



CAR must be involved in the genesis of vascular remodeling.

**Key words:** Coxsackie virus and adenovirus receptor, intimal hyperplasia, vascular smooth muscle cells

## はじめに

コクサッキーウイルス及び一部のアデノウイルスに対して高い親和性を持つ細胞外受容体 Coxsackie virus and Adeno virus Receptor (CAR) が同定された。これは免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞接着因子として機能すると報告されているが<sup>1)–3)</sup>、未だその生理的機能は十分わかっていない。我々は過去に CAR が胎生期のマウスの脳及び心臓に強発現し、出生直後に消失することを明らかにし、CAR が胎生期の脳、心臓の組織の発達、形成に関与している可能性を示した<sup>4)</sup>。また、心筋細胞において生後一旦は消失した CAR が、ラットの自己免疫性心筋炎モデルにおいて、心筋炎の急性期に再度強発現されることを見出し、心筋のリモデリングに関与している可能性を報告した<sup>5)</sup>。しかし、現時点で動脈硬化巣や血管平滑筋での CAR の役割についての報告はない。今回の研究では、ラットの頸動脈バルーン傷害モデルを用いて、内膜をバルーンで擦過した後に新たに生じる新生内膜に CAR が発現する可能性を推測し、免疫組織化学および定量的 RT-PCR 法を用いてこれを解析した。また、ラット大動脈の培養血管平滑筋細胞において、CAR が発現することを免疫細胞化学にて解析した。

## 実験動物と方法

チャールスリバー株式会社 (Yokohama, Japan) より雄 8 週齢の Sprague-Dawley ラット (250–290g) を購入し、実験に使用した。すべての実験手順は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No.86-23; National Institute of Health, Bethesda, MD) に基づき無菌的に行われた。

### ラット頸動脈バルーン傷害モデル

ラットをペントバルビタール (50mg/kg) にて

腹腔内麻酔した。前頸部を縦切開し左頸動脈を露出後、直視下に 2Fr Fogarty カテーテル (Baxter Healthcare, Santa Ana, CA) を外頸動脈より総頸動脈に挿入し、バルーンを広げ合計 3 回総頸動脈の血管内皮を擦過した。カテーテルを外頸動脈より抜去後、外頸動脈を結さつし傷を縫合して終了とした。擦過後 3, 5, 7, 10, 14, 21 日目に左総頸動脈を摘出した。対照として傷害を加えていない検体についても検討を行った。

### 抗体、組織の準備、免疫組織化学

マウスの CAR の細胞内ドメインを構成する 17 のアミノ酸残基 (KTQYNQVPSDFERAPQ) からなるポリペプチド鎖を合成し、この抗原で免疫した白色ウサギの血清の免疫グロブリン分画を精製し、ウサギ抗マウス CAR 抗体として免疫組織化学に使用した<sup>6)</sup>。摘出した頸動脈は周囲の結合組織を十分剥離したのちに、OCT コンパウンド (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し液体窒素で凍結し零下 80 °C で保存した。連続切片作成後 APS コートスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に貼付し、Zamboni 液で 30 分間固定した。抗 CAR 抗体の他に、血管内皮細胞のマーカーとして抗第 8 因子関連抗原抗体 (FVIIIIRAg; Zymed, San Francisco, CA)、細胞増殖のマーカーとしてマウス抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) モノクローナル抗体 (clonePC10; DAKO, Carpinteria, CA) にて免疫染色を行った。ウサギ抗体はビオチン化ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン (Nichirei, Tokyo, Japan) 及び、FITC 結合ストレプトアビジン (Vector, Burlingame, CA) にて、マウス抗体はロタミン結合ヤギ抗マウス 2 次抗体 (Vector) にて検出した。対照としてウサギ IgG を一次抗体として同様の手順で免疫組織化学を行った。

