

平成 30 年 4 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18996

研究課題名(和文) HMGB-1 を標的とする血管新生阻害薬の開発

研究課題名(英文) Development of the new angiogenic inhibitor targeting HMGB-1

研究代表者

小堀 宅郎 (KOBORI, Takuro)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60734697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ(M<sub>2</sub>)は大きくM1およびM2の二つのフェノタイプに分類され、M2-M<sub>2</sub>は病的血管新生を促進することによって、関節リウマチやがんをはじめとする種々の慢性炎症性疾患の病態増悪に寄与している。本研究課題では、微小環境がM<sub>2</sub>の分極状態や形態変化ならびに機能活性へ及ぼす影響を評価するための簡便なin vitro実験モデルを確立し、M2-様M<sub>2</sub>が血管新生を誘導するメカニズムの探索を行った。その結果、M2-様M<sub>2</sub>は細胞表面におけるCD163を介して血管内皮細胞と直接的に相互作用することによって、血管新生を強力に促進する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Macrophages (M<sub>2</sub>s) are classified as M1 or M2 phenotypes, with the latter promoting angiogenesis which is a precipitating factor for several chronic inflammatory diseases including rheumatoid arthritis (RA) and various cancers. In this study, we initially established the simplified in vitro experimental model to evaluate the influence of micromilieu on the M<sub>2</sub> polarization status, morphology, and functional activity. As a result, M2-like M<sub>2</sub> strongly induced excessive angiogenesis through the direct cell-cell interaction with endothelial cells mediated by the surface CD163.

研究分野：薬理学

キーワード：マクロファージ 血管新生 炎症性メディエーター インターロイキン-18 オステオポンチン トロンピン CD163

1. 研究開始当初の背景

[抗血管新生療法について]

種々のがんや慢性関節リウマチ (RA) をはじめとする様々な慢性炎症性疾患において、過剰な血管新生の促進がそれらの病態増悪に必須の現象と考えられている。したがって、抗血管新生療法の発展が有効な治療戦略とされている。しかしながら、既存の血管新生阻害薬は、正常血管の再生・修復阻害に起因する重篤な副作用に加え、低い費用対効果など医療経済学的な課題も多いのが現状である。したがって、病態局所で特異的に作用する新規血管新生阻害薬の開発が求められている。

[マクロファージと血管新生]

マクロファージ (Mφ) は、組織ホメオスタシスの維持において必須の役割を果たしており、生体内において M1 および M2 等の多様なフェノタイプの分集団として存在している。M1 Mφ はインターフェロン-γ や腫瘍壊死因子 (TNF)-α 等の Th1 サイトカインをはじめ、細菌由来のリポ多糖によって誘発され、多くの炎症促進性サイトカインを産生する。一方、M2 Mφ は Th2 関連サイトカインのインターロイキン (IL)-4、IL-13 および IL-21 をはじめ、IL-10 やグルコシルコドによって誘導され、CD163、CD204 ならびに CD206 等の細胞表面スカベンジャー受容体を高発現し、強力なファゴサイトシス活性や細胞残屑の除去作用を示す。これに加えて、M2 Mφ は組織修復、創傷治癒、血管新生および腫瘍増殖促進作用を有している。血管新生誘導機構における Mφ の役割として、血管新生促進性のメディエーターの遊離作用または血管内皮細胞との直接的な細胞間相互作用を介した機構が知られている (図 1)。しかしながら、Mφ による血管新生誘導機構の詳細について検討した研究はほとんどなく、その情報が乏しいのが現状である。したがって、病巣局所の微小環境における M2 Mφ の活性化機構を解明し、その働きを抑制することが、病的血管新生の阻害につながる可能性がある。

[炎症性メディエーターと血管新生]

IL-18 や high mobility group box (HMGB)-1 は、主として Mφ から分泌される炎症促進性のメディエーターであり、血管新生を強力に誘導することが知られている。しかしながら、これらのメディエーターが Mφ を介して血管新生を誘導する機構についてはほとんど解明されていない。

そこで本研究課題では、慢性炎症性微小環境において血管新生を強力に促進する因子を見出し、Mφ の分極化状態や形態、機能活性への影響を解析するための実験モデルを確立させることによって、微小環境における Mφ を介した血管新生誘導メカニズムの解明のみならず、アンメットメディカルニーズを克服する新規血管新生阻害薬の開発と臨床応用への寄与が期待できる。

