

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591109

研究課題名(和文)マクロファージ極性変化による動脈硬化病変進展の分子機序解明と制御法の開発

研究課題名(英文)The roles of macrophage polarization in vascular remodeling

## 研究代表者

武田 憲彦 (TAKEDA, NORIHIKO)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：40422307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化病変、大動脈瘤の進展および腫瘍血管の形成過程では、これら組織リモデリング過程で形成された血管の脆弱性がその病態において重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では、炎症細胞、特にマクロファージ極性に着目し、血管リモデリング過程における炎症惹起型、炎症抑制型マクロファージの役割について解析を行った。その結果、腫瘍を含む未熟な血管新生過程において、炎症惹起型マクロファージの持続的な集積が血管脆弱性の原因となっていることを明らかにした。血管増殖因子のみならず、マクロファージ亜集団の挙動を制御することで、血管リモデリングの正常化を引き起こせる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Vascular remodeling develops during the pathogenesis of atherosclerosis, aortic aneurysm and tumor progression. While the vascular integrity critically influence the progression of these disorders, its underlying mechanisms are still unclear. Macrophages are key mediators of inflammation, and can be broadly classified as M1 (pro-inflammatory) and M2 (anti-inflammatory) type. In this study, we examined the molecular link how macrophage polarization affect the vascular remodeling processes, and elucidated that persistent accumulation of pro-inflammatory macrophages elicits the immature vessel formation. These results showed that not only regulating the abundance of angiogenic factor, but also modulating the behavior of inflammatory cells could be a potential therapeutic target in normalization of the vascular remodeling processes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：炎症 低酸素シグナル 血管リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

生体内における様々なストレスは組織構造の再構築(リモデリング)を引き起こす。組織リモデリングには皮膚創傷治癒過程のような恒常性維持に働く組織リモデリングもあれば、炎症、代謝ストレスにより惹起される動脈硬化病変、血行力学的ストレスにより生じる動脈瘤進展など病態形成に深く関わるものも含まれる。更には腫瘍進展過程もよりダイナミックな組織リモデリングと考えられる。

このような組織リモデリング過程では、新生血管の形成とその成熟化が極めて大きな役割を果たしており、特に血管リモデリングと呼ばれている。血管リモデリングにおける血管新生過程は大別して、機能的血管を再構成することにより組織の酸素供給を改善する成熟した血管形成プロセスと、透過性の高い未熟な血管を生成する未熟な血管新生プロセスの2種類が存在することが知られている。特に未熟な血管新生は、動脈硬化病変や大動脈瘤の不安定化、および腫瘍内低酸素環境を惹起することで、その病態進展に大きく関わっているが、“なぜ未熟な血管形成が惹起されるのか？”については未だ詳細な機構は不明である。

近年の報告から、血管リモデリング過程において、組織に浸潤するマクロファージが重要な役割を果たしている事が報告されている。更に最近の研究から、組織に浸潤するマクロファージが大きく2種類に分類されること、即ち炎症惹起型(M1)マクロファージと、炎症抑制型(M2)マクロファージが存在することが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

上記の背景から血管リモデリング過程において炎症惹起型(M1)および炎症抑制型(M2)マクロファージが固有の役割を果たしているとの仮説を構築し、動脈硬化モデル、動脈瘤モデルおよび皮膚、腫瘍血管新生モデルにおけるM1・M2マクロファージの役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス動脈硬化モデルとして ApoE ノックアウトマウスにおける高脂肪食負荷モデル、また動脈瘤モデルとして、マウス腹部大動脈に塩化カルシウムを塗布し、2週間後に動脈瘤を発症させる病態モデルを作成、動脈壁に浸潤する炎症細胞の解析を行う。

(2) 成熟・未成熟な血管形成過程を解析するために、成熟した血管新生モデルとして皮膚

創傷治癒モデルを用いた解析、また未熟な血管新生モデルとしてマウス皮下腫瘍増殖モデルを用いた解析を行う。両モデルに浸潤する炎症細胞、特にマクロファージ極性につき解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 動脈硬化モデル、動脈瘤形成モデルでの解析

ApoE 欠損マウスへの高脂肪食負荷を用いた動脈硬化モデル、およびリン酸カルシウム投与による動脈瘤形成モデルを作成した。病変部の動脈壁を回収し、炎症細胞浸潤につき、フローサイトメーターを用いて解析を行った。いずれの病態モデルにおいても、動脈硬化層および動脈壁の脆弱化を認めたものの、動脈壁から回収した組織における炎症細胞浸潤を十分に評価することが困難であった。これはマウス動脈壁に浸潤する炎症細胞数が限定的であることも一因であると考えられた。そこで、まず以下の研究計画(2)の解析を先行させることとした。

### (2) 皮膚創傷治癒モデル、腫瘍血管新生モデルを用いた解析

皮膚創傷治癒モデルにおいては、その過程でまず脆弱な血管新生が引き起こされた後に、成熟した血管構造が再構築されることが知られている。即ち、皮膚創傷治癒過程において浸潤する炎症細胞、マクロファージ極性を解析することで、成熟した血管新生に伴うマクロファージ浸潤の様式を解析することが可能になる。

