 血液を灌流しながら徐々に 100s<sup>-1</sup> (low shear rate) または 1500s<sup>-1</sup> (high shear rate) まで上げ, 更に 10 分間灌流した。その後, 再び培養液を灌流し血液を洗浄した後, 透過光観察を行なった。

**実験 3:** 灌流前に, 健康者の血液および高血糖培養した HUVECs へ拮抗剤およびモノクローナル抗体を添加し, 37°C で 30 分間インキュベートした。GPIIb/IIIa の拮抗剤である FR144633 (藤沢薬品工業より提供) 1.0μM を健康者の血液に添加し, von Willebrand Factor のモノクローナル抗体である VW1-2 (タカラバイオ) 25μg/ml, GPIb/IX/V のモノクローナル抗体である GUR20-5 (タカラバイオ) 20μg/ml, αVβ3 のモノクローナル抗体である LM609 (Chemicon International) 40 μg/ml, ICAM-1 のモノクローナル抗体である RR1/1 (Bender Med Systems) 20μg/ml を高血糖培養した HUVECs に添加した。実験は, 各拮抗剤およびモノクローナル抗体ごとに行い, 高血糖培養した HUVECs を flow chamber に組み込み, 培養液を 100s<sup>-1</sup> で 5 分間灌流した後, 血液を灌流しながら徐々に 100s<sup>-1</sup> (low shear rate) または 1500s<sup>-1</sup> (high shear rate) まで上げ, 更に 10 分間灌流した。

その後, 再び培養液を灌流し血液を洗浄した後, 透過光観察を行なった。

#### 実験 4. 活性酸素産生の経時的变化

細胞継代時に 24well のマイクロプレートに 0.5ml ずつの培地を入れ, そこに 1×10<sup>5</sup> cells/ml 細胞を播種した。そして実験の 48, 24, 6, 3, 0.5 時間前に各々別の well の培地に 30mM D-glucose を添加。実験時には各 well に高血糖 0.5 時間培養から 48 時間培養までの状態を作ることができる。それに glucose を添加しなかったコントロールの状態を加えた 6 つの状態をマイクロプレートに順に作った。この 6 つの一連の well にスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)を蛍光染色する DHE 3μg, または過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)蛍光プローブである DHF 1μg を添加し, インキュベートから 10 分~30 分の蛍光画像を 10 分毎に記録し, 10 分から 30 分までの画像全体の平均輝度値をその条件での活性酸素産生量の指標とした。

**実験 5.** ミトコンドリア由来活性酸素の確認  
35mm glass bottomed dish に 3ml の培地を入れ, HUVEC を 1.5×10<sup>5</sup> cells/ml で播種し, 十分接着した状態の細胞を使用した。ここで glass bottomed dish を用いたのは実験の際に使用する 100 倍の対物レンズの焦点距離よりも細胞を播種した容器の底の厚みが厚いと焦点が合わないからである。

始めにミトコンドリア染色用の MitoRed を 1μg 添加し, 15 分間インキュベート。培地で洗浄後, 30mM D-glucose を含んだ培地を新たに添加。B 励起の画面に MitoRed の蛍光がクロストークしていないことを確認。グルコースを含んだ培地を添加してから 30 分後に観察するために, その 15 分前に活性酸素染色用の DHF-DA 4μl を添加した。蛍光観察には蛍光顕微鏡の G 励起および B 励起を, 画像取得にはカラー CCD カメラを使用した。

### C. 結果

#### 実験 1

任意の shear rate における正常培養した HUVECs への血小板粘着画像を図 3 に, 任意の shear rate における正常培養した HUVECs への血小板粘着面積を図 4 に示す。

その結果, 比較的低い shear rate ではほとんど血小板粘着は観察されなかったが, 比較的高い shear rate では shear rate に依存して血小板粘着の増加が観察された。

この結果から, shear rate の高いところでは, 何らかの接着因子が強く働いていることが示唆された。

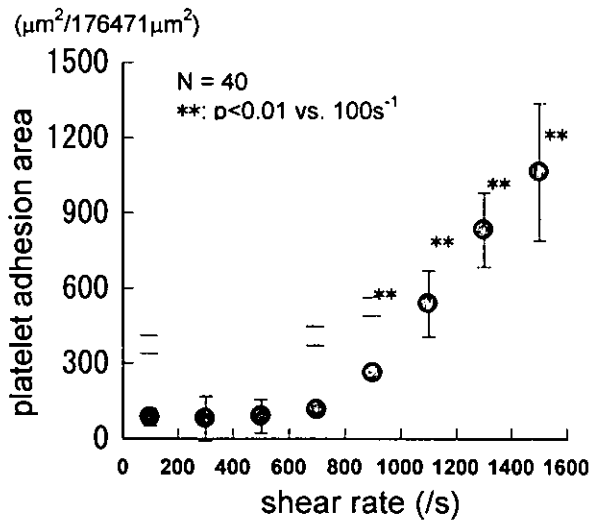


図4 任意の shear rate 条件下における正常培養血管内皮細胞上の血小板粘着面積

実験 2

low shear rate および high shear rate 下における高血糖培養した HUVECs への血小板粘着画像を図 5 に, 高血糖培養および高シエアストレス下における HUVECs への血小板粘着面積を図 6 に示す。

