

学 位 論 文

Doctor's Thesis

マウス胎生期におけるクラス A スカベンジャー受容体 I, II 型
(CD204)の発現はアポトーシス細胞の処理に必須ではない

(Expression of class A scavenger receptor type I,II (CD204) is not essential
in the clearance of apoptotic cells in mouse embryo)

菰 原 義 弘

Yoshihiro Komohara

指導教員

竹屋 元裕 教授

熊本大学大学院 医学研究科 博士課程 病理学第二

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：マウス胎生期におけるクラス A スカベンジャー受容体 I, II
型 (CD204) の発現はアポトーシス細胞の処理に
必須ではない
(Expression of class A scavenger receptor type I, II (CD204) is
not essential in the clearance of apoptotic cells in mouse embryo)

著者名：菰原 義弘
(Yoshihiro Komohara)

指導教員名：病理学第二講座担当教授 竹屋 元裕

審査委員名：造血発生学分野担当教授 小川峰太郎
分子病理学講座担当教授 山本 哲郎
病理学第一講座担当教授 伊藤 隆明
免疫識別学講座担当教授 西村 泰治

2005年3月

目 次

要旨	1
発表論文リスト	2
謝辞	3
略語一覧	4
第1章：研究の目的と背景	5
第2章：材料と方法	
I: 動物	9
II: 抗体	9
III: 免疫染色	9
IV: 透過電子顕微鏡	12
V: 免疫電子顕微鏡	13
VI: TUNEL 染色	14
第3章：結果	
I: マウス胎生期における CD204 の発現	15
II: CD204 欠損マウス胎仔におけるアポトーシス細胞処理	18
III: CD204 欠損マウス胎仔のマクロファージにおける CD36 の発現増加	20
IV: マウス発生初期における未熟間葉系細胞のアポトーシス 細胞処理への関与	20
第4章：	
I: 考察	25
II: 結語	27
第5章：参考文献	28

要旨

【目的】アポトーシスは胎仔期の形態形成に重要な役割を果たしており、アポトーシスに陥った細胞はマクロファージ(M ϕ)によって貪食・処理されることが知られている。Class A scavenger receptor type I, II (CD204)は変性低比重リポ蛋白(LDL)をリガンドとするスカベンジャー受容体ファミリーに属し、主に M ϕ に発現している受容体である。CD204 は変性 LDL の他に細菌、advanced glycation end products、 β アミロイドなどの陰性荷電分子をリガンドとするが、近年、アポトーシス細胞の処理にも関与することが分かってきた。しかし、これまで胎生期における CD204 の発現とその機能に関する研究はなされていない。そこで、本研究では、胎生期における CD204 の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】野生型および CD204 欠損マウスの胎仔を用いて主に免疫組織化学的手法と電子顕微鏡的手法を用いて検索を行った。

【結果】M ϕ は、マウスでは胎生 9.5 日(E9.5)に初めて胎仔組織内と卵黄嚢に発現し、その後徐々に増加する。我々の検索では、CD204 は M ϕ が出現する初期から殆ど全ての M ϕ の細胞膜に発現していた。趾間形成過程ではアポトーシス細胞を貪食する M ϕ が多数出現し、その大多数に CD204 が強く発現されており、CD204 がアポトーシス細胞の処理に関与すると考えられた。しかし、CD204 欠損マウスの検討で趾間形成をはじめとする形態形成に異常は認められなかった。そこで、アポトーシス細胞の認識に関与する受容体の一つである CD36 の免疫染色を行ったところ、CD204 欠損胎仔の M ϕ には CD36 が野生型に比べて高発現していた。M ϕ はアポトーシス細胞の処理に重要な役割を果たしているが、M ϕ が出現する以前にも多数のアポトーシス細胞が存在する。そこで、M ϕ が出現する以前の胎仔組織を電子顕微鏡的に観察すると、それらの細胞は未熟な間葉系細胞であった。アポトーシス細胞の処理に関して、定量的な解析を行うと、胎生が進むにつれてアポトーシス細胞処理における M ϕ の関与が大きくなった。

【考察】マウス胎生期では、発生初期の未熟 M ϕ においても既に CD204 の発現が確認され、CD204 が M ϕ にとって重要な役割を有することを示している。CD204 は胎生 M ϕ の細胞膜に発現しており、アポトーシス細胞を貪食している M ϕ に強陽性を示すことから胎生期におけるアポトーシス細胞の処理に深く関与する考えられた。CD204 欠損胎仔では趾間形成を含む形態形成に障害が見られなかったが、その理由として CD36 等の他の受容体によってアポトーシス細胞の処理が代償されたものと考えられた。また、胎生初期におけるアポトーシス細胞の処理には、M ϕ ではなく未熟間葉細胞が主に関与し、M ϕ が出現する胎生中期以降は未熟間葉細胞から M ϕ へとその役割が移行すると考えられた。

発表論文リスト

Komohara Y, Terasaki Y, Kaikita K, Suzuki H, Kodama T, Takeya M.
Clearance of apoptotic cells is not impaired in mouse embryos deficient in class A scavenger receptor types I, and II (CD204)
Dev Dyn. 232:67-74, 2005

Hori M, Satoh M, Furukawa K, Sakamoto Y, Hakamata H, Komohara Y, Takeya M, Sasaki Y, Miyazaki A, Horiuchi S.
Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) is responsible for elevated intestinal ACAT activity in diabetic rats.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24:1689-1695, 2004.

Sakashita N, Miyazaki A, Chang CC, Chang TY, Kiyota E, Satoh M, Komohara Y, Morganelli PM, Horiuchi S, Takeya M.
Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) is induced in monocyte-derived macrophages: in vivo and in vitro studies.
Lab Invest. 83:1569-1581, 2003.

謝辞

本研究は、熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野（旧病理学第二）、竹屋元裕教授の指導の下行いました。研究においては勿論、多面に渡り御指導頂き、深く感謝いたします。

東京大学先端科学技術研究センターの児玉龍彦教授、帯広畜産大学原虫病研究センターの鈴木宏志教授には、マクロファージスカベンジャー受容体ホモ欠損マウスを御供与頂きました。熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野の中川雄伸氏、中村治氏、清田恵美氏、菰原（旧姓田中）真紀子氏には、組織切片作製・免疫染色・電子顕微鏡標本作製・PCR 等の実験手技について御指導頂きました。高橋潔名誉教授、宮川和久先生、坂下直実先生、寺崎泰弘先生をはじめその他の細胞病理学の教官、教室員の皆様には日頃から御助言・御協力を頂きました。

皆様に心より感謝いたします。

略語一覽

LDL: low density lipoprotein

LOX-1: lectin-like oxidized LDL receptor -1

ABC1: adenosine triphosphate-binding cassette protein

PCR: polymerase chain reaction

PLP: periodate-lysine-paraformaldehyde

PFA: paraformaldehyde

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

AGE: advanced glycation end products

第1章

研究の目的と背景

マウスでは、胎生 9.5 日に卵黄嚢と胎仔内に初めてマクロファージ (M ϕ) が出現する。M ϕ はその後、日齢の増加と共に数も増加し、肝臓・脾臓・骨髄中に確認される(Moore and Metcalf, 1970; Cline and Moore, 1972; Morris et al, 1991)。これらの M ϕ は、分裂能を有し単球を経由しない M ϕ で、Primitive/fetal macrophage と呼ばれており、単球由来の M ϕ とは異なる性質を有していると言われている(Takahashi et al., 1989、Shepared et al., 2000; 表 1)。

表 1 : 胎生期における2種類のマクロファージの比較

Fetal macrophages	Adult macrophages
Arise during yolk sac hematopoiesis (E9)	Arise during fetal liver hematopoiesis (E14)
Are not monocytes-derived	Are monocyte-derived
Have no peroxidase activity	Have peroxidase activity
Have proliferative capacity	Have no proliferative capacity
Have phagocytic capacity	Have phagocytic capacity

(Shepared et al., 2000を一部改変)

Fetal macrophageは、単球が出現する以前から、卵黄嚢・胎児内に出現している。一方、Adult macrophageは肝造血が始まり単球が出現し始めてから、胎児内に確認される。これらの2種類のM ϕ は、形態的には酷似しているが、PO活性、増殖能の有無がことなる。Fetal macrophageは、胎生期以降も増殖し続け、在住M ϕ となるとも言われている。