### 定量的 RTP-CR

摘出した頸動脈のサンプルからトリゾル試薬 (Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いて

Total RNA を抽出し、 $2\mu\text{g}$  の Total RNA からランダムプライマー及び Takara PCR キット Ver. 2.1 (Takara, Tokyo, Japan) を用いて cDNA を作成し、最終的に  $20\mu\text{l}$  の溶液に調整した。定量的 PCR に必要な CAR 及び標準遺伝子として  $\gamma$ -actin の template を作成した。サンプルからの cDNA を CAR,  $\gamma$ -actin のプライマー (CAR-5':GAACAGAGGATCGAAAAAGCTAAAG, CAR-3':TCGTTACTCGTAAAGTGAATACAAT),  $\gamma$ -actin-5':AGCCTTCCTTCCTGGGCATGGAGT,  $\gamma$ -actin-3':TGGAGGGGCCTGACTCGTCAT-ACT8)) にて増幅し、その PCR 産物を pGEN-T ベクターにライゲーションし、これを大腸菌 (JM109) に組み込み培養した後、回収したプラスミドを精製し、template とした。100 倍に希釈した template 及び、サンプルからの cDNA  $5\mu\text{l}$  を CAR 及び  $\gamma$ -actin の定量的 RT-PCR に使用した。両者をプライマー及び蛍光プローベ (Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I; Roche, Indianapolis, IN) にて増幅し、 $94^\circ\text{C}$  10 分の初期変性を行ったのち変性ステップ  $94^\circ\text{C}$  1 分、アニーリングステップ  $58^\circ\text{C}$  1.5 分、伸長ステップ  $73^\circ\text{C}$  2 分の 3 ステップ過程で PCR を 35 cycle 行った。得られた標準曲線から Light Cycler ソフトウェアを用いて計算し、スタート時の CAR 及び  $\gamma$ -actin の定量化を行った。最終的な CAR mRNA 量は CAR/ $\gamma$ -actin の比で示した。この定量的 RT-PCR 法の信頼性は以前にも報告した<sup>9)10)</sup>。

#### 血管平滑筋細胞培養

ラット胸部大動脈より血管平滑筋細胞を explantation 法で採取し<sup>11)</sup>、60mm コラーゲンタイプ 1 コートの培養皿 (Biocoat; Becton Dickinson, Bedford, MA) 上でインスリン、EGF、bFGF の添加された培養液 (SMC P-STIM; Becton Dickinson) 5ml とともに  $37^\circ\text{C}$  で培養した。4 日目に浮遊組織を回収し培養液を交換、8 日目に培養血管平滑筋細胞を cell scraper を用いて剥離、回収し、サイトスピンにてプレパラートを作成、抗 CAR 抗体をペルオキシダーゼ発色 (DAKO) にて、マウス抗  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体

(clone1A4; Sigma, St.Lois, MO) を APPAP 法 (DAKO) にて免疫染色を行った。

#### 統計学的処理

mRNA 量の表記は mean+SE にて行い、各群の mRNA 量を Bonferroni 法にて比較した。  $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## 結 果

ラット頸動脈バルーン傷害組織における CAR, PCNA の局在

図 1 に頸動脈の連続切片における、CAR 及び PCNA の発現を示す。同時に血管内皮細胞のマーカーとして第 8 因子関連抗原 (FVIIIIRAg) の免疫染色を行った。無処置の血管 (d 0) では CAR は血管内皮細胞に発現し、中膜には発現を認めない。バルーン傷害の 5 日目では内皮細胞は擦過され欠落しているが、中膜第 1 層に CAR の発現した。7 日目になると、中膜の CAR の発現は消失し、新たに生じた新生内膜に強く CAR を発現するようになり、この細胞の核は PCNA にて染色された。再生されつつある血管内皮細胞は FVIIIIRAg 陽性細胞として新生内膜の表面に認められるが、新生内膜の細胞群とは明らかに区別されている。14 日目になると、新生内膜での CAR の発現は消失し、再生中の血管内皮細胞のみが CAR で染色されるようになった。

