

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09153

研究課題名(和文) 動脈硬化症の発症・進展過程における白血球浸潤の可視化

研究課題名(英文) Visualization of leukocyte migration in diagnosis and development of atherosclerosis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス大腿動脈における血管内膜への白血球接着現象から内皮下浸潤の過程を観察するためのin vivoイメージングシステムを構築した。そのシステムを駆使して高脂肪食摂取による血管内膜での白血球集積は接着した白血球が内皮下浸潤することによるものではなく内膜に常在する白血球増加による可能性を明らかにした。さらに、それらの白血球分画はCD11b陽性、CD11c陽性、MHCclass 陽性、CCR2陽性、F4/80陰性、Ly6G陰性、CD40陽性、CD80陽性、CD86陽性であり、表面マーカーとしては樹状細胞に近い表現型をもつが、新しい白血球分画の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We constructed new in vivo imaging system to observe process of leukocyte migration via adhesion on endothelium. This system did not capture the migration via adhesion, suggesting that increment of residual leukocytes may cause accumulation of leukocytes in intima. Furthermore, these leukocytes were positive for CD11b, CD11c, MHC class2, CCR2, CD40, CD80 and CD86 but not F4/80 and Ly6G, suggesting that residual leukocytes may be new cell type.

研究分野：医学

キーワード：血管炎症 白血球接着 内皮下浸潤 内在性白血球

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化症と血管炎症

動脈硬化症は脂質異常症により血管壁が障害され、傷害部位に白血球が遊走・浸潤する血管炎症反応によって発症・進行する。特に浸潤した白血球は炎症性サイトカインなどを分泌し、さらに炎症反応を増悪することが考えられている。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が報告されている。一方、血管壁に常在するマクロファージの増加の重要性が免疫染色法とフローサイトメトリーを使って示されている。これまでも肥満した脂肪組織、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の in vivo イメージングについて報告されているが、動脈硬化症に焦点を当てて内皮下遊走を観察した報告はない。また、動脈硬化病変の起こりやすい大血管を観察部位にした報告もない。

(2) 血管炎症反応における白血球接着の可視化

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、これまでに本システムを駆使して白血球遊走や接着現象の機序解明に迫る検討を多く手がけてきた。マウス大腿動脈におけるワイヤー傷害モデルでは血管内膜肥厚前に起こる白血球接着現象を捉えた。さらに、動脈硬化症のモデル動物である 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生体内でリアルタイムに可視化することに成功した (図1)。

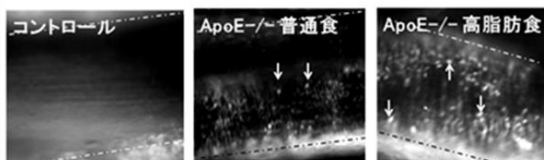


図1 大腿動脈における白血球接着現象

また、野生型マウスに高脂肪食を摂取させて、生活習慣が血管炎症反応を惹起するかどうか白血球遊走を観察したところ、高脂肪食摂取後4週間という慢性炎症の早期において白血球遊走が観察されている (図2)。

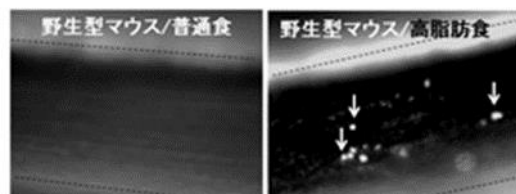


図2 高脂肪食による白血球接着

(3) 血管内膜に浸潤する白血球に対する高脂肪食の影響

さらに、高脂肪食を与えたマウスでは血管

壁内に集積する白血球が増加し、その白血球は表面マーカーの解析から内在性の単球様細胞である可能性が高いことを申請者らは確認している (未発表データ)。しかし、動脈硬化症の発症や進展において血管壁に集積する白血球は末梢血白血球が血管内膜への接着を介して血管壁内へ潜り込むことによるとする説もある。このことを含め、動脈硬化症発症初期の血管炎症反応から動脈硬化巣形成に至るまでの白血球動態について、不明な点が多い。また、この過程における接着分子、サイトカインの動態も不明である。

2. 研究の目的

(1) 白血球接着と内皮下浸潤の関係性の解明

動脈硬化症の発症・進展における遊走・接着する白血球分画の内皮下遊走と血管壁内に常在する白血球の関与について in vivo イメージングを使って検討する。マウス大腿動脈への白血球浸潤を観察するための新規 in vivo イメージングユニットの構築を行う。

(2) 浸潤白血球分画の同定

白血球分画特異的蛍光マウスや白血球分画特異的抗体を使って遊走・接着から浸潤に至る白血球分画を同定し、その系譜を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 白血球浸潤特異的観察ユニットの構築