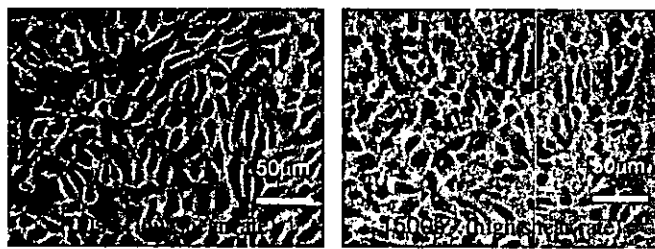


図5 low および high shear rate 下における高血糖培養血管内皮細胞上への血小板粘着

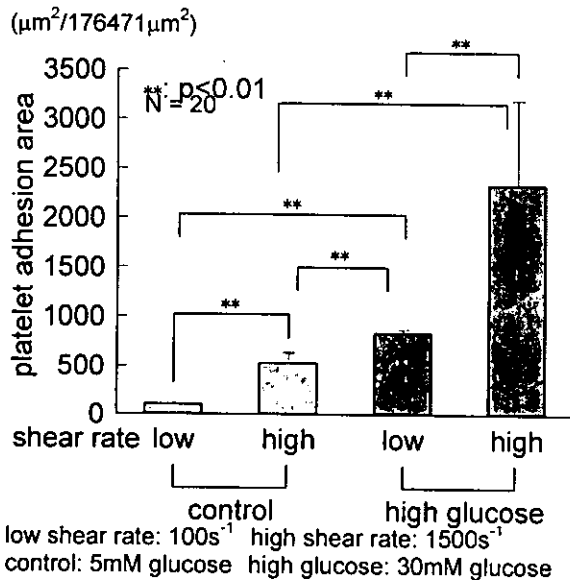


図6 高血糖培養および高シエアストレス下における血小板粘着面積

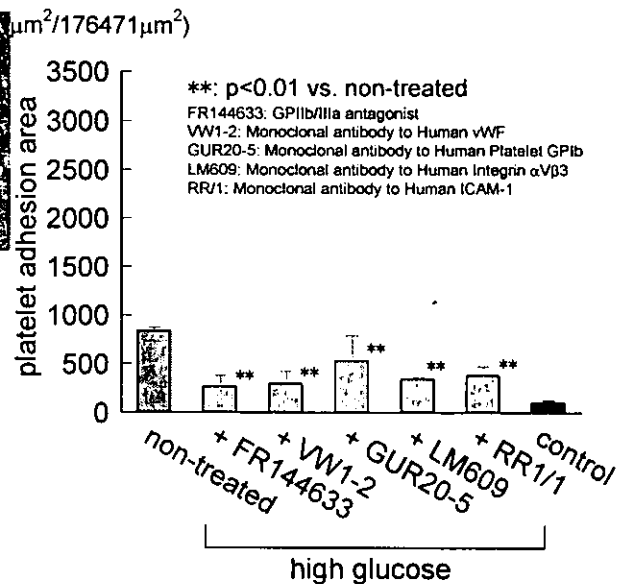
その結果, low, high いずれの shear rate 下においても高血糖培養した血管内皮細胞により多くの血小板粘着が見られた。また, 正常培養および高血糖培養いずれの培養条件においても, low shear rate 下に比し, high shear rate 下において, 粘着がより増加していた。さらに, 正常培養した血管内皮細胞上を high shear rate で灌流させるよりも, 高血糖培養血管内皮細胞上を low shear rate で灌流させる方が, 血小板粘着が増大していた。

これらの結果より, 糖尿病では, 高シエアストレス下において易血栓性がより亢進していることが示唆された。また, 糖尿病における易血栓性は, シエアストレスによる影響よりも, 高血糖による影響の方が強いことが示唆された。

実験 3

low shear stress 下および high shear stress 下における各拮抗剤およびモノクローナル抗体を用いた血小板粘着抑制実験の結果を図 7 に示した。

low shear rate (100s⁻¹)



high shear rate ( $1500s^{-1}$ )  
 $(\mu m^2/176471\mu m^2)$

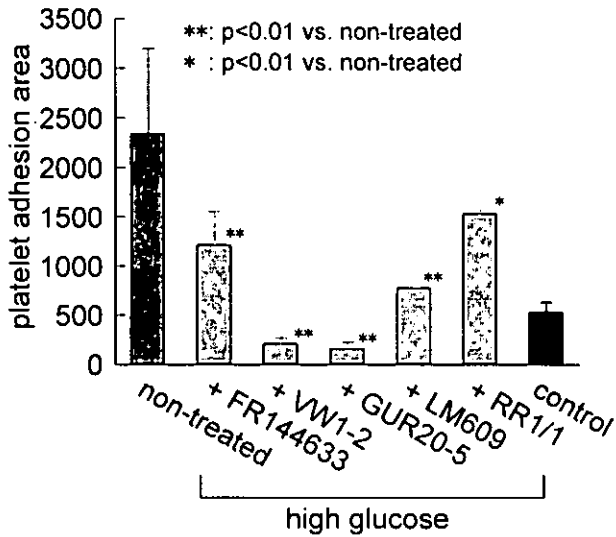


図7 高血糖培養およびシエアストレス下における拮抗剤およびモノクローナル抗体を用いた血小板粘着抑制

実験4 活性酸素産生の経時的变化

活性酸素を蛍光染色することによって Fig. 3 (左: DHE による  $O_2$  染色画像, 右: DHF-DA による  $H_2O_2$  染色画像) のような画像が得られた。微弱に光る塊が細胞1つに相当する。

このような画像から、各 well での平均輝度値の変化を、30mM D-glucose を添加していない well の平均輝度値を1として各高 D-glucose 培養時間ごとにプロットした。  $O_2$  についての結果が Fig. 4,  $H_2O_2$  についての結果が Fig. 5 である。

図4から分かるように、  $O_2$  量はグルコース添加から30分後に若干増加、その後減少するという傾向はあるものの、変化の大きさとしてはあまり大きなものではなかった。

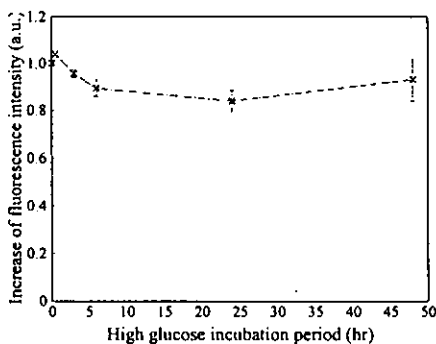


図4 高 D-glucose 培養時間による  $O_2$  染色蛍光強度の変化

これに対して  $H_2O_2$  は Fig. 5 のようにグルコ

ース濃度上昇後すぐに急激に上昇、一端減少して再び上昇、その後変化は緩やかになるという2段階の増加を呈した。

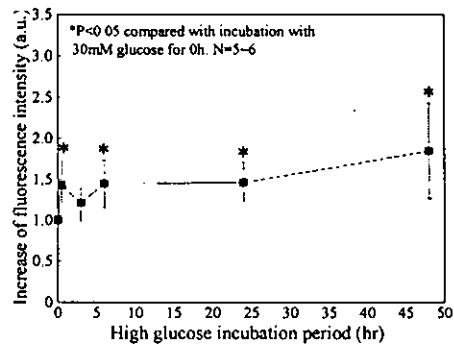


図8 高 D-glucose 培養時間による  $H_2O_2$  染色蛍光強度の変化

実験5 ミトコンドリア由来活性酸素の確認

MitoRed によって赤く染色されたミトコンドリアの画像が Fig. 6, DHF-DA によって緑色に染色された  $H_2O_2$  の画像が Fig. 7 である。どちらも画面右上から左下にかけて伸びる一つの細胞を写している。 Fig. 6 において右上に細胞内で赤く染まっていない部分はミトコンドリアが存在しないことから核だと考えられる。白く囲った部分は画像処理によって特にコントラストを強めた。この部位を見ると分かるように、ミトコンドリアの局在と  $H_2O_2$  産生部位の局在は一致した。B 励起による観察では最初の1秒前後のみ、MitoRed によるミトコンドリア像と同様の局在性を示すが、その後すぐに核を中心に全体が強く緑色に染まってしまった。

