

6) マクロファージと内皮細胞における
スカベンジャー受容体の発現

新潟大学医学部病理学第二講座 内藤 眞・高塚 尚和
長谷川 剛・伊藤 重雄
東京大学先端科学技術研究センター分子生物医学部門 児玉 龍彦

Expression of Scavenger Receptors in
Macrophages and Endothelial Cells

Makoto NAITO, Hisakazu TAKATSUKA,
Go HASEGAWA and Shigeo ITO

*Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine*

Tatsuhiko KODAMA

*Department of Molecular Biology and Medicine,
Research Center for Advanced Science and Technology,
University of Tokyo*

In order to clarify the expression and tissue distribution of scavenger receptors, we have performed immunohistochemical and immunoelectron microscopical studies as well as in situ hybridization. Scavenger receptors are a trimeric glycoprotein mediating endocytosis of chemically modified low density lipoproteins (LDL). The receptors were detected specifically in macrophages in various tissues by immunohistochemistry using anti-bovine scavenger receptor monoclonal antibody IgG-D2, although hepatic sinusoidal cells are known to incorporate modified LDL actively. In contrast, scavenger receptor protein was detected both in Kupffer cells and endothelial cells of the hepatic sinusoid and lymphatic sinus by immunohistochemistry using anti-bovine scavenger receptor antibody IgG-D1 and anti-murine scavenger receptor antibody 2F8. In situ hybridization demonstrated the expression of scavenger receptor mRNA in Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells. Scavenger receptors were not expressed in endothelial cells of other tissues than the liver and lymph nodes. These findings indicate that scavenger receptors are expressed both in macrophages and specific endothelial cells and that endothelial cells in various tissues constitute heterogeneous populations with regard to lipoprotein metabolism.

Key words: scavenger receptor, LDL receptor, macrophages, endothelial cells,
immunohistochemistry

スカベンジャー受容体, LDL 受容体, マクロファージ, 内皮細胞, 免疫組織化学

Reprint requests to: Makoto NAITO,
Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine,
1 Asahimachi-dori, Niigata, City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部病理学第二講座

内藤 眞

はじめに

コレステロール運搬において低密度リポ蛋白 (low density lipoprotein: LDL) の受容体¹⁾²⁾ とスカベンジャー受容体^{3)~6)} は重要な役割を演じている。LDL の 2/3 は LDL 受容体を介してそのままの形 (native LDL; nLDL) で線維芽細胞など種々の細胞に取り込まれて代謝され (LDL 経路), 1/3 は nLDL が生体内で何らかの化学修飾をうけた修飾 LDL (modified LDL; mLDL) としてマクロファージのスカベンジャー受容体によって活発に取り込まれる。しかし、細胞種ごとにみると、マクロファージは mLDL を取り込むが nLDL を取り込むことはなく、内皮細胞は nLDL と mLDL の両者を取り込み⁷⁾, 線維芽細胞は nLDL を取り込むが mLDL は取り込まない。このような差異から、細胞種によって異なった LDL 代謝経路が存在することが考慮される。スカベンジャー受容体は児玉らによってアセチル化 LDL の受容体として発見され³⁾⁴⁾, 当初の免疫組織学的検索で肝臓の Kupffer 細胞と類洞内皮細胞に発現していると報告された。しかし、その後スカベンジャー受容体はマクロファージに選択的に発現するとの報告が続き⁸⁾⁹⁾, スカベンジャー受容体の発現細胞について決着がつかなかった。本研究では血管内皮とマクロファージのリポ蛋白代謝とスカベンジャー受容体の発現細胞についての最近の知見についてふれる。

マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現

児玉らはウシの肺泡マクロファージからスカベンジャー受容体蛋白を分離・精製し、遺伝子クローニングによる解析を行い、その分子構造と機能を明らかにした⁴⁾。スカベンジャー受容体はウシ、ヒト、マウス、ウサギで I 型と II 型の存在が知られ^{4)~6)}, I 型は 220 kD の 3 量体蛋白で、3 重鎖構造をとる。細胞質、膜透過部、スパーサー、 α -helical coiled coil, コラゲン様、および cysteine-rich の各ドメインからなり、II 型は cysteine-rich domain を欠く。コラゲン様ドメインにはリガンド結合部位がある。機能的にはスカベンジャー受容体はアセチル LDL, 酸化 LDL など種々の mLDL および幾つかの陰性荷電を有する巨大分子と結合し、その取り込みに関与する。

ウシのスカベンジャー受容体を認識する抗体 IgG-D1 を用いた肝の免疫組織化学的検索ではスカベンジャー受容体は肝の類洞を構成する内皮細胞と Kupffer 細胞に発現が認められた³⁾。しかし、著者が別の抗体 (IgG-D2) を用いて検討すると、肝をはじめ種々の組織でスカベンジャー受容体の発現はマクロファージに特異的に観察された (図 1)⁸⁾。スカベンジャー受容体は肝の Kupffer 細胞、肺泡マクロファージ、副腎のマクロファージや脳の小動脈周囲のマクロファージ (Mato cell) などに特に強い発現が見られた。動脈硬化病巣ではスカベンジャー