胎生期には、多くの細胞がアポトーシスに陥ることで、胎仔の形態形成に関与しており、M ϕ はそれらのアポトーシス細胞を貪食・処理することで胎生期における胎仔形成に重要な役割を果たしている(Shepared and Zon, 2000)。M ϕ によるアポトーシス細胞の認識に関与する受容体については近年多くの分子が同

定されている (reviewed by Platt et al., 1998; Geske et al., 2002: 図 1)。主に Mφ に発現する受容体で、変性 LDL を認識する受容体として最初に発見された class A scavenger receptor types I and II (CD204)にもアポトーシス細胞を認識する作用があることが報告されている。すなわち、CD204 欠損マウスの胸腺由来の Mφ を培養し、アポトーシス細胞を貪食させると、正常マウス由来の Mφ と比較して 50%程度の貪食能しか示さない(Platt et al., 1996; 図 2)。しかし、in vivo の実験系では、CD204 欠損マウスでは Mφ による明らかな貪食能の低下は認められなかったと報告されている(Platt et al., 2000)。

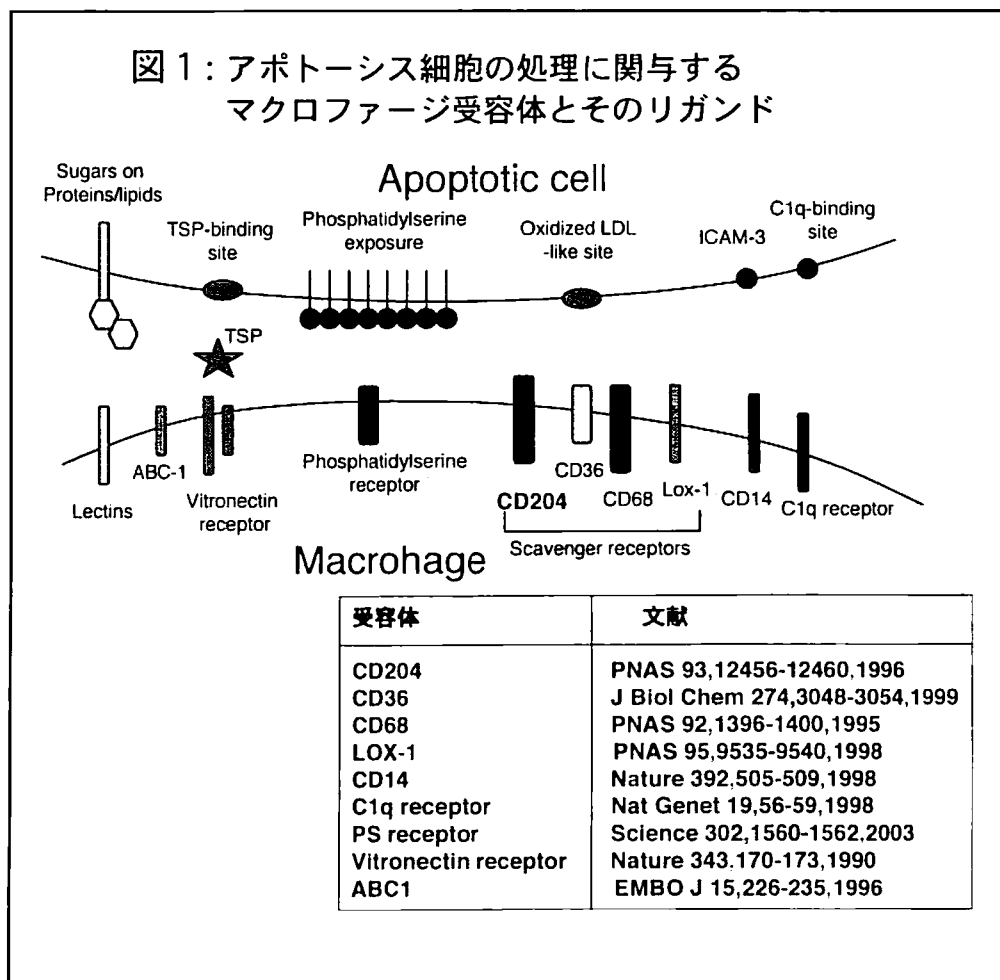
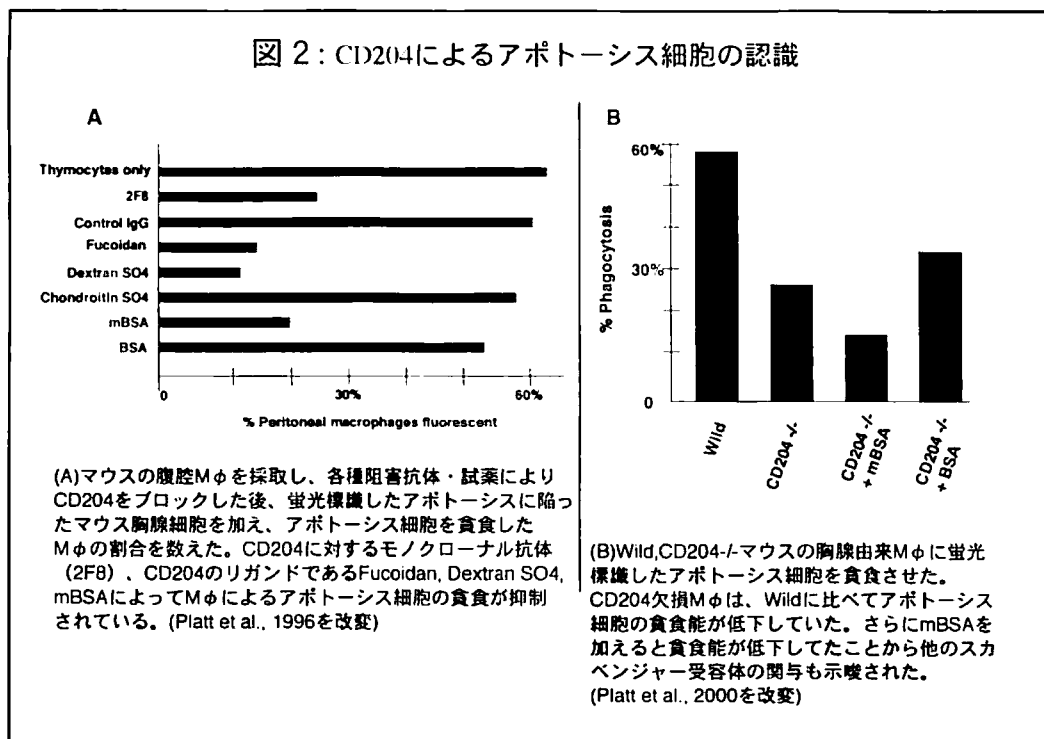


図 2 : CD204によるアポトーシス細胞の認識



成熟マウスにおいて、CD204 は一部の例外はあるが、主に Mφ に発現している事が知られている(Hughes et al., 1995)。マウスの胎生期においては、CD204 は E9.5 以降に mRNA が発現し、その発現はアポトーシス細胞を貪食している Mφ に特異的だとする報告がある(Lichanska et al., 1999)。この報告は、CD204 がマウス胎生期において、アポトーシス細胞の貪食に深く関与していることを示しているが、CD204 欠損マウスでは胎仔期や出生後の発育異常や奇形は見られない(Suzuki et al., 1997)。しかしながらこれまで、胎仔期における CD204 の発現細胞の同定と、CD204 欠損マウス胎仔での形態形成について詳細な報告はなされていない。そこで、我々は、マウスの胎生期におけるアポトーシス細胞の貪食・処理と CD204 の関連性を検討するために主に免疫組織化学的、電子顕微鏡的手法を用いて検討を行った。

加えて、これらの一連の実験において、胎生初期、特に Mφ が殆ど存在しない時期においてもアポトーシス細胞が出現し、貪食・処理されていることに気

付き、さらに電子顕微鏡による観察で、胎生初期におけるアポトーシス細胞の処理に関わる細胞が M ϕ ではなく未熟な間葉系細胞であることを見出した。これまで、胎生期におけるアポトーシス細胞の貪食・処理には M ϕ のみが注目されてきたが、我々の検討では、必ずしも M ϕ だけでは無く M ϕ 以外の細胞（特に未熟間葉細胞）も重要な役割を果たしていることが示唆された。