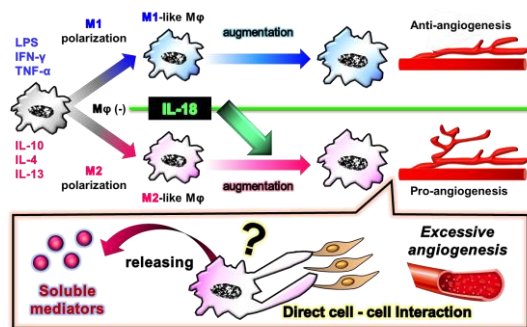


図 1. Mφ の M1/M2 分化と血管新生への影響の概念図

2. 研究の目的

異常な病的血管新生は、RA やがんをはじめとする種々の慢性炎症性疾患にみられる病理学的な特徴である。これらの疾患の微小環境において、炎症促進性サイトカインの一つである IL-18、様々な生理機能や病態と関連する多機能性タンパク質の オステオポンチン (OPN)、血液凝固カスケードにおいて極めて重要な酵素である トロンビンの発現レベルあるいは活性が上昇することが知られている。興味深いことに、これらのタンパク質は、いずれも強力な血管新生促進性のメディエーターとして同定されている。さらに、IL-18、OPN、あるいはトロンビンのノックアウトや阻害薬は、RA やがんの進行を抑制することが証明されており、これらの作用は少なくとも一部、血管新生の阻害を介してものと考えられている。しかしながら、これらのメディエーターが病的血管新生を促進するメカニズムはほとんど明らかになっていない。種々の慢性炎症性疾患における微小環境が、Mφ の分極化状態や形態変化ならびに機能活性へ及ぼす影響を評価する簡便な実験モデルを確立することができれば、新規治療薬の開発に幅広く応用できると可能性が考えられる。

そこで本研究課題では、IL-18、OPN、トロンビンが存在する微小環境において Mφ が血管新生を誘導する機能の解明に加え、血管新生の誘導過程における Mφ の時空間的な挙動と形態変化の可視化を目的として検討を行った (図 2)。これらの検討は、様々な慢性炎症性疾患に共通して認められる過剰な病的血管新生のメカニズムの解明につながる可能性がある。さらに加えて、本研究課題で確立した簡便な実験システムを用い、病的血管新生の原因となる因子・標的を探索することによって、新規治療薬の開発にも応用できると期待される。

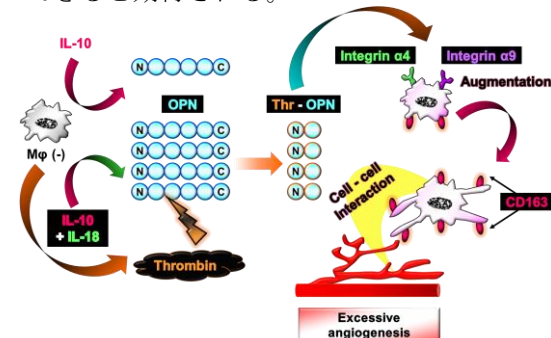


図 2. IL-18 による Mφ の M2 分化と血管新生増強機構の概略

### 3. 研究の方法

マウス単球由来 M $\phi$  様細胞株の RAW264.7 細胞およびマウス由来血管内皮細胞株の b.End5 細胞を用い、下記の *in vitro* 実験を実施した。

#### (1) サイトカイン刺激による M $\phi$ の分化

RAW264.7 細胞を 24-well プレートに播種した後、TNF- $\alpha$  (5 ng/mL)、IL-10 (10 ng/mL) および IL-18 (1 - 200 ng/mL) を単独または併用して添加し、24 時間培養した。各 M $\phi$  サブセットの細胞表面における M1 マーカー (CD54, CD86)、M2 マーカー (CD163, CD206) 発現量を Flow cytometry 法 (FACS Canto II、BD Biosciences) で測定した。

