

# ラット個体発生におけるマクロファージの分化と liver X receptor $\alpha$ の発現に関する研究

坂 本 梓

新潟大学大学院医歯学総合研究科

細胞機能講座分子細胞病理学分野

(主任：内藤 眞教授)

## Expression of Liver X Receptor $\alpha$ in Macrophage Development and Differentiation During Rat Ontogeny

Azusa SAKAMOTO

*Division of Cellular and Molecular Pathology, Department of Cellular Function,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Makoto Naito)*

### 要 旨

Liver X receptor (LXR) はステロールセンサーとしてコレステロールや脂質の代謝調節に働く核内受容体である。LXR  $\alpha$  はマクロファージ、肝細胞や脂肪細胞などに発現することが知られている。しかし個体発生における LXR  $\alpha$  の組織発現については十分な検討がなされていない。本研究では、新規に作製された LXR  $\alpha$  抗体を用いて、ラットの個体発生における LXR  $\alpha$  の細胞・組織学的発現について検討した。LXR  $\alpha$  は、胎生 11 日の卵黄囊の内胚葉層に発現し、その後、肝臓、脾臓および胸腺のマクロファージに発現した。肝原基では、LXR  $\alpha$  陽性マクロファージは胎生 12 日に出現し、その数は胎生 18 日に最多となった。一方、肝細胞や褐色脂肪組織は胎生後期に LXR  $\alpha$  陽性となり、これら細胞・組織の脂質代謝機能の成熟を示唆するものと考えられた。マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下で培養した成熟ラット単球由来のマクロファージは細胞の成熟とともに LXR  $\alpha$  の発現が亢進した。以上の成績から LXR  $\alpha$  はマクロファージの分化や脂質代謝に関わる細胞の分化成熟に重要な役割を果たしていると考えられた。

キーワード：LXR  $\alpha$ 、ラット、胎仔、肝臓、マクロファージ

### 緒 言

Liver X receptor (LXR) は、retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成する核内受容体

で<sup>1)2)</sup>、オキシステロールにより活性化されることが知られている<sup>3)4)</sup>。LXR  $\alpha$  は肝臓、小腸、脂肪組織やマクロファージに発現し、LXR  $\alpha$  は、種々の臓器に広範囲に発現する<sup>5)–8)</sup>。LXR  $\alpha$  欠損マ

Reprint requests to: Azusa SAKAMOTO  
Division of Cellular and Molecular and Pathology  
Department of Cellular Function  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能講座分子  
細胞病理学分野 坂本 梓

ウスでは、重篤な脂質・胆汁酸代謝異常が生じる<sup>4)9)</sup>。これらの事実から、LXR  $\alpha$  はステロールセンサーとしてコレステロールなどの脂質代謝を制御していると考えられる。最近、マクロファージは LXR  $\alpha$  を介して炎症と脂質代謝に関与し、動脈硬化発症に重要な役割を果たしていることが明らかにされた<sup>10)11)</sup>。LXR  $\alpha$  はヒトマクロファージに高発現しており<sup>5)12)</sup>、コレステロール逆輸送系に関わって、マクロファージの泡沫化に抑制的に働くと考えられている<sup>5)8)10)-12)</sup>。しかし、個体発生やマクロファージの分化における LXR  $\alpha$  の発現や役割に関しては十分な検討がなされていない。*In situ hybridization* によるマウス胎仔組織の研究では、LXR  $\alpha$  は胎生 11.5 日に肝臓に発現し、増強すること、小腸・褐色脂肪組織など脂質代謝に関与する臓器に発現すること、一方 LXR  $\beta$  は、より広範な組織に発現することが明らかにされている<sup>7)</sup>。しかし良い抗体がなかったため、細胞・組織発現についての詳細は不明であった。これまでわれわれは新規に作製された LXR  $\alpha$  抗体を用いて、ヒトの肝細胞、脂肪細胞、組織マクロファージや動脈硬化病変の泡沫細胞における LXR  $\alpha$  の発現を報告した<sup>8)</sup>。本研究では、ラットの胎生期から成熟期までの組織とラット単球由来マクロファージの LXR  $\alpha$  の発現について検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

胎生 11-20 日、生後 1, 14, 56 日の Wistar ラット (260-300 g) (Charles River Inc, 神奈川, 日本) を使用した。ラットを麻酔下で屠殺し、組織を採取して免疫染色に使用した。胎生 14, 16, 18 日、生後 1, 14, 56 日のラットから肝臓を摘出し Real-time PCR に用いた。生後 56 日のラットから心臓、肺臓、肝臓、脾臓、および腎臓からタンパクを抽出し Western blot を施行した。

### 2. 抗体

染色には、マウス抗ヒト LXR  $\alpha$  モノクローナ

ル抗体 (PPZ0412) (以下 LXR  $\alpha$  抗体) (Perseus Proteomics Inc, 東京, 日本)<sup>8)</sup>、マウス抗ラット単球/マクロファージ/樹状細胞モノクローナル抗体 (以下 ED1 抗体) (BMA Biomedicals, Augst, Switzerland)、マウス抗マクロファージスカベンジャーレセプターモノクローナル抗体 (以下 MSR-A 抗体) (熊本大学第二病理学教室 竹屋教授より恵授)、チキン抗アクチンモノクローナル抗体 (JLA20) (以下 actin 抗体) (Oncogene sciences Inc, UNIORDALE, NY) を使用し、LXR  $\alpha$  抗体、ED1 抗体 および MSR-A 抗体はそれぞれ 1:100, 1:500, 1:1 の希釈倍率で使用した。Western blot には LXR  $\alpha$  抗体と actin 抗体をそれぞれ 1:1000 と 1:2000 の希釈倍率で使用した。