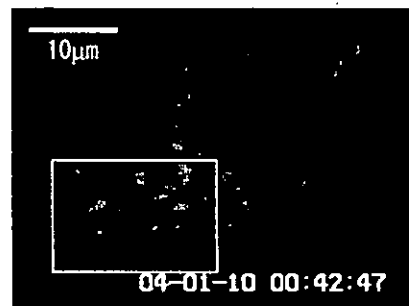


図9 ミトコンドリア蛍光染色画像

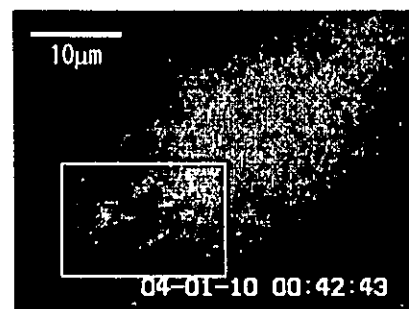


図 10 活性酸素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)蛍光染色画像

D.考察

現在, 血小板血栓形成機序の一般的なモデルは, 血管壁損傷により血管内皮細胞が剥離した後, 血管内皮下組織に血小板が粘着, 凝集すると考えられている. しかし近年, *in vivo* 実験において, 活性酸素<sup>1)</sup>, ウイルス感染<sup>2)</sup>などによって血管内皮細胞が傷害されると, 血小板が血管内皮細胞に粘着するという報告が幾つかある. 加えて, 研究背景でも述べたように, 我々研究班では, 活性酸素による血管内皮細胞傷害によって内皮細胞非剥離型血小板血栓が形成されることを *in vivo* 実験で認めている. 更に, *in vitro* 実験においても, トロンピンに暴露した血管内皮細胞に血小板が粘着するという報告<sup>3)</sup>や, 活性化血小板が GPIIb/IIIa を介して血管内皮細胞に粘着するという報告もある<sup>4), 5)</sup>. 我々研究班においても *in vitro* 実験において高血糖培養および高 AGE 培養血管内皮細胞への血小板粘着を確認しているが, これらの報告は全て血小板と血管内皮細胞の静止接触のみの検討である. 流動下における血管内皮細胞への血小板粘着においても報告がある<sup>6), 9)</sup>が, shear rate で 10s<sup>-1</sup> 程度での検討であり, 微小循環レベルでの検討はなされていなかった.

今回我々の報告では, まず, 正常培養血管内皮細胞への shear rate 別血小板粘着の検討に関しては, 図 4 から分かる通り, shear rate に依存して血小板粘着が増加する結果は得られなかった. つまり, 比較的低い shear rate (100 s<sup>-1</sup>, 300 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 700 s<sup>-1</sup>) 下においては, 殆ど血小板粘着は見観察されなかった. これは, 血管内皮細胞が本来持つ抗血栓性が働いているものと思われる. しかし, 比較的高い shear rate (900 s<sup>-1</sup>, 1100 s<sup>-1</sup>, 1300 s<sup>-1</sup>, 1500 s<sup>-1</sup>) 下においては, coverage にして最大 1%未満であるが, 急激に血小板粘着が shear rate に依存して増加する結果が得られた. これは, 血管内皮細胞の抗血栓性が失われつつある可能性と, 血小板が shear stress により, 活性化されている可能性とが考えられ, 何らかの接着因子が強く関与していると思われる.

次に, 高血糖培養および high shear stress 下における血小板粘着の検討に関しては, 図 6 から分かる通り, low, high いずれの shear rate 下においても, 正常培養条件下に比し, 高血糖培養条件下の方が, 血管内皮細胞への血小板粘着面積は有意に増加していた. この結果は, 以

前, 我々研究班が報告した, 静止接触下における高血糖培養血管内皮細胞への血小板粘着についての検討結果と一致する所見が得られた. また, 高血糖培養条件下では, low shear rate 下に比し, high shear rate 下においては, 血小板粘着面積が, 2~3 倍に増加しており, 糖尿病では, high shear stress 下において, 易血栓性がより亢進していることが示唆された. さらに, high shear rate 下における正常培養血管内皮細胞への血小板粘着面積に比し, low shear rate 下における高血糖培養血管内皮細胞への血小板粘着面積の方が, 有意に増加しているという結果から, 血管内皮細胞への血小板粘着には, shear stress の影響よりも, 高血糖の影響の方が, より強く働いていることも示唆された. このことは, 糖尿病においては, 血小板膜糖蛋白である GPIIb/IIIa の発現増加<sup>10)</sup>や vWF の血中濃度増加<sup>11)</sup>, 血管内皮細胞からの産生増加, フィブリノーゲンの血中濃度増加, 血管内皮細胞膜上のインテグリンリガンドである ICAM-1 の発現増加などに起因しているものと考えられる.

最後に, 高血糖培養および high shear stress 下における血小板粘着への接着因子の関与についての検討では, 図 7 より, 拮抗剤およびモノクローナル抗体を添加した際の血小板粘着面積 (緑の棒グラフ) と, 何も添加しなかった際の血小板粘着面積 (赤の棒グラフ) とから, 血小板粘着抑制効果を計算し (表 1), 拮抗剤およびモノクローナル抗体ごとに low shear rate 下と high shear rate 下で, 比較した結果, low shear rate 下においては血小板膜上 GPIIb/IIIa と血管内皮細胞膜上 ICAM-1 が, high shear rate 下においては血漿中 vWF と血管内皮細胞膜上 GPIb の関与が強いことが示唆された. また, 血管内皮細胞膜上 αVβ3 に関しては high shear rate 下に比し, low shear rate 下において若干関与が高かったが, low shear rate 下と high shear rate 下で, 血小板粘着への関与の違いにそれほど差異はないと考えられる.

表 1 high shear stress 下および low shear stress 下における各接着因子の関与

shear rate	GPIIb/IIIa	vWF	GPIb	αVβ3	ICAM-1
	a	F	b	3	1
low	68%	65%	37%	59%	55%
high	48%	91%	94%	67%	34%

以上の考察から、高血糖状態下における血管内皮細胞への血小板粘着機序は、low shear stress 下では血小板膜上の GPIIb/IIIa と血管内皮細胞膜上の ICAM-1 が血漿中のフィブリノーゲン (Fg) やフィブロンectin (Fn) を介して結合する機序がより強く働くと考えられる (図 8)。また、high shear stress 下は、血小板膜上の GPIb と血管内皮細胞膜上の GPIb が血漿中の vWF を介して結合する機序がより強く働くと考えられる

#### ミトコンドリア由来活性酸素について

図 9 の MitoRed によるミトコンドリア染色像、図 10 の活性酸素 ( $H_2O_2$ ) 蛍光の局在から高グルコース培養初期におけるミトコンドリア由来であることが視覚的に示唆された。励起光照射直後から数秒で、核を中心に急速に細胞全体が蛍光で飽和してしまった。しかし、ある程度のレーザー照射強度でないと蛍光が検出できず、濃度が高くてはすぐに細胞全体に蛍光が飽和してしまうという点でミトコンドリア局在を示す画像取得は非常に困難であった。DHF はミトコンドリア内の活性酸素まで高感度に検出できる。しかし、その反面ミトコンドリアや細胞からの漏洩が大きく、バックグラウンド光も大きくなってしまふ。しかしコントラストを強めるために余計な試薬を洗浄しようとしても、細胞内の試薬も一緒に流れてしまう。さらに B 励起によって細胞内のフラビンまたはフラビン含有酸化酵素が活性化されて  $H_2O_2$  が発生してしまうことも蛍光飽和の大きな要因である<sup>[19]</sup>

#### E. 結論

今回我々の報告では、静止状態でなく、シエアストレスを考慮に入れた血流のあるより血管内に近い状態設定のため、血流下における血管内皮細胞非剥離型血小板血栓モデルを構築し、更に低シエアおよび高シエアストレス下の糖尿病易血栓性における接着因子の関与について検討を行なった。その結果、①正常培養内皮細胞においても、高シエアストレス下ではより多くの血小板粘着が認められ、高シエアストレス下では、何らかの接着因子が働いていることが示唆された。②高血糖培養内皮細胞においては、低シエアストレス下に比し、高シエアストレス下で血小板粘着が 3 倍増大しており、糖尿病では、高シエアストレス下において易血栓性がより亢進していることが示唆された。③また、高シエアストレス下における正常培養内皮