#### (2) マトリゲル管腔形成アッセイ

細胞膜基底膜基質であるマトリゲルを 96-well プレートへ添加して固形化させた後、b.End5 細胞を播種した。次に (1) の方法で分化させた各 M $\phi$  サブセットを上層し、16 時間共培養した。その後、細胞膜透過性の蛍光基質の Calcein acetoxymethylester を添加して血管管腔構造を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡 (C2、Nikon) を用いて血管管腔面積 (Area) および長さ (Length) を算出した。

#### (3) タイムラプスライブセルイメージング解析

細胞膜蛍光ラベリング色素を用い、b.End5 細胞および RAW264.7 細胞をそれぞれ緑色 (PKH67)、赤色 (PKH26) に標識した。PKH26-RAW264.7 細胞を用い、(1) と同様の方法にて M $\phi$  (IL-10 + IL-18) を作成した。マトリゲルを 35-mm ディッシュへ添加して固形化させた後、PKH67-b.End5 細胞と PKH26-M $\phi$  (IL-10 + IL-18) をマトリゲル上へ播種して共培養した。オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710、Keyence) により、タイムラプス画像を 10 分毎に 16 時間にわたって記録した。

#### (4) 走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscopy; SEM) 法

マトリゲルを 35-mm ディッシュへ添加して固形化させた後、b.End5 細胞と M $\phi$  (IL-10 + IL-18) を播種して 4 時間共培養した。洗浄、前固定、後固定、脱水、凍結乾燥等の操作後、白金-パラジウムコーティングにより導電処理を行った。SEM (SU3500、Hitachi High-Technology) を用い、血管内皮細胞と M $\phi$  間における細胞間相互作用を観察した。

#### (5) 各種 mRNA およびタンパク質発現量の解析

RAW264.7 細胞を 6-well プレートに播種した後、IL-10 (10 ng/mL) および IL-18 (100 ng/mL) を単独または併用して添加し、24 時間培養した。各 M $\phi$  サブセットより総 RNA

と全細胞画分を抽出・調製し、それぞれ real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、Western Blotting 法を用い、各種 mRNA およびタンパク質発現量を測定した。

#### (6) 免疫蛍光染色法

RAW264.7 細胞を 35-mm ガラスボトムディッシュへ播種した後、IL-10 (10 ng/mL) および IL-18 (100 ng/mL) を単独または併用して添加し、24 時間培養した。4% パラホルムアルデヒドで固定し、細胞膜透過化処理およびブロッキングを行った後、各種タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を実施した。共焦点レーザー顕微鏡 (C2、Nikon) を用い、各タンパク質の細胞内局在を評価した。

### 4. 研究成果

(1) IL-18 は M $\phi$  の M2 分化と血管新生作用を増強する。

RAW264.7 細胞への TNF- $\alpha$  または IL-10 の単独処置により、M1-様 M $\phi$  および M2-様 M $\phi$  がそれぞれ特異的に誘導された (図 3A)。IL-18 単独刺激は、いずれの M1/M2 マーカー発現量も変化させず、M $\phi$  (TNF- $\alpha$ ) における M1 マーカー発現量の増加作用にも影響を及ぼさなかった。一方、IL-10 と併用刺激した場合、M $\phi$  (IL-10) における CD163 発現量の増加作用を有意に増強した (図 3B)。さらに、IL-18 は、M $\phi$  (IL-10) による血管管腔形成の促進作用も顕著に増強した (図 3C)。これらの結果から、IL-18 は慢性の炎症性微小環境において、IL-10 と相乗的に作用することによって、M $\phi$  の M2 分化と血管新生促進作用を増幅することが明らかとなった。