第2章

材料と方法

動物

ICR (Clea Japan), C57BL/6J, CD204-knock out マウス (C57BL background; Suzuki et al., 1997)を使用した。10-15 週齢の上記マウス雄 2 匹雌 1 匹を夜 9 時前後に同一ケージに入れて、朝 6 時頃に Plug の有無を確認した。Plug が確認出来たその日の正午を胎生 0.5 日(E0.5)とし、E8.5 から E14.5 の胎仔を取り出した。

抗体

実験に使用した抗体は、認識抗原、使用倍率、入手先を表 2-1 に示した。

免疫染色

マウス胎仔・卵黄嚢を PLP 固定液で 4 時間～overnight 固定し、10%、15%、20% シュクロース溶液で置換後、OCT compound で包埋した。クリオスタットで 6 μ m の厚さで切り、スライドグラスにのせた後、30 分以上風乾後免疫染色の操作に移った。一般的に、糖鎖抗原の場合は PLP 固定液の方が染色しやすいと言われているが、CD204 の場合は 4%PFA と PLP の両者を検定した結果、PLP の方が染色具合が良好だった。PBS で洗浄後、5%正常動物血清/PBS (動物血清は二次抗体の動物と同じ動物種を使用)で室温 20 分反応させて、非特異反応をブロックし、一次抗体を 4 $^{\circ}$ C overnight で反応後、PBS で洗浄した後二次抗体を室温で 30 分～60 分反応させた。PBS で十分に洗浄した後、DAB で発色させ、蛍光の場

合は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。固定液の作成法と免疫染色のプロトコールは図3及び図4に示した。

表2：実験に使用した一次抗体及び二次抗体

一次抗体

抗体	認識抗原	種類, 希釈倍率	入手先
2F8	Mouse CD204	Rat, mono, x1	Serotec. Ltd
F4/80	(Macrophages)	Rat, mono, x1	Serotec. Ltd
c-fms	Mouse M-CSF receptor(Macrophages)	Rabbit, poly, x1000	Upstate Biotec.
CD36(clone 63)	Mouse CD36	Mouse, mono, x1000	Cascade Bio.
FA-11	Mouse CD68 (Macrophages)	Rat, mono, x100	Serotec. Ltd
BM8	(Macrophages)	Rat, mono, x50	BMA

二次抗体

Anti-	ラベル	種類, 希釈倍率	入手先
ラット	PO (polymer)	Goat, poly, x2	Nichirei
ウサギ	PO (polymer)	Goat, poly, x2	Nichirei
マウス	PO (Envision)	Goat, poly, x2	DAKO
ラット	Alexa 488 (Green)	Goat, poly, x500	Molecular Probe
ウサギ	Alexa 546 (Red)	Goat, poly, x500	Molecular Probe

図 3 : PLP 固定液

固定液の作り方

0.1M Phosphate buffer (PB) pH7.4
Na₂HPO₄ · 12H₂O: 28.7g + NaH₂PO₄ · 2H₂O: 3.3g / DW 1L

0.01M Phosphate buffered saline (PBS) pH7.2
Na₂HPO₄ · 12H₂O: 28.7g + NaH₂PO₄ · 2H₂O: 3.3g + NaCl 85.0g/DW10L.

○ PLP 液

保存液 A: 0.2M L-リジン塩酸塩に 0.1M Na₂HPO₄ を加えて pH7.4 にする。0.1M PB を加えて 0.1M リジン塩酸塩にする。(4℃10 日 保存可)

保存液 B: 8% PFA/ DW (60℃で攪拌しながら溶かす。NaOH を数 滴加える)

使用直前に A 液と B 液を 3:1 の割合で混合し、過ヨウ素酸ナトリ ウムを 0.01M (21.4mg/10ml)加え、溶解する。

組織 (5mm~1cm 角の場合) - 4~6 時間 4℃で固定。

図 4 : 免疫染色プロトコール

免疫染色プロトコール

1. 薄切、風乾 (30min)
2. Washing in PBS
3. 内因性阻害 (Isobe 法)
 - 1) オルト過ヨウ素酸 Orthoperiodic acid [162-00732;WAKO]
114mg/ 100ml DW 10min at room temperature
 - 2) Washing in PBS
 - 3) 水酸化ホウ素ナトリウム Sodium Borohydride [312-28; nacalai]
11.4mg/ 100ml DW 30min at room temperature
4. Washing in PBS
5. Blocking 5% normal animal serum / 0.5%BSA/PBS 20min at RT
(animal: 二次抗体を作った動物)
6. Primary antibody 1hour at RT or on ice overnight
表 1 参照
7. Washing in PBS 5min x3
8. Second antibody
表 2 参照
9. Washing in PBS 5min x3
10. 発色
DAB 30mg/ 150ml TBS(pH7.6) + H₂O₂ 30 μl
11. 核染(Hematoxylin 5sec)、透徹、封入

透過電子顕微鏡

E9.5 と E10.5 のマウス胎仔を 2.5% Glutaraldehyde / 0.1M Cacodylate buffer で 1 時間固定後、細切し、1% Osmium tetroxide で 1 時間後固定した後、70%、80%、90%、100% アルコールで十分に脱水した。Propylene oxide、Epon 812 で置換した後、0.1 μ m の厚さで薄切、Uranyl acetate 20min, Lead citrate 5min 染色した後、Hitachi H-7500 電子顕微鏡にて観察した (図 5)。

図 5: 透過電子顕微鏡プロトコール

透過電子顕微鏡プロトコール				
1. 固定				
2.5% glutaraldehyde/0.1M Cacodylate buffer (CB, PBS でも可) 60min on ice				
2. Washing in CB 5min×3 (on ice)				
3. 1% OsO ₄ 固定 60min (at room temp)				
4. 0.1M CB かるく				
5. 脱水 on ice				
70%アルコール 10min 80% 10min 90% 10min 100% 30min 100% 30min				
100%アルコール+1vol Propyleneoxide 30min				
Propyleneoxide 30min				
Propyleneoxide + 1vol Epon 3h~overnight				
Epon overnight				
6. Epon 包埋、重合				
Epon (Epon 40°C 1day, Epon 60°C 1day)				
7. 超薄				
8. 電子染色				
9. Uranyl acetate 20min, Lead citrate 5min				
Epon の作り方	Epok 812	DDSA	MNA	DMP30
軟 (冬) ↑ ↓ 硬 (夏)	23.1	15.2	11.8	0.75
	23.9	12.1	14.1	0.75
	24.4	9.0	16.5	0.75
	25.1	6.0	18.9	0.75

免疫電子顕微鏡

E10.5 の胎子を 4%PFA で固定、8 μ m の厚さで薄切、風乾、洗浄、ブロッキング後一次抗体を 12 時間 4 $^{\circ}$ C で反応させた。洗浄後、二次抗体を 6 時間 4 $^{\circ}$ C で反応させ、0.5% GA で後固定を行い、顕微鏡で観察しながら DAB の反応、オスミウム酸で固定後アルコール脱水し、Epon に置換した。超薄切片を Lead citrate で 1min 染色してから観察した。(図 6)

図 6: 免疫電子顕微鏡プロトコール

免疫電子顕微鏡プロトコール

1. 8 μ m の厚さで薄切、風乾 (30min)
2. Washing PBS 5min \times 3
3. 非特異反応阻害
5% normal goat serum/PBS 20min
4. 一次抗体
F4/80, 2F8 12hr on ice
5. Washing
6. 二次抗体
Goat anti-rat IgG -PO rebelled 6hr on ice
7. Washing
8. 再固定
0.5%GA 5min on ice
9. Washing
10. 発色
DAB 30mg+ 0.05M TB (pH7.6) 150ml
(濾過する) 5-10min
11. Washing
12. 後固定
1%OsO4 30min on ice
13. 脱水
70%、80% 3min、
90% 10min-overnight (on ice)
100%アルコール 10min \times 2 (室温)
- 14 Epon で包埋

TUNEL 染色

アポトーシスに陥った細胞は、電子顕微鏡、光学顕微鏡的に濃縮・断片化した核、細胞質の消失によって認識される。断片化した染色体を認識する際には、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase –mediated dUTP nick end –rebellng)法で行い (図7)、この実験では、Intergen 社の ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit を使用した。

図7:TUNEL 染色プロトコール

TUNEL Stain

Intergen company “Apop Taq Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit”
#S7100

