

氏名	さかもと あずさ 坂本 梓
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第148号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	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
論文審査委員	主査 教授 内藤 眞 副査 教授 味岡 洋一 副査 教授 安保 徹

#### 博士論文の要旨

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, オキシステロールに結合し, 活性化されることが知られている. LXR $\alpha$  は肝臓, 小腸, 脂肪組織やマクロファージに発現し, LXR $\beta$  は, 種々の臓器に広範囲に発現する. LXR $\alpha$  欠損マウスでは, 重篤な脂質・胆汁酸代謝異常が生じることから, 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. また, 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, 動脈硬化病変形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされた. LXR $\alpha$  はヒトマクロファージに高発現しており, コレステロール逆輸送系に関わり, 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. 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に検討されていない. *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. これまで免疫染色用の良い抗体がなかったため, 細胞・組

組織発現についての詳細は不明であった。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 $\alpha$  の発現について免疫染色法、Western blot 法、Real-time PCR 法を用いて検討した。

成熟ラットにおける LXR $\alpha$  の免疫染色では、肝細胞・脂肪細胞や、肝臓のクッパー細胞・肺泡マクロファージや脾臓などのマクロファージの核が陽性であった。Western blot では成熟ラットの肺臓、肝臓、および脾臓で LXR $\alpha$  のタンパクが検出されたが心臓と腎臓では検出されず、免疫染色と一致した。以上の成績から、使用した抗ヒト LXR $\alpha$  抗体はラットにも有用であることが明らかになった。

胎仔ラットにおける免疫染色で、胎生期に初めて LXR $\alpha$  の発現がみられたのは、胎生 11 日の卵黄囊の内胚葉層である。胎生後期に肝細胞と脂肪細胞が LXR $\alpha$  陽性となった。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、これらの細胞はコレステロール排泄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、LXR $\alpha$  を含めて胆汁酸代謝に関与する核内受容体の発現は乏しいことが知られている。これらの事実は、LXR $\alpha$  の発現がラット胎生後期になって肝細胞に観察されたことと合致する。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、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。

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、その他の組織のマクロファージが LXR $\alpha$  陽性となったのはそれ以降である。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 $\alpha$  の mRNA レベルは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は多数存在し、血球の貪食能が高く、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。

成熟ラットの単球は 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。胎生初期の末梢血では原始／胎生マクロファージが循環し、胎生後期には単球が出現して徐々に増加することが知られている。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、卵黄囊に出現し、胎生マクロファージへと分化するが、本研究では LXR $\alpha$  陽性単核球は卵黄囊には見られず、胎生 16 日および 18 日の血管内に観察された。一方、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下で培養したラットの単球由来マクロファージは、細胞の成熟とともに LXR $\alpha$  の mRNA とタンパクの発現が亢進した。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た。

本研究で用いた新規抗ヒト LXR $\alpha$  抗体はラットにも使用可能であり、LXR $\alpha$  はラットの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おいて重要な役割を果たしていると考えられた。

#### (論文審査の要旨)

Liver X receptor (LXR) はオキシステロールをリガンドとしてコレステロールなどの脂質代謝調節に働く核内受容体である。従来、LXR $\alpha$  はマクロファージ、肝細胞や脂肪細胞に発現することが知られていたが、個体発生における発現については十分な検討がなされていなかった。そこで申請者は新規に作製された抗 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・組織学的発現と培養マクロファージにおける発現について検討を行った。

免疫組織学的に LXR $\alpha$  は胎生 11 日の卵黄囊内胚葉層に発現し、その後、肝、脾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 日に出現して胎生 18 日に最も多くなった。一方、肝細胞や褐色脂肪組織では胎生後期に LXR $\alpha$  が発現し、これら細胞・組織の脂質代謝機能の成熟を示唆した。次に成熟ラット単球の培養による解析を行ったところ、単球では発現しなかったが、マクロファージへの分化、成熟に伴って LXR $\alpha$  の発現が亢進した。

以上、本研究は胎生期ラット組織およびマクロファージの分化過程における LXR $\alpha$  の発現を明らかにし、本受容体が脂質代謝関連細胞の分化成熟にも重要な役割を果たしていることを示唆した点に学位論文としての価値を認める。