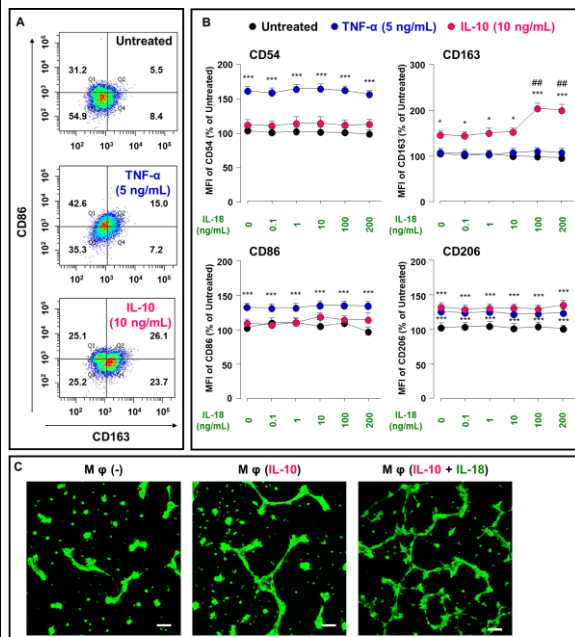


図 3. IL-18 は M $\phi$  の M2 分化と血管新生作用を増強する

(2) 血管新生の誘導における M $\phi$  (IL-10 + IL-18) の時空間的挙動の変化



マトリゲル管腔形成アッセイにおけるタイムラプスライブセルイメージング解析を行い、血管新生過程における Mφ (IL-10 + IL-18) の時空間的な挙動を観察した。PKH26-Mφ (IL-10 + IL-18) は、PKH67-b.End5 細胞との接触を介して吻合を促進することによって、血管管腔形成を強力に駆動した (図 4A)。また PKH26-Mφ (IL-10 + IL-18) は、伸長した偽足 (図 4B; 白色矢尻) を用いて血管内皮細胞と相互作用し、血管新生が誘導される血管の分岐部へと運んでいた。さらに両手を伸ばして橋渡しの役割を担い、血管内皮細胞同士を繋げて安定化させているかのような像が観察された (図 4B)。

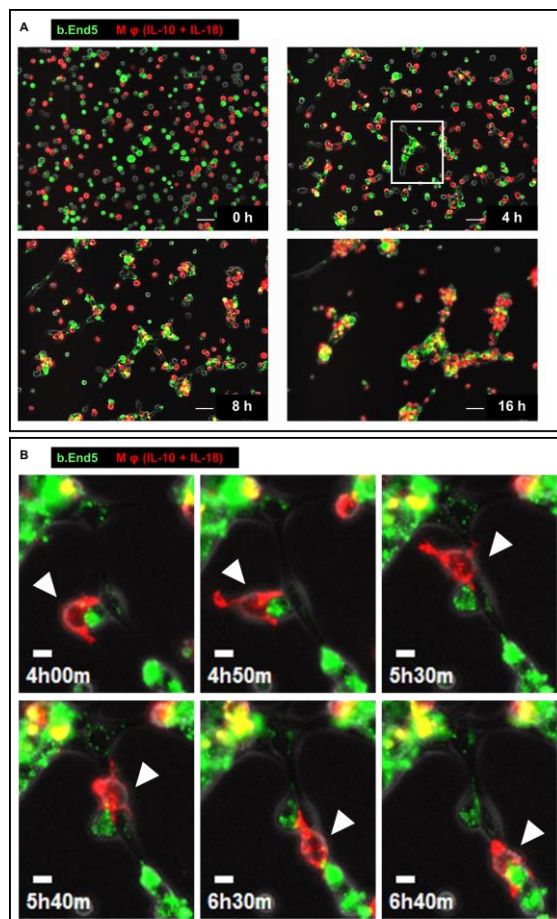


図 4. 血管新生の誘導における Mφ (IL-10 + IL-18) の時空間的挙動の変化

### (3) 血管新生の誘導における Mφ (IL-10 + IL-18) の形態学的特徴と血管内皮細胞との細胞間相互作用

マトリゲル管腔形成アッセイにおける Mφ と血管内皮細胞の細胞間相互作用を SEM 解析で観察したところ、血管発芽または融合部付近において、Mφ (IL-10 + IL-18) は偽足 (図 5; 赤色矢尻) を伸ばして血管内皮細胞と相互作用し (図 5A)、血管構造の間隙を橋渡しする像が観察された (図 5B, C)。さらにこれらの Mφ は、血管管腔構造の先端や分岐部にも集積し、偽足を伸ばすことによって近接する血管内皮細胞や血管の分節体を引き寄せ、新生血管の伸長方向を決定する