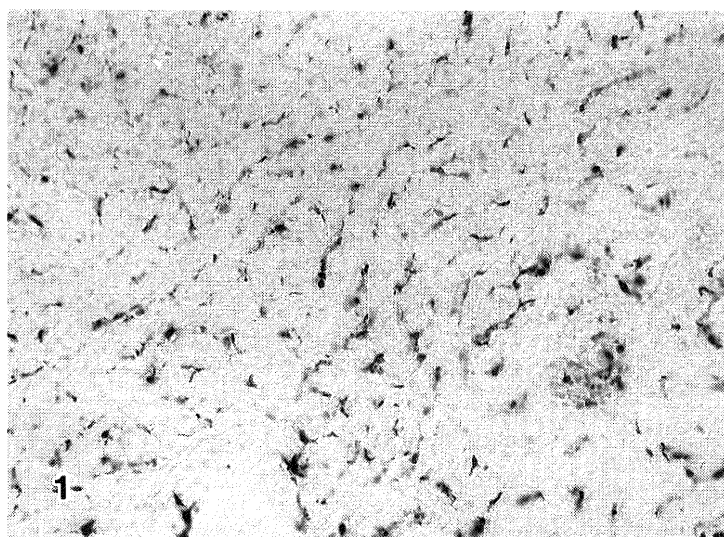


図 1 スカベンジャー受容体に対する抗体 (IgG-D2) を用いたウシ肝臓の免疫組織化学。Kupffer 細胞に陽性像がみられる。×100。

受容体はマクロファージおよび泡沫細胞に発現し、動脈硬化病変の進展の引き金としての役割が想定されている^{9)~11)}。免疫電顕ではスカベンジャー受容体はマクロファージの細胞膜、小胞、取り込み空胞に局在した⁸⁾。ウシ肺胞マクロファージを用いたアセチル LDL の取り込み実験ではリガンドは細胞膜上のスカベンジャー受容体に結合し、ともに coated pit に集積し、coated vesicle として細胞内に取り込まれ、癒合して endosome となり、リガンドはライソゾームに移行し、一方スカベンジャー受容体はリガンドと解離して Golgi 装置を経由して再び細胞膜にリサイクルする過程が観察された⁸⁾。

内皮細胞における LDL 受容体及びスカベンジャー受容体の発現

LDL 受容体は 839 個のアミノ酸からなる 1 本鎖の糖蛋白で、LDL 結合、EGF 前駆体相同、O 結合糖鎖、膜透過部位、細胞質内ドメインからなる¹⁾²⁾。ヒト臍帯血管内皮を免疫電顕的に検索すると、LDL 受容体は細胞膜に存在し、培養実験では LDL を coated pit, endosome によって取り込み、受容体はリガンドと解離して LDL はライソゾームに移送され、スカベンジャー受容体と近似した動態を示す。内皮細胞はこのように LDL 受容体を介して LDL 代謝に参画する。

一方、内皮細胞、ことに肝類洞内皮細胞は活発に m-LDL を取り込む⁷⁾。前述したようにウシスカベンジャー

受容体の抗体 IgG-D1 を用いた免疫染色では内皮細胞もスカベンジャー受容体が発現していることが示唆された。最近 Oxford 大学の S. Gordon らはマウスマクロファージの接着因子に対するモノクロナル抗体 (2F8) を作製し、これがスカベンジャー受容体を認識していることを見いだした¹²⁾。著者も抗体の供与を受け免疫組織化学的に検索したところ、肝の Kupffer 細胞のみならず類洞内皮細胞にもスカベンジャー受容体の発現が確認された (図 2)。ただし、小葉中心部では内皮細胞のスカベンジャー受容体発現は不明瞭で、小葉内にも発現の局在、極性があることが示唆された。児玉らの作製したスカベンジャー受容体ノックアウトマウスの検索では両細胞に陽性像は全くみられず、この抗体がスカベンジャー受容体を認識していることは明らかである。われわれの行った in situ hybridization でも Kupffer 細胞のみならず内皮細胞にもスカベンジャー受容体 mRNA の発現がみられた (図 3)。以上の成績から IgG-D1 や 2F8 は内皮細胞とマクロファージのスカベンジャー受容体を認識し、IgG-D2 はマクロファージのスカベンジャー受容体のみを認識する抗体であることが判明した。しかしながら両細胞のスカベンジャー受容体蛋白に構造的差異があるとは考えられず、それぞれの抗体がスカベンジャー受容体のどの部分を認識するか、そして IgG-D2 がなぜマクロファージに特異的に反応するかという問題は謎である。これまでの検索では、内皮細胞におけるスカベ

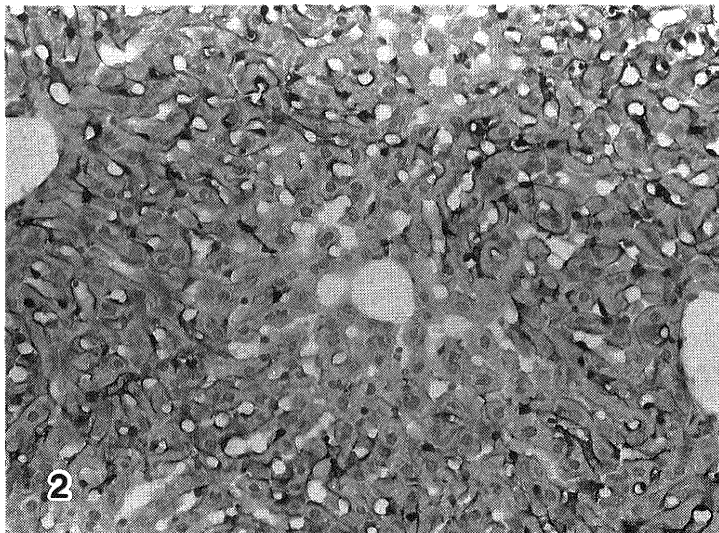


図 2 抗マウススカベンジャー受容体抗体 (2F8) を用いたマウス肝の免疫組織化学。Kupffer 細胞と内皮細胞に陽性像が観察される。×100。

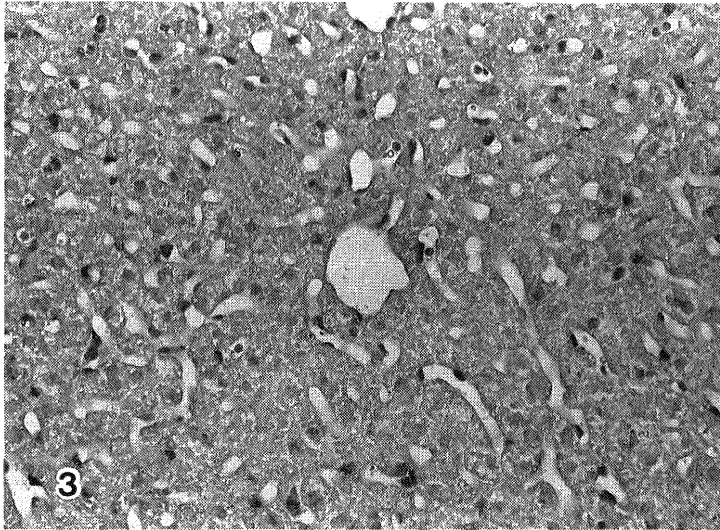


図3 ジゴキゲンニン標識 in situ hybridization によるマウス肝におけるスカベンジャー受容体 RNA の発現。Kupffer 細胞と内皮細胞にシグナルがみられる。×100.