### 3. 免疫組織化学染色

摘出した各臓器は 10% 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋ブロックを作成し、3  $\mu$ m 厚に薄切した。パラフィン切片は、脱パラフィン後加熱処理で賦活化を行い、内因性ペルオキシダーゼを阻害し、10% ヒツジ正常血清で非特異的反応を阻害した。一次抗体を 4°C、一晚反応させ、二次抗体はシンプルステインラット MAX-PO (株式会社ニチレイ, 東京, 日本) を用い、室温で 30 分反応させた。発色基質には 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Dojindo Laboratories, 熊本, 日本) を用い、ヘマトキシリンで核染色を行った。二重染色での第二抗体の発色基質は、4-chloro-1-naphthol (Nakarai, 京都, 日本) を用いた。肝臓における LXR  $\alpha$ 、ED1 および MSR-A の発現マクロファージは光学顕微鏡下で単位面積あたり (/mm<sup>2</sup>) の陽性細胞数を算定した。

### 4. 単球培養

成熟ラットから採取した末梢血を Lymphoprep TM (AXIS SHIELD, Oslo, Norway) により単核球を分離した。RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Japan) で  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整した細胞溶液を May-Giemsa 染色および免疫染色用に Lab-Tek multi-well tissue culture chambers (Nunc Inc, IL) に、Real-time PCR および Western blot 用に 35mm/

Tissue Culture Dish (IWAKI, 東京, 日本) に播種し, 37 °Cで, 2時間培養した. その後, 浮遊細胞を除去し, 10 %非動化胎仔ウシ血清, ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (10mg/ml) 含有 RPMI1640 培養液に 1000U/ml の macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (森永乳業株式会社, 神奈川, 東京, より恵与) を添加し 3, 5, 7 日間培養した. 培養細胞を cold アセトンで固定し, 0.5 % Triton X で処理し, 免疫染色を行った.

### 5. RNA の抽出と Real-time PCR 法

抽出した肝臓と培養細胞を acid guanidinium-phenol-chloroform 法を用いて Total RNA を抽出した. 1  $\mu$ g の total RNA を, 1  $\times$  RT buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.01M の dithiothreitol (Invitrogen), 20U の RNase inhibitor (Promega, Madison, WI), 500  $\mu$ M の deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1  $\mu$ g の random primer (Promega), 100U の reverse transcriptase (Invitrogen) と混和し, 蒸留水で総量 20  $\mu$ l とした. 反応液を 42 °C で 60 分インキュベート後, 95 °C, 3 分加熱して cDNA を作成した. Real-time PCR は chromo 4 four-color real-time PCR system (Bio Rad, Hercules, CA) で SYBR Green 法を用いた. 指数関数的増幅開始サイクル数 (Ct 値) は, Opticon Monitor ver 3.1 で解析し,  $\beta$ -actin で相対定量化した. 反応液には, 1  $\mu$ l の cDNA, 1  $\times$  iQ SYBER Green Supremix (Bio Rad) を, それぞれ 200nM のプライマーと蒸留水で総量 20  $\mu$ l とした. 使用したプライマーは LXR  $\alpha$ <sup>13)</sup>, forward: 5'-TCA GCATCTTCTCTGCAGACCGG-3', reverse: 5'-TCA TTAGCATCCGTGGGAACA-3',  $\beta$ -actin<sup>14)</sup>, forward: 5'-TGGAATCCTGTG GCATCCATGAAAC-3', reverse: 5'-TAAAACG CAGCTCAGTAACAGTCCG-3' を用いた. 反応は denaturation 95 °C 10 秒, annealing 55 °C 30 秒, elongation 72 °C 30 秒, 40 サイクルで行った.

### 6. Western blot

抽出した各臓器と培養細胞に 150mM NaCl,

50mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA, 1 % Triton X, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM leupeptin と 1mM aprotinin の混合溶液を加え氷上に 30 分静置後, 12000 rpm, 4 °C, 30 分遠心分離し, タンパクを抽出した. タンパク抽出液を (臓器は 50  $\mu$ g, 培養細胞は 10  $\mu$ g) sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel で電気泳動 (SDS-PAGE) し, PVDF membrane (Amersham, Aylesbury, UK) に転写した. Membrane は 5 % スキムミルクで一晩ブロッキング後, 一次抗体で 1 時間, 二次抗体の抗マウス IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (Amersham) (1:2000 希釈) で 30 分反応させた. ECL detection system (Amersham) で可視化した.