かのごとく振る舞った (図 5D)。

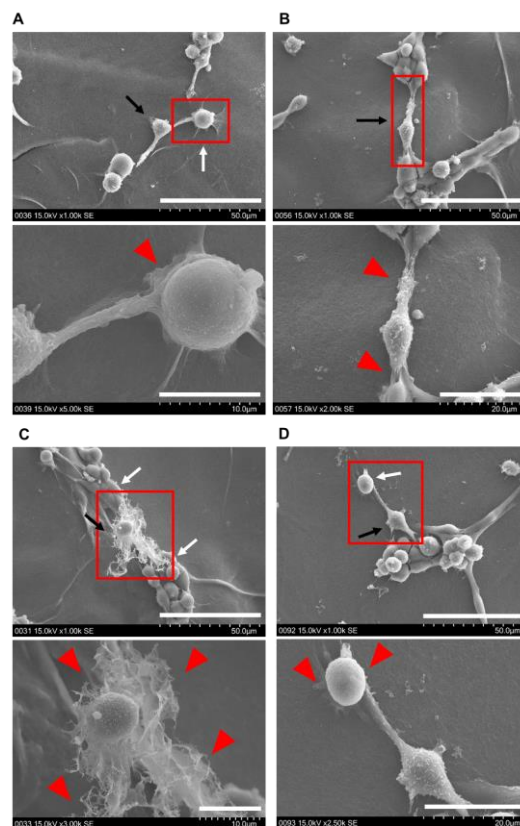


図 5. 血管新生の誘導における Mφ (IL-10 + IL-18) の形態学的特徴と血管内皮細胞との細胞間相互作用

### (4) OPN は Mφ の M2 分化と血管新生促進作用を駆動する

IL-18 による Mφ の M2 分化と血管新生促進作用の増強機構に関与する因子を探る目的で、プロテインアレイを実施した。その結果、対照群の Mφ (-) と比較して、Mφ (IL-10) および Mφ (IL-10 + IL-18) において著明に発現が増加する OPN を見出した (図 6A; 赤色矢尻)。実際、IL-10 による OPN の mRNA およびタンパク質発現量の増加作用は、IL-18 の併用処置によっていずれも有意に増強した (図 6B, C)。また、M2-様 Mφ の形態変化に伴い OPN の発現増加と細胞内局分布変化が認められた (図 6D)。次に、IL-18 による Mφ M2 分化と血管新生促進作用の増強機構における OPN の関与を検討するため、抗 OPN 中和抗体を用いた実験を行った。その結果、Mφ (IL-10) および Mφ (IL-10 + IL-18) における CD163 発現量の増加と血管新生促進作用は、いずれも対照群のレベルまで抑制された。これらの結果から、IL-18 による Mφ の M2 分化増強および血管新生促進機構において、OPN が重要な役割を担うことが示された。

### (5) Mφ の M2 分化と血管新生促進機構における OPN 修飾因子の関与

トロンピンは、OPN を開裂し、高い生理活性を示す Thr-OPN を産生する。一方、OPN は種々のインテグリン受容体に結合して作用

を發揮するが、RA やがん等の炎症性微小環境に局在する M $\phi$  において、インテグリン  $\alpha 4$  と  $\alpha 9$  が高発現することが知られている。そこで、IL-18 による M $\phi$  の M2 分化と血管新生促進作用の増強機構において、OPN の作用を調節する因子としてトロンビンとインテグリン  $\alpha 4/\alpha 9$  の関与について検討した。M $\phi$  (-) と比較して M $\phi$  (IL-10) において、トロンビン、Thr-OPN および細胞表面インテグリン  $\alpha 9$  発現量はいずれも顕著に増加した。さらに IL-18 は、これらの作用をいずれも有意に増幅した。また、トロンビンおよびインテグリン  $\alpha 9$  発現量の増加や細胞内局在性の変化は、M2-様 M $\phi$  の形態変化に伴うことが示された。興味深いことに、トロンビン阻害薬の Hirudin あるいは抗インテグリン  $\alpha 4/\alpha 9$  中和抗体を処置することによって、M $\phi$  (IL-10) および M $\phi$  (IL-10 + IL-18) における CD163 発現量の増加と血管新生促進作用は、いずれも対照群のレベルまで抑制された。これらの結果から、炎症性微小環境において、M $\phi$  由来の液性因子として OPN ならびにトロンビン発現量が増加し、Thr-OPN 産生が亢進した。さらに Thr-OPN がインテグリン  $\alpha 4/\alpha 9$  を介して M $\phi$  の M2 分化を増幅することにより、血管新生を促進することが示された (図 2)。