1. ホルマリン固定→パラフィンで包埋
2. Xylene 5min x2 →100%,90%,80%,70% EtOH 3min each
3. PBS 5min
4. Proteinase K (20 μ g/ml) 15min at room temp (DAKO proteinase K ready-to-use No. S3020 でも可)
5. Washing DW
6. 2-3% hydrogen peroxide in PBS 5min at room temp
7. Washing in PBS
8. 1x Equilibration Buffer 15sec 以上 at RT plastic coverslip を使う
9. WORKING STRENGTH TdT Enzyme---54 μ l (実際は 40 μ l / slide で良い)
Incubate for 1 hour at 37°C
(TdT enzyme to reaction buffer is 1:2) 1:3 でも OK
10. WORKING STRENGTH STOP BUFFER 10min at RT
11. Washing in PBS
12. Anti-DIG peroxidase x 1 (plastic coverslip を使う)
1hour at RT
13. PBS x3
14. DAB/ TBS (30mg/150mlTBS) 5-10min
15. Hematoxylin 1min
16. 水洗 5min、
17. 脱水
18. xylene 置換、封入

第3章

結果

マウス胎生期における CD204 の発現

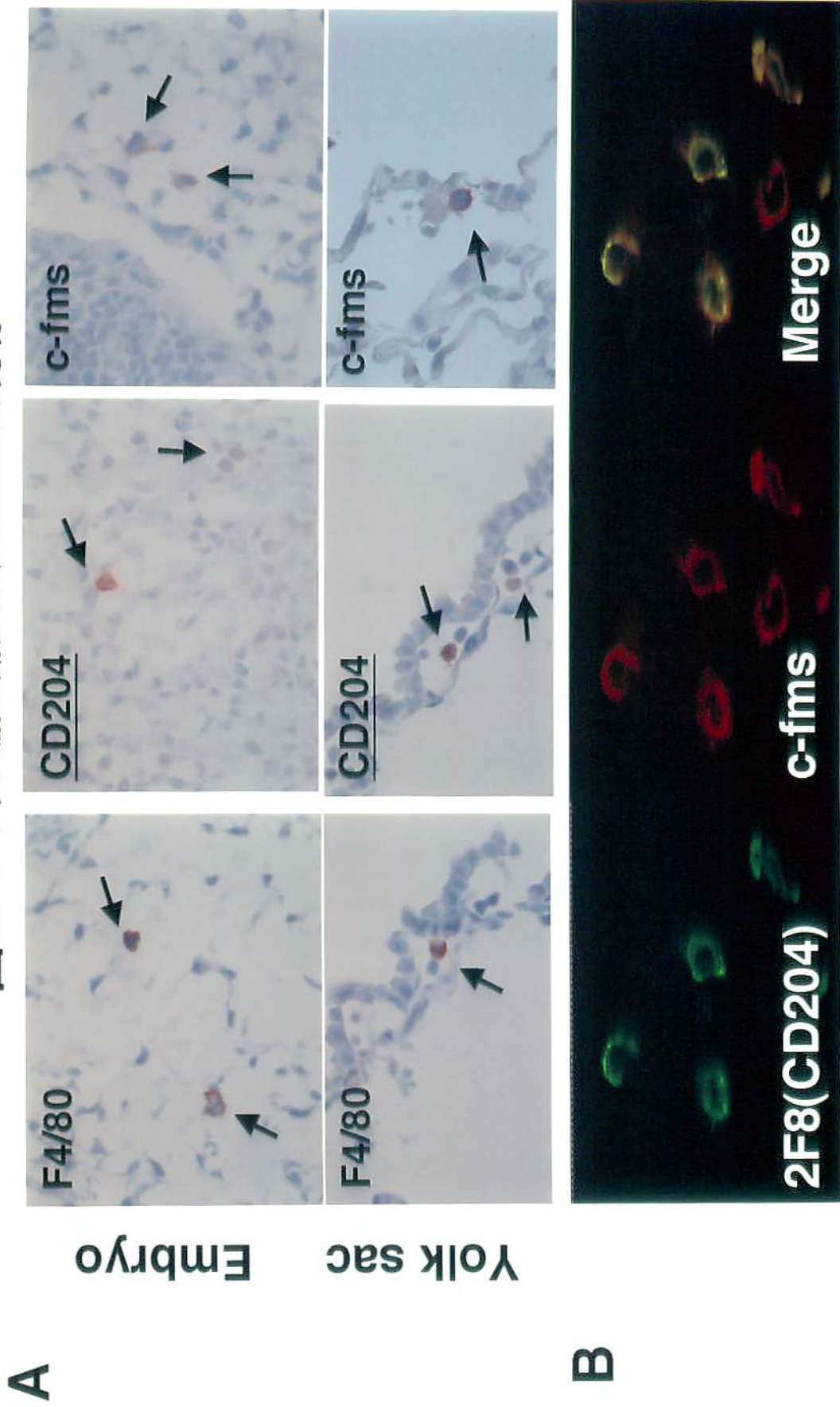
マウス M ϕ マーカーとして、F4/80 (Emr 1 antigen; Morris et al., 1991) と c-fms (CD115, M-CSF receptor; Lichanska et al., 1999) を利用し、CD204 に対するモノクローナル抗体として 2F8 を使用した。しかし、C57Black 系統では CD204 遺伝子に点突然変異があり、2F8 が反応しないため (Daugherty et al., 2000)、胎生期における CD204 の発現を検討するために ICR 系統のマウスを使用した。

E8.5 の胎仔・卵黄嚢では、何れの抗体でも陽性像は確認出来ず、E9.5 で初めて M ϕ マーカーである F4/80・c-fms に陽性の細胞が卵黄嚢の血島と胎仔の軟部組織に僅かに出現し、またそれらの M ϕ は 2F8 にも陽性であった (図 8 A)。また、この時期の M ϕ にアポトーシス細胞の貪食像は認められなかった。

E10.5 の卵黄嚢・胎仔の免疫染色では、E9.5 と比較してさらに多くの F4/80, c-fms 陽性 M ϕ が出現しており、殆どの M ϕ に CD204 が発現していることが蛍光二重染色で確認出来た (図 8 B)。これらの細胞は、FA11 (anti-mouse CD68) や BM8 にも同様に陽性であった。この時期の M ϕ には、アポトーシス細胞の貪食像が見られ、E9.5 に比べて豊富な胞体を有しており CD204 の発現も強かった。免疫電子顕微鏡による観察でも、CD204 は細胞突起や豊富な細胞内小器官を有する M ϕ の特徴を示す細胞の細胞表面に発現しており、それらの細胞は、アポトーシスに陥った細胞断片を貪食していた (図 9 A)。

E11.5 以降も、各臓器・軟部組織に多くの M ϕ が確認され、アポトーシス細胞が集簇している部分には多くの M ϕ が集り、アポトーシス細胞の処理を

図 8 : マウス胎生期におけるCD204の発現



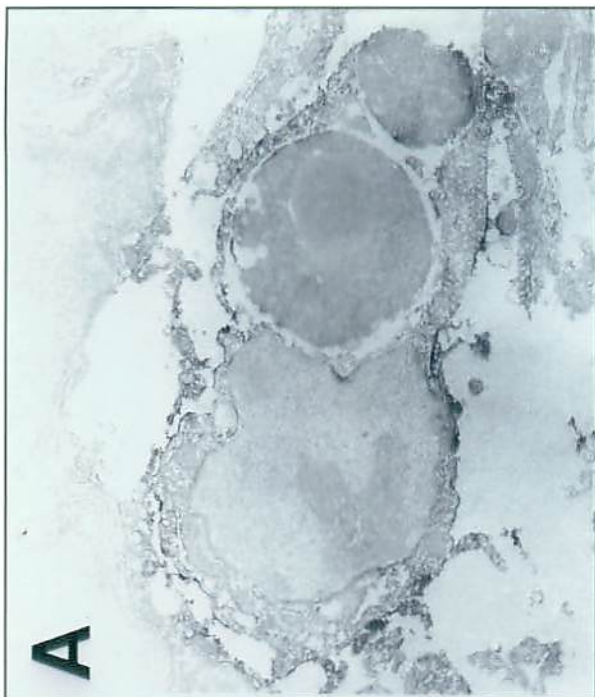
A: 免疫染色では胎生9.5日で初めて胎仔組織と卵黄嚢にF4/80、c-fms、CD204発現細胞が確認出来た。