表1 スカベンジャー受容体発現細胞 (2F8 陽性細胞)

肝:	Kupffer 細胞, 類洞内皮
脾:	赤脾髄マクロファージ
腎:	間質マクロファージ
肺:	肺胞マクロファージ
心:	間質マクロファージ
腸管:	粘膜固有層マクロファージ
子宮:	内膜および筋層マクロファージ
卵巣:	マクロファージ
皮膚:	真皮組織球
リンパ節:	マクロファージ, 辺縁洞内皮
腹腔:	腹腔マクロファージ, 大網マクロファージ
脳:	髄膜マクロファージ, 真藤細胞, 脈絡膜マクロファージ

ンジャー受容体の発現は肝臓の類洞内皮細胞の他, リンパ節の辺縁洞内皮にみとめられた (表 1). 両内皮は Ashoff の提唱した網内系学説¹³⁾ ではともに細網内皮に分類されるが, リポ蛋白代謝からみて特異な内皮細胞であることが明らかにされた. このように各臓器の内皮細胞には機能の上で heterogeneity があると考えられる.

おわりに

血管は血液, リンパ液の輸送に極めて重要なシステムであるが, 単に管としての役割を果たすのみではなく, 多様な生命現象に関与する. 肝臓の類洞内皮細胞は細網内皮と位置づけられ, マクロファージと同様活発な取り込み機能を有し, 各種代謝に関わる特殊な細胞とみなされ, 網内系学説の中核をなしてきた. 現在内皮細胞とマクロファージは起源を異にする別種の細胞と考えられているが, 肝の類洞内皮細胞は LDL 受容体に加えて Kupffer 細胞と同様スカベンジャー受容体も発現し, リポ蛋白代謝をはじめとして広範な生物学的役割を果たしている. 今後内皮細胞の多様性のメカニズムと, マクロファージとの機能的関連の解明が期待される.

謝辞

抗体を供与下さいました Oxford 大学 Siamon Gordon 教授に深謝いたします.

参考文献

- 1) Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. and Brown, M.S.: Binding site on macrophages that mediates uptake degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol

- deposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76: 333~337, 1979.
- 2) **Brown, M.S. and Goldstein, J.L.:** Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu. Rev. Biochem., 52: 223~264, 1983.
 - 3) **Kodama, T., Reddy, P., Kishimoto, P.C. and Krieger, M.:** Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 9238~9242, 1988.
 - 4) **Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrewsky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M.:** Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. Nature, 343: 531~535, 1990.
 - 5) **Rohrer, L., Freeman, M., Kodama, T., Penman, M. and Krieger, M.:** Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. Nature, 343: 570~572, 1990.
 - 6) **Freeman, M., Ashkenas, J., Rees, K.J.G., Kingsley, D.M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Krieger, M.:** An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8810~8814, 1990.
 - 7) **Pitas, R.E., Boyles, J., Mahley, R.W. and Bissell, D.M.:** Uptake of chemically modified low density lipoproteins in vivo is mediated by specific endothelial cells. J. Cell Biol., 100: 103~117, 1985.
 - 8) **Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T. and Takahashi, K.:** Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine scavenger receptors. Am. J. Pathol., 139: 1411~1423, 1991.
 - 9) **Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Kodama, T., Matsumoto, A. and Takahashi, K.:** Coexpression of type I and II human macrophage scavenger receptors in macrophages in various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. Am. J. Pathol., 141: 591~599, 1992.
 - 10) **Matsumoto, A., Naito, M., Itakura, H., Ikemoto, S., Asaoka, H., Hayakawa, I., Kanamori, H., Aburatani, H., Takaku, F., Suzuki, H., Kobari, Y., Miyai, T., Takahashi, K., Cohen, E.H., Wydro, R., Housman, D.E. and Kodama, T.:** Human macrophage scavenger receptors: Primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87: 9133~9137, 1990.
 - 11) **Ylä-Herttuala, S., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Sigal, E., Särkioja, T., Witztum, J.L. and Steinberg, D.:** Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. J. Clin. Invest., 87: 1146~1152, 1991.
 - 12) **Fraser, I., Hughes, D. and Gordon, S.:** Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. Nature, 364: 343~346, 1993.
 - 13) **Aschoff, L.:** Das reticulo-endotheliale System. Erg. inn. Med. Kinderheilk., 26: 1~118, 1924.
- 司会 (内藤) これから、討議に移ります。一応、発表された順序に進めていきたいと思います。まず、最初の皆河先生のご発表に、ご質問があれば承りたいと思います。
- ではまず、私からお伺いします。培養実験で、内皮細胞の増殖と血管腔形成に対して、腫瘍細胞培養上清が、一見反対に効いているように見えましたけれども、glioma cell からはどういうファクターが産生されたと考えていらっしゃるのでしょうか。
- 皆河 これはずっと以前にやった仕事ですが、ヒトの脳腫瘍や glioma 細胞からの培養上清を砂ネズミ脳微小血管由来の培養内皮にかけたときに、同じ現象が見られました。要するに、内皮細胞の増殖を抑制するという現象がどういふことなのかということで、今回はラット対ラットでやりました。そうしたら同様の結果が得られました。TGF- β が一般に示すものと同じようなデータなのですが、中和抗体とかそのようなものを使えば良かったのだと思います。それ以上はやっておりません。
- 司会 (内藤) ペリサイトやアストロサイトを内皮細胞と一緒に培養しておられましたけれども、あれは、内皮細胞がある程度増殖してから加えられたのでしょうか。

それとも最初から加えられたのでしょうか。

皆河 モデルのところを省略してしまったのですが、まず、ゼラチンの上に内皮細胞を培養しまして、その上にタイプIコラーゲンを薄くまきますと、ああいった血管様の構造物ができます。できた時点で、アストロサイト、或いはペリサイトをまいたわけです。