### 7. 統計学的検討

各実験ではラット 3 個体について検討した. LXR  $\alpha$ , ED1, および MSR-A 陽性細胞数の算定は, それぞれ 3 個体の平均値と標準偏差を算出した. Real-time PCR の反応は 3 個体からの検体をそれぞれ 2 回行い, 平均値と標準偏差を算出した. 統計比較 (t 検定) は SPSS version 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL) で行い, 有意差は  $P < 0.05$  とした.

## 結 果

### 1. 成熟ラット組織における LXR $\alpha$ の発現

Western blot では肺臓, 肝臓, 脾臓で LXR  $\alpha$  (47kDa) のバンドが検出されたが, 心臓と腎臓では検出されなかった (図 1). 免疫染色では, 肝細胞 (図 2a) や脂肪組織 (図 2b) の核に LXR  $\alpha$  の発現が見られた. また, 肝臓のクッパー細胞 (図 2a), 肺泡マクロファージ (図 2c) や脾臓, 胸腺, リンパ節, 腸管粘膜のマクロファージで LXR  $\alpha$  が陽性であった (表 1). LXR  $\alpha$  陽性細胞の多くは ED1 との二重陽性像が見られ, マクロファージであることが確認された (図 2d). 肝臓では, クッパー細胞は肝細胞よりも LXR  $\alpha$  の染色強度は高かった (図 2a). 腎臓, 脾臓, 副腎および心臓では LXR  $\alpha$  の発現は見られなかった (データ未提示). ラットにおける LXR  $\alpha$  の染色パターン

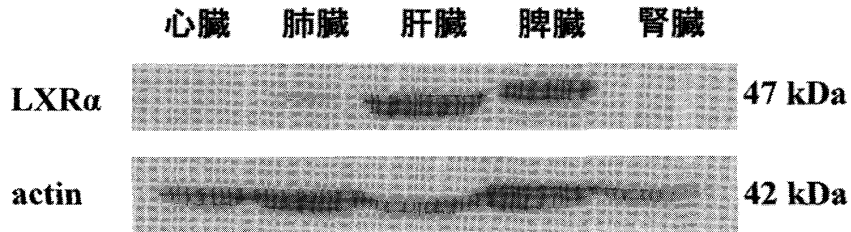


図1 成熟ラット各臓器の LXR  $\alpha$  タンパクの発現 (Western blot)  
肺臓, 肝臓および脾臓で LXR  $\alpha$  と一致する 47 kDa のバンドが確認された。

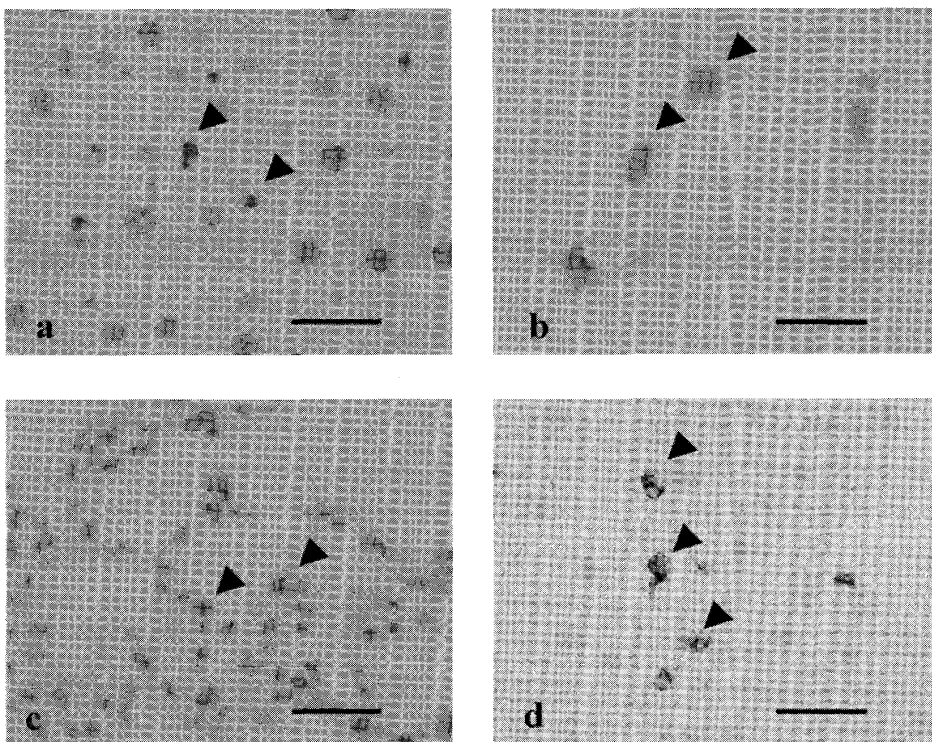


図2 成熟ラット各組織の LXR  $\alpha$  の免疫染色

(a) 肝臓では肝細胞およびクッパー細胞 (矢頭) が陽性. (b) LXR  $\alpha$  陽性の脂肪細胞 (矢頭) および (c) 肺胞マクロファージ (矢頭). (d) 肝臓における LXR  $\alpha$  (茶) および ED1 (青) の二重染色では ED1 陽性細胞の半数以上が LXR  $\alpha$  との二重陽性を示した (矢頭). Bars 40  $\mu$ m (a-d)

はヒトと一致しており, 使用した抗ヒト LXR  $\alpha$  抗体はラットにおいても有用であることが明らかになった.