B: 胎生10.5日での二重染色では、殆どのc-fms陽性細胞にCD204が発現していた。

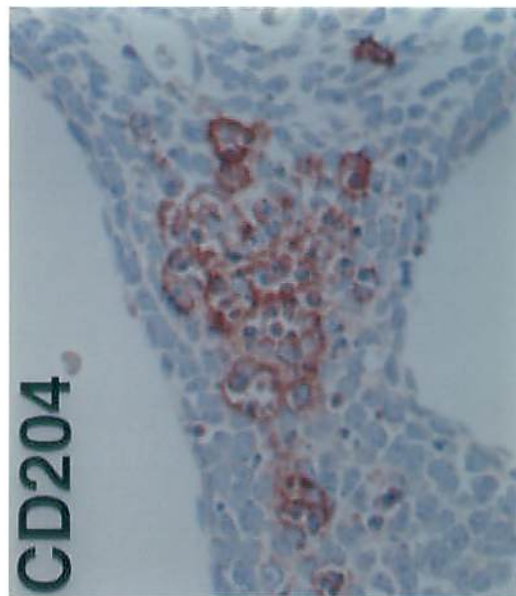
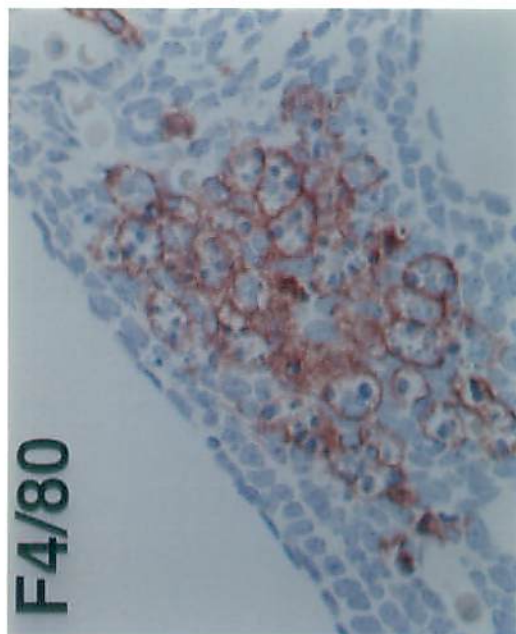
図9：マウス胎生期におけるアポトーシス細胞処理とCD204の関与

A: 胎生10.5日のMφを2F8で免疫染色後、電子顕微鏡で観察を行った。Mφの多くはアポトーシス細胞を貪食していた。Mφの細胞膜に2F8の陽性像が見られた。

B: 胎生13.5日のマウス胎仔の手をF4/80と2F8で免疫染色した。趾間組織にはアポトーシス細胞を取り込んだ多数のMφが集簇しており、殆どのMφは2F8に強く反応していた。



B



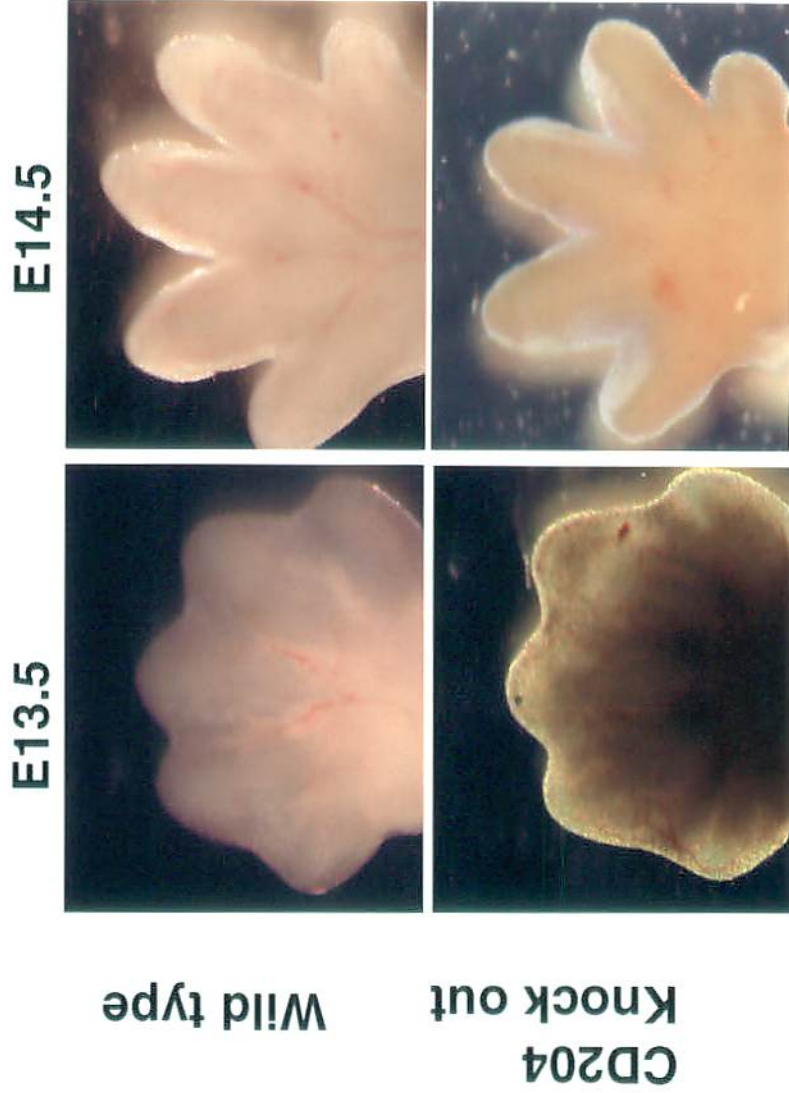
行っていた。E12.5 から E14.5 にかけて、胎仔の趾間組織では、趾間の間葉細胞がアポトーシスに陥り、M ϕ に貪食処理されることで趾間形成が行われる。E13.5 での免疫染色では、趾間組織にアポトーシス細胞が多数認められ、多数の F4/80 陽性 M ϕ がそれらを貪食している像が見られた (図 9 B)。さらに、それらの M ϕ は、CD204 にも強陽性を示していた (図 9 B)。この時期は肝造血が開始される時期でもあり、肝でも多数の細胞がアポトーシスに陥るが、CD204 陽性の M ϕ がそれらを貪食している所見が見られた。このような観察結果から、我々はマウスの胎仔形成過程においても M ϕ によるアポトーシス細胞の処理には CD204 が深く関与しているのではないかと考えた。

CD204 欠損マウス胎仔におけるアポトーシス細胞処理

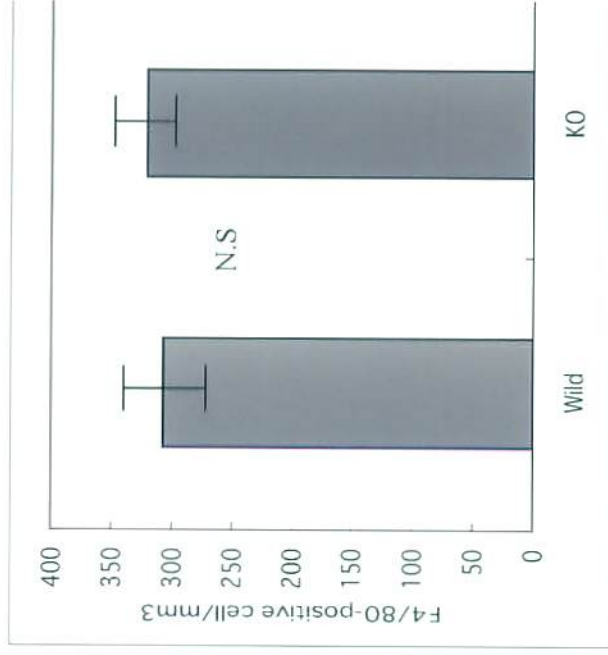
マウス胎生期におけるアポトーシス細胞の処理に CD204 が関与するかどうかを明らかにするために、CD204 欠損マウスの胎仔を野生型と比較・検討した。E12.5 から E14.5 は手指が形成される時期であり、その過程では多くの趾間組織の間葉細胞がアポトーシスに陥り、M ϕ によって処理される事が知られており、この時期の手指を観察・比較することでアポトーシス細胞の処理が障害されているかどうかを検討することができる (Wood et al., 2000)。そこで、我々は、野生型の胎仔と CD204 欠損胎仔の手指の形成過程を観察したが、肉眼的に明かな障害は確認出来ず(図 10 A)、E13.5 の第二指と第三指の間の角度を測定して比較しても有意な差は認められなかった (図 10 A)。次に、趾間組織に浸潤している M ϕ の数を免疫染色によって、測定したが野生型と CD204 欠損胎仔の間に差は認められなかった(図 10 B)。以上の結果から、CD204 欠損胎仔では、胎仔期の形態形成におけるアポトーシス細胞の処理に障害は認められないことが示された。