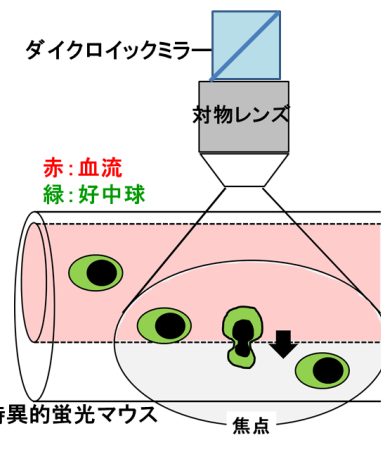


図3 白血球浸潤観察ユニットの概略
これまで白血球接着の観察の際には 20 倍の対物レンズを使用していたが、白血球の動態を観察する上でさらに詳細な動きを観察する必要があることから 40 倍の水浸レンズ (LUMPlanFL N, 40 × /0.80W ∞ /0/FN26.5; Olympus) とした。また、血管内膜への白血球接着から浸潤を観察するにあたり、内腔と内膜の境界を明瞭にする必要があることからダイクロイックミラーと蛍光顕微鏡用イメージスプリッティング光学系 (W-VIEW GEMINI; Hamamatsu Photonics) を使って同時に 2 色の蛍光画像を同時に 1 画像での撮影を可能とした。顕微鏡本体は観察部

位である大腿動脈を生理的な状態で観察するために現在使用している正立型を使用した (BX51WI ; Olympus) (図3)。

好中球特異的に GFP を発現しているマウスに高脂肪食を 4 週間与えて観察ユニットを使って好中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、大腿部の皮膚を切開して大腿動脈を露出した。観察直前に血流に蛍光色素を混入させることによって血管内腔と内膜の境界を明確にするために Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) -Dextran を大腿静脈より投与した。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。

(2) 浸潤白血球分画の同定

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 DNase I, 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) の細胞を使って 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。

4. 研究成果

(1) 白血球浸潤特異的観察ユニットの構築と浸潤白血球の生体内観察

構築した白血球浸潤観察用ユニット (図4) によって血管内膜に GFP 陽性白血球の観察が可能となり、2 色の蛍光画像を同時に 1 画像で観察が可能となった。



図4 白血球浸潤観察ユニット

血管内膜に接着した GFP 陽性細白血球、すなわち好中球は 30 分間の観察の間に内皮下へ浸潤する過程は捉えられなかった。しかしながら、観察開始時点で内膜内に存在する好中球が観察された。これらの結果から、

好中球は高脂肪食摂取により血管内膜に接着するが、内皮下浸潤には至らない可能性が考えられた。(図5)

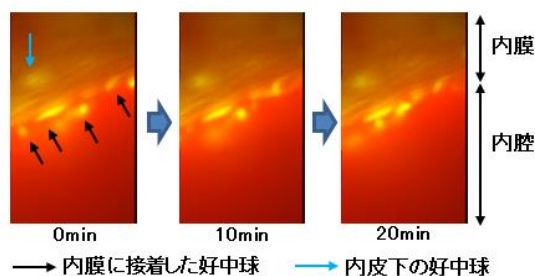
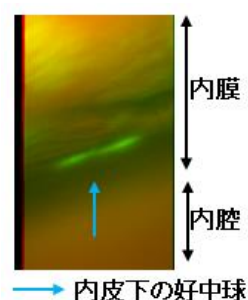


図5 接着後の白血球動態のタイムラプス観察



従って、内膜内にて観察された好中球は血管内膜に常在するものである可能性も示唆された。(図6)

図6 血管内膜で観察された好中球

(2) 浸潤白血球分画の同定

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。

<引用文献>

- ① Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbato 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.
- ② Ito S, Osaka M, Higuchi Y, Nishijima F, Ishii H, Yoshida M. Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin. *J Biol Chem.* 285(50):38869-75. 2010.
- ③ Osaka 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
- ④ Osaka 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.

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)

- ① Osaka 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.
- ② Ito 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.
- ③ Kataoka 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
- ② Mizuko Osaka
Neutrophil extracellular traps (NETs) triggers atherosclerotic lesion development in high fat diet fed mice. *International Vascular Biology Meeting 2018*
2018 年
- ③ Masayuki Yoshida
A novel role of neutrophils in vascular inflammation and atherosclerosis induced by high fat diet
International Vascular Biology Meeting 2018
2018 年
- ④ Mizuko 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

⑤ Mizuko 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

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

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

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

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

⑩ Mizuko 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

⑪ Mizuko Osaka

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

⑫ Mizuko 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

[その他]

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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