

エラスチンとの接触はマクロファージのTNF α 発現を誘導し、 動脈硬化発症に寄与する

樋口 智紀¹ 森 一郎² 中村 美砂¹
中村 靖司¹ 尾崎 敬² 覚道 健一¹

要 旨：内皮傷害局所でのマクロファージ(M Φ)-内皮下マトリックス(特にエラスチン)接触が動脈硬化発症への鍵とする仮説に基づいて、マクロファージをエラスチンで刺激した結果、TNF α が一過性に誘導された。また、このTNF α 発現に至る過程に、エラスチン-ラミニン受容体、さらにERK 1/2、JNK/SAPK系が関与している可能性が示唆された。内皮傷害部でのM Φ -エラスチン接触が、TNF α 発現を介して炎症反応を惹起し、動脈硬化発症の引き金となることが示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 3-10)

Key words: macrophage, elastin-laminin receptor, TNF α , atherogenesis

序 言

動脈硬化の成り立ちを考える際に、最も初期に起こる変化は血管内皮傷害であり、血管内皮細胞が傷害を受け剥離や内皮間の離開を起こすと、最初に血流に露出される細胞外マトリックスは内皮基底膜および内弾性板である。流血中の単球は血管壁に侵入後マクロファージ(M Φ)へと分化する。共著者の森らは、ラットを実験的に高血圧としたモデルを用いて、内皮細胞の剥離と内皮下組織の露出、M Φ の内皮下組織への粘着と内膜への侵入を走査電顕と透過電顕で観察し¹⁾、またコレステロール食負荷ウサギを用いて、大動脈内膜にまずM Φ が侵入し、続いて中膜筋細胞が内膜に遊走して内膜肥厚を形成していく過程を免疫組織化学的に観察している²⁾。これらの内皮基底膜および内弾性板を構成する細胞外マトリックスは、エラスチン、ラミニン、IV型コラーゲンなどであるとされ、細胞間接着因子であるintegrinとは反応しないことが知られている。エラスチンは可溶性であるトポエラスチンとして中膜筋細胞から分泌され、細胞外においてフィブリリンなどのマイクロフィブリルと架橋構造を成して

不溶性の弾性線維を形成する³⁾。エラスチンを代表するペプチド配列はVGVAPGであり、コラーゲンと違ってintegrinと反応するRGD配列を含んでいない。近年Hinekらはエラスチン-ラミニン受容体(elastin-laminin receptor: ELR)の概念を提唱している⁴⁻⁶⁾。彼らによればELRはelastin-laminin binding protein(EBP)を含む3種の分子からなるnon-integrin receptorであり、EBPは β -galactosidase遺伝子の選択的スプライシングによって形成され、本来の基質であるgalactose, lactoseなどを認識するgalacto-lectin domainとエラスチンを認識するelastin-laminin binding domainを併せもつとされている。galacto-lectin domainを含んでいる特性から、*in vitro*においてgalactoseやlactoseなどの基質と結合するとEBPの高次構造が変化し、細胞膜表面上からEBPが解離するとされ、実際にlactoseを加えることでEBPが解離すること⁵⁾とそれに伴いエラスチンによる刺激が抑制されていること⁷⁾を証明している。ELRはM Φ をはじめ、線維芽細胞やリンパ球、平滑筋細胞、内皮細胞などに発現するとされているが⁸⁾、その機能の詳細についてはまだ不明な点が多い。

われわれはこれまで、M Φ のELRを介したエラスチ

¹和歌山県立医科大学第二病理学教室

²和歌山県立医科大学臨床検査医学教室

2005年10月19日受付 2006年1月6日受理

Published online before print March 17, 2006

ンとの接触がERK 1/2 経路を介してmacrophage colony stimulating factor(M-CSF)の発現および産生を増加させることを見いだしており、M Φ のエラスチンとの接触が動脈硬化発生の初期段階に深く関連していることを示唆してきた(この内容に関しては、2004年6月にカナダのトロントで行われた13th International Vascular Biology Meetingにて発表し、現在投稿中である⁹⁾。