図10：CD204欠損マウス胎仔におけるアポトーシス細胞処理

A: 趾間形成の比較



B: 趾間組織へ浸潤しているMφの数



A: 胎仔の手指の形成過程をWildとCD204^{-/-}で比較したが明かな障害は見られなかった。

B: 胎生13.5日における趾間組織へのMφの浸潤をF4/80による免疫染色で比較したが明かな差は認められなかった。

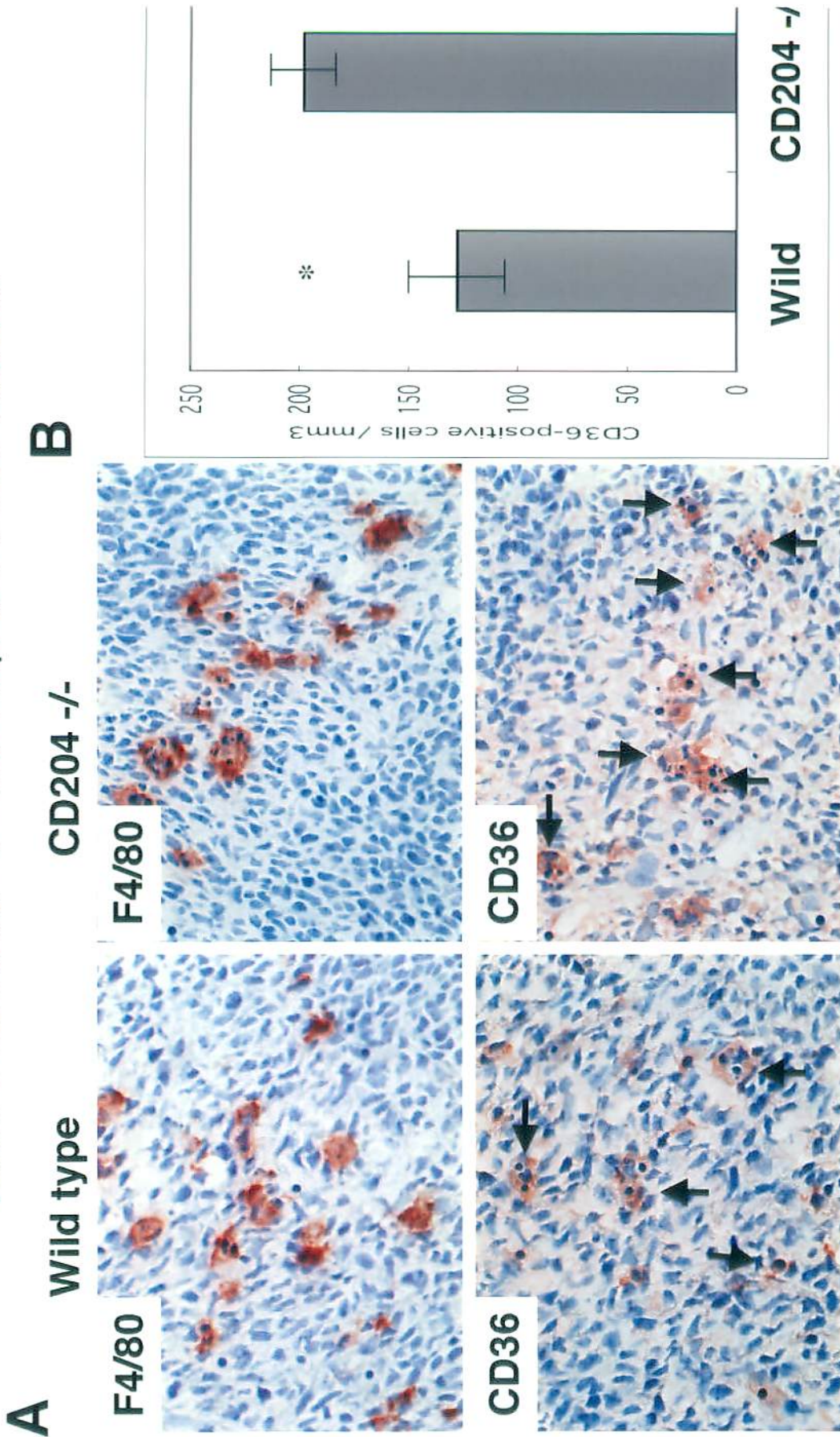
CD204 欠損マウス胎仔のマクロファージにおける CD36 の発現増加

近年、マクロファージに発現するアポトーシス細胞の認識に関わる受容体に関する研究が盛んに行われており (Reviewed by Henson et al., 2001)、CD204 以外にも数個の受容体が関与すると報告されている。このことから、我々は CD204 欠損胎仔において、CD204 以外の受容体が代償性に高発現しているのではないかと仮定し、免疫組織化学的手法を用いて検討を行った。CD36 は、クラス B スカベンジャー受容体に属する受容体 (CD204 はクラス A に属する) で、マクロファージにも発現しておりアポトーシス細胞の認識・貪食に関与するといわれている (Moodley et al., 2003)。そこで、我々は E13.5 の趾間組織に集簇している M ϕ における CD36 の発現を免疫染色にて観察したところ、CD204 欠損胎仔の方で CD36 陽性 M ϕ の数が有意に増加しており、染色強度も CD204 欠損の方で強かった (図 1 1 A,B)。このことから、CD204 欠損胎仔では CD36 が過剰に発現することで、欠損した CD204 を代償していることが示唆された。さらに、CD36 の mRNA 量を real-time PCR で検討したが、CD204 欠損胎仔での明らかな増加は認められなかった。これは、CD36 が M ϕ だけでなく赤芽球や間葉細胞にも弱く発現しているためで、M ϕ での CD36 の mRNA 量だけを測定するのは困難であった。

マウス発生初期における未熟間葉系細胞のアポトーシス細胞処理への関与

アポトーシスは、胎仔の形態形成に不必要な細胞を排除する重要な機能であり、アポトーシスに陥った細胞は直ぐにプロフェッショナルな貪食細胞である M ϕ によって処理されると言われている。しかしながら、今回我々は実験の

図11 : CD204欠損マウス胎仔のMφにおけるCD36の発現増加



A: WtとCD204^{-/-}の胎生13.5日の趾間組織をF4/80とCD36で免疫染色した。WtとCD204^{-/-}ではF4/80陽性細胞の数は差は見られなかったが、CD204^{-/-}ではCD36陽性細胞の数が増加していた。