細胞への血小板粘着に比し、低シエアストレス下における高血糖培養内皮細胞への血小板粘着が 1.5 倍増大しており、糖尿病における易血栓性には、シエアストレスの影響よりも、高血糖の影響の方が強いことが示唆された。更に、④低シエアストレス下の糖尿病易血栓形成機序には、血小板膜上の GPIIb/IIIa および血管内皮細胞膜上の ICAM-1 がより強く関与しており、⑤高シエアストレス下の糖尿病易血栓形成機序には、血漿中 vWF および血管内皮細胞膜上の GPIb/IX/VI が強く関与していることが示唆された。最後に、⑥糖尿病におけるシエアストレス下血管内皮細胞非剥離型血小板血栓機序の仮説を提唱した。

血管内皮細胞を高グルコース状態で培養し、その際の活性酸素産生の経時的変化および局在性について 2 つの結論を得た。

まず高グルコース培養による活性酸素 ( $O_2^-$  および  $H_2O_2$ ) の変化を蛍光試薬の輝度値を画像から求めることで評価した。その結果、 $O_2^-$  には大きな変化はなく、やや減少傾向があった。一方  $H_2O_2$  はグルコース添加後急激に増加、一端減少するものの再び増加するという 2 段階の増加を呈することが分かった。

また、この活性酸素の増加が主にミトコンドリア由来であることを、高グルコース状態で 30 分間培養した HUVEC の  $H_2O_2$  とミトコンドリアを二重染色することで示した。

以上のことから高血糖状態における血管内皮細胞ではグルコース添加直後からミトコンドリア由来の活性酸素 ( $O_2^-$ ) が急激に増加するが、SOD によって  $H_2O_2$  へとすぐに変換されてしまう。この  $H_2O_2$  も一端は増加するものの、GPx などの  $H_2O_2$  除去酵素によって一端減少する。しかし、 $H_2O_2$  除去酵素の発現量の限界や活性低下によって  $H_2O_2$  が除去能力を越えて再び増加してしまうと思われた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hiromiti Nakadate, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Yasunori Hirose, Haruhiko Gokan and Hruyuki Minamitani The effect of shear stress on high thrombogenesis of diabetes mellitus, In Microcirculation annual 2004 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, 2004, in press
- 2) Yasunori Hirose, Eiichi Sekizuka,

- Chikara Oshio, Hiromiti Nakadate, Haruhiko Gokan and Hruyuki Minamitani Enhanced platelet aggregation in diabetic patient by laser light scattering method, In Microcirculation annual 2004 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, 2004, in press
- 3) Mami Ishikawa., Eiichi Sekizuka., Boris Krischek, Ulrich Sure., Raif Becker, Helmut Bertalanffy, Role of nitric oxide in the regulation of spinal arteriolar tone Neurosurgery 50(2):371-378, 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 In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.41-42, 2002, October
  - 5) Tadasu 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- In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.63-64, 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 In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.13-14, 2002, October
  - 7) Tomomi Uchida, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Kosuke Tsukada, Tadasu Ozawa Hiromiti Nakadate and Hruyuki Minamitani Investigation on the thrombus formation of diabetes mellitus In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.67-68, 2002, October
  - 8) Mami Ishikawa, Eiichi 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
  - 9) 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 日本バイオロロジー学会誌 16(1):29-31, 2002
  - 10) 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
  - 11) 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
2. 学会発表
- 1) Koji Miyazaki, Eiichi Sekizuka, Kazuhiko Ooya, Chikara Oshio, Haruyuki Minamitani, Kazuo Suzuki Phagocytic effect of LECT2 on kupffer cells Workshop on Dysfunction of Host-Defence-2002-, Hatooji, Tokyo, 2002, November 8-9
  - 2) ナノプローブとバイオイメージング技術を用いた微小循環障害の機構解析, 微小循環セミナー第 28 回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)
  - 3) 岡崎絵里奈, 塚田孝祐, 中橋浩康, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之, 原子間力顕微鏡による赤血球ゴーストの弾性解析, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)
  - 4) 広瀬耕徳, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 中橋浩康, 南谷晴之, 糖尿病患者の血小板凝集能亢進における GP II b/IIIa の関与 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)
  - 5) 中橋浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 森下鉄夫, 糖尿病状態化における血管内皮細胞と血小板との相互作用の検討, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)
- その他
- |                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 第 10 回日本ヘモレオロジー学会           | 5 件 |
| 第 29 回日本微小循環学会              | 5 件 |
| 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 | 3 件 |
- H. 知的財産権の出願・登録状態  
特許申請なし。

## 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。第一にミトコンドリア膜電位および形態の同時観察を可能にするミトコンドリア蛍光イメージング法を確立、第二にタンパク質系蛍光プローブの開発を行いながら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を蛍光イメージングし、細胞死刺激が加えられてから、カスパーゼカスケードの開始のタイミングは細胞個々で大きく異なるものの、カスパーゼ8活性化からカスパーゼ3活性化に至るカスパーゼカスケードはほとんどの細胞で極めて短時間に進行することを明らかにした。第三に昨年度確立した細胞内カルシウムイオン、pH、NO 産生同時マルチカラーイメージング解析法により、流れ刺激によるNO産生、細胞障害メカニズムを解析し、NO産生にアシドーシスが関係する可能性を示唆した。

#### 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。今年度はミトコンドリア膜電位の蛍光強度比イメージング、カスパーゼ活性化のイメージング、さらにはCa<sup>2+</sup>、pH、NOの同時イメージングについて報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. ミトコンドリア膜電位の蛍光強度比イメージング

コラゲナーゼ還流法により単離したラット肝細胞を、コラーゲン塗布した直径25mmのカバーグラス上で一晚培養した。ミトコンドリア蛍光プローブ MitoTracker Green FM (MTG: 100 nM) と約60分インキュベートしたのち、さらに Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 50 nM) と15分インキュベートした。画像化はMTGは488nm励起、505-550nmの蛍光測定、TMREは543nm励起、560nm以上の蛍光測定で行った。

##### 2. 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（あるいはEGFP）及びEYFP（場合によってはDsRed2）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。また、チトクロームcのミトコンドリアからの遊離をイメージングするために、チトクロームc遺伝子をHeLa細胞からクローニング、そのC-末端にECFPを融合させたタンパク質発現用ベクターを作製した。以上のタンパク質をHeLa細胞に発現し、LSM510(Carl Zeiss)を用いて、それぞれ表1に示した波長についてマルチスキャンモードでイメージングを行った。画像処理、データ解析にはMetaFluor(Universal Imaging)を用いた。

### 3. 細胞内Ca<sup>2+</sup>応答、pH<sub>i</sub>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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>とNO産生あるいはpH<sub>i</sub>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し、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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、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波長により励起し、昨年度報告した条件で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. ミトコンドリア膜電位と形態のイメージング