## 2. 胎仔・新生仔ラット組織における LXR $\alpha$ の発現

胎生期では, 最初に胎生 11 日の卵黄嚢の内胚

葉層で LXR  $\alpha$  陽性細胞が確認され, 出生時まで卵黄嚢は LXR  $\alpha$  陽性であった (表 1). しかし, 卵黄嚢の間質や血管内の細胞は LXR  $\alpha$  陰性であった. 胎生 12 日の肝臓に LXR  $\alpha$  陽性マクロファージが出現し (図 3a) (表 1), その数は胎生日数とともに増加した (図 3b). 肝臓の LXR  $\alpha$ , ED1 と MSR-A 陽性マクロファージ数を比較すると

表1 胎生期, 生後および成熟ラットのLXR $\alpha$ の発現(免疫染色)

	Fetus						After birth			
	Day	11	12	14	16	18	20	1	14	56
<b>Macrophages</b>										
Liver	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Spleen	ND	ND	ND			+	++	+++	+++	+++
Bone marrow	ND	ND	-	-	-	-	-	-	+	
Thymus	ND	ND	ND	±	±	±		++	++	++
Lymph node	ND								±	±
Lung								±	±	±
Intestine			-	-	-	-	-	-	+	+
Kidney	ND	ND			-	-	-	-	-	-
Intravascular mononuclear cell	ND	ND			±	±		-	-	-
<b>Non-macrophages</b>										
Hepatocyte	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+++
Adipocyte	ND	ND	-	-	-	±		+	+	+
Yolk sac endoderm	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			

-:negative, ±:<10/high power field, +:>10/HP, ++:>20/HP, +++:>30/HP, ND: not detected

(図4), LXR $\alpha$ , ED1陽性細胞数はそれぞれ胎生18日と胎生16日に最も多かった。MSR-A陽性細胞数は日数とともに増加する傾向がみられた。肝細胞は胎生16日までLXR $\alpha$ 陰性であったが, 胎生18日には陽性となった(図3b)(表1)。生後, 肝細胞のLXR $\alpha$ の発現は増したが, 成熟ラットと同様にマクロファージと比較すると染色性は弱かった。肝臓のLXR $\alpha$ のmRNAレベルは胎生期では胎生18日に最大となったが(図5), 生後は胎生期より高レベルであった。これは肝細胞のLXR $\alpha$ が生後増加するためと考えられた。胸腺では胎生16日から, 脾臓では胎生18日からLXR $\alpha$ 陽性マクロファージが出現した(表1)。また, 胎生18日の褐色脂肪細胞がLXR $\alpha$ 弱陽性となった(図6a)。さらに胎生16日と18日の血管内にLXR $\alpha$ 陽性単核球が観察された(図6b)。

生後は, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 骨髄, リンパ節, 肺臓, 消化管のマクロファージがLXR $\alpha$ 陽性であった(表1)。しかし, 血管内にLXR $\alpha$ 陽性単核球は確認できなかった(図7a)。LXR $\alpha$ 陽性肺泡マクロファージは生後1日から見られたが(図7b), その後陽性細胞数に変化はなかった。

### 3. ラット単球由来マクロファージにおけるLXR $\alpha$ の発現

付着培養2時間後の単球は小型で細胞質に乏しく(図8a), 培養7日には大型細胞に成熟した(図8b)。免疫染色では培養2時間の単球は, LXR $\alpha$ (図8c)およびMSR-A(図8d)が陰性であったが, 培養7日ではほとんどの細胞でLXR $\alpha$ (図8e)およびMSR-A(図8f)が発現していた。LXR $\alpha$ の発現は核内にドット状に, MSR-Aは細胞膜に見られた。mRNAレベルの検索成績は免疫染色と一致した(図9)。Western blotでは培養2時間の細胞で非常に弱いLXR $\alpha$ のバンドが検出されたが, 培養7日では明らかなバンドが検出された(図10)。以上の結果からLXR $\alpha$ の発現は単球がマクロファージに分化する過程で増強することが確認された。

## 考 察

新規に作製された抗LXR $\alpha$ 抗体を用いて胎生期および成熟ラットの組織発現の検討を行った。LXR $\alpha$ の発現は主にマクロファージに観察された。加えてLXR $\alpha$ は卵黄囊の内胚葉層, 肝細胞お

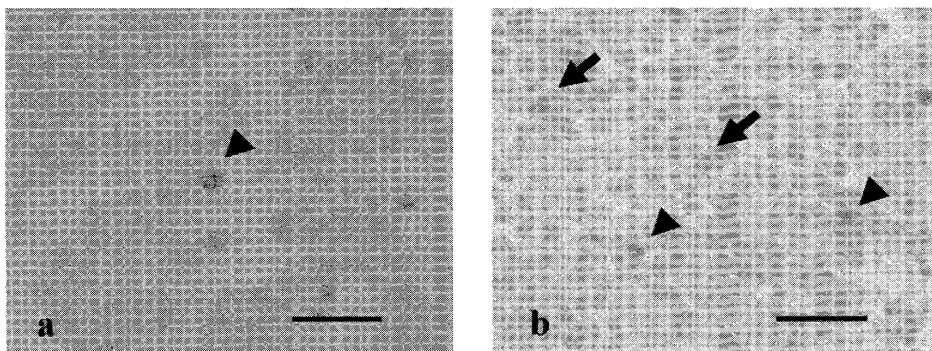


図3 胎生期ラット肝臓のLXR  $\alpha$  の免疫染色

(a) 胎生 12 日 肝臓で LXR  $\alpha$  陽性マクロファージ (矢頭) が出現. (b) 胎生 18 日に肝細胞 (矢印) が LXR  $\alpha$  陽性となった. 矢頭は LXR  $\alpha$  陽性マクロファージ. Bars 40  $\mu$ m (a, b)

