

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15439

研究課題名(和文)動脈硬化症初期段階における血管内膜内在性樹状細胞の役割

研究課題名(英文)The role of residual dendritic cell in the early phase of atherosclerosis

研究代表者

吉田 雅幸 (YOSHIDA, Masayuki)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：80282771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス並体接合モデル大腿動脈において高脂肪食摂取によって血管内膜に接着した白血球が内皮下浸潤に至る過程をin vivoイメージングシステムを使って観察することを試みた。血管内膜での白血球集積は観察されたが、接着から浸潤の過程は確認できなかった。従って血管内膜に接着した白血球は内皮下に浸潤せず、内膜中に集積する白血球は内在する白血球の増加によるものである可能性が示唆された。また、白血球接着を抑制すると内膜に集積する白血球増加が減少することから接着する白血球が内在性白血球の増加に関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：We examined to observe the process of leukocyte migration via adhesion on murine femoral artery in parabiosis model under high fat diet feeding. Although leukocyte accumulation was captured in intima, migration via adhesion was not seen. Thus, these results suggested that increase of residual leukocyte in intima may induce leukocyte accumulation but not migration. In addition, inhibition of leukocyte adhesion decreased leukocyte accumulation in intima suggesting that leukocyte adhesion may related in increase of residual leukocytes.

研究分野：医学

キーワード：血管炎症 高脂肪食 白血球接着 白血球集積 内在性白血球

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症は脂質などにより血管壁が障害され、傷害部位に白血球が遊走・接着する血管炎症反応によって発症・進行する。さらに接着した白血球は血管内皮下へ浸潤し、炎症性サイトカインなどを分泌することによってさらに炎症反応を増悪すると考えられている。申請者らはマウス大腿動脈における血管壁への白血球遊走・接着を生体下で観察するシステム (intravital microscopy; IVM) を構築し、生体内でリアルタイムに可視化することに成功した。このシステムを使って、動脈硬化症のモデル動物であるアポリポプロテイン E (ApoE) 欠損マウスにおいて動脈硬化巣の形成前に白血球遊走が起こることを明らかにした。さらに過剰な高脂肪食摂取による血管内膜への白血球遊走・接着現象を捉えることに成功している。また、これらのマウスでは血管内膜において集積する白血球が増加し、その白血球は単球様樹状細胞である可能性が高いことを予備的実験によって突き止めている。

これまでの培養細胞を使った研究では主に単球が血管内皮へ遊走・接着し、接着現象を経て内皮下へ遊走することや肥満した脂肪組織、移植後の肝臓、腎臓などの細動脈・静脈における末梢血白血球の組織浸潤について報告されているが、大血管、特に動脈において血管内皮に接着した白血球が内皮下へ浸潤する過程は生体下では捉えられておらず、接着した白血球が内皮下へ浸潤するかどうか定かではない。一方で動脈硬化症が進行して形成された動脈硬化巣では血管壁に常在するマクロファージの増加が報告されている。従って集積している白血球は接着した白血球の内皮下遊走のみではなく血管内膜に常在する白血球の増殖によるものである可能性が考えられる。

また、申請者らは次のような予備的データに基づいて本研究を立案した。

- ・高脂肪食摂取は血管内膜に集積する白血球を増加する。
- ・高脂肪食摂取によって内膜中で増加する白血球はコントロールマウスでも存在し、常在する。
- ・これらの集積する白血球は単球様白血球であるが、マクロファージではない可能性が高い。
- ・血管内膜に接着する白血球は好中球である。
- ・大血管において血管内膜に接着した白血球が内皮下へ浸潤する現象が生体下でのリアルタイム観察で確認されていない。