内皮傷害からM Φ を主体とする細胞浸潤を介して動脈硬化に至る過程は創傷治癒過程と類似性があり、Rossらの傷害反応仮説¹⁰⁾にもあるように、動脈硬化は一種の炎症反応として捉えることができる。TNF α は腫瘍細胞を壊死させる作用のある物質として発見されたサイトカインであり、157個のアミノ酸からなる17kDのタンパク質で、3量体を形成する。これは炎症反応を惹起するうえで必要不可欠な因子であり、lipopolysaccharide(LPS)などストレス性の刺激によって特に強くその産生が促されることでよく知られている¹¹⁾。また、M-CSFによってTNF α が産生誘導されるというWarrenらの報告もある¹²⁾。最近では、慢性リウマチやCrohn病などの炎症を伴う疾患に深く関与していることが報告されている^{13,14)}。血管内皮の傷害に伴う血管壁の炎症反応として動脈硬化を捉える場合、M Φ によるTNF α の産生は炎症反応の上流に位置する重要なステップと考えられる。

われわれは内皮傷害が動脈硬化へ発展するか、修復・治癒されるかの分岐点にM Φ と内皮下の細胞外マトリックスとの接触が関与しているという仮説のもと多くの因子を解析した。本研究ではM Φ とエラスチンの接触に主眼をおき、M Φ におけるELRのひとつの作用として、TNF α の発現を一過性に誘導することを見いだしたのでこれを報告する。

方 法

試薬とその購入先は以下の通りである。minimum essential medium, alpha modification(α MEM), RPMI 1640, ウシ頸部韌帯由来不溶性エラスチン, ウシ・アキレス腱由来I型コラーゲン(Sigma-Aldrich社)。テフロンFEPフィルム(DuPont de Nemours社)。mouse TNF α custom primer, TRIZOL, salmon sperm DNA solution (Invitrogen社)。Hybond-N + membrane, ECL western blotting analysis system(GE社)。Prime-It II random primer labeling kit(Stratagene社)。Bio-Spin 30 chromatography columns(Bio-Rad Laboratories社)。lactose(和光純薬株

式会社)。PD98059, SP600125, SB203580(Calbiochem社)。Immobilon transfer membran(Millipore社)。抗マウスTNF α 抗体(Pierce Biotechnology社)。HRP標識抗ウサギIgG抗体(Santa Cruz Biotechnology社)。

(1) L929 conditioned medium(L929CM)

L929細胞株はマウス線維芽細胞由来の線維肉腫株であり、培養上清中にM-CSFを大量に分泌する。M Φ の分化・増殖、および維持のためにこの培養上清をフィルター滅菌して用いた。

細胞培養上清は、L929細胞株を10%FBS含有RPMI 1640培地中で5% CO₂, 37°Cで10日間培養した後に採取し、4°Cに保存した。

(2)マウス骨髄由来M Φ の培養

オスのC57BL/6 マウスの大腿骨および脛骨から α MEMを入れた25G針付き1mL注射器によって骨髄を採取し、1,000rpm, 10分間遠心することで有核細胞を沈降させ、上清を取り除いた後に0.83% NH₄Cl/Tris HCl バッファー(10mM, pH7.4)を加えて5分間放置して赤血球を溶解させ除去した。 α MEMで数回洗浄し、テフロンFEPフィルムで作成した培養用袋を用いて α MEM(10% FBS, 20% L929 CM)中で5% CO₂, 37°Cで1週間培養した。1週間後、培養用テフロン袋から培養細胞を取り出し、 6×10^6 cells/dishの量で10cm培養皿(10% FBS, 20% L929CM含有 α MEM)に移した。24時間5% CO₂, 37°Cで置いた後、培養皿に張り付いた細胞を α -naphthyl butyrate(α -NB)による非特異的エステラーゼ染色法で染色し、単球/M Φ に分化していることを確認し、各実験に用いた。

(3)エラスチンによるM Φ の刺激

培養したM Φ を、実験群と対照群に分けた。エラスチンは0.3mg/mlの割合で α MEM培地(10% FBS, 10% L929CM)中に懸濁させ、培養皿に張り付いたM Φ の培養液として加えた。実験群はエラスチン懸濁培養液、対照群はエラスチン未添加の α MEM培地で1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間培養し、total RNAを採取した。

(4)lactoseによるELRの阻害

ELRの阻害の目的で0.5mg/ml lactoseを添加した α MEM培地(10% FBS, 20% L929CM)中でM Φ を24時

間培養した^{5,7,15}。lactose添加群と無添加群それぞれにエラスチンを加え、2時間反応させた後のTNF α mRNAの発現を比較した。また、ELRに対するlactoseの阻害作用の特異性を検討するために、同様の実験をエラスチンの代わりに0.03mg/ml I型コラーゲンに置き換えて行った。