#### 定量的 RT-PCR

傷害血管における CAR mRNA の発現量の経時的变化を図 2 に示す。CAR/ $\gamma$ -actin mRNA の定量値の mean + SD は以下の如くである。傷害前 ( $0.072 + 0.027$ ;  $n = 8$ )、傷害後 3 日 ( $0.075 + 0.027$ ;  $n = 5$ )、5 日 ( $0.124 + 0.027$ ;  $n = 7$ )、7 日 ( $0.180 + 0.038$ ;  $n = 8$ )、10 日 ( $0.152 + 0.024$ ;  $n = 7$ )、14 日 ( $0.135 + 0.010$ ;  $n = 5$ )、21 日 ( $0.122 + 0.015$ ;  $n = 6$ )。傷害前のラットの頸動脈での CAR mRNA の発現は低いレベルにあるが、障害後増加し 7 日後にピークに達し ( $p = 0.0050$ )、その後徐々に減少傾向した。

#### 培養血管平滑筋細胞

ラットの胸部大動脈から採取し primary culture

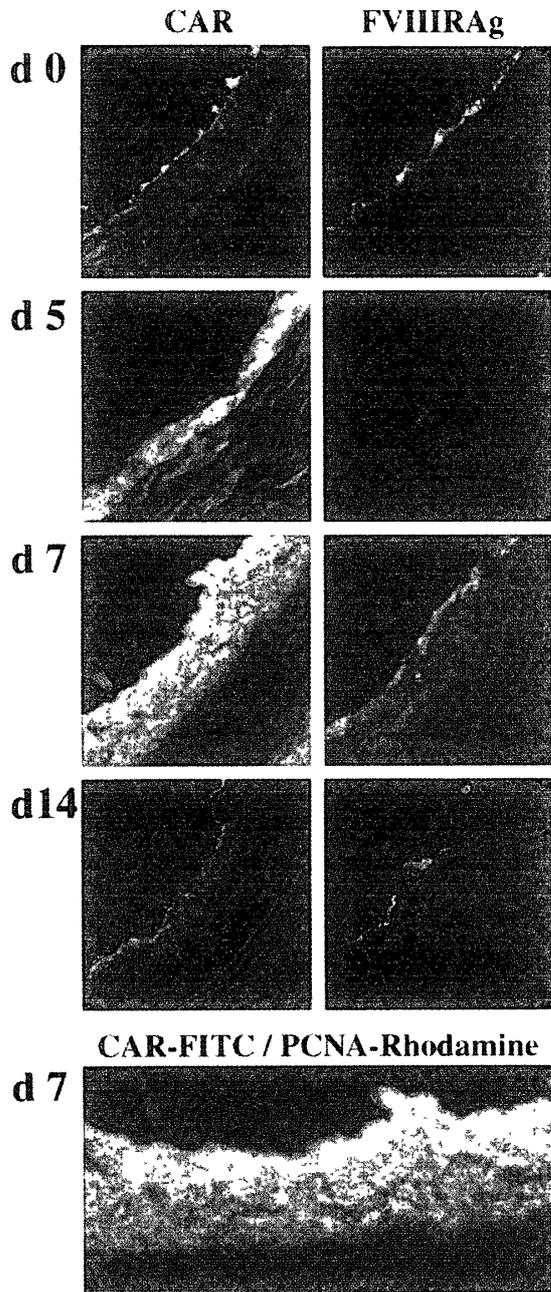


図1 ラット頸動脈バルーン傷害におけるCAR, PCNAおよびFVIIIIRAgの局在. Day 0は非傷害血管を示す. 左図: CAR (FITC: 緑), 右図: FVIIIIRAg (FITC). 下図: CAR (緑)とPCNA (ロタミン赤)の二重染色. 拡大率はDay 0, 5, 7は $\times 400$ , Day 14は $\times 200$ , 二重染色は $\times 800$ .