司会(岡田) 血管新生は私も非常に興味を持っています。例えば、糖尿病の時の網膜症ですね。あれは、網膜の血管が閉塞することよりは、その後起こってくる血管新生が、失明の直接的なきっかけになっているということです。いろんな研究がありますが、高血糖下に眼の毛細管をさらしますと、先生のデータと同じように、内皮細胞が管腔状構造を示しながら増殖してきます。その過程には FGF などの成長因子が大いに関与しており、これが糖尿病の時の失明の1つのメカニズムであるようです。先生は、血管新生をどのような目標でやっていたのでしょうか。

皆河 僕らがよく診るのは、モヤモヤ病という病態です。内頸動脈の終末部が、徐々に閉塞していきまして、新生血管が出てきます。それがあたかもモヤモヤしているということで、モヤモヤ病という名前が付いています。ウイリス動脈輪閉塞症というのが、昔からの名前なのですが、あと、動静脈奇形が脳内にありますと、そのシャントのために、周囲が虚血状態になります。血管新生が起こると言って良いのかどうか分かりませんが、異常な血管が見られるものですから、そのようなメカニズムを考える上で、実験モデルが有用ではないかと考えています。

追手 3つほど教えていただきたいのですが。1つは、三次元の培養は非常に興味があったのですが、三次元で培養したときの、内皮細胞の ICAM や VCAM などの発現はいかがでしたか。

皆河 調べておりません。

追手 それから、ペリサイトといってもいろんな内皮細胞との接着の仕方があると思うのです。例えば、メサングウム細胞と内皮細胞というのは、直接、細胞と細胞が接しております。先生の実験系で、人工的に三次元培養して血管ができますね。そこにペリサイト、或いは他の細胞を加えると、ECM を介して接触しているのですか、それとも直接接触しているのですか。

皆河 ペリサイトに関しては、電顕で見ておりませんので分かりません。アストロサイトに関しては、これもはっきりしたデータではないのですけれども、電顕で観察しますと直接、接しているようです。脳では、ペリサ

イトあるいはアストロサイトと内皮細胞は、基底膜を介して接しているんです。ですから、実験系では *in vivo* からかなり離れていると考えて良いと思います。それから、先程お見せしたのですが、確か5時間くらいで遊走するのですけれども、あれを1日くらい置きますと、ペリサイトは血管様構造の上で、1つの細胞がすごく伸びます。そして内皮細胞を被うようになります。非常に激しい変化をするなと思いました。

追手 最後の質問ですが、先生のご発表は、内皮細胞が他の細胞からレギュレートされているという主旨だったと思いますが、例えば腎臓の培養の細胞を考えてみますと、むしろペリサイトに当たるメサングウム細胞の増殖が圧倒的に強いですね。生体内でも、内皮細胞がどんどん増えるという所見よりも、むしろペリサイト的なものが増える。三次元的培養で、内皮細胞が抑制されるという系は生体に近いのではないかと思うのですけれども、先生のお仕事で、内皮細胞がペリサイトの増殖をレギュレートしているというようなデータがあったら教えていただきたいのですが。

皆河 論文を発表後に指摘されたのですが、三次元的培養によりアストロサイトの GFAP が非常にきれいに染まるようになります。内皮が働きかけて、アストロサイトが活性化され、リアクティブ・アストロサイトになるというふうに考えると、生体内の現象と一致するのではないかと思います。実際に、内皮細胞がアストロサイトの増殖を促進するという報告もあります。

司会(岡田) 追手先生の最後のご質問に関係しますが、大血管で言いますと、ペリサイト、アストロサイトに相当する邪魔者が平滑筋です。特に心臓の冠血管などは、内皮細胞が普段、増殖を抑制してくれていますが、最近臨床で普及している方法のようにカテーテルで、動脈硬化部位を削り取るという手術をしますと、内皮細胞が無くなるものですから、とたんに平滑筋が元気を出して、せっかく取り除いた部位がまた塞がってしまいます。それを何とか遺伝子で抑制できないかという遺伝子治療の研究が始まっていますね。

司会(内藤) では、次の話題に移りたいと思います。

渡辺先生のご発表にご質問、ご意見がありましたらお願いいたします。

司会(岡田) 渡辺先生に要点をもう一度教えていただきたいのですが、血中のカテコールアミンが多いとか少ないとかというお話とレセプターとの関係、或いは遺伝子異常があってそういうことが起こるのかどうか。それから、Ca²⁺ との関係がどういうことであったのか、そ

の辺をもう一度解り易く教えてください。

渡辺 時間が無く、大分省略したところがあってすみません。

私が研究したわけではないのですが、論文によれば、例えば高血圧を惹起しない程度にカテコールアミンを(イスでもラットでも良いのですが)、投与した場合、心筋が肥大してきます。つまり、カテコールアミンと心肥大に大きな関係があるのではないかということで、この研究をやり始めたわけです。今日は血管細胞がテーマですから血管を出せば良かったのですが、血管というのは固くてなかなか細胞膜を採れないのです。それで心筋を用いているのです。心筋のスライドを出して下さい。この一番上のところにザルコレンマという膜があるのですが、そこに大体レセプターがあるわけです。 α でも β 受容体でも何でも良いのですが、カテコールアミンがどんどん外からレセプターを叩きます。先程先生がおっしゃいましたように、刺激が中のほうにずっと入ってくるわけなんです。(スライドの)一番上にあるザルコレンマと書いてあるのが形質膜です。下のほうが心筋の中です。このザルコレンマを血管ではなかなか取り出せないのです。私も内皮細胞を使って、セロトニンとかアンギオテンシンのレセプターを測っている最中なのです。今回は、カテコールアミンがレセプターを刺激しますと、そこからいろんなセカンドメッセンジャーが出てきて、それがいろんな作用をする。そういう過程があるということをお話させていただきました。

司会(岡田) それが心筋肥大に結びついていると。

渡辺 そうです。刺激により心筋も収縮しますし心筋肥大も出てきます。ノルエピネフリン、アンギオテンシン、エンドセリンなど、いろんなものがありますが、各物質に対応する受容体というものがあるのです。その受容体に物質がつかますと、いろんなセカンドメッセンジャーが出てきます。protein kinase Cとか、スライドにいろいろ書いてありますが、それが少しずつ変化して、心肥大が起きたり、心収縮力が出てきたりするのではないかと、今は考えられております。

