

# Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) 強制発現による マクロファージ機能の修飾と動脈硬化症進展過程に及ぼす影響

## 学位論文内容の要旨

### I. 背景

AIF-1 は、ラットのアロ慢性拒絶心に浸潤するマクロファージ系細胞に特異的に発現する遺伝子として同定された。その発現は主に単球/マクロファージ系細胞に局限している。近年、アロ移植片に限らず、様々な炎症モデルにおいても病巣局所に浸潤するマクロファージで AIF-1 の発現が亢進していることが報告されており、活性化マクロファージが関与する疾患で AIF-1 が発現することが示唆されている。

最近、動脈硬化症の進展には、血管局所の慢性炎症が大きく寄与することが明らかになりつつある。動脈硬化病巣形成においては、マクロファージの血管壁への侵入、脂質の貪食・泡沫化が、最も重要な役割を果たす。

以前、綿野らはマウス AIF-1 遺伝子を同定し、AIF-1 強制発現細胞株を樹立した。リポポリサッカライド (LPS) でこの AIF-1 強制発現細胞株を刺激すると、コントロール群と比較し、細胞形態の変化 (扁平化、偽足の進展) が著明に認められた。このことから、AIF-1 が細胞骨格に作用し、貪食能へ影響する可能性が示唆された。従って、マクロファージの浸潤、貪食が病態形成に関与する動脈硬化症において、AIF-1 が重要な役割を果たす可能性が考えられた。しかし現在まで、これまでのところ、動脈硬化病巣局所においても、AIF-1 の発現が病巣の進展にどのような影響を与えるかについては不明である。

### II. 目的

動脈硬化症と AIF-1 の関わりを明らかにする目的で、AIF-1 強制発現細胞株、および AIF-1 トランスジェニックマウス (Tgm) の腹腔細胞を用いて、AIF-1 発現の貪食能に及ぼす影響を解析する。さらに、動脈硬化モデルマウスである apolipoprotein E ノックアウト (ApoE<sup>-/-</sup>) マウスと、AIF-1 Tgm を交配して動脈硬化モデルマウス、AIF-1<sup>+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> を新たに作成し、AIF-1 強制発現の動脈硬化症に及ぼす影響を解析する。

### III. 方法と結果

1. AIF-1 発現の貪食能への直接影響を解析するため、AIF-1 遺伝子を RAW264.7 マクロファージ細胞株にトランスフェクトした。次に、FITC 標識マイクロビーズを用いて、AIF-1 過剰発現株とベクターコントロールである mock 対照群でのビーズ取り込み能の評価を行った。親株 RAW264.7, mock 群に比較して、AIF-1 過剰発現株において、マイクロビーズを取り込んだ細胞の割合が著明に増加した。

2. 個体レベルにおいても AIF-1 の過剰発現が、マクロファージの貪食能を亢進させるかを解析するために、AIF-1 遺伝子 Tgm を作成した。次に、AIF-1 Tgm と非トランスジェニックマウス (NTgm) の常在腹腔細胞、およびチオグリコレートで刺激した腹腔滲出細胞 (PEC) を用いて貪食を解析した。イムノプロット法で AIF-1 の発現量を較べると、非刺激の常在腹腔細胞では、NTgm 群と比較し、AIF-1 Tgm 群で発現増強が認められた。次に、

チオグリコレートで刺激4日後の AIF-1 Tgm の PEC においては、非刺激常在腹腔細胞と較べて、AIF-1 の発現量が著明に亢進しており、マクロファージ活性化に伴い、AIF-1 の発現が上昇することが判明した。

次に、これらのマクロファージの貪食能を見た。PEC における FITC 標識マイクロビーズの取り込みを経時的に解析したところ、NTgm 群と比較して Tgm 群で 15 分、30 分で有意にマイクロビーズの取り込み亢進が認められ、この現象は PEC における AIF-1 発現量に相関した。