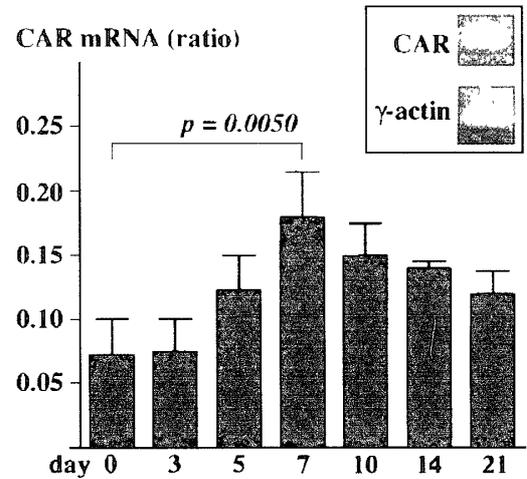


図2 ラット頸動脈バルーン傷害における血管壁のCAR mRNA発現量の経時的变化 (mean + SD). 縦軸は定量的RT-PCRにて測定したCAR及び $\gamma$ -actinのmRNAの比. 対照である非傷害血管 (Day 0)との比較により有意差検定を行った.

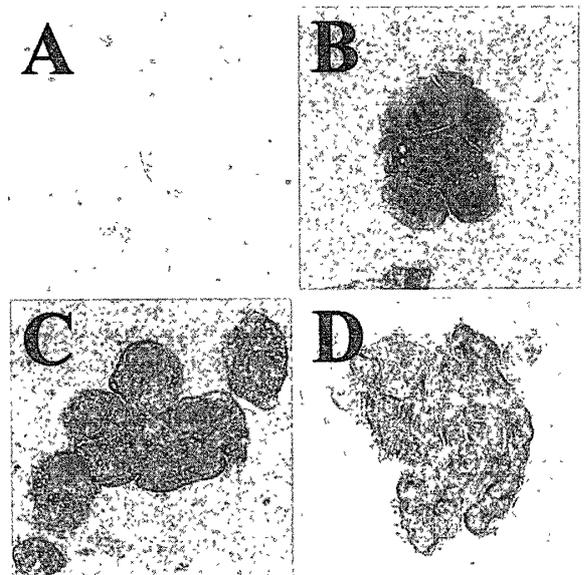


図3 培養血管平滑筋細胞の形態及びCAR抗原の発現. A: 位相差顕微鏡像, B: May-Giemsa染色, C:  $\alpha$ -smooth muscle actin (APAAP), D: CAR (horseradish peroxidase). 拡大率はいずれも $\times 600$ .

を行った血管平滑筋細胞は、紡錘形の細胞形態を示し、8日の培養で subconfluent の状態となった。この細胞は  $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性、CAR 陽性であり、in vitro でも増殖中の血管平滑筋細胞は CAR を強く発現するということが示された (図 3)。

## 考 察

無処置のラット頸動脈では CAR は血管内皮細胞にのみ発現し、mRNA の baseline level はこれに由来すると考えられた。バルーン傷害後7日目になると、新生内膜の形成が明らかとなり、新生内膜を構成する血管平滑筋は CAR を強く発現した。これらの細胞の核は PCNA を強く発現しており、活発な増殖を行っていることが示された。新生内膜に発現していた CAR は14日目には消失し、血管内皮細胞で覆われることで血管の修復が完了したことがわかる。CAR の mRNA の経時的推移は新生内膜の形成と並行しており、新生内膜の増殖の終了とともに baseline level に復帰した。新生内膜を構成する細胞の由来は内皮下から移動してきた血管平滑筋細胞と考えられているが<sup>12)</sup>、今回の in vitro の培養で増殖中の大動脈壁由来血管平滑筋細胞が CAR を発現していたことはこれを支持する観察と考えられる。以上より、CAR の発現は新生内膜平滑筋細胞の増殖に密接に関与していると考えられる。

また、傷害早期の新生内膜出現以前 (5日目) に中膜第1層すなわち血管平滑筋細胞層に CAR が発現しているという点が注目される。既存の血管平滑筋が血管内皮による被覆を奪われ、cell-to-cell contact が失われたために CAR が発現したという可能性を示していると考えられた。

臨床的な観点からは、CAR はアデノウイルスの高親和性受容体であり、新生内膜でその発現が増強されていることは、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が各種動物のバルーン傷害血管の新生内膜で高い効率を示す<sup>13)–16)</sup> ことのメカニズムを説明すると考えられる。VCAM-1 は CAR と同一性が高く、血管壁へのアデノウイルス