司会(岡田) 分かりました。

司会(内藤) では、追手先生のご発表について、ご質問がありましたら、お願いいたします。

では、1つ伺います。Thy-1.1という分子の機能ということで、お仕事を進めていらっしゃるのですが、この抗体を投与したときには、蛋白尿等の病変が出るわけですね。その障害機序というのは、どういうことなのでしょう。

追手 今のところ考えられているのは、補体依存性の機序といまして、メサングウム細胞の表面にその抗体が付くと、補体の活性化がおこり、補体を介したメサングオリシスを起こし、腎炎になるというものです。

司会(内藤) 非常に限られた場所から、病変が全体に広がるということですね。

追手 そうです。ただ、今日も示しましたけれども、2種類の細胞に対する抗体を使っています。OX-7というのはもう市販されていますから、どなたでも使えるのですが、それを投与した動物と、うちで開発した1-22-3という抗体をやってみますと、必ずしも同じような病態をとらない。従って、その機序が補体だけで説明できるのか、それともファンクショナル・エピトープをいじっているからということなのか、それは、将来の問題だと思えます。

山本 同じThy-1.1を認識する抗体ですが、1つは、内皮細胞と接するところにエピトープを持っていて、もう1つは、それと接しないところで全体にあるというわけですね。それは内皮細胞が、何か新しく抗原決定基をそのThy-1.1分子に与えたというふうに考えておられるのですか。

追手 今のところ、そうは全然考えていません。Thy-1.1分子にはアイソフォームがありうる。2つあって、一方は1-22-3を持っている。両方ともOX-7は持っていますが。もう1つの考え方は、立体構造を認識している。すなわち、お見せしましたように、メサングウム細胞だけを培養した状態では、全細胞周辺にあるわけですね。ところが、内皮細胞と混合培養したときに、接触面に強く出るということは、何か立体的な構造を認識しているエピトープがある。今のところはその2つを想定しています。

山本 その立体構造を変えるのは、内皮細胞がやはりやっているというふうに考えるのですか。

追手 メサングウム細胞だけを単独で培養して、そして反応をみましても、1-22-3とOX-7では、OX-7が圧倒的に強く染まります。だから、何かファクターを出しているというようなことも、可能性はあるのですけれども、それよりは、先程も言いましたように、何か立体的なことが関係している可能性が非常にある。結局、エピトープを1つ1つ決めていくという操作をやらない限りは、結論は出ないと思います。

山本 COS細胞にThy-1.1を発現させた場合は両方の抗体で染まっていたのですか。

追手 そうです。

山本 そうすると、1つのタイプの Thy-1.1 があるにも関わらず、両方のエピトープがあったというふうに考えるのですか。

追手 いえ。例えば、cDNA を入れても、アルタネイティブ・スプライシングということはありません。発現する分子がエピトープレベルで違っても全然おかしくないことです。現実はこの cDNA でノーザンブロッティングをやると2本バンドが出ますから、アルタネイティブ・スプライシングでも説明がつくと思います。

山本 分かりました。

司会 (岡田) それは接着分子ではないのですね。

追手 僕は、一種の接着分子であると考えています。

司会 (岡田) それから、肝心なところを聞き落としてしまいましたが、その分子と、周細胞の機能制御は、どう関わっているのでしょうか。

追手 そうですね。そこら辺りが分からないところなのです。先生の言われるように、そこを直接結びつける根拠はないのです。今、非常に飛び飛びの話をしていて、接着している分子に細胞機能に関係している。それから、メサンギオリシスというのは細胞接着がそう失っている。それらを直接結びつける話は、まだできないのですね。

司会 (岡田) 以前、木原教授に「糸球体の内皮細胞は、生理的にダイナミックに間隙を作ったり塞いだりして、物質透過の制御をしている」というお話を伺ったことがあります。私が培養しています大血管の内皮細胞も、やはり機能的に間が開いたり閉じたりしているように見えるのですね。そんなことと関係しませんか。

追手 すごく関係していると思います。ただ糸球体の内皮細胞というのは、普通の内皮細胞と違ってフェネストレーションがあるのですね。すなわち、かなり大きな物質でも、到達できるのです。糸球体の基底膜までは。だから、大血管の内皮細胞とは、ちょっと考え方が違うのではないのでしょうか。ただ、先生の言われた通り、機能分子が働いて、大血管で開いたり閉じたりという、そういう可能性は十分あると思います。

皆河 基本的なことでも申し訳ないですけども、糸球体の内皮細胞を培養したときというのは、フェネストレーションはどうなっているのでしょうか。

追手 今日は、ちょっと省略してしまって申し訳ないのですけれども、これは糸球体の内皮細胞ではないのです。糸球体の内皮細胞は、採ろうと努力しているのですが、ラットでは本当に難しいです。ここで使っているのは、ラットの大動脈の内皮細胞です。糸球体の内皮細胞でよく使われるのはウシですけど、ウシ以外の内皮

細胞というのはなかなか採れなくて、皆様苦勞しているみたいです。

司会 (内藤) 次に話題を移して、藤中先生の実験腎炎における接着因子の発現のお話へのご質問をお願いいたします。

追手 先程の続きなのですが、フェネストレーションがあるわけですね。ということは、内皮細胞に接着分子が出て出なくても、十分、基底膜についての抗体に対して白血球が反応しようと思うのです。だから ICAM-1 が出ることがどの程度の意味があるのかということですが、それはかなり難しい話なので、一番最後に置いて、まず最初に糸球体の ICAM の発現を見てもらっちゃいますけれども、あれは何の細胞のメッセージなのでしょう。

藤中 腎炎で、要するに ICAM-1 の発現する細胞は何かということだと思っておりますけれども、発現細胞を染めたとかという仕事はないので、はっきりしたお答えはできないのですが、今まで文献的に言われていることから考えて、内皮、もしくはメサンギウム細胞ではないでしょうか。

追手 もう1つですけれども、ブロック実験で、抗 ICAM-1 と、それから抗 LFA-1 をやっていますけれども、確かに今日の講演をお聴きして、内皮細胞に働いているのではないかというのは、誰しも想像することですが、それは逆に炎症細胞にも働いている可能性があるわけですし、それから免疫系の細胞にも働いている可能性がある訳ですね。これはどうやって区別したら良いですか。