我々はマウス皮膚における創傷過程において新生血管周囲に浸潤するマクロファージを回収、フローサイトメーターを用いてその様式を解析した。CD11b 陽性細胞集団を更にF4/80 および Ly6c を用いて展開したところ、炎症惹起型(M1)および炎症抑制型(M2)の2群の細胞集団に分類することが出来た。

創傷治癒作成後、集積する細胞を経時的に解析したところ、急性期に一過性に炎症惹起型マクロファージが集積する一方で、創傷治癒後亜急性期に炎症抑制型マクロファージが集積することを確認した。血管新生過程の主要な制御因子である血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)発現を解析したところ、炎症惹起型マクロファージにおいて強発現していることを確認した。

引き続き腫瘍内血管リモデリング過程において集積するマクロファージ極性につき解析を行った。腫瘍内においても炎症惹起型(M1)および炎症抑制型(M2)の表現型を呈す

る2種類の細胞集団を特定することが出来た。興味深い事に、腫瘍内においては炎症抑制型マクロファージの集積に比して、炎症惹起型マクロファージ集積が有意に増加していることが確認された。また、皮膚創傷治癒過程と同様に、炎症惹起型マクロファージは VEGF-A を強発現していた。

皮膚創傷モデルにおける成熟した血管リモデリング過程と、腫瘍内における未熟な血管リモデリング過程において集積するマクロファージ極性を比較した。その結果、腫瘍組織における未熟な血管形成過程では、炎症惹起型マクロファージの集積が遅延していることが判った。炎症惹起型マクロファージは血管新生増殖因子 VEGF-A を発現していることから、炎症惹起型マクロファージが慢性的に集積することが未熟な血管形成の原因になっていると考えられた。

更にこの仮説を検証すべく、炎症惹起型マクロファージ特異的に発現する Chemokine Receptor を探索し、受容体 A を同定した。受容体 A は腫瘍組織に浸潤する炎症惹起型マクロファージにおいて強発現する一方、皮膚創傷治癒部位に集積する炎症惹起型マクロファージでの発現は亢進していなかった。即ち受容体 A の発現誘導は腫瘍組織特異的であると考えられた。

そこで受容体 A の役割を解析するために、骨髓球、マクロファージ特異的に受容体 A 発現を欠失したマウスを樹立した(骨髓球特異的受容体 A 欠損マウス)。この受容体 A 欠損マウスを用いて腫瘍移植モデルを行ったところ、腫瘍内に浸潤する炎症惹起型マクロファージ数が有意に減少していることを確認した。即ち受容体 A を介するシグナルは、腫瘍組織における炎症惹起型マクロファージ浸潤において必須の役割を果たしている事が判った。引き続き、骨髓球特異的受容体 A 欠損マウスにおいて形成される腫瘍組織を解析した。その結果、受容体 A 欠損マウスにおいて、腫瘍内血管構造が成熟化していること、更に腫瘍増殖がより亢進することを確認した。即ち腫瘍内における炎症惹起型マクロファージ浸潤は、腫瘍内の血管の未熟化引き起こし、腫瘍進展を抑制していることが確認された。以上の結果より、炎症惹起型マクロファージの持続的な組織浸潤が未熟な血管リモデリング過程を惹起している事が示唆された。

## 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7件)

1. Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Uemoto S, Asagiri M. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-caused acute liver failure. *FEBS Open Bio* 2014;4:777-87.
2. Ruthenborg RJ, Ban JJ, Kim JW, Wazir A, Takeda N, Kim JW. Regulation of Wound Healing and Fibrosis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1. *Mol Cells*. 2014 Sep;37(9):637-43.
3. Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, Takeda N, Nagai R, Komuro I, Suga H, Nureki O. Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocyclic Peptide Inducing Dynamic Structural Change. *Structure*. 2014 Feb 4;22(2):345-52.
4. Cowburn AS, Takeda N, Boutin AT, Kim JW, Sterling J, Nakasaki M, Southwood M, Goldrath AW, Jamora C, Nizet V, Chilvers E, Johnson RS. HIF isoforms in the skin differentially regulate systemic arterial pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 22;110(43):17570-5.
5. Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, Isagawa T, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R, Maemura K. VEGF-A Induces its Negative Regulator, Soluble Form of VEGFR-1, by Modulating its Alternative Splicing. *FEBS Lett*. 2013;587(14):2179-85.
6. 武田憲彦  
“低酸素シグナルによるマクロファージ制御”  
血管医学 Vol.15 No.2, 23-28, 2014
7. 武田憲彦  
“組織リモデリングにおける低酸素シグナル”  
循環制御 Vol. 35 No.3, 203-204, 2014

〔学会発表〕(計3件)

武田憲彦

第78回日本循環器学会学術集会

トピック 組織リモデリングにおける低酸素・代謝シグナル

“The Roles of Hypoxia Signaling in Cardiac Remodeling”

(03/22/2014、東京国際フォーラム、東京)

武田憲彦

第35回日本循環制御医学会総会

シンポジウム2 (臓器連関と循環器疾患)

心臓リモデリングにおける低酸素シグナルの役割

(7/4/2014、九州大学百年講堂、福岡)

武田憲彦

第18回日本適応医学会学術集会

マクロファージ代謝リプログラミングにおける細胞内低酸