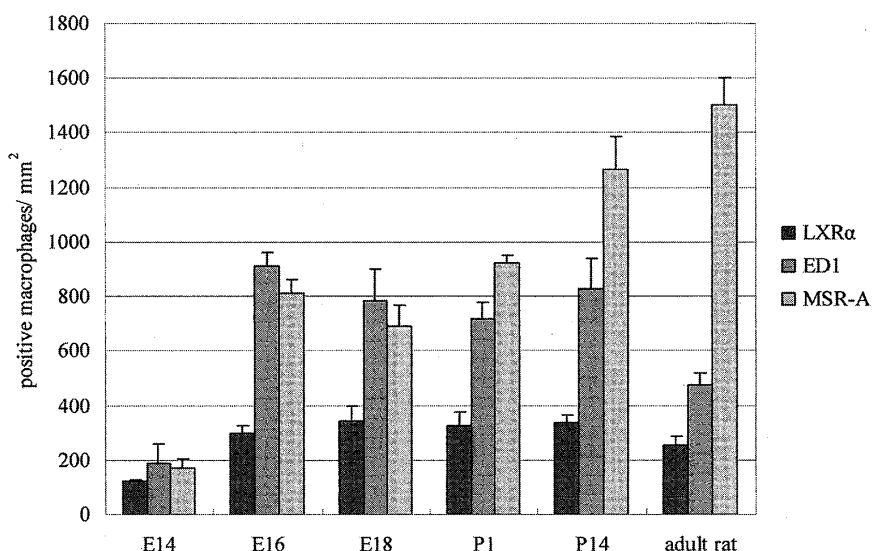


図4 肝臓におけるLXR  $\alpha$ , ED1 および MSR-A 陽性マクロファージ数

LXR  $\alpha$  陽性マクロファージ数は胎生 18 日に, ED1 陽性マクロファージは胎生 16 日に最多であった. MSR-A 陽性マクロファージは日数とともに増加した.

よび脂肪細胞で発現が認められた. LXR  $\alpha$  はコレステロール異化の制御因子であり, 胎生期においても上述の細胞はコレステロール排出の調節を担っていると考えられる. 肝臓は脂質代謝において重要であるが, 胎生期では acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT) の活性は低く<sup>17)</sup>, LXR  $\alpha$  を含めて胆汁酸代謝に参与する核内受容体の発現は乏しいことが知られている<sup>18)</sup>.

LXR  $\alpha$  の発現がラット胎生後期になってようやく肝細胞に観察されたことは肝細胞の機能的成熟が遅いことを示唆している. 個体発生において最初に LXR  $\alpha$  の発現が見られたのは胎生 11 日の卵黄囊内胚葉層である. 卵黄囊は卵黄からの脂質の体循環への輸送を担っており<sup>17)</sup>, 肝臓が未熟な胎生期には脂質輸送に重要な役割を果たすと考えられた.

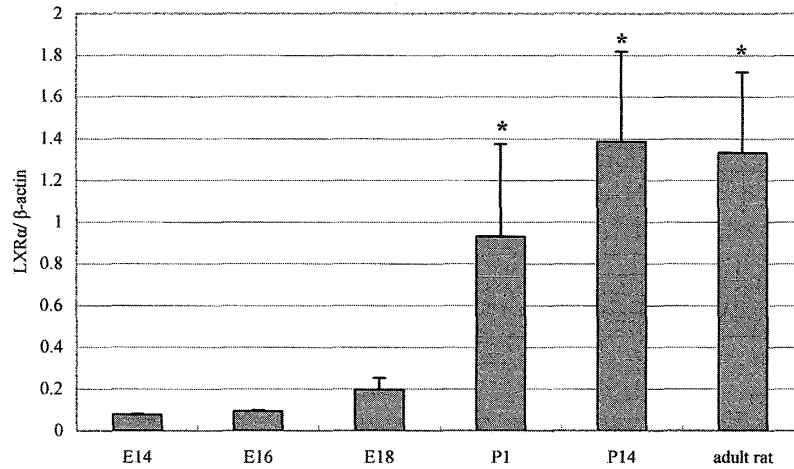


図5 肝臓における LXR  $\alpha$  mRNA レベル (Real-time PCR)  
胎生期では胎生18日に LXR  $\alpha$  の mRNA レベルが最大になった。生後は胎生期と比較して有意に LXR  $\alpha$  mRNA の発現が高い。\*  $P < 0.05$