司会 (岡田) お答えが難しいようです。藤中先生がお考えになっている間に、もう少し簡単な質問を出していただきましょうか。どうぞ。

渡辺 (健) 藤中先生に2つほど質問があります。一般的に免疫反応の最初は、CD4 のヘルパー T 細胞というふうに習ってきたわけですが、このモデルでは CD4 に関しては、どのような結論が得られたのでしょうか。

藤中 受け売りという形になるのでけれども、少なくとも蛋白レベルでは、CD4 陽性細胞はほとんど染まってこないということで、関与していないのではないかと考えています。

渡辺 (健) 第二外科では移植モデルで、抗 α , β T 細胞受容体という T 細胞に対するモノクローナル抗体を使って、移植拒絶反応の抑制をしています。その抗体を使った場合に、やはり先生がおっしゃったように、TNF-

α とか $\text{INF-}\gamma$ とか $\text{IL-1}\beta$ のメッセンジャーレベルでの発現が抑制されています。それで論文にするとき、そこをどういうふうにディスカッションしようかと考えています。IL-1 β とか TNF- α に関しましては、マクロファージがその主要な産生細胞だと、ほとんどの論文にそういうふうにかかれていて、そうしますと、結局 ICAM-1 の発現、CD8 (+) リンパ球、マクロファージ、それからサイトカインと、この4つの関係が、今日の先生のお話を伺っても、やっぱり分かりません。自分自身で論文を書くにしても、マクロファージなのか、サイトカインなのか、CD8 (+) リンパ球なのか、結局イニシエーションはどれかというのは、やはり分からないのです。先生はどのようにお考えですか。何かアドバイスをいただければ。

藤中 ストーリーとしては CD8 があって、サイトカインがあって、ICAM-1 があって、マクロファージがあるはずですが、その前にまたマクロファージがあるのですよね。結局どれが最初かという話は、まあ、意図的でもあったのですけれども、敢えてしゃべらなかつたと言うか、はっきりしたことはちょっとお答えできないのですが、もう少しご存じの先生がいたら、その先生にお答えいただいたほうが良いのではないかと思います。

渡辺 (健) そうしますと、ちょっと余計なお節介かも知れませんが、例えばマクロファージをつぶしてしまう物質を内藤先生がお持ちだというふうに向っているのですけれども、今度はマクロファージをたたくような実験をされてはいかがでしょうか。

藤中 MIP の 1α とか β の話をしたのですけれども、MCP-1 というケモカインがあって、それはマクロファージを炎症局所に呼び寄せる働きがあるということが知られています。腎炎でも MCP-1 の発現がかなり強くなるというデータを、一応自分が持っているものですから、そのモノクローナル抗体を投与して MCP-1 を押さえたときに、マクロファージの浸潤が減るのではないかと。減ったときにその腎炎がどうなるかという実験も一応しているのですが、あまりきれいな結果ではありませんでした。MCP-1 のモノクロを使うことによって、マクロファージの浸潤は不完全に抑制されて、蛋白尿も不完全ながら抑制されるというデータはあるのですけれども、完全にどうだとかこうだとかということをお示しできる結果ではありません。

司会 (岡田) 共同研究者の川崎先生からご発言があるそうです。

川崎 まず、マクロファージの件ですが、別のモデル

でアグリゲート IgG とかで網内系をブロックしたことがあります。マクロファージの機能を完全にブロックするのは非常に難しいです。ですから、モノクローナル抗体を使ってもうまく行くかどうかという問題があるので、まあ手っ取り早く CD8 陽性細胞なら何とかなるだろう、というのが昔にやった実験です。うまく行ったのですけれども。

そこから追手先生の質問ですけれども、免疫系がターゲットにしているかどうかという点です。まず WKY ラットの馬杉腎炎は、nephrotoxin がすごく少ない量でできるモデルで、通常量 $1/20\sim 1/50$ で腎炎ができます。私の系もそれでやっています。抗体産生系もそんなに大きく動きませんので、免疫系も動いているとは思いますが、なんとも答えようがありません。それから、モノクローナル抗体を投与すると、それに対する抗体ができるわけですが、それも2週間目から立ち上がります。2週間目より前だと、自己抗体というか、打ったモノクロに対する抗体産生が見られませんが、そういう意味では抗体による直接の影響というふうには考えてまして、免疫応答が動いたことによるというふうにはあまり考えておりません。それで追手先生ご質問の答えになっていますでしょうか。

追手 エフェクター細胞に ICAM に対する抗体とか、LFA-1 に対する抗体が働いた可能性はいかがですか。内皮細胞ではなくて。

川崎 抗 ICAM-1 が内皮細胞でない細胞に働いた可能性は少ないと思います。というのは、ICAM-1 が染まる細胞は大部分が内皮細胞で、一部の上皮細胞が染まりますけれども、蛍光強度が全然違いますので、大部分は内皮細胞だと思います。T細胞に働いた可能性もありますけれども、LFA-1 のほうが圧倒的に強く染まりますので、あまり ICAM-1 のほうが効いたという印象は持っておりません。これも厳密に測ったわけではないので、否定はできませんけれども、印象としてはやはり、抗 ICAM-1 のメインのターゲットは内皮細胞、抗 LFA-1 のメインのターゲットはT細胞系と考えております。

司会 (岡田) そろそろ時間が迫ってきましたので簡潔をお願いします。

渡辺 (健) 第二外科で LFA-1 の投与実験をやっているのですが、これを投与しますと、T細胞はちゃんと存在しているのに、T細胞上の LFA-1 が細胞表面から消失しているということを実験で確かめてあります。

司会 (岡田) 今のご議論は、血管障害の一連の話を考えるときに、一番根幹に関わる重大な問題で、かつ一

番からないところです。ICAM-1 というのはいろんな刺激で簡単に出てきてしまうわけで、かつマクロファージに対して固有ではありません。実験腎炎の場合はマクロファージ以外にどんな細胞が集まってくるのですか。多核白血球とかT細胞ですか。もしそうだとすると、ICAM-1 以外の接着分子を指標となさった方が、もう少しはっきりするのではないかという気もいたしますが、どうでしょう。