3. マイクロビーズとは性状の異なる粒子の取り込みに関しても解析するため、AIF-1 Tgm 群、NTgm 群から採取した腹腔細胞を用いて、*E. coli* BioParticles の取り込みを評価した。常在腹腔内細胞に関しては、両群間で *E. coli* BioParticles の取り込みに有意な差は認められなかったが、刺激を加えた PEC の蛍光強度は、NTgm ( $366 \pm 43$  n=5)、AIF-1 Tgm ( $449 \pm 66$  n=6) となり、AIF-1 Tgm 群で有意 ( $p < 0.05$ ) に亢進していた。従って、PEC による *E. coli* の取り込みも、AIF-1 の過剰発現によって、亢進することが判明した。

4. 動脈硬化症と AIF-1 発現の関係を解析するために、AIF-1<sup>+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> マウスと ApoE<sup>-/-</sup> マウスを実験に用いた。これらの体重、血清脂質、空腹時血糖を比較して、AIF-1 を過剰発現の血清脂質代謝への影響を検討したが、体重・血清総コレステロール・中性脂肪・HDL コレステロール・空腹時血糖において、両群で有意差を認めず、AIF-1 の過剰発現は、マウス血清脂質等には、有意な変化を生じないことが判明した。

5. ApoE 欠損下の血清脂質条件下で、AIF-1 の過剰発現により、動脈硬化症の発症・進展過程にどのような影響が生ずるかを解析した。AIF-1<sup>+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>、ApoE<sup>-/-</sup> マウスに通常食を与え、生後 15 週で、動脈硬化病巣を比較検討した。Oil red O 染色を行った ApoE<sup>-/-</sup> マウスと AIF-1<sup>+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> マウス両群の動脈硬化巣の面積は計測したところ、AIF-1<sup>+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> マウス群 ( $281,893 \pm 19,846 \mu\text{m}^2$  n=21) は、ApoE<sup>-/-</sup> マウス群 ( $235,386 \pm 20,439 \mu\text{m}^2$  n=18) と比較して、有意に病巣が増大しており ( $p < 0.05$ )、AIF-1 の過剰発現は動脈硬化病巣の進展に関与していると考えられた。

6. AIF-1 高発現マクロファージ系細胞の貪食能亢進と、AIF-1 過剰発現によるマウス動脈硬化の進展の二つの現象の関連性をより直接的に解析するため、AIF-1 過剰発現細胞で脂質の取り込み亢進が認められるかを検討した。AIF-1 過剰発現株と mock に Dil 標識アセチル化 LDL (Dil-AcLDL) を加え、これらの取り込みを FACS 解析した結果、AIF-1 過剰発現マクロファージ細胞株では、mock と比較して、全体として AcLDL の取り込みが亢進していた。また、これら AcLDL が、実際に細胞内に取り込まれていることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。

#### IV. 考察

以上の結果から、AIF-1 の動脈硬化促進のメカニズムとして、炎症局所で活性化したマクロファージにおいて、AIF-1 の発現増強が誘導され、その結果、脂質取り込み亢進から、動脈硬化病巣の進展が観察されたと推定した。動脈硬化症は多因子が複雑に関係する病態であり、マクロファージ系細胞における、短期的な貪食能亢進のみで、病巣進展のメカニズムを全て説明することは困難と考えられる。しかし、AIF-1 の発現増強が動脈硬化進展に関与し得ることが本研究により初めて示されたことから、AIF-1 が今後、新規の治療標的となる可能性が示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 川 口 秀 明

## 学位論文題名

### Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) 強制発現による マクロファージ機能の修飾と動脈硬化症進展過程に及ぼす影響

AIF-1 は、ラットのアロ慢性拒絶心に浸潤するマクロファージ系細胞に特異的に発現する遺伝子として同定され、その発現は主に単球/マクロファージ系細胞に限局している。近年、アロ移植片に限らず、様々な活性化マクロファージが関与する疾患で AIF-1 が発現することが示唆されている。

以前、AIF-1 強制発現細胞株を、リボポリサッカライドで刺激すると、コントロール群と比較し、細胞形態の変化が著明に認められ、AIF-1 が細胞骨格に作用し、貪食能へ影響する可能性が示唆された。従って、マクロファージの浸潤、貪食が病態形成に関与する動脈硬化症において、AIF-1 が重要な役割を果たす可能性が考えられたが、これまでのところ、AIF-1 の発現が動脈硬化病巣の進展にどのような影響を与えるかは不明である。