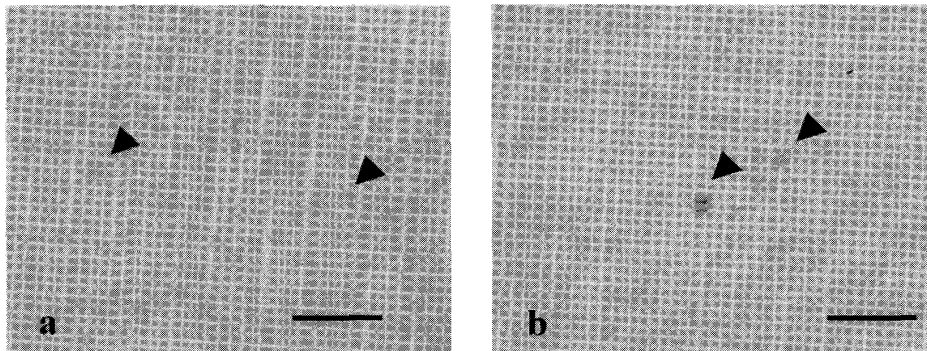


図6 胎生18日の脂肪細胞および単核球の LXR  $\alpha$  の免疫染色  
(a) LXR  $\alpha$  弱陽性褐色脂肪細胞 (矢頭). (b) 血管内 LXR  $\alpha$  陽性単核球 (矢頭). Bars  $40\mu\text{m}$  (a, b)

ラット胎生期における LXR  $\alpha$  発現細胞は主にマクロファージ系の細胞であった。胎生12日に、肝臓のマクロファージが LXR  $\alpha$  陽性となり、それ以降、他の組織のマクロファージが LXR  $\alpha$  陽性となった。肝臓の LXR  $\alpha$  陽性マクロファージが最多となったのは出生直前であり、胎生期の肝臓の LXR  $\alpha$  mRNA レベルも出生直前に最も高くなった。胎生期の肝臓にはマクロファージが多数存在し、血球の貪食能が高く<sup>18)</sup>、その他の組織マクロファージよりも脂質代謝能が高いと考えられる。

Kohro らは、ヒトの単球がマクロファージに分

化する際、転写制御因子の中で LXR  $\alpha$  mRNA が最も高くなることを報告した<sup>5)</sup>。本研究では、ラットの単球由来マクロファージは単球に比して LXR  $\alpha$  の mRNA とタンパクレベルがともに高いことを確認した。これらの結果は、LXR  $\alpha$  の発現がマクロファージの分化と機能の制御に重要であることを示唆している。成熟ラット組織の免疫染色において、単球は LXR  $\alpha$  陰性であったが、胎生期ラットの血管内に LXR  $\alpha$  陽性単核球が存在した。内藤らは、原始/胎生マクロファージが胎生初期の末梢血中を循環し、胎生後期には単球が出現

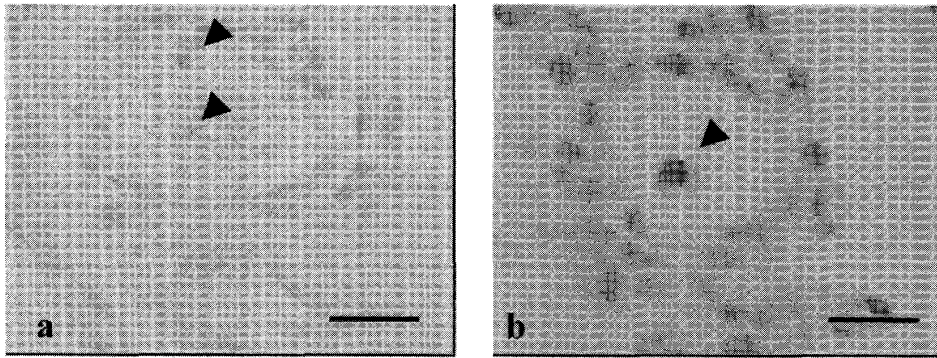


図7 新生仔ラットの単核球および肺胞マクロファージの LXR  $\alpha$  の免疫染色  
(a) 生後の血管内の単核球は LXR  $\alpha$  陰性 (矢頭). (b) 生後1日の LXR  $\alpha$  陽性肺胞マクロファージ (矢頭). Bars 40  $\mu$ m (a, b)