藤中 おもしろいと思いますので、これからやってみたいと思います。今回やったのは、すでに私どものデータで、ICAM-1 と LFA-1 のモノクローナル抗体を使って、この腎炎が抑制できるというデータがあったものですから、この系が重要なのではないかと考え解析をしたということです。

木原 今、ご質問がありました腎炎というのは他にどのような細胞が動くのかという点ですが、ヒトでは、例えば好中球がある時期に非常に激しく動いているという腎炎はあるのですけれども、動物実験のレベルで、ラットなどでは、マクロファージが圧倒的に多いのですね。そして少数のリンパ球と少数の好中球。急性の炎症を起こさせても、多核白血球がドミナントという形は非常に少ない。

次に、抗 GBM という抗体の話が出ましたが、この抗血清は非常に癖もので、決して1つの抗体から成っているというふうには考えにくいのですね。細胞膜に対する抗体もあったり、或いは接着分子に対する抗体も入っていると考えていいでしょう。それから私のところで作るものと、例えばAという大学で作っているものと、Bという大学では、抗体の質はかなり異質なものが不均一に入っているというふうにお考えいただきたい。ですから、この解析は、話がいつもこんがらがらる。少しまたアバウトに言いますと、動物実験、特にラットを使う実験では、マクロファージというのが主役を成しているように考えている。決してそれは好中球の数が少ないから意味が無いと、申し上げているではありません。

司会(岡田) よく分かりました。

司会(内藤) さっき、マクロファージの除去法の話が出ましたけれども、マクロファージに対するクロドロンネート封入リボソームの投与経路が問題になります。血中に投与した場合、血液に露出された部分のマクロファージだったら、確実に取り込みますので、除去できます。血中に晒されている場所がないと、マクロファージの枯渇ができないという点で、使い方の難点があるかと思えます。

では、腎炎関係の話題から、最後の動脈硬化に関する接着因子、スカベンジャー受容体について、まとめて質問を伺いたいと思います。

追手 最初に岡田先生に3つ質問があります。すごく興味があったのですけれども、1つは、LDL の取り込みのお仕事がありましたね。oxidized と native の LDL の取り込みがありましたけれども、それに差がなかったと僕には見えただけでも、あれで差がないというのは、レセプターに差があるわけではなくて、両方とも同じレセプターを介してやっているから、というふうに見たほうがよろしいのでしょうか。

司会(岡田) いえ、明らかに違うレセプターがすでに知られています。可能性としては2つあります。1つは、差がなかったのは偶然ということ。もう1つは、native LDL のことなのですが、これは本来、ヒトのと言いますか、生き物の血中にある状態を native と言うわけで、試験管に取り出した瞬間から、様々な構造変化が起こり始めます。すでに実験系で使い始めているときには、native ではないということがあります。現に、私が先程スライドでお示ししましたような、激しい変化を起こした LDL ではなくて、ごく軽微な変性のほうが、むしろ、動脈硬化にとっては危険なんだと言う方もいらっしゃるぐらいです。そうなりますと、測定技術上の制約もあり識別は難しいので、これからの問題だと思っています。

追手 2番目の質問は、撤回しますけれども、抗体価にも差が認められなかったですよ。僕ら素人が聴くと、何か変性したほうが自己抗体ができやすいような気がするのですが、それが同じだったというのもそういう説明の仕方が、1つはあるのでしょうか。

司会(岡田) おっしゃる通りです。よく見ていらっしゃいましたね。その通りです。

追手 最後ですけれども、glycated LDL の話が非常に興味があったのです。糖尿病の場合に、おそらくああいうものに対する抗体、ないしレセプターの発現が非常に出てくる可能性があるわけですが、何かそれに関連した仕事があったら、教えていただきたいと思います。

司会(岡田) 最近、advanced glycation endproduct というものが非常に話題になっていますが、最後のスライドでお示ししましたように、これを試験管内で作りまして、接着分子、各種のものを発現させますと、やはり出てまいりますので、これ自身が独立した危険因子になりうるのだと思います。ただ、この AGE 限ってだけ申しますと、ここ数年、例えば心筋梗塞のある患者さんとなし患者さんの値を測ったという研究がたくさんある

のですが、どうも、差がないのですね。したがって、臨床家の方々からは、急激に興味が薄れてしまっているような感じがしています。この AGE をいかに考えるかは、これからもう一度仕切り直しをしなければならないかなと思っています。

追手 最後に内藤先生に1つ教えていただきたいのですが、すけれども、2F8 ですか、あの抗体にすごく興味があったのですが、あれは type I に対するものか、type II のレセプターですか、それとも関係ないのですか。

司会 (内藤) あれば I 型、II 型の共通部分に対する抗体だと言われております。

追手 そのレセプターは、何かケモカインとか、或いはサイトカインで刺激すると、発現が上がるとか下がるとか、そういうデータがあったら教えてください。

司会 (内藤) スカベンジャー受容体の発現の増幅因子としては、いろんなサイトカインが挙げられておりますが、マクロファージ・コロニー刺激因子 (CSF-1) がマクロファージのスカベンジャー受容体の発現を増強することが最も知られています。動脈硬化の場合ですと、動脈硬化の初期病巣に変性 LDL が蓄積して、それが動脈壁の平滑筋や内皮細胞に働いて、CSF-1 (M-CSF) と単球遊走因子を産生させますのでマクロファージが入ってきます。マクロファージもまた CSF-1 を産生して、これらのカスケードが働いて、スカベンジャー受容体も増強して、どんどん変性 LDL を取り込んで、泡沫細胞を形成して、アテローム斑を作ると考えられております。

追手 はい、どうもありがとうございました。

山本 抗体の D1 とか D2 で認識できるのは、1つのクラスだけなのですか。

司会 (内藤) D1 の認識部位は、よくまだ解析をしていないうちにミエロマセルが無くなってしまいました。D2 のほうも蛋白を作らなくなってその解析ができなくなってしまいました。結果から言いますと、D1 のほうが分かりやすいというか、正しかったのだらうと思います。D2 のほうがマクロファージしか認識しなかった理由は分かりません。