ミトコンドリア膜電位はATP産生の駆動力であり、その減少は組織細胞障害と密接に関係している。ミトコンドリア膜電位の測定は、古くは脂溶性かつプラス荷電を有する色素のミトコンドリア-細胞質間の分布測定によって行われていたが、Rhodamine123をはじめとした膜電位依存性ミトコンドリア蛍光プローブの発見によって、現在では蛍光イメージングによって行われることが多い。しかし膜電位依存性ミトコンドリア蛍光プローブの多くは脱分極時には消失するため、ミトコンドリア形態の観察が困難となる。そこで、膜電位非依存性プローブとの同時使用によって蛍光強度比として膜電位をモニターする方法の検討を行った。膜電位依存性プローブとしては、膜電位変動への追従性に優れるTMRE、膜電位非依存性プローブとしては蛍光波長という点でTMREとの同時使用が可能なMTGを用いた。

TMREおよびMTGで同時染色した初代培養肝細胞では、20秒毎の間欠記録を行ったところ、どちらのプローブも少なくとも2時間までは安定なイメージングが可能であった。脱共役剤CCCP 0.1 μMを添加すると、20秒後には既にTMREの蛍光が減少するが、MTGは20分程度まではほとんど変わらない蛍光像を示した。それ以降、MTGの蛍光像も減少する傾向がみられた。そこでTMREの蛍光を赤色、MTGの蛍光を緑色の擬似カラーで表示し重ね合わせをすると、始めは黄色になるが膜電位の脱分極に伴い緑色に変化した。図1は、SH修飾剤N-エチルマレイミド5.0 μMを加えて、その影響を観察したものであるが、添加5分後か

ら細胞内のミトコンドリアが部分的に脱分極を示す像が観察された。この脱分極は時間経過を経るに従い、回復を示すが、その後脱分極と再分極を繰り返す像が得られた。この脱分極のメカニズムは現在の所不明であるものの、SH-基の修飾に伴い、ミトコンドリアの膜透過性チャネルが開口した可能性が考えられる。

## 2. カスパーゼ活性化の画像化

昨年度カスパーゼ 3 の活性化測定用プローブおよびカスパーゼ 8/9 測定用プローブの報告を行ったが、今年度はまず、それぞれの活性化のタイミングを比較した。現在までのところ、この二つプローブの蛍光波長の重なりにより、同一細胞における同時測定はできないため、それぞれのプローブを TMRE によるミトコンドリア膜電位像と比較し、カスパーゼの活性化およびミトコンドリア脱分極のタイミングの差を細胞個々についてプロットした (図 2)。その結果、TNF- $\alpha$  (200 ng/ml) では、細胞個々にばらつきはあるものの、平均値ではいずれのカスパーゼともミトコンドリア脱分極に 5~10 分先立って活性化が生じること、また staurosporine (3  $\mu$ M) の添加では、カスパーゼ 8/9 はミトコンドリア脱分極にやや先立ち、カスパーゼ 3 はやや遅れて活性化されることが明らかとなった。

次にチトクローム c のミトコンドリアからの遊離とカスパーゼ 3 活性化のタイミングを比較した。図 3 はその結果を示しているが、TNF- $\alpha$  (200 ng/ml) 添加において、多くの細胞でチトクローム c の遊離まで 1 時間~数時間の時間経過が必要であったが、その後数分でカスパーゼ 3 の活性化が観察された。

以上の結果から、アポトーシス刺激後の細胞内情報伝達メカニズムであるカスパーゼカスケードは、カスパーゼ 8 の活性化が始まるまでは長時間の経過が必要であるが、その後カスパーゼ 3 の活性化までは 15 分程度の極めて短時間に生じることが明らかとなった (図 4)。

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

### (3-1). LPA 存在下流れ刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、pHi 酸性化及び NO 産生の相関性

昨年度、10  $\mu$ M LPA 存在下に内皮細胞に流れ刺激 (250 mm/sec) を負荷し、 $[Ca^{2+}]_i$ 、pHi 及び NO の 3 重同時測定を行い、LPA 存在下流れ刺激により  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇し、その後 pHi 低下及び NO 産生が観察されることを報告した。そこで NO 産生と pHi の関係をより詳細に検討したところ、NO は pHi 低下が大きいほど産生量は増大すること、また NO 産生の開始時間は pHi 変化とほぼ同時か遅れて生じることが明らかとなった。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、pHi 低下及び NO 産生は認められなかった。また、10  $\mu$ 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。即ち、反復性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の場合、pHi 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、pHi 低下及び NO 産生が大きく、pHi 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 pHi 低下の場合に大きく産生され、細胞障害に関わることが示唆された。

そこで LPA 存在下、流れ刺激による  $[Ca^{2+}]_i$ 、pHi 及び NO の 3 重同時測定を繰り返した実験結果 (n=3) を用いて、流れ刺激を与えて反応開始から 3 分間の反応を中心に  $[Ca^{2+}]_i$  上昇、pHi 変化、NO 産生相互間の相関性を検討した (Fig. 3)。パラメータとして、 $[Ca^{2+}]_i$  反応は 3 分間の平均上昇率を Fura Red 蛍光比 (F/F0) の平均減少率として、pHi 変化は 3 分後の低下の程度を BCECF 蛍光 (F/F0) の減少率として、NO 産生は 3 分後の DAR-4M 蛍光 (F/F0) の上昇率として示した。三者の間には有意の相関 ( $p < 0.01$ , n(cells)=100) が認められ

表1 蛍光プローブのイメージング波長

蛍光プローブ	励起nm	蛍光 <sup>1</sup> nm	蛍光 <sup>2</sup> nm
EYFP-peptide-ECFP	458	467.5-497.5	515-545
EGFP-peptide-DsRed2	488	505-530	560-615
Cytochrome c-ECFP	458	467.5-497.5	