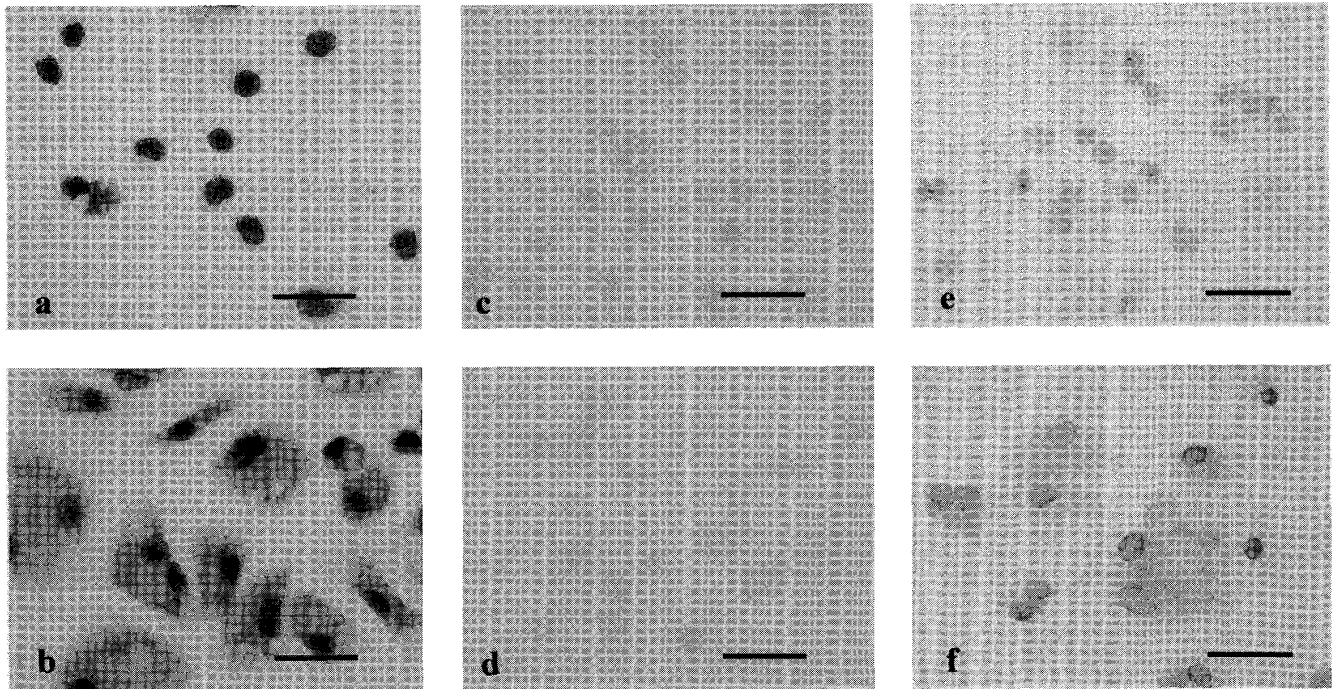


図8 ラット単球由来マクロファージの形態と LXR  $\alpha$  および MSR-A の免疫染色

(a) 単球は円形小型で、細胞質に乏しい (May-Giemsa 染色). (b) 培養7日後の単球由来マクロファージは大型化 (May-Giemsa 染色). (c) LXR  $\alpha$  免疫染色陰性単球. (d) MSR-A 免疫染色陰性単球. (e) 培養7日後のマクロファージは核内にドット状に LXR  $\alpha$  陽性. (f) 培養7日後のマクロファージは細胞膜に MSR-A 陽性. Bars 40  $\mu$ m (a-f)

して徐々に増加することを報告している<sup>18)</sup>. 原始マクロファージと呼ばれる未熟なマクロファージは、卵黄嚢に出現し、胎生マクロファージへと分化するが<sup>14)17)18)</sup>, 本研究では LXR  $\alpha$  陽性単核球は卵黄嚢には見られず、胎生16日および18日

の血管内に観察された。これらの事実から胎生期に循環している LXR  $\alpha$  陽性単核球は単球ではなく、胎生マクロファージであると解釈される。

LXR  $\alpha$  は組織標本の免疫染色では核内に存在することが確認された。興味あることに、培養細



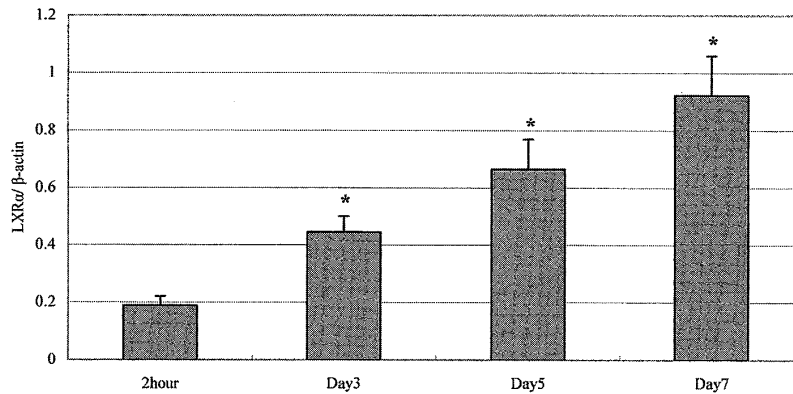


図9 ラット単球由来マクロファージの LXR  $\alpha$  mRNA の発現 (Real-time PCR)

培養マクロファージにおける LXR  $\alpha$  mRNA レベルは培養時間の経過につれて有意に高くなった. \* P < 0.05

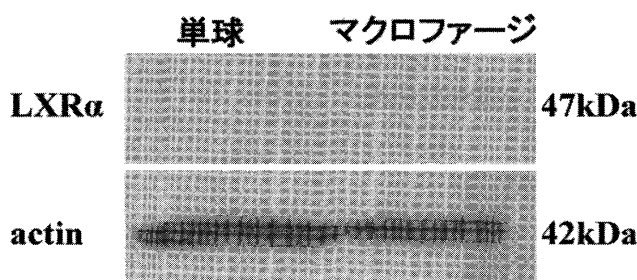


図10 ラット単球由来マクロファージの LXR  $\alpha$  タンパクの発現 (Western blot)