(5) mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系の阻害実験

MAPK系の阻害剤であるPD98059 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 MEK 1/2 阻害剤)、SP600125 (c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) 阻害剤)、SB203580 (p38 MAPK阻害剤) を培養したM Φ にそれぞれ20 μ M加えて1時間5% CO₂、37°Cで各MAPK系の阻害処理を行った¹⁶⁻¹⁸。これら前処理後にM Φ とエラスチンを反応させ、2時間反応後のTNF α mRNA量を比較した。

(6) Northern blot法

TRIZOLを用いてM Φ からtotal RNAを抽出し、1.1% agarose gel (2.2M formaldehyde, 1 \times MOPSバッファー) で電気泳動した。Hybond-N+ membraneにRNAを移し、マウスTNF α cDNA (708bp) をtemplateとしてPrime-It II random primer labeling kitでdCTP [α -32P] RI標識したものをprobeとして用いた。hybridizationは、hybridization buffer (1M NaCl, 50mM Tris-HCl [pH7.4], 2.5% SDS, 5 \times Denhardt's solution, 50% formamide) 中53°Cで1晩行った。その後、wash buffer 1 (1 \times SSPE, 0.5% SDS) で2回軽く濯ぎ、65°Cで5分間洗浄し、wash buffer 2 (0.1 \times SSPE, 0.5% SDS) で65°C、15分間洗浄した。検出・解析にはBAS2500 Imaging Analyzer (富士フイルム) を用いた。

(7) Western blot法

M Φ からlysing buffer (50mM HEPES [pH 7.5], 1% Tween X-100, 5mM EDTA, 50mM NaCl) を用いて細胞内タンパク質を抽出し、各サンプルを12.5% SDS-polyacrylamide gelを用いてSDS-PAGEを行い (25mA, 1.5時間)、immobilon transfer membraneに電気泳動したタンパク質を移した (4°C, 80V, 2時間)。目的のタンパク質を検出するために、1次抗体の抗マウスTNF α 抗体 (希釈率は1:100) と4°Cで1晩反応させた後、2次

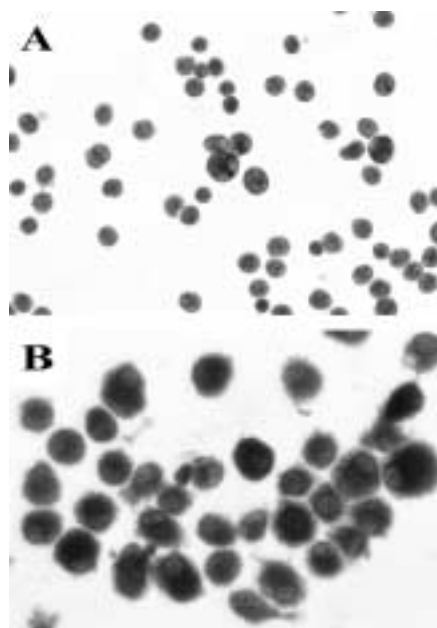


Figure 1 α -naphthyl butyrate esterase stain of cultured cells. Figure 1A shows mouse bone marrow cells with only a few positive cells, mostly composed of myeloid lineage cells. Figure 1B shows the cells we used in this study. Most of the cells were positive indicating monocyte-macrophage cells were selectively cultured.

抗体のHRP標識抗ウサギIgG抗体 (希釈率は1:2000) と室温で1時間反応させ、ECL western blotting analysis systemを用いて検出した。

(8) 統計処理法

Northern blot法およびWestern blot法による解析で得られたバンドは、Scion image (Scion社) を用いて定量化した。経時の変化については反応0時間を、阻害実験については非阻害処理群を、TNF α 産生についてはエラスチン無添加群を1とした相対値とした。統計学的有意差検定にはt検定を用いた。

結 果

(1) α -NBによるM Φ の非特異的エステラーゼ染色

Fig. 1 に α -NBを用いたM Φ の非特異的エステラーゼ染色の結果を示す。マウス骨髄より採取したばかりの骨髄細胞では、エステラーゼ陽性のM Φ はごく少数である (Fig. 1A)。これに対して1週間培養後の細胞では、大部分がエステラーゼ陽性であり (Fig. 1B)、M Φ が選択的に培養されていることを示している。