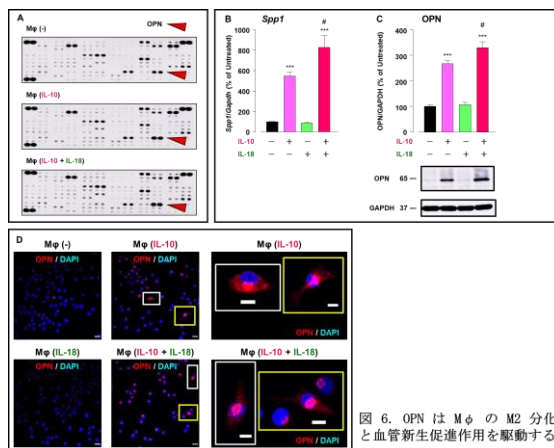


図 6. OPN は M $\phi$  の M2 分化と血管新生促進作用を駆動する

#### (6) M2-様 M $\phi$ による血管新生促進機構における CD163 の役割

CD163 は当初、ヘモグロビン-ハプトグロブリン複合体を内在化する受容体として発見され、現在では M2 M $\phi$  マーカーとしても広く認識されている。近年、RA やがんをはじめとする慢性炎症性疾患患者の炎症病巣において、CD163 陽性 M $\phi$  が高度に集積することに加え、病的血管新生の密度と CD163 発現量が正の相関を示すことが報告されている。しかしながら、その役割についてはほとんど知られていない。そこで、M2-様 M $\phi$  による血管新生促進機構における CD163 の役割について検討した。M $\phi$  (-) と比較して、M $\phi$  (IL-10 + IL-18) において、CD163 は偽足先端部付近に高度に局在した (図 7A)。さらに抗 CD163 中和抗体の処置によって、

血管内皮細胞と M $\phi$  (IL-10 + IL-18) との細胞間相互作用が消失し、その結果として血管新生促進作用が阻害された (図 7B)。したがって、M2-様 M $\phi$  は、CD163 を介して血管内皮細胞と直接的に相互作用することにより、血管新生を促進させる可能性が考えられた。

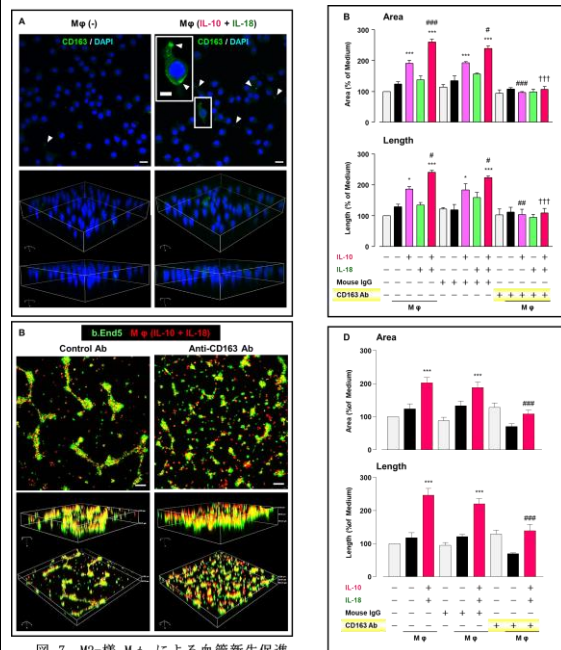


図 7. M2-様 M $\phi$  による血管新生促進機構における CD163 の役割

#### まとめ

以上の結果より、炎症局所の微小環境において、IL-18 は IL-10 と相乗的に M $\phi$  由来の液性因子として OPN およびトロンビン発現量を増加させ、このことが Thr-OPN 産生増加を引き起こし、インテグリン  $\alpha 4/\alpha 9$  を介して M $\phi$  の M2 分化を増強することによって、血管新生促進作用を誘導することが明らかとなった (図 2)。さらに M2-様 M $\phi$  による血管新生促進機構において、CD163 を介した M $\phi$  と血管内皮細胞間の直接的な細胞間相互作用が、決定的な役割を担っている可能性が提唱された (図 2)。