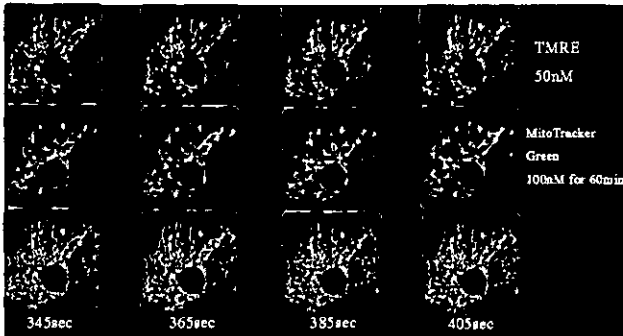


図1 初代培養肝細胞のミトコンドリアイメージング  
最下段の図は蛍光重ね合わせ像で、図の下の数字はN-ethylmaleimid添加後の時間を示す。本文参照。

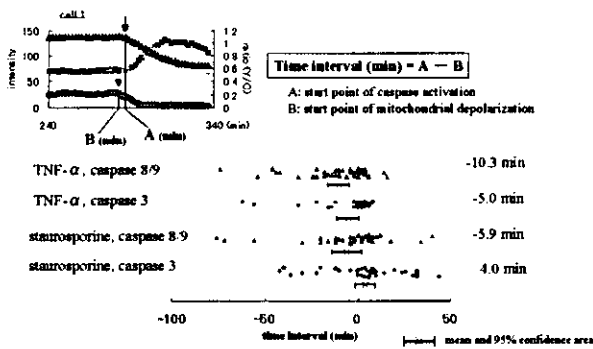


図2 カスパーゼ活性化とミトコンドリア脱分極の開始時間差  
本文参照

Time Schedule of Cell Death

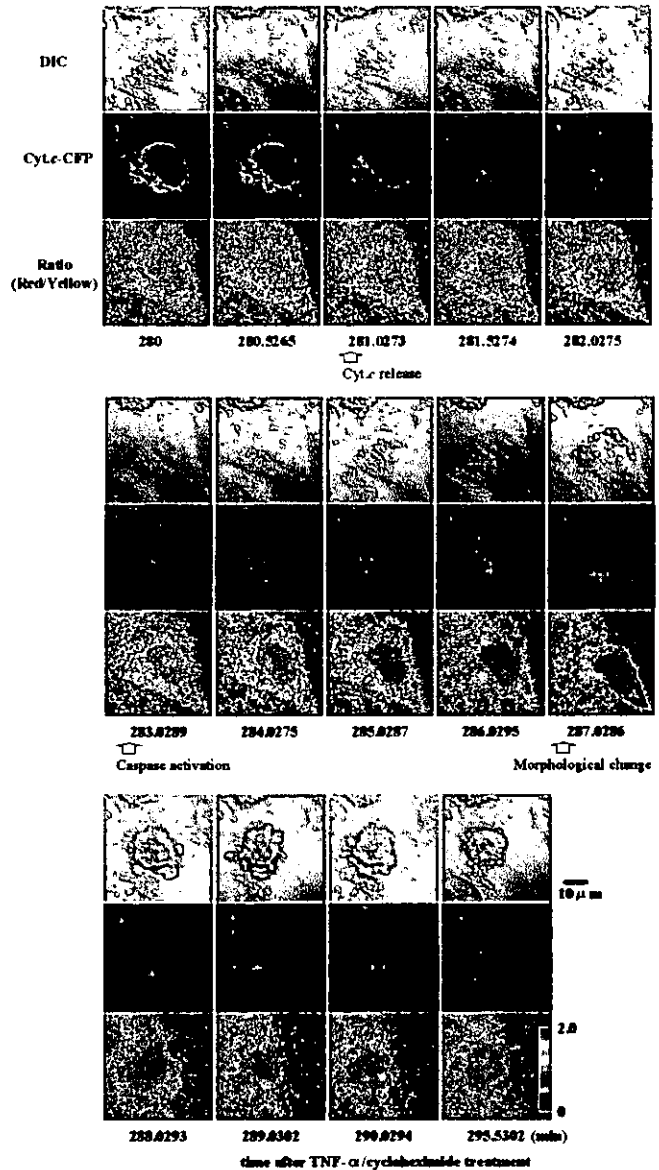
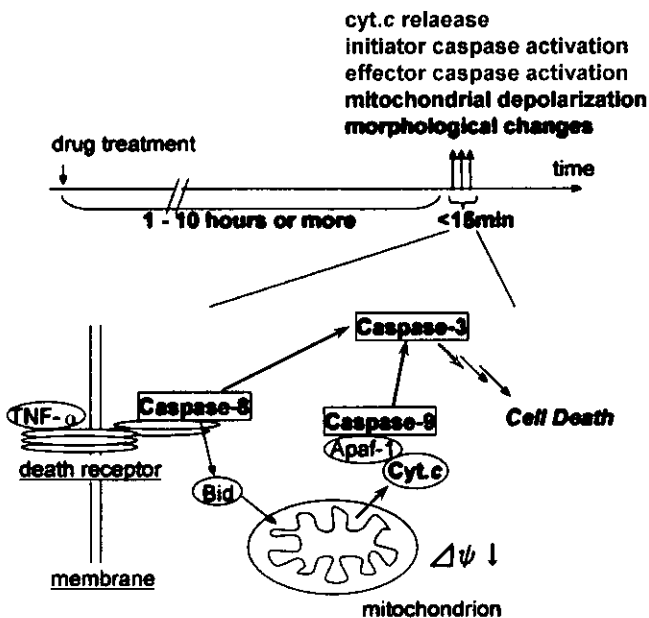
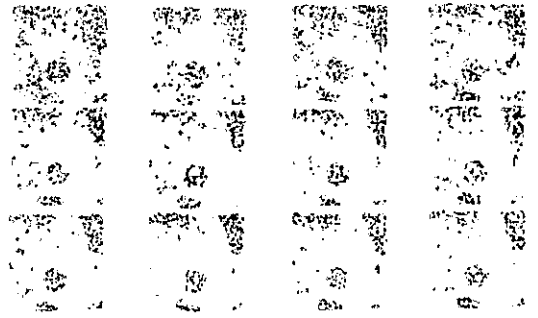


図3 チトクロームcのミトコンドリアからの遊離とカスパーゼ3活性化のタイミング  
カスパーゼ3の活性化は蛍光強度比を擬似カラー表示している。青が活性化を示す。図の下の時間はTNF-αとサイクロヘキシミドの添加後の時間経過を示す。その他は本文参照。

図4 アポトーシス刺激の細胞内情報伝達のまとめ  
本文参照



1. The first block of text is located at the top of the page and contains several lines of illegible text.

2. The second block of text is located in the middle of the page and contains several lines of illegible text.

3. The third block of text is located at the bottom of the page and contains several lines of illegible text.

4. The fourth block of text is located at the bottom of the page and contains several lines of illegible text.

たが、 $pH_i$  変化と NO 産生との相関が高く ( $r = 0.679$ )、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇と  $pH_i$  変化 ( $r = 0.366$ )、NO ( $r = 0.265$ ) 産生との相関性は低かった。

### (3-2). NO 産生の細胞内局在性

10  $\mu$ M LPA 存在下流れ刺激 (250 mm/sec) で生じる  $[Ca^{2+}]_i$  変化と NO 産生を高倍率の対物レンズ (40 倍) を用いて詳細に検討した結果を Fig. 4 に示す。刺激前の状態で DAR-4M は rhodamine123 とほぼ同一の細胞内局在性を示し、ミトコンドリアに集積しやすいことが明らかとなった。LPA 適用により DAR-4M と Fura Red の蛍光が低下したのは、適用時の攪拌による焦点面のズレを反映したアーチファクトであり、その後の流れ刺激を与えた直後からの変化が  $[Ca^{2+}]_i$  応答と NO 産生を示している。 $[Ca^{2+}]_i$  反応は細胞質 (紫) とミトコンドリア (赤) でほぼ同様の上昇を示したのに対して、NO 産生はミトコンドリアで先行し、その後細胞質で増加することが明らかとなった。この結果は、ミトコンドリアで産生された NO が細胞質へと拡散し、その後の細胞障害を導く可能性を示すものである。

本研究において  $[Ca^{2+}]_i$ 、 $pH_i$  及び NO のマルチカラーイメージングにより、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  $\mu$ M) LPA 存在下流れ刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇、 $pH_i$  変化及び NO 産生はその後の細胞障害に密接に関与しており、ミトコンドリアでの NO 産生が細胞障害の一因である可能性が考えられた。LPA は動脈硬化病変部位に蓄積することや血小板の活性化により放出されることから、本研究の結果は、LPA が血管障害の原因物質の一つである可能性を示すとともに、新たな治療ターゲットとなりうることを示唆するものである。