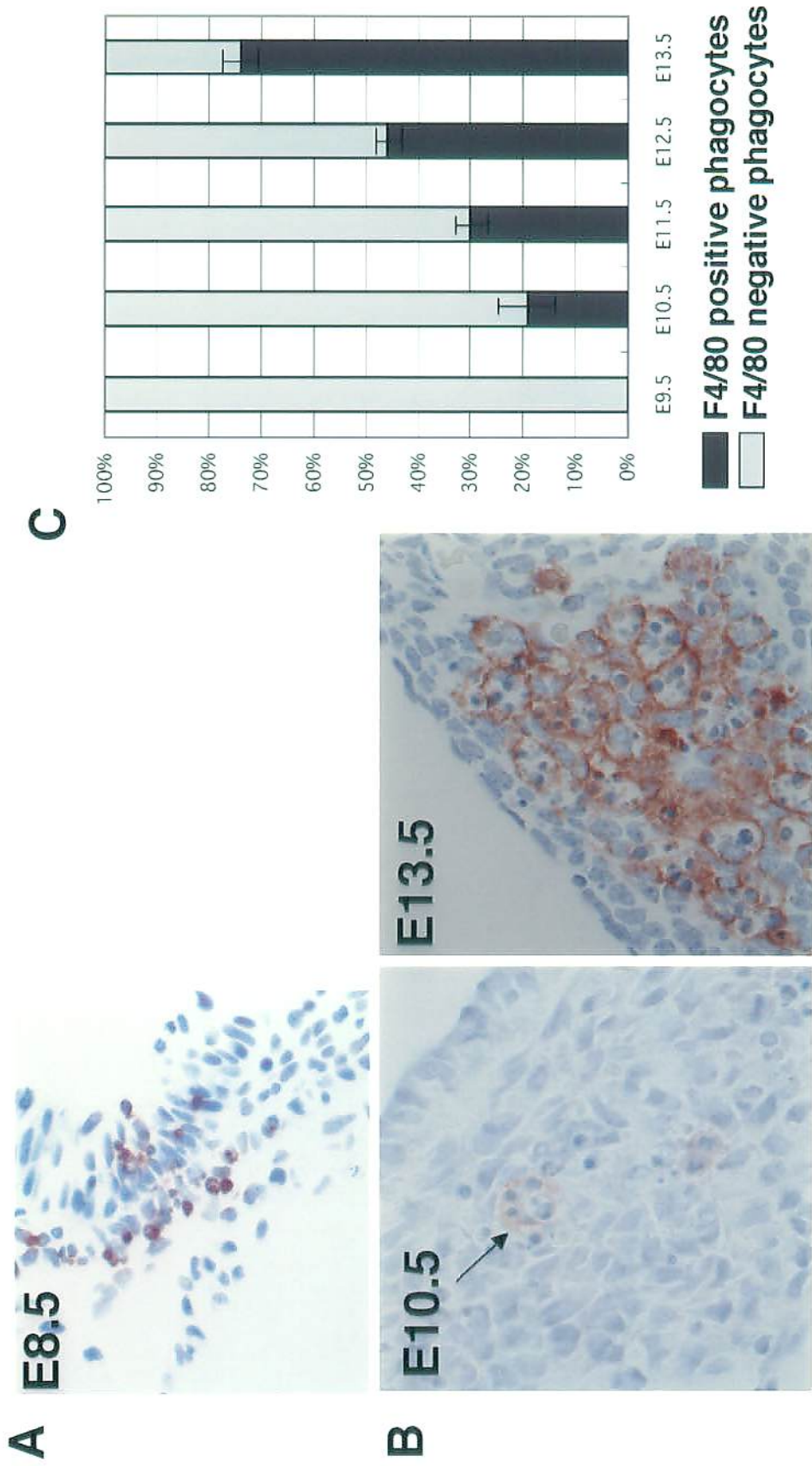
B: 胎生13.5日の趾間組織におけるCD36陽性細胞をカウントしWtとCD204^{-/-}で比較した(*P<0.01, student t-test)。

過程で、M ϕ が出現する以前の段階 (E8.5)にも TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞は存在し(図 1 2 A)、M ϕ ではない何らかの細胞によって貪食・処理されることに気がついた。それらの細胞は、M ϕ マーカーである F4/80, c-fms, FA-11, Mac-1, BM8 に免疫染色で陰性であった。

免疫染色標本では、アポトーシス細胞は濃縮した核として認識することができる。マウス胎仔切片を F4.80 で免疫染色した標本を観察すると、E9.5 で少数の M ϕ が出現しているが、アポトーシス細胞を取り込んでいる所見は見られなかった。E10.5 では、少数の F4/80 陽性 M ϕ にアポトーシス細胞を取り込んでいる所見が見られた (Fig. 5B)が、多くのアポトーシス細胞は M ϕ ではない細胞に貪食されていた。F4/80 陰性の貪食細胞は、他の M ϕ マーカーに陰性であった。E10.5 日以降、貪食細胞における M ϕ の比率は増加し、逆に M ϕ ではない貪食細胞の比率は減少していき(Fig.5C)、E13.5 には多くの貪食細胞が F4/80 に陽性となった(図 1 2 B)。

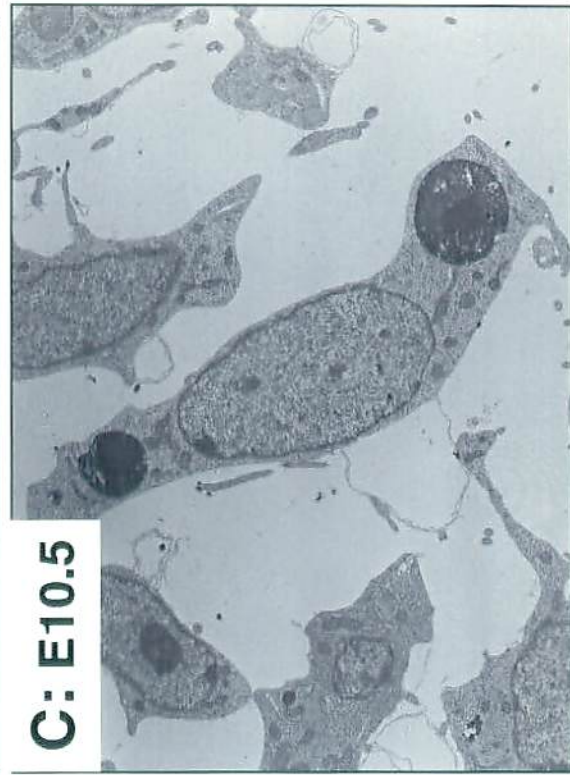
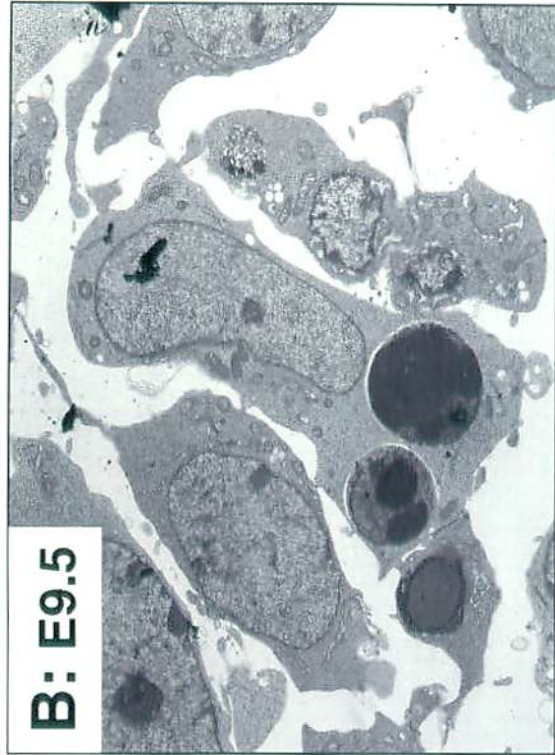
そのような M ϕ ではない貪食細胞を電子顕微鏡で観察したところ、細胞表面は滑らかで細胞突起を有さず、細胞内小器官も少量で未熟であった(図 1 3 A,B)。このような所見は、M ϕ ではなく、未熟な間葉細胞の所見であった。E10.5 でも多くのアポトーシス細胞は未熟な間葉細胞に貪食されていてその所見は E9.5 における所見とほぼ同様であった(図 1 3 C)。E10.5 での F4/80 の免疫電顕の所見では、F4/80 は一部の貪食細胞の細胞膜に陽性で、何れの細胞も細胞突起と多数の貪食像が認められ、明らかに前述した F4/80 陰性の未熟間葉細胞とは異なる所見であった(Fig. 1 3 D)。

図12: マウス発生初期における未熟間葉系細胞のアポトーシス細胞処理への関与-1



A: 胎生8.5日のICRマウス胎仔のTUNEL染色。アポトーシス細胞がMφ以外の細胞によって貪食されている。B: F4/80による免疫染色。胎生10.5日では貪食細胞の一部がF4/80であるのに対して、胎生13.5日になると多くの貪食細胞がF4/80陽性になっている。C: アポトーシス細胞を貪食した細胞におけるF4/80陽性細胞と陰性細胞の比率をグラフにした (n=5, mean ± SE)。

図13: マウス発生初期における未熟間葉系細胞のアポトーシス細胞への関与-2



A,B,C: 胎生9.5-10.5日の胎仔の電子顕微鏡による観察では未熟間葉系細胞がアポトーシス細胞を貪食していた。D: F4/80による免疫電子顕微鏡では、Mφは明らかに未熟間葉系細胞とは形態的に異なっている。

第4章

考察

マウス胎生期において M ϕ は E9.5 から E10 で初めて卵黄嚢・胎仔内に発生するといわれている(Takahashi et al., 1989; Morris et al., 1991)。我々の今回の実験で、CD204 は E9.5 以降の殆どの M ϕ に発現していることが示された。このことから、CD204 は胎生期の M ϕ において非常に重要な役割を果たしている受容体であることが考えられた。