このため、動脈硬化症と AIF-1 の関わりを明らかにする目的で、AIF-1 強制発現細胞株、および AIF-1 トランスジェニックマウス (Tgm) の腹腔細胞を用いて、AIF-1 発現の貪食能に及ぼす影響を解析した。さらに、apolipoprotein E ノックアウト (ApoE<sup>-/-</sup>) マウスと、AIF-1 Tgm を交配して動脈硬化モデルマウス、AIF-1<sup>+</sup>ApoE<sup>-/-</sup>、を新たに作成し、AIF-1 強制発現が動脈硬化症に及ぼす影響を解析した。

まず、AIF-1 発現の貪食能への直接影響を解析するために、FITC 標識マイクロビーズを用いて、AIF-1 過剰発現株とベクターコントロールである mock 対照群でのマイクロビーズ取り込み能の評価を行ったところ、AIF-1 過剰発現株において、マイクロビーズを取り込んだ細胞の割合が著明に増加していた。

次に、個体レベルにおいても AIF-1 の過剰発現が、マクロファージの貪食能を亢進させるかを解析するために、AIF-1 Tgm と非トランスジェニックマウスの常在腹腔細胞、およびチオグリコレートで刺激した腹腔滲出細胞 (PEC) を用いて貪食を解析した。チオグリコレートで刺激 4 日後の AIF-1 Tgm の PEC においては、非刺激細胞と較べて、AIF-1 の発現量が著明に亢進しており、ビーズの取り込みも、Tgm 群で有意に亢進が認められ、PEC における AIF-1 発現量に相関した。また、*E. coli* BioParticles の取り込みを評価したとこ

ろ、常在腹腔内細胞に関しては、両群間で *E. coli* の取り込みに有意な差は認められなかったが、刺激後の PEC の蛍光強度は、AIF-1 Tgm 群で有意に亢進していた。

次に、AIF-1<sup>+</sup>ApoE<sup>-</sup>マウスと ApoE<sup>-</sup>マウスを実験に用いた。これらの体重・血清総コレステロール・中性脂肪・HDL コレステロール・空腹時血糖において、両群で有意差を認めず、AIF-1 の過剰発現は、マウス血清脂質等には、有意な変化を生じないことを確認し、両群マウスの動脈硬化病巣を比較検討した。動脈硬化巣面積は、AIF-1<sup>+</sup>ApoE<sup>-</sup>マウス群で有意に病巣が増大しており、AIF-1 の過剰発現は動脈硬化病巣の進展に関与していると考えられた。

AIF-1 高発現マクロファージ系細胞の貪食能亢進と、AIF-1 過剰発現によるマウス動脈硬化の進展の関連性を解析するため、AIF-1 過剰発現株と mock に DiI 標識アセチル化 LDL (DiI-AcLDL) を加え、FACS 解析した結果、AIF-1 過剰発現細胞株では、AcLDL の取り込みが亢進しており、実際に、AcLDL が細胞内に取り込まれていることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。

以上の結果から、AIF-1 の動脈硬化促進のメカニズムとして、炎症局所で活性化したマクロファージにおいて、AIF-1 の発現増強が誘導され、その結果、脂質取り込み亢進から、動脈硬化病巣の進展が観察されたと推定された。

口頭発表後、主査の筒井教授より組織へ AIF-1 誘導するメディエーターについて、副査の川口教授よりマウス腹腔細胞における AcLDL の取り込みの検討について、小野江教授より AIF-1 Tgm の免疫学的な特徴についての質問があったが、いずれの質問に対しても申請者は、自身の予備実験の結果や、他の報告を引用して、適切に回答した。

本研究は、AIF-1 の発現増強が動脈硬化進展に関与し得ることを初めて示したことで高く評価され、今後 AIF-1 が新規の治療標的として期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価して、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。