## D. 考 察

ミトコンドリア蛍光プローブは既に多種類が報告されている。しかし当初広く用いられた

Rhodamine123 は膜電位の脱分極への追随性が悪く、膜電位をモニターする目的には不適切である。一方 TMRE などは追随性はよいが、脱分極するとミトコンドリアから消失するため、脱分極時に形態を観察することができない。JC-1 は高濃度になると J-アグリゲイトを生じ、蛍光色が緑から橙に変化することが知られており、蛍光強度比による膜電位のイメージングへの応用が期待された。しかし、実際に用いてみると、高濃度条件では細胞内で析出が生じたり、また細胞間での染色の違いも大きく、細胞への応用が極めて難しい色素である。TMRE と MTG を組合せた本方法は、簡便であり、今後組織細胞傷害のイメージング研究の様々な場面に応用可能な方法といえる。

アポトーシス刺激における細胞内情報伝達で重要な役割を果たしているカスパーゼ活性化をイメージングで解析したところ、意外な事実が明らかとなった、すなわち、カスパーゼカスケードの開始点であるカスパーゼ 8 活性化が生じるタイミングは細胞個々によって大きな違いがある (アポトーシス誘発刺激後 3 分~数時間) が、多くの細胞では一度活性化が生じるとカスパーゼ 3 活性化まで、速やか (15 分以内) にカスケードが伝播した。ただし、今現在カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 3 の活性化を同一細胞でイメージングすることはできない。今後、同一細胞での同時イメージングを目指して検討を進める予定である。また、アポトーシス刺激受容体 death receptor からカスパーゼ 8 までの経路についてイメージングで解析する方法を開発して、細胞間で時間経過が異なるこの間のメカニズム解析に進む予定である。

$[Ca^{2+}]_i$ 、 $pH_i$  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  $\mu$ 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

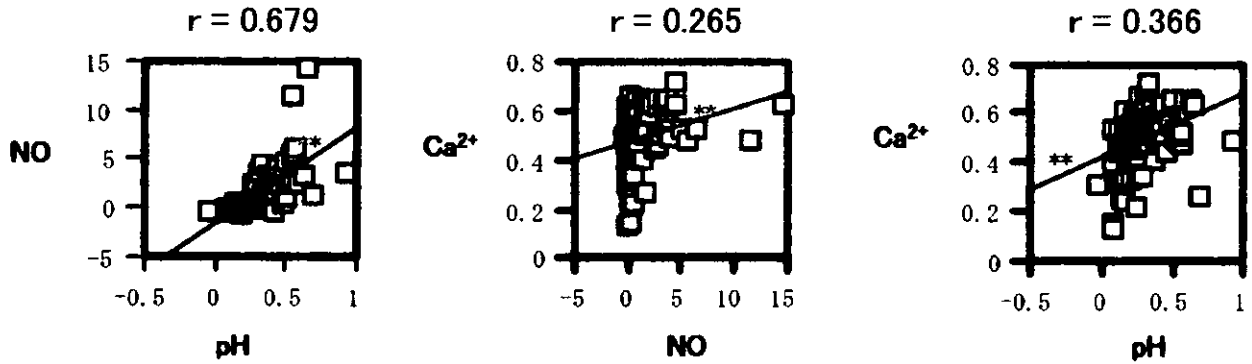


図5 LPA存在下、流れ刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 、pHi変化及びNO産生の相関性  
 LPA存在下、流れ刺激によって $[Ca^{2+}]_i$ 、pHi変化及びNO産生を同時測定し、流れ刺激を与えて3分間の変化について互いの相関性を検討した。パラメーターとして $Ca^{2+}$ 変化には $[Ca^{2+}]_i$ 平均上昇率 (Fura Red 蛍光 (F/F0)の平均減少率)、pHi変化には3分後にBCECF蛍光 (F/F0)減少量、NO産生には3分後のDAR-4M 蛍光 (F/F0)の上昇量にした。相関性をrで示した。(\*\* :  $p < 0.01$ ,  $n$  (cells) = 100)

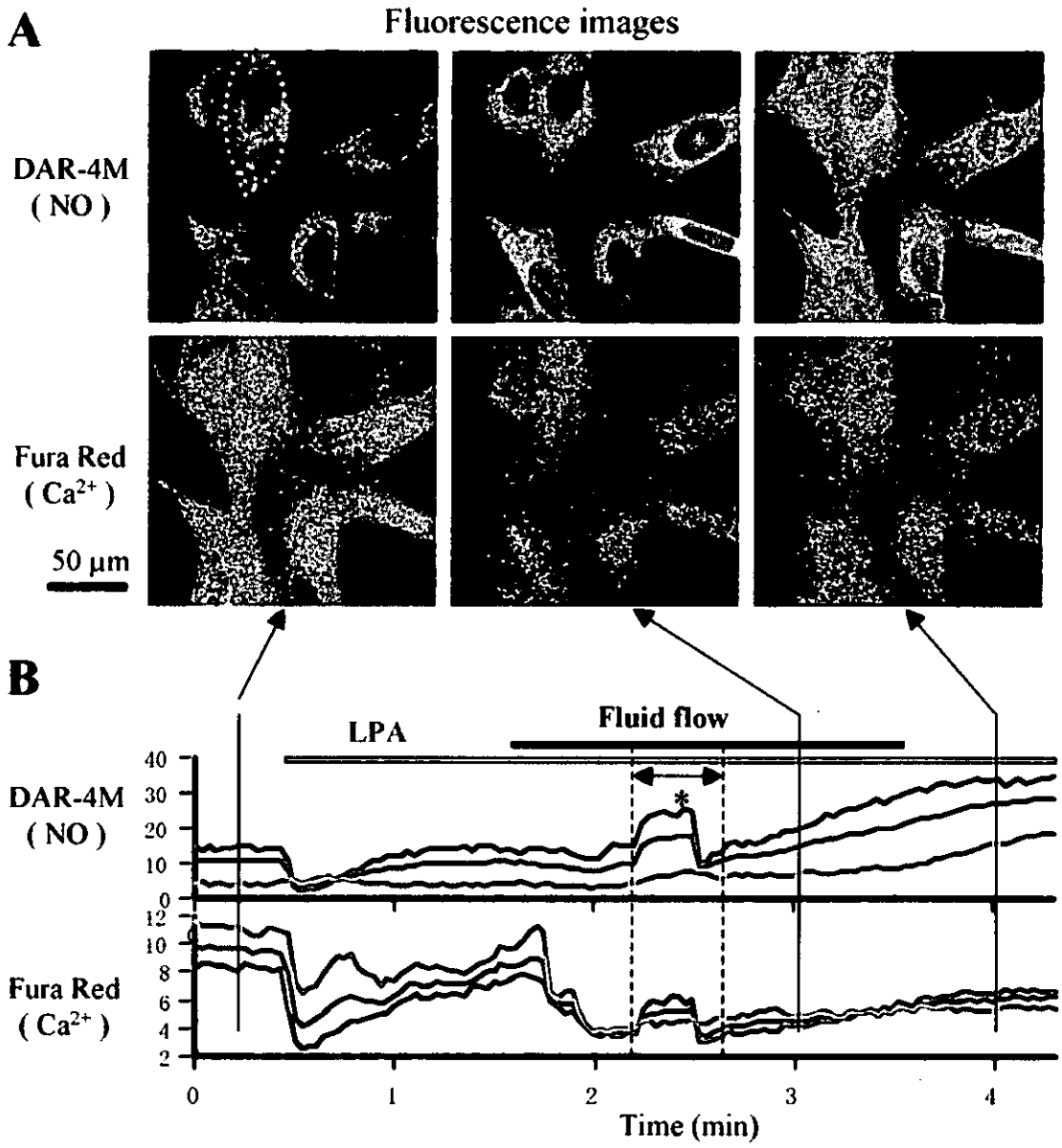
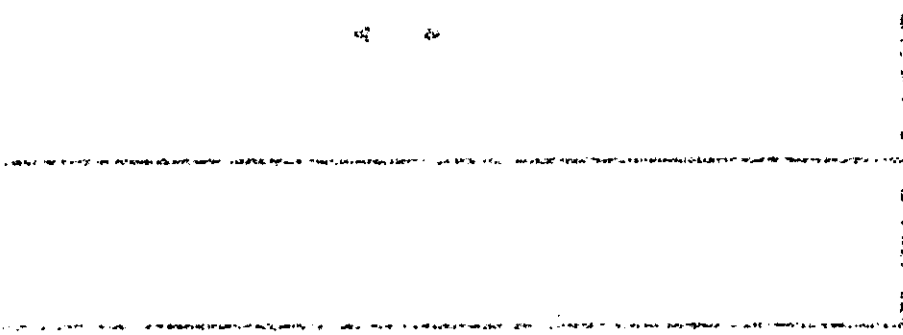
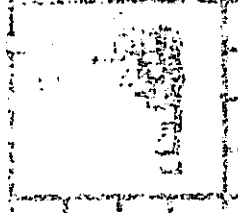
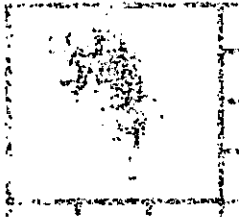