山本 分かりました。もう1つ岡田先生にお聞きしたかったのですが、一番最初に先生が見せてくださった、ICAM の立体構造が変わることが大事かも知れないという話ですが、先生のデータからでもそれをうかがわせるようなことがあったから、ああいうことを示されたのでしょうか。

司会 (岡田) いえ、そうではございません。話の中

でちらっと申しましたように、刺激をしていない細胞にも、かなりの濃度で発現しているのですね。各種サイトカインで刺激しますと、それが少し増える程度なのですが、その増えが非常にわずかなものですから、この程度ですと、何かことが起こってから接着の機能を発揮すると考えるのは、ちょっと納得がいかない。初めからあって、何かシグナルで機能変化が起って、くつつくのだというふうに考えると、非常にスムーズに理解できるものですからそう申し上げただけで、証拠はございません。

山本 分かりました。

渡辺 (健) 臨床家の立場から、岡田先生にお聞きしたいことがあります。幼若な血管内皮細胞と、成熟した成人の血管内皮細胞のことについてお聞きしたいのですが、第二外科で開心術をするときに、人工心肺回路を使って、無血視野を得るために、心臓と肺のほうには血液を一旦全部遮断します。その間はもちろん人工呼吸器は止めますし、心臓のほうは心筋保護液を流しておく。人工心肺を使って酸素化を行なって、二酸化炭素を飛ばして、それを体に流すということをしています。その人工心肺から離脱するときに、心臓にも、肺にもまた再び血液が流れていく。そうするとリパーフェュージョンインジャリーというものが起こるわけなのです。その原因としましては、人工心肺という異物の中を通るために、白血球の活性化、いろいろなサイトカインが出ること、低酸素などがありまして、肺のほうの血管内皮細胞に接着分子の発現が出てくるのではないかと。実際、患者さんのことも考えて、肺のバイオプシーをするとかいうことはできないので、そこら辺の検索は行なえないのですが、同じような条件でも、成人の体外循環に比べて、子供の、特に1歳以下の子供の体外循環を行なうと、その後の肺の酸素化能が悪くなるというのを非常にしばしば経験します。そうしますと、1歳以下の子供の血管内皮細胞の反応と、それ以降の人の血管内皮細胞の反応が違うのではないかということも考えられるかと思うのですが、そういうことに関して先生、何か知っていることがありましたら教えていただきたいのですけれども。

司会 (岡田) 子供のほうが起りやすいのですね。私は、ヒトの各種臓器、それから様々な動物の内皮細胞を扱っていますが、年齢を分けて扱うということをしてなかったものですから、今の質問にはお答えできません。どなたかいかがでしょうか。皆河先生どうでしょう。

皆河 僕は脳の微小血管、イヌの頸動脈とか、あとウシの大動脈などをやってみましたけれども、やはり僕も臓器による差はあると思いますし、加齢変化もあるのは

間違いないと思います。だからということにはならないのですが、継代培養していきますと、多核で巨大な内皮細胞も出てきますし、やはりいろんな面で機能が変わってきているのではないかなと思います。例えば、プロスタサイクリンの産生能も段々落ちてくるのも間違いないようです。

渡辺(健) ありがとうございます。

司会(内藤) まだ、質問もあるかと思いますが、一応ここでまとめということにさせていただきます。

本日は6名の演者の方に血管、それから心筋も含めまして、最新の知見を報告していただき、それを基に活発な討議を繰り広げていただきました。血管というものは、脊椎動物に共通する重要な組織の1つでありまして、血管系がどのように形成されて維持されるかということは、極めて重要な問題でございます。これらにつきましても、最近では分子レベルでの解明が次々と行なわれております。

本日は、皆河先生に、脳の血管新生のメカニズムについてお話をいただきました。血管新生というのは非常に興味ある現象で、特に脳の血管は blood brain barrier が存在するなど特異性があるということで、この分野の研究の進展が期待されます。

渡辺先生には、高血圧、心筋症における心筋のアドレナリンに対する反応性、或いはカルシウム拮抗薬受容体等のお話をいただきましたけれども、心筋の機能制御という点からと、またこれが血管のモデルとして挿入できるかどうか、或いは血管モデルができるかどうかということに、これからの研究課題があるかと思えます。

追手先生には腎糸球体の周細胞と内皮細胞についてお話をいただきました。糸球体という濾過装置は、機能に対応する構造を有し、細胞機能のお互いのバランスが崩れて構造の破壊が起きてくることと、それらの細胞の機能的な制御機構の解明がこれからの腎機能と病態の理解に

重要であることが示されました。

藤中先生の実験腎炎のモデルは CD8 陽性リンパ球の意義についてお話をいただきました。

岡田教授には動脈硬化の病変における、内皮細胞の接着因子の発現と内皮障害について最新の所見をお話をいただきました。炎症とか動脈硬化で、このように接着因子による類似した分子機構が関与しているということが明らかにされましたけれども、病変の種類とか、或いは臓器によって、接着因子の発現様式や制御様式にも違いがあるということも示唆されたかと思えます。

最後に私のほうから、マクロファージと内皮細胞に共通した機構があることを、スカベンジャー受容体に例を挙げて発表させていただきました。特定の内皮が、異物を活発に取り込むということから、網内系学説が提唱されたわけですけれども、細胞の起源という点では、明らかに間違いを含んでいた訳です。しかしながら、機能という面から、或いはこういう分子機構から、網内系に対する新たな視点も必要だろうと考えております。

本日、直接取り上げませんでしたけれども、血管の発生の問題も重要だと思います。血管新生については、今日も一部触れられましたが、脳の他にも、性周期に伴う子宮内膜での血管新生、それから血管系のネットワークとも言える胎盤での血管形成とその維持など、興味あるテーマが山積しています。その他、糖尿病の際の網膜症の血管の変化、炎症や創傷治癒などの病的な状態における血管新生の役割も重視されると思います。さらに腫瘍細胞の増殖、進展における血管の役割とその調節機構の解明は、臨床上も非常に重要であります。

本シンポジウムは、岡田先生のご尽力によって成功裏に終えることができたと思いますが、ご参加下さった皆様の理解を深め、また今後の研究の進展のきっかけになれば大変幸いに存じます。本日は長時間ありがとうございました。