2. 研究の目的

(1) 高脂肪食摂取による血管内膜での内在性白血球の増加

血管炎症反応に伴う大血管の血管内膜への白血球浸潤について、常在する白血球増殖の関与があるのかどうかマウス大腿動脈にて検証する。常在する白血球の増殖の関与が

確認された場合には白血球遊走・接着の意義と常在する白血球増殖への関与の有無、またどのように関与するのかについても明らかにする。予備的実験から得られた結果より血管内膜に接着する白血球分画と集積する白血球分画が同一でないことが示唆されること、浸潤している白血球は野生型のコントロールマウスでもみられ、常在するものである可能性が高いこと、高脂肪食摂取によってそれらが増加することから申請者らは高脂肪食による血管内膜での白血球集積は常在性白血球の増殖に起因するものであるという仮説をたて、これを検証する (図 1)。

(2) 高脂肪食摂取による血管炎症における常在性樹状細胞の関与

常在性白血球は樹状細胞である可能性に着目し、血管炎症反応における常在性樹状細胞の役割について解明する。まず、単球様白血球が樹状細胞であるかどうか検証する。また、高脂肪食によって血管内膜に接着する白血球は好中球であるとする、集積する単球様白血球との関連が不明である。この疑問に対して、接着する白血球 (おそらく好中球) が増殖因子を分泌することにより常在する単球様樹状細胞の増加が起こる、と予想している。また、樹状細胞の増殖からマクロファージ浸潤が誘導されて動脈硬化巣の形成を促進するのではないかと仮定しており、これらの仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食摂取によって血管内膜に集積する白血球は内在性白血球の増加によるものか。

LysozymeM-eGFP (LysM) マウスは好中球が eGFP 標識されている遺伝子改変マウスである。高脂肪食によって接着する eGFP 陽性細胞の動態を観察することによって接着する白血球が内皮下へ浸潤するかどうか観察した。具体的には LysM マウスと野生型マウス (C57BL/6J、オス、7 週令) の並体結合 (parabiosis) を行った。マウスはイソフルラン (導入 4-5%v/v, 維持 1.5-2%) により麻酔し、10mg/kg カプロフェンを腹腔内投与、

0.1mg/kg プブレノフィンを皮下投与する。LysM マウス、野生型マウスそれぞれの肘下 1cm から膝下 1cm の皮膚を切開し、3-0 縫合糸でそれぞれのマウスの肘と膝を束ねる (図 1)。5-0 縫合糸で皮膚を



図 1 並体接合

縫い合わせる。術後スルファメトキサゾール

/トリメソプリンを飲水投与して感染対策をする。10 日後から高脂肪食を 4 週間負荷し、IVM にて野生型マウスの大腿動脈における白血球浸潤の観察を行った。高脂肪食摂取後の野生型マウスを麻酔後、IVM システムを使って LysM-eGFP 陽性白血球の接着から浸潤に至るまでを観察した。観察直前には気管切開し、人工呼吸器を設置した。また、野生型マウスの大腿部の皮膚を切開して大腿動脈を露出した。観察時は人工呼吸器により呼吸管理を行い、ヒートパッドにより体温を 37℃ に維持し、生理的条件下とした。1 分間白血球動態の画像を録画し、5 分後さらに録画することを 30 分間行った。録画した画像は画像解析ソフト (MetaMorph) で解析した。もし eGFP 陽性細胞が観察された場合は接着現象を介して内皮下へ浸潤したと考えられ、陽性細胞が検出できなかった場合は常在性白血球の増殖によるものであると評価する (図 2)。