LXR  $\alpha$  のバンド (47 kDa) は単球由来マクロファージ (培養7日) で確認された。

胞では核内にドット状に局在していた。最近の筆者らの観察では、核内受容体は核内にびまん性に分布するものと核小体内に局在するものの二種に大別され、LXR  $\alpha$  は核小体内に局在するものと考えられた。組織切片では免疫反応が核内に拡散したものである。前述のように、マクロファージの LXR  $\alpha$  は動脈硬化に抑制的に作用することから<sup>10)</sup>、LXR  $\alpha$  の合成リガンドによって LXR  $\alpha$  の発現を亢進させるという動脈硬化の治療開発が試みられている。一方、炎症刺激は LXR  $\alpha$  の発現を低下させる<sup>11)</sup>。このような LXR  $\alpha$  の発現機構の解明には、LXR  $\alpha$  の核小体内局在のより詳細な

解析とともに LXR  $\alpha$  と結合する cofactor の局在の検討も重要な課題と思われる。

以上、免疫組織化学染色と Western blot の手法を用いて胎生期から成熟期までのラット組織および単球由来マクロファージにおける LXR  $\alpha$  の発現を明らかにした。本研究で用いた新規抗ヒト LXR  $\alpha$  抗体は LXR  $\alpha$  の機能を明らかにする上でラットにも有用であった。

#### 謝 辞

最後に、実験の計画、および実技の指導、論文校閲を頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能講座分子細胞病理学分野 内藤 眞教授に深く感謝いたします。また、本研究に関して助言・協力を頂いた川崎 隆助手、姜 淑英先生、大橋 瑠子先生、百崎 進技官、大谷内 健二技官、青山 崇技官をはじめ教室の皆様にご礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G and Pfahl M: A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol* 14: 7025 - 7035, 1994.

- 2) Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA and Mangelsdorf DJ: LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9: 1033 - 1045, 1995.
- 3) Peet DJ, Janowski BA and Mangelsdorf DJ: The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 8: 571 - 575, 1998.
- 4) Edwards PA, Kennedy MA and Mak PA: LXRs; Oxysterol - activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vasc Pharmacol* 38: 249 - 256, 2002.
- 5) Kohro T, Nakajima T, Wada Y, Sugiyama A, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Imoto I, Inazawa J, Hamakubo T, Kodama T and Emi M: Genomic structure and mapping of human orphan receptor LXR alpha: Upregulation of LXR  $\alpha$  mRNA during monocyte to macrophage differentiation. *J Atheroscler Thromb* 7: 145 - 151, 2000.
- 6) Lu TT, Repa JJ and Mangelsdorf DJ: Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 276: 37735 - 37738, 2001.
- 7) Annicotte JS, Schoonjans K and Auwerx J: Expression of the Liver X receptor  $\alpha$  and  $\beta$  embryonic and adult mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 277A: 312 - 316, 2004.
- 8) Watanabe Y, Jiang S, Takabe W, Ohashi R, Tanaka T, Uchiyama Y, Katsumi K, Iwanari H, Noguchi N, Naito M, Hamakubo T and Kodama T: Expression of the LXR  $\alpha$  protein in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 25: 1 - 6, 2005.
- 9) Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JA, Hammer RE and Mangelsdorf DJ: Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR  $\alpha$ . *Cell* 93: 693 - 704, 1998.
- 10) Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, Daige CL, Thomas D, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Wang X, Lusis AJ, Tontonoz P and Schulman IG: Identification of macrophage liver X receptor as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11896 - 11901, 2002.
- 11) Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ and Tontonoz P: Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9: 213 - 219, 2003.
- 12) Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM, Wilson JG, Willson TM, Collins JL and Kliewer SA: Liver X receptor (LXR) regulation of the LXR  $\alpha$  gene in human macrophages. *J Biol Chem* 276: 43509 - 43515, 2001.
- 13) Hoekstra M, Kruijt JK, Eck MV and van Berkel TJC: Specific gene expression of ATP - binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer Cells. *J Bio Chem* 278: 25448 - 25453, 2003.
- 14) Watanabe T, Hasegawa G, Yamamoto T, Hatakeyama K, Suematsu M and Naito M: Expression of heme oxygenase - 1 in rat ontogeny. *Arch Histol Cytol* 66: 155 - 162, 2003.
- 15) Ding ST and Lilburn MS: The developmental expression of acyl - coenzyme A: cholesterol acyltransferase in the yolk sac membrane, liver, and intestine of developing embryos and posthatch turkeys. *Poultry Sci* 79: 1460 - 1464, 2000.
- 16) Balasubramanian N, Shahid M, Suchy FJ and Ananthanarayanan M: Multiple mechanisms of ontogenic regulation of nuclear receptors during rat liver development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G251 - G260, 2005.
- 17) Naito M, Hasegawa G and Takahashi K: Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 39: 350 - 364, 1997.
- 18) Takahashi K, Naito M and Takeya M: Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* 46: 473 - 485, 1996.

(平成 18 年 11 月 21 日受付)