ベクターの結合に関与しているとの報告<sup>17)</sup> もあるが、今回の検討からはむしろ CAR そのものが新生内膜への遺伝子導入に重要な働きをしていると推測された。

CAR が傷害血管で発現することが示されたが、その発現を調節する機構はわかっていない。cell-to-cell contact が疎になった箇所で CAR が発現し、密になると消失するということから、cell-to-cell contact が CAR の発現を調節する可能性が推測される。

## 謝 辞

最後に、この研究を行うにあたり御指導賜りました新潟大学医学部第1内科相澤義房教授、新潟大学遺伝子実験施設桑野良三助教授に心から御礼を申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL and Finberg RW: The Murine CAR Homolog Is a Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses. *J Virol* 72: 415–419 1998.
- 2) Tomko RP, Xu R and Philipson L: HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3352–3356 1997.
- 3) Bergeson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL and Finberg RW: Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Virus and Adenovirus 2 and 5. *Science* 275: 1320–1323 1997.
- 4) Honda T, Saitoh H, Masuko M, Katagiri-Abe T, Tominaga K, Kozakai I, Kobayashi K, Kumanishi T, Watanabe YG, Odani S and Kuwano R: The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Molecular Brain Research* 77: 19–28 2000.
- 5) Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K,

- Hotta Y, Honda T, Kuwano R and Aizawa Y: Expression of Coxsackievirus and Adenovirus Receptor in Hearts of Rats With Experimental Autoimmune Myocarditis. *Circ Res* 86: 275 - 280 2000.
- 6) Abe TK, Tanaka H, Iwanaga T, Odai S and Kuwano R: The presence of the 50 - kDa subunit of dynactin complex in the nerve growth cone. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 295 - 299 1997.
- 7) Fechner H, Haack A, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J and Poller W: Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav - integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* 9: 1520 - 1535 1999.
- 8) Brown CW, McHugh KM and Lessard JL: A cDNA sequence encoding cytoskeletal gammer - actin from rat. *Nucleic Acids Res* 17: 5312 1990.
- 9) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T and Yoshifusa Aizawa: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci* IN PRESS
- 10) Toba K, Hanawa H, Sakaue M, Yoshida K, Itoh H, Tsuchiyama J, Maruyama S, Narita M, Takahashi M, Watanabe K and Aizawa Y: FcεR1 and CD22 mRNA are expressed in early B - lineage and myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* IN PRESS
- 11) Sprague EA, Kelley JL and Schwartz CJ: Growth, structure and function of baboon aortic smooth muscle cells in culture. *Exp Mol Pathol* 37: 48 - 66 1983.
- 12) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature* 362: 801 - 809 1993.
- 13) Guzman RJ, Lemarchand P, Crystal RG, Epstein SE and Finkel T: Efficient and Selective Adenovirus - Mediated Gene Transfer Into Vascular Neointima. *Circulation* 88: 2838 - 2848 1993.
- 14) Rekhter MD, Simari RD, Work CW, Nabel GJ, Nabel EG and Gordon D: Gene Transfer Into Normal and Atherosclerotic Human Blood Vessels. *Circ Res* 82: 1243 - 1252 1998.
- 15) Leclerc G, Gal D, Takeshita S, Nikol S, Weir L and Isner JM: Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model: efficiency in normal and balloon - dilated atherosclerotic arteries. *J Clin Invest* 90: 936 - 944 1992.
- 16) Flugelman MY, Jaklitsch MT, Newman KD, Cassells W, Bratthauer GL and Dichek DA: Low level in vivo gene transfer into the arterial wall through a perforated balloon catheter. *Circulation* 85: 1110 - 1117 1992.
- 17) Chu Y, Heistad DD, Cybulsky MI and Davidson BL: Vascular Cell Adhesion Molecule - 1 Augments Adenovirus - Mediated Gene Transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 238 - 242 2001.

(平成15年1月21日受付)