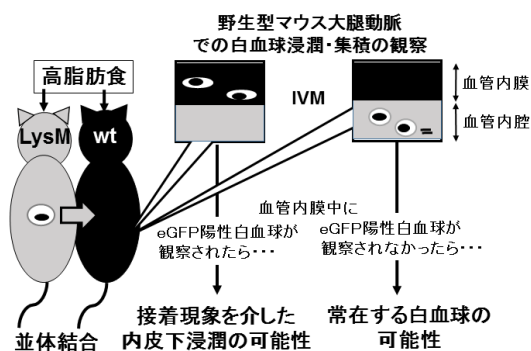


図 2 並体接合による白血球集積の評価方法

(2) 高脂肪食摂取による血管炎症における常在性樹状細胞の関与

野生型マウス (C57BL/6J; オス 7 週令) に高脂肪食あるいは普通食を 4 週間与えてリン酸バッファーを左心室より還流後、大腿動脈あるいは胸部大動脈を採取した。採取した動脈は 125 U/ml collagenase type XI, 60 U/ml hyaluronidase type I-s, 60 U/ml DNaseI, 450 U/ml collagenase type I を含む溶液に 37℃ 1 時間反応させてコラゲナーゼ処理を行い、単一細胞懸濁液とした。これらの細胞を抗 CD11b、抗 CD11c、抗 MHCclass II、抗 CCR2、抗 F4/80、抗 Ly6G、抗 CD40、抗 CD80、抗 CD86 抗体を使って染色し、フローサイトメトリー (BD FACS Calibur) を使って 10,000 個の細胞について細胞表面マーカーが陽性か陰性かを検討した。解析は FlowJo7.6 を使って行った。

(3) 白血球接着が白血球集積に影響するのか、どうか。

野生型マウス (C57BL/6J; オス 7 週令) に高脂肪食を 4 週間与え、同時に好中球中和抗体 (125ug) を 3 日ごとに腹腔内投与した。その後、リン酸バッファーを左心室より還流

後、大腿動脈あるいは胸部大動脈を採取した。採取した動脈は 125 U/ml collagenase type XI, 60 U/ml hyaluronidase type I-s, 60 U/ml DNaseI, 450 U/ml collagenase type I を含む溶液に 37℃ 1 時間反応させてコラゲナーゼ処理を行い、単一細胞懸濁液とした。これらの細胞を抗 CD45 抗体を使って染色し、フローサイトメトリー (BD FACS Calibur) を使って 10,000 個の細胞について CD45 陽性白血球数を検討した。解析は FlowJo7.6 を使って行った。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食摂取によって血管内膜に集積する白血球は内在性白血球の増加によるものか。

並体接合後約 1 週間に縫合糸が外れ、切開部が自然治癒し、他個体との接合がはずれてしまうという問題点が数多くあった。手術の完全な成功率は 10% ほどであり、実験数を増やすことが困難であった。この点については縫合糸の代用として外科用クリップを使用することが可能であれば可能性はあると考えられる。

並体接合の成功した個体の血管内膜を IVM で観察すると野生型マウスの大腿動脈には LysM-eGFP 陽性白血球は観察されなかった。従って、高脂肪食摂取による血管炎症反応において血管内膜に集積する白血球増加は接着を介した現象ではない可能性があり、これらの増加は血管内膜に常在する白血球が内膜中で増加することに起因する可能性が示唆された。

(2) 高脂肪食摂取による血管炎症における常在性樹状細胞の関与

大腿動脈に集積する白血球は CD11b 陽性、CD11c 陽性、MHCclass II 陽性、CCR2 陽性、F4/80 陰性、Ly6G 陰性、CD40 陽性、CD80 陽性、CD86 陽性であった。これらの結果から血管内膜に常在し、高脂肪食摂取で増加する白血球は単球様樹状細胞である可能性が考えられた。しかしながら、樹状細胞とは表面マーカーが似ているものの、完全に合致しないことからこれらの白血球は新しいタイプの細胞である可能性もある。

(3) 白血球接着が白血球集積に影響するのか、どうか。

好中球特異的抗体により血管内膜への白血球接着を抑制すると、高脂肪食摂取による血管内膜へ集積する白血球増加が抑制された。従って、白血球接着は血管内膜に集積する白血球増加に関与することが示唆された。

<引用文献>

①Osaka M, Hagita S, Haraguchi M, Kajimura M, Suematsu M, Yoshida M. Real-time imaging of mechanically injured femoral artery in mice reveals a biphasic pattern

of leukocyte accumulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(4):H1876-82. 2007

②Osaka M, Hagita S, Yoshida M. In vivo imaging of leukocyte recruitment to the atheroprone femoral artery reveals anti-inflammatory effects of rosuvastatin. *Biomed Res Int*. 2013:962369. 2013.

③Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbatorov R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*. 19(9):1166-72. 2013.

④Kamran P, Sereti K, Zhao P, Ali SR, Weissman IL, Ardehali R. Parabiosis in mice: a detailed protocol. *J Vis Exp*. 6;(80). 2013.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Osaka M, Ito S, Honda M, Inomata Y, Egashira K, Yoshida M. Critical role of the C5a-activated neutrophils in high-fat diet-induced vascular inflammation. *Sci Rep*. 査読有. 19:6:21391. 2016.
doi: 10.1038/srep21391.

②Ito S, Osaka M, Edamatsu T, Itoh Y, Yoshida M. Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation. *J Atheroscler Thromb*. 査読有. 1;23(8). 2016. 960-75.
doi: 10.5551/jat.34462.

③Kataoka H, Ariyama Y, Deushi M, Osaka M, Nitta K, Yoshida M. Inhibitory Effect of Serotonin Antagonist on Leukocyte-Endothelial Interactions In Vivo and In Vitro. *PLoS One*. 査読有. 11(1):e0147929. 2016.
doi: 10.1371/journal.pone.0147929.

[学会発表] (計 16 件)

①大坂 瑞子
動脈硬化巣形成における好中球細胞外トラップ (NET) の関与
第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会
2018 年

②Mizuko Osaka
Neutrophil extracellular traps (NETs) triggers atherosclerotic lesion development in high fat diet fed mice. International Vascular Biology Meeting

2018

2018 年

③Masayuki Yoshida

A novel role of neutrophils in vascular inflammation and atherosclerosis induced by high fat diet
International Vascular Biology Meeting
2018

2018 年

④Mizuko Osaka

High fat diet-triggered neutrophil activation initiates leukocyte adhesion to murine artery in vivo.
23rd Annual Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy
2018 年

2018 年

⑤Mizuko Osaka

Histone citrullination in neutrophils plays a key role in atherosclerotic plaque formation
第 1 回日本循環器学会基礎研究フォーラム
2018 年

2018 年

⑥大坂 瑞子

高脂肪食誘発性の動脈硬化巣形成には好中球細胞外トラップ形成が関与する
第 25 回日本血管生物医学会学術集会 (心血管代謝週間 2017)
2017 年

2017 年

⑦大坂 瑞子

アテローム性動脈硬化症の進展における好中球の重要性
第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会
2017 年

2017 年

⑧大坂 瑞子

動脈硬化巣形成における好中球の重要性
第三回 J-ISCP 学術集会
2017 年

2017 年

⑨大坂 瑞子

過剰な高脂肪食摂取は補体成分 C5a を増加させることによって血管炎症反応を誘導する。
脳心血管抗加齢研究会 2016
2016 年

2016 年

⑩Mizuko Osaka

Complement C5a initiate vascular inflammation by high-fat diet-feeding.
第 24 回日本血管生物医学会学術集会
2016 年

2016 年

⑪Mizuko Osaka

C5a play an important role in high fat diet-induced neutrophil activation
XXVI International Complement Workshop
2016 年

2016 年

⑫Mizuko Osaka

Complement component C5a play an important role in vascular inflammation by high fat diet-feeding via neutrophil activation.

International Vascular Biology Meeting
2016

2016年

⑬大坂 瑞子

アテローム性動脈硬化症の進展における
補体成分 C5a の役割

第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会

2016年

[その他]

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 雅幸 (YOSHIDA, Masayuki)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：80282771

(2) 研究分担者

大坂 瑞子 (OSAKA, Mizuko)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：00581711