#### 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 2 件)

① Shinichi Hamasaki, Takuro Kobori, Yui Yamazaki, Atsuhiko Kitaura, Atsuko Niwa, Takashi Nishinaka, Masahiro Nishibori, Shuji Mori, Shinichi Nakao, and Hideo Takahashi, Effects of scavenger receptors-1 class A stimulation on macrophage morphology and advanced glycation end product phagocytosis, Scientific Reports, 査読有, Vol. 8, No. 5901, 2018, DOI: 10.1038/s41598-018-24325-y

② Takuro Kobori, Shinichi Hamasaki,

Atsuhiko Kitaura, Yui Yamazaki, Takashi Nishinaka, Atsuko Niwa, Shinichi Nakao, Hidenori Wake, Shuji Mori, Tadashi Yoshino, Masahiro Nishibori, Hideo Takahashi、Interleukin-18 Amplifies Macrophage Polarization and Morphological Alteration, Leading to Excessive Angiogenesis、Frontiers in Immunology、査読有、Vol. 9、No. 334、2018、DOI: 10.3389/fimmu.2018.00334

[学会発表] (計 10 件)

① 小堀 宅郎、濱崎 真一、北浦 淳寛、山崎由衣、西中 崇、丹羽 淳子、西堀 正洋、高橋 英夫、マクロファージと血管内皮細胞の細胞間相互作用による血管新生促進機構の解析、第 138 回 日本薬理学会関東部会、2018 年 3 月 10 日、慶応義塾大学薬学部 (東京都・港区)

② 小堀 宅郎、濱崎 真一、北浦 淳寛、西中 崇、丹羽 淳子、森 秀治、西堀 正洋、高橋 英夫、IL-18 はオステオポンチンを介してマクロファージ M2 分化と血管新生作用を増強する、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日、長崎ブリックホールおよび長崎新聞文化ホール (長崎県・長崎市)

③ 西中 崇、丹羽 淳子、小堀 宅郎、高橋 英夫、SHRSP は赤血球産生の増加を示す、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日、長崎ブリックホールおよび長崎新聞文化ホール (長崎県・長崎市)

④ 丹羽 淳子、西中 崇、赤星 保光、小堀 宅郎、高橋 英夫、運動介入は骨髄微小環境を改善し血管系前駆細胞による脳卒中回復を促進する、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホールおよび長崎新聞文化ホール (長崎県・長崎市)

⑤ Takuro Kobori, Takashi Nishinaka, Atsuko Niwa, Hideo Takahashi、IL-18 amplifies macrophage M2 polarization, leading to enhancement of angiogenesis via up-regulation of osteopontin、第 11 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス、2016 年 10 月 29 日、近畿大学東大阪キャンパス (大阪府・東大阪市)

⑥ 小堀 宅郎、濱崎 真一、北浦 淳寛、加藤貴史、丹羽 淳子、高橋 英夫、M2 マクロファージによる血管新生促進作用に対する IL-18 の影響、第 89 回 日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑦ 濱崎 真一、小堀 宅郎、北浦 淳寛、丹羽 淳子、高橋 英夫、終末糖化産物 (AGEs) はマクロファージによる血管内皮細胞の管腔

形成を促進する、第 89 回 日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑧ 小堀 宅郎、濱崎 真一、北浦 淳寛、加藤貴史、丹羽 淳子、高橋 英夫、IL-18 は M2 マクロファージによる血管新生を促進する、第 128 回 日本薬理学会近畿部会、2015 年 11 月 20 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)

⑨ 丹羽 淳子、赤星 保光、堀内 喜高、濱崎 真一、小堀 宅郎、西堀 正洋、高橋 英夫、自発運動は視床下部神経新生を促進し脳卒中後の恒常性維持に寄与する、第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

⑩ 小堀 宅郎、濱崎 真一、丹羽 淳子、高橋 英夫、IL-18 はマクロファージの M2 分化を促進する、第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
<https://www.med.kindai.ac.jp/laboratory/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堀 宅郎 (KOBORI, Takuro)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号：60734697