図6 LPA存在下流れ刺激による細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇及びNO産生  
 DAR-4M及びFura Redを同時に取り込ませた内皮細胞に $10 \mu M$  LPA存在下で流れ刺激 (250 mm/sec)を負荷し、細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇及びNO産生を同時に観察した。Aは共焦点顕微鏡を用いて観察された蛍光画像である。左側の画像は刺激前の画像、中央の画像はLPA存在下で流れ刺激の負荷してから90秒後の画像、右側は流れ刺激負荷を止めてからの画像を示している。Bは左上画像内に表示してある部分 (緑：細胞全体、紫：細胞質、赤：ミトコンドリア)の経時変化を示しており、グラフのラインの色と対応している。(\*)は実験中に生じた焦点面のずれを手動で補正したことによる変化 (アーチファクト)を示す。



SECRET

SECRET

に密接に関与しており、今後循環器系疾患の病態との係りの検討を行う予定である。

#### E. 研究成果

1. H. Tanaka, T. Kawanishi, K. Shigenobu: Atrio-ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling ---influence of T-tubules and endocardial endothelium --, *Recent. Res. Devel. Physiol.*, **1**, 253-262 (2003)
2. H. Tanaka, T., Kawanishi, K., Shigenobu, Optical Bioimaging: From Living tissue to a single molecule: atrio-Ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling - Sequential verses simultaneous activation of SR  $Ca^{2+}$  release units, *J. Pharmacol. Sci.*, **93**, 248-252 (2003)
3. A. Ishii-watabe, E. Uchida, A. Iwata, R. Nagata, K. Satoh, K. Fan, M. Murata, H. Mizuguchi, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Yamaguchi, T. Hayakawa: Detection of Replication-Competent Adenovirus Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR, *Mol. Therapy*, **8**, 1009-1016 (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*, **67**, 157-162 (2003)
5. T. Kobayashi, S. Niimi, T. Kawanishi, M. Fukuoka, and T. Hayakawa: Changes in peroxisomes proliferator-activated receptor  $\gamma$ -regulated gene expression and inhibin/activin- follistatin system gene expression in rat testis ater an administration of di-n-butyl phralate, *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003)
6. 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. Biophy. Res. Commm.*, **300**, 770-774 (2003)
7. 川西 徹、河合 洋： 細胞傷害機構のイメージング、 *実験医学* **22**(3), 428-429 (2004)
8. Hashimoto, T., M. Yamashita, H. Ohata, and K. Momose : Lysohosphatidic acid enhances *in vivo* infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/Rho-associated protein kinase-mediated pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **91** (1) : 8-14 (2003)
9. 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：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**(2), 103-111 (2003)
10. Ohata, H, H. Yamada, T. Niioka, M. Yamamoto and K. Momose : Calcium imaging in blood vessel *in situ* employing two-photon excitation fluorescence microscopy. *J. Pharmacol. Sci.* **93**: 242-247 (2003)
11. Hashimoto, T., H. Ohata, and K. Momose: Itch-scratch response Induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacol.*, (In press).



## 炎症反応、関節炎発症における CD69 分子の役割と血栓形成のイメージング

分担研究者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学 教授

**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。胸腺内で分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現が見られる (Nakayama et al. J. Immunol. 168:87, 2002)。CD69 は、c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、45Kd の糖蛋白であるが、通常ホモダイマーとして存在している。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。リガンドは同定されていない。血小板には恒常的に発現している。CD69 ノックアウトマウスを樹立し、関節炎モデル及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。

### 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。

そこで本年度は、樹立した CD69-KO マウスを用いて、生体内での CD69 分子の役割を解析することを目的にした。また、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。

### B. 研究方法

#### 1) 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。

## 2) 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。

## 3) 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。

## 4) サイトカイン及びケモカインの発現レベルの測定

抗タイプ II コラーゲンモノクローナル抗体カクテル投与 4 日後及び 10 日後に関節部位を切り取ってホモジナイズし、TRIzol を用いて RNA を抽出した。各種サイトカインまたはケモカイン特異的なプライマーを用いて半定量性 RT-PCR 法により発現レベルを測定した。

## 5) In situ hybridization

マウスの膝関節パラフィンブロックを 4  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切し、切片を作製した。ジゴキシゲニン標識 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、 $1 \times 10^8$  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  $1 \times 10^8$  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  $5 \times 10^6$  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。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。

### 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。

### 2-2) 関節部位でのサイトカイン及びケモカインの発現レベル

抗タイプ II コラーゲン抗体誘導性の関節炎モデルでは、IL-1 $\beta$ や IL-6 などの炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカインのレベルと炎症の程度との間に高い相関性がみられる。そこで関節部位におけるこれらの発現レベルを半定量性 RT-PCR 法により測定したところ、CD69-KO マウスでは炎症性サイトカイン・ケモカインの発現上昇が有意に抑制されていた (図 5 A)。したがって、CD69-KO マウスでは wild type マウスに比べ、関節炎の症状が軽いと考えられた。

また好中球の遊走に関与する種々のケモカインの発現レベルを調べたところ、抗タイプ II コラーゲン抗体投与後にみられる CXCL1 の発現レベルの上昇が CD69-KO マウスでは有意に低かった (図 5B)。

#### 2-3) 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。

#### 2-4) 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つ

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。

### 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