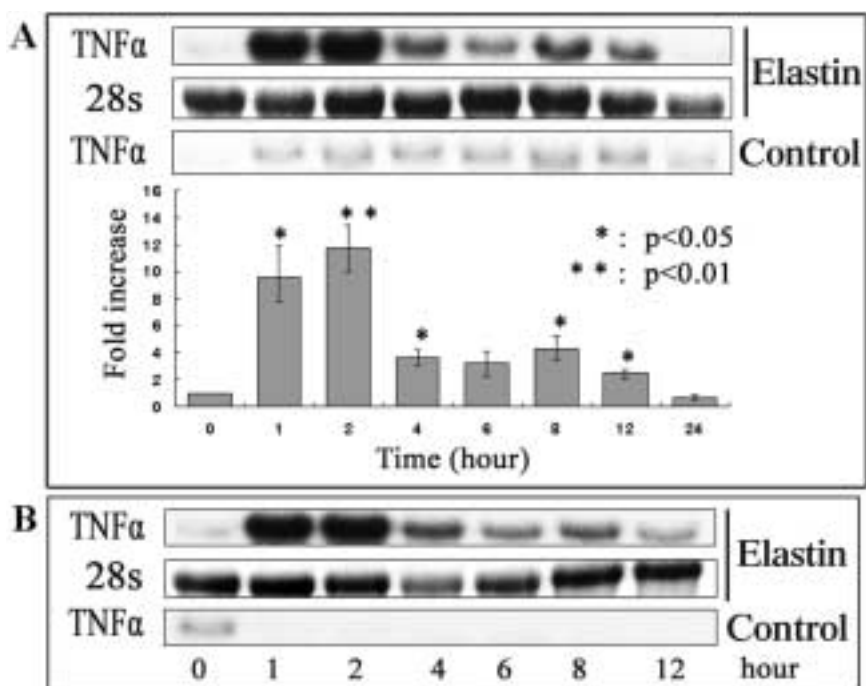


Figure 2 TNF α induced by elastin on macrophage. Northern blot analysis shows the time course of TNF α stimulated by elastin with M-CSF (A) or without M-CSF (B). TNF α : tumor necrosis factor alpha

(2) エラスチン刺激によるTNF α の発現

エラスチンを添加後、1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間培養したM Φ のTNF α mRNA量の変化をFig. 2Aに示す。2時間をピークにTNF α mRNAの発現が増加した。2時間の時点における増加は統計学的に有意だった(11.8 \pm 1.7S.D., $p = 0.0084$)。TNF α mRNA量は時間の経過とともに減少したが、6時間を除き12時間後まで統計学的に有意な高値を持続した。

次にM-CSFによってTNF α が産生誘導されるというWarrenらの報告から、M Φ を培養する際、M Φ の生存維持に必須なM-CSFを含むL929CMを加えることが、エラスチン刺激によるTNF α mRNAの発現に関与しているかを検討するために、L929CM無添加培地を用いて同様の実験を行った。その結果、L929CM添加群とほぼ同様に2時間をピークにTNF α mRNA量は増加していた(Fig. 2B)。

(3) エラスチン刺激によるTNF α の産生

エラスチンを添加後、6時間培養したM Φ から細胞内タンパク質を抽出し、Western blot法によりTNF α の産

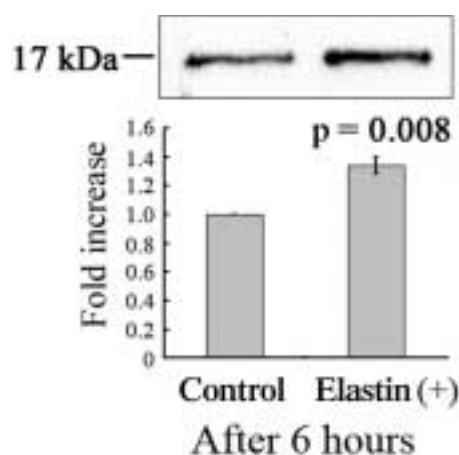


Figure 3 TNF α induction by elastin and macrophage interaction. Western blot analysis shows TNF α production stimulated by elastin at 6 hours.