CD204 は、変性 LDL をリガンドとするスカベンジャー受容体として最初に発見された受容体である。しかし、その後 CD204 は変性 LDL の他にさまざまな陰性荷分子を認識し(Doi et al., 1993)、AGE(Araki et al., 1995)、細菌表面の脂質(Dunne et al., 1994)、 β アミロイド(El-Khoury et al., 1996)等もリガンドとすることが明かとなった。また、Platt 等は、M ϕ によるアポトーシス細胞の貪食が CD204 に対するモノクローナル抗体で阻害され、さらに CD204 欠損マウスの M ϕ がアポトーシス細胞の貪食能の低下を示したことから CD204 とアポトーシス細胞認識の関連性を指摘した(Platt et al., 1996)。しかしながら、彼らはその後の CD204 欠損マウスをつかった *In vivo* の実験系では CD204 とアポトーシス細胞の認識処理の関連性を証明することが出来なかった(Platt et al., 2000)。Lichanska 等は、CD204 の mRNA は、アポトーシス細胞を貪食した M ϕ に限局して発現されていたと述べており(Lichanska et al., 1999)、我々の今回の実験では殆どの M ϕ に CD204 が発現しており、我々の結果とは矛盾している。我々の免疫染色による結果と違うのは、*In situ hybridization* の感度が免疫染色の感度よりも弱いことが原因と考えられ、このことは、胎生期の殆どの M ϕ は CD204 を発現しているが特にアポトーシス細胞を貪食した M ϕ に多くの CD204 が発現されているという我々の考えを支持するものと考えられる。しかし、CD204 欠損マウスは何の障害も持たずに生まれて来ることを考慮に入れると、CD204

欠損胎仔では CD204 以外の何らかの受容体が過剰に発現しているのではないかと考えられた。

これまで、アポトーシス細胞の認識に関与する受容体として様々な受容体が報告されている (第一章、図 1 参照)。その中で、CD36 は 88kDa の糖タンパク質で、クラス B スカベンジャー受容体に属する受容体で、酸化 LDL、脂肪酸、陰性リン脂質、thrombospondin をリガンドとすることが知られており、Vitronectin receptor (VnR) や thrombospondin と複合体をつくることでアポトーシス細胞の認識に関与することが示されている (Moodley et al., 2003)。われわれは、CD204 欠損胎仔では CD36 が代償性に過剰発現することにより形態形成に影響が現れないという仮説を立て、免疫染色の結果からこの仮説を示すことが出来た。

さらに、今回の一連の実験の中で、我々は、マウス胎生早期 (特に M ϕ が出現し始める時期) までは、アポトーシス細胞の処理を司るのは M ϕ ではなく、未熟間葉細胞であることに気が付いた。免疫染色と電子顕微鏡により、未熟間葉細胞が M ϕ ではないことを証明し、さらに、胎仔中期以降 M ϕ の数が増加するのに従って未熟間葉細胞によるアポトーシス細胞貪食像が見られなくなり、E14.5 以降は殆どの貪食細胞が M ϕ に置き換わることを示した。

これまで、胎仔期における M ϕ ではない貪食細胞の存在について詳しく検索した文献は殆ど無く、M ϕ ではない貪食細胞の存在を指摘した文献も数編あるが詳しくは言及していない (Ballard et al., 1968; Woolley et al., 1994)。例えば、Coucovanis 等 (1995) はマウス発生初期の体腔内にアポトーシス細胞が出現しそれを近隣の M ϕ ではない細胞が貪食することに触れているが、その貪食細胞については多くは触れていない。Wood 等 (2000) は、M ϕ の存在しない PU.1 ノックアウトマウスの胎仔では、趾間形成に微小の遅れが見られ、アポトーシス細胞は “stand-in” mesenchymal cell によって貪食されると報告している。その “stand-in” mesenchymal cell は、ABC1 や ClqR を有しておらず、c-fms 以外のマクロファージマーカーに陰性であった。彼らの “stand-in” mesenchymal cell は c-

fms に陽性であることから我々が今回の実験の中で示した未熟間葉細胞とは異なる細胞ではないかと考えられる。未熟間葉細胞が、アポトーシス細胞を貪食する際に関与する受容体に関してこれまで十分な検討はなされていないが、我々の検討では、胎生初期における間葉細胞が CD36 を発現しているというデータもあり、CD36 の関与が示唆された。CD204, CD68, SR-BI, Lox-1 等の免疫染色も試みたが明かな未熟間葉細胞での発現は認められなかった。Li 等 (2003) は、マウスの E7 の胎仔の ISH による検討で PSR が間葉細胞も含む様々な細胞に発現していることを指摘し、さらに PSR 欠損胎仔では明かな奇形が見られることを報告している。このことは、未熟間葉細胞によるアポトーシス細胞の貪食には PSR も関与していることを示唆している。これまで、M ϕ によるアポトーシス細胞の貪食に関しては多くの報告があるが、non-professional な貪食細胞に関する研究は殆どなされておらず、これからの検討課題である。

結語

今回の実験で、我々は、マウス胎生期における殆どの M ϕ に CD204 が発現していること、組織学的検討からマウスの発生過程で CD204 がアポトーシス細胞の処理に関与している可能性が考えられるが CD204 欠損胎仔では発生過程に障害が認められず、またその原因として CD36 の過剰発現が見られたことを報告した。さらに、これまでマウスの胎生期でのアポトーシス細胞の処理には M ϕ だけではなく未熟な間葉細胞の関与も重要な役割を果たしていることを示した。

第5章

参考文献

Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, Shichiri M, Horiuchi S. 1995. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 230: 408-415.

Ballard KJ, Holt SJ. 1968. Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes. *J Cell Sci* 3: 245-262.

Cline MJ, Moore MAS. 1972. Embryonic origin of the mouse macrophage. *Blood* 39: 842-849.

Coucouvanis E and Martin GR. 1995. Signals for death and survival: A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 83: 279-287.

Davitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-509.

Daugherty A, Whitman SC, Block AE, Rateri DL. 2000. Polymorphism of class A scavenger receptors in C57BL/6 mice. *J Biol Chem* 275: 1568-1577.

Doi T, Higashino K, Kurihara Y, Wada Y, Miyazaki T, Wada Y, Miyazaki T, Nakamura H, Uesugi S, Imanishi T, Kawabe Y, Itakura H, Yazaki Y, Matsumoto A, Kodama T. 1993. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 268: 2126-2133.

Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA. 1994. The type I

macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1863-1867.

El-Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils. *Nature* 382: 716-719.

Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108: 957-962.

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz AR, Henson PM. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85-90.

Geske, FJ, Monks J, Lehman K, Fadok VA. 2002. The role of the macrophage in apoptosis: hunter, gatherer, and regulator. *Int J Hematol* 76: 16-26.

Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. 2000. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2: 399-406.

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. 2001. Apoptotic cell removal. *Cur Biol* 11:R795-R805.

Hughes DA, Fraser IP, Gordon S. 1995. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur J Immunol* 25: 466-473.

Isobe S, Nakane PK, Brown WR. 1977. Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. 1. Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem Cytochem* 10: 167-171.

Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P, Flavell RA. 2003. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302: 1560-1562.

Lichanska AM., Browne CM, Henkel GW, Murphy KM, Ostrowski MC, McKercher SR, Maki RA, Hume DA. 1999. Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood* 94: 127-138.

Luciani MF, Chimini G. 1996. The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO J* 15: 226-235.

Moodley Y, Rigby P, Bundell C, Bunt S, Hayashi H, Misso N, McAnulty R, Laurent G, Scaffidi A, Thompson P, Knight D. 2003. Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162: 771-779

Moore MAS, Metcalf D. 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the development mouse embryo. *British J Haematol* 18: 279-296.

Morris L, Graham CF, Gordon S. 1991. Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80. *Development* 112: 517-526.

Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. 1996. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12456-12460.

Platt N, da Silva RP, Gordon S. 1998. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8: 365-372.

Platt N, Suzuki H, Kodama T, Gordon S. 2000. Apoptotic thymocyte clearance in scavenger receptor class A-deficient mice is apparently normal. *J Immunol* 164: 4861-4867.

Sambrano GR, Steinberg D. 1995. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1396-1400.

Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90: 1513-1522.

Shepared JL, Zon LI. 2000. Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. *Curr Opin Hematol* 7: 3-8.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Chynshi Y, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, Berkel TJ, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 20: 292-296.

Takahashi K, Yamamura F, Naito M. 1989. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45: 87-96.

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, Martin P. 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryo. *Development* 127: 5245-5252.

Woolley JH, Hughes D, Gordon S, Martin P. 1994. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J Cell Sci* 107: 1159-1167.