生の有無を解析した結果をFig. 3に示す。エラスチン添加群のTNF α の産生量は無添加対照群と比較して高値を示し、2群間の差は統計学的に有意であった(1.34 \pm 0.05S.D., $p = 0.008$)。

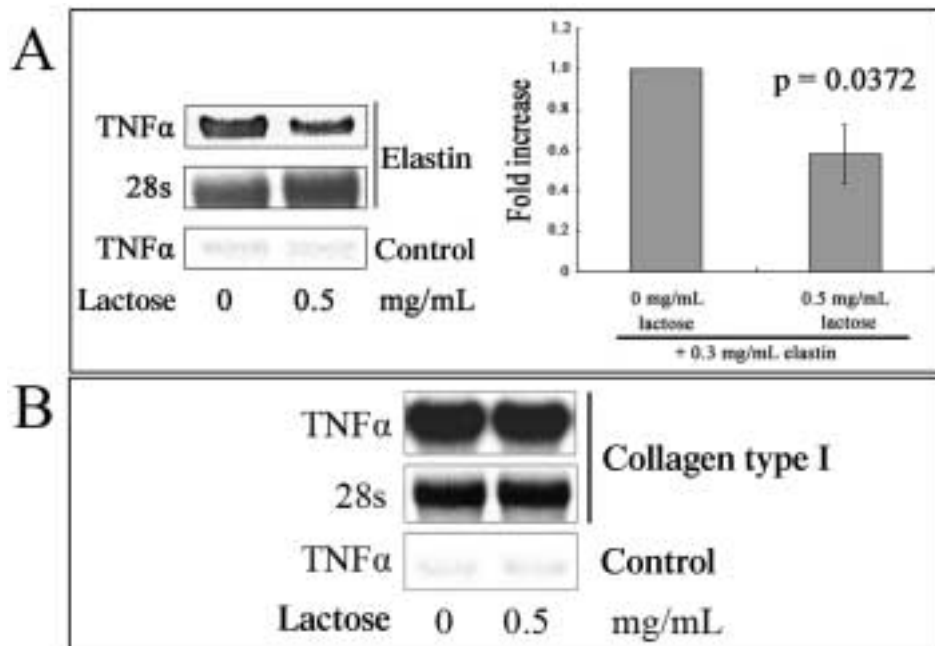


Figure 4 Lactose pretreatment down-regulate TNF α mRNA induction by elastin (A), but not by collagen type I (B).
TNF α : tumor necrosis factor alpha

(4) エラスチンによるTNF α 発現の機序1 ELR阻害実験

ELRを阻害する目的でのlactose前処理後、2時間エラスチン刺激したMφにおけるTNF α mRNAの発現をFig. 4Aに示す。lactose無添加群を1とした時の発現量はlactose添加群において統計学的に有意に低下していた(0.58 \pm 0.14 S.D., $p = 0.0372$)。この低下がlactoseの直接作用ではなくELR阻害を介したものであることを確認するために、ELRではなくintegrinと結合するI型コラーゲンをを用いたMφの刺激実験を行った。I型コラーゲンの刺激によってもエラスチン刺激時と類似したTNF α の発現上昇がみられるが(データ未提示)、この発現上昇はlactose前処理によって影響を受けなかった(Fig. 4B)。

(5) エラスチンによるTNF α 発現の機序2 - 細胞内シグナル伝達系の解析

MAPK系がエラスチン刺激によるMφのTNF α mRNAの発現に関与しているのかについて検討するために、ERK 1/2 extracellular signal-regulated kinase 1/2をリン酸化するMEK 1/2の阻害剤であるPD98059、JNK/SAPKの阻害剤であるSP600125、p38 MAPKの阻害剤である

SB203580をそれぞれ用いた阻害実験の結果をFig. 5に示す。PD98059による前処理によって、エラスチンによるTNF α の発現は減少した(0.758 \pm 0.082 S.D., $p = 0.0365$)。さらに、SP600125によって前処理した場合、その発現量はMEK 1/2阻害時より大幅に減少していた(0.406 \pm 0.064 S.D., $p = 0.0038$)。しかしながら、SB203580前処理においてはTNF α の発現に差はみられなかった。また、いずれの阻害剤を用いた場合でもTNF α の発現は消失しなかった。

考 察

われわれは当初、これまでの研究結果とWarrenらの報告により、エラスチン刺激によって産生が増加するM-CSFが、TNF α の発現に影響すると予測していた。しかしながら、M-CSF mRNAの増加のピークは2時間であり、Fig. 2Aにみられるように、TNF α 発現のピークも2時間と同時期であった。また、Mφ生存維持のために添加するL929CMの影響を除外するために行ったL929CM無添加培地を用いたエラスチン刺激実験においても、L929CM添加群と同様に2時間をピークにTNF α mRNA量は増加していた(Fig. 2B)。これらのこ

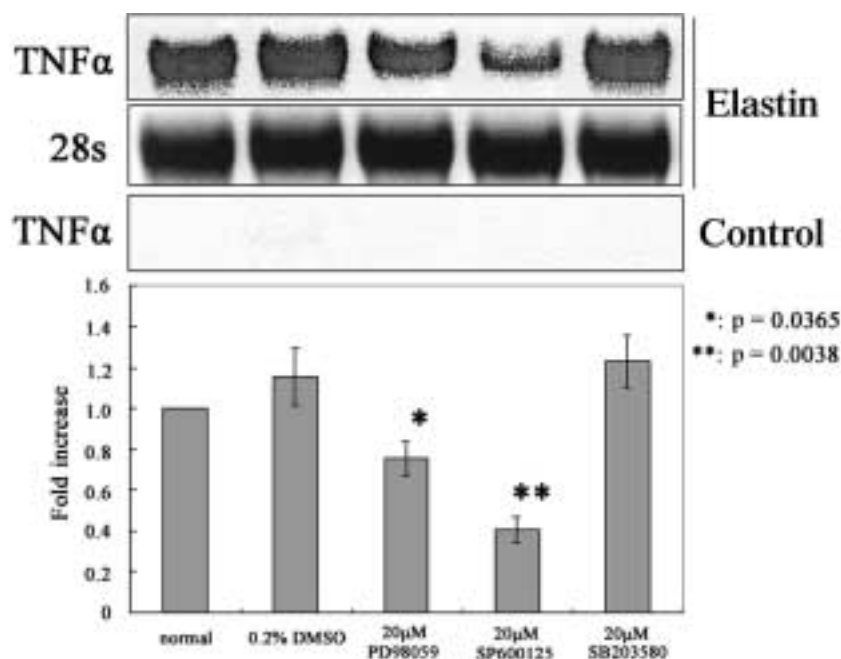


Figure 5 Northern blot analysis shows that expression of TNF α mRNA in macrophage stimulated by elastin were inhibited by PD98059 and SP600125, but not by SB203580. TNF α : tumor necrosis factor alpha, DMSO: dimethyl sulfoxide

とから、本実験でのL929CM添加量において、L929CM中に含まれるM-CSFや未知の物質はTNF α の誘導に大きな影響を与えておらず、加えて、TNF α の産生も確認されたこと (Fig. 3) から、エラスチン刺激そのものがTNF α の誘導を引き起こしていると考えられた。

今回の実験では、ウシの不溶性エラスチンをマウスのM Φ に作用させているが、エラスチンはVGVAPG配列が種を越えて存在し、いずれもELRと結合すると考えられている。また実際に水溶性エラスチンやVGVAPGペプチドを加えても不溶性エラスチンを加えた場合と同様の反応がみられることやlactoseによるELRの阻害によりその反応が抑制されていることがすでに証明されていることから^{7,9)}、動物種の問題や不溶性エラスチンを用いることに問題はないと考えている。

エラスチンと細胞との接触はELRを介して行われるとされている。今回見いだされたM Φ -エラスチン接触によるTNF α の発現がELRを介したものであるかどうかを確認するために、lactose添加によるELR阻害実験を行った結果、lactose添加によってエラスチンによるTNF α mRNAの発現は抑制されたが、コラーゲンに

よるTNF α mRNAの発現は抑制されなかった (Fig. 4A, 4B)。この結果はlactoseがELRを阻害していることを示し、この現象はELRを介したM Φ -エラスチンの接触自体がTNF α の発現を誘導したと結論した。共著者の森らが観察した内皮細胞剥離後のM Φ の動態や内膜肥厚の形成過程と照らし合わせると、これらの結果は、血管内皮下へ遊走・浸潤したM Φ がエラスチンに接触することで活性化し、傷害部局所でTNF α を産生するとともに、周辺の血管内皮細胞への傷害、さらなるM Φ の遊走・活性化を増強させ、炎症の増悪化から動脈硬化を引き起こす要因になるという仮説の*in vitro*における証拠と考える。

lactoseによってTNF α mRNAの発現を完全には抑制できなかったが、この原因として実験に使用したエラスチンの純度の問題が考えられる。今回、lactoseによるエラスチン刺激の選択的阻害が確認されたことから、TNF α mRNAの発現誘導はエラスチン刺激に特異的であると考えられるが、エラスチンや細胞外マトリックスは本来純粋な形で生体内には存在せず、種々の成分が混在していることが知られている。内皮下組織では、エ

ラスチンは通常マイクロフィブリルと架橋構造を形成しているとされ、本研究に使用したエラスチンも類似した状態である。これらマイクロフィブリル等の混在の影響については本研究において明確な検討は行っていない。また、不溶性エラスチンによるMΦへの機械的刺激が追加されている可能性も否定できない。lactoseによってTNF α mRNAの発現を完全には抑制できなかったのはこれらの影響と考えた。

次に、エラスチン刺激によるTNF α 発現の細胞内シグナル伝達系について調べた結果、MEK 1/2 およびJNK/SAPKの阻害剤を用いた実験でTNF α mRNAの上昇が抑制されたことから、ERK 1/2 とJNK/SAPK経路が関与していることを見いだした(Fig. 5)。ERK 1/2 は細胞増殖に深く関与していることで知られ¹⁹⁾、MΦにおけるその関与について多くの報告がなされている。われわれがこれまで行ってきた研究結果でも、エラスチン刺激によってリン酸化ERK 1/2 の増加がみられ、このMAPK系を介するM-CSFの発現が認められている⁹⁾。また、血管平滑筋細胞におけるELRを介したMAPK系においてもERK 1/2 の関与が示唆されており⁷⁾、ELRを介するERK 1/2 経路の活性化が血管内皮下でのMΦの過剰な増殖・集積につながると同時に炎症反応を開始する1つの経路になっていると考えられる。

一方、今回の結果においてERK 1/2 とJNK/SAPK経路の阻害によるTNF α の発現の抑制は完全ではなかった。その理由としては先に述べたlactoseによる阻害実験と同様に、使用したエラスチンの純度・形状および機械的刺激等の影響が考えられた。また、ERK 1/2 とJNK/SAPK経路の阻害によるTNF α の発現に差がみられることから、MEK 1/2 およびJNK/SAPKのどちらかの阻害時に残りの経路を介してTNF α の発現が上昇していることも考えられた。

多くのストレス刺激において、JNK/SAPKとp38 MAPKがともに活性化されることが一般的であり、それはMAPKKK(MAPK kinase kinase)が両経路の下流に位置するMAPKK(MAPK kinase)を同時に活性化することに起因している²⁰⁾。しかし、Fig. 5に示したように、エラスチンによるTNF α 発現にはJNK/SAPKの阻害にのみ顕著な差が認められた。このことから通常のストレス応答的な反応によるTNF α 発現ではなく、ELRを介したJNK/SAPK経路が存在することが示唆される。しかしながら、血管平滑筋細胞におけるELRを介するMAPK系

にはJNK/SAPKの関与について否定的な論文もあり⁷⁾、実験系や細胞種の違いとも解釈できるが、今後明確にすべき課題である。

結 論

以上、われわれはエラスチン刺激を与えたMΦがTNF α を発現させることを見出した。この反応系はELRを介し、ERK 1/2 およびJNK/SAPK経路が関与することを示した。動脈における硬化症にあてはめると、血管内皮下におけるエラスチンを主体とする細胞外マトリックスへのMΦの接触が、局所的な血管内皮の傷害に引き続く炎症を引き起こす1因子となり、これがくり返されることで動脈硬化の発症の起点になりうることを示した。

なお、この研究内容は、第46回日本脈管学会総会(2005年12月、大阪)にて発表した。

文 献

- 1) 森 一郎: 高血圧性動脈病変ことに類線維素変性の進展と治癒に関する走査電顕的研究, 両腎動脈を狭窄した高血圧ラットの腸間膜動脈のことに内皮における観察. 脈管学, 1979, **19**: 877-892.
- 2) Mori I, Yoshimura S, Tsukamoto H et al: Interaction between foamy macrophages and smooth muscle cells in atherogenesis in rabbit aortae: lipoperoxidative changes occurring in those cells and its chemotactic activity for cell migration. *Acta Histochem Cytochem*, 2002, **35**: 471-481.
- 3) Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG: Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl J Med*, 1981, **304**: 566-579.
- 4) Hinek A: Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes Commun*, 1994, **2**: 185-193.
- 5) Hinek A, Rabinovitch M: 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol*, 1994, **126**: 563-574.
- 6) Privitera S, Prody CA, Callahan JW et al: The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 6319-6326.
- 7) Mochizuki S, Brassart B, Hinek A: Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 44854-44863.

- 8) Fulop T, Jacob MP, Wallach J et al: The elastin-laminin receptor. *J Soc Biol*, 2001, **195**: 157–164.
- 9) Mori I, Higuchi T, Nakamura M et al: Elastin induced upregulation of M-CSF in macrophage is mediated by elastin-laminin receptor. *Cardiovasc Pathol*, 2004, **13**: 81.
- 10) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801–809.
- 11) Tibbles LA, Woodgett JR: The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**: 1230–1254.
- 12) Warren MK, Ralph P: Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J Immunol*, 1986, **137**: 2281–2285.
- 13) Feldmann M: Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**: 364–371.
- 14) Suryaprasad AG, Prindiville T: The biology of TNF blockade. *Autoimmun Rev*, 2003, **2**: 346–357.
- 15) Peterszegi G, Texier S, Robert L: Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur J Clin Invest*, 1999, **29**: 166–172.
- 16) Lehman JA, Calvo V, Gomez-Cambronero J: Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, m-TOR-related THR389 kinase. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 28130–28138.
- 17) Lahti A, Jalonen U, Kankaanranta H et al: c-Jun NH₂-terminal kinase inhibitor anthra (1,9-cd) pyrazol-6 (2H)-one reduces inducible nitric-oxide synthase expression by destabilizing mRNA in activated macrophages. *Mol Pharmacol*, 2003, **64**: 308–315.
- 18) Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE: A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 2004, **173**: 6928–6937.
- 19) L'Allemain G: Deciphering the MAP kinase pathway. *Prog Growth Factor Res*, 1994, **5**: 291–334.
- 20) Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H et al: Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct*, 2003, **28**: 23–29.

TNF α Induction by Elastin and Macrophage Interaction: Role of Macrophage in Very Early Atherogenesis

Tomonori Higuchi,¹ Ichiro Mori,² Misa Nakamura,¹ Yasushi Nakamura,¹ Takashi Ozaki,² and Kennichi Kakudo¹

¹Department of Pathology, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

²Department of Clinical Laboratory Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

Key words: macrophage, elastin-laminin receptor, TNF α , atherogenesis

In the pathogenesis of arteriosclerosis, endothelial injuries occur at a very early stage. The injuries cause vascular endothelial tissues to be stripped, leading to the exposure of either endothelial basement membrane or internal elastic lamina to blood flow as the first extracellular matrixes. Since elastin, laminin, and collagen type-IV make up endothelial basement membrane and internal elastic lamina, these extracellular matrixes are recognized by elastin-laminin receptor (ELR) of macrophage. We investigated whether macrophage-elastin interaction induces tumor necrosis factor alpha (TNF α) expression or not, which is the essential cytokine to evoke inflammation. Macrophages incubated with elastin showed 11.8 ± 1.7 S.D. fold upregulation of TNF α mRNA with its peak at 2 hours, and 1.34 ± 0.05 S.D. fold upregulation of TNF α protein at 6 hours. This result is similar to upregulation of M-CSF stimulated by elastin that we already reported. In addition, macrophages incubated with elastin after lactose pretreatment showed down regulation of TNF α mRNA probably due to uncoupling of ELR. When we pretreated macrophages with MEK1/2 inhibitor (PD98059) and JNK/SAPK inhibitor (SP600125), TNF α mRNA expression were inhibited. In conclusion, ELR, ERK and JNK/SAPK pathway mediate TNF α upregulation in elastin stimulated macrophages. Macrophage-extracellular matrix interaction through this ELR may trigger inflammation in an endothelial injury lesion, a key event of very early atherogenesis.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2006, **46**: 3–10)

Published online before print March 17, 2006

脈管学 Vol. 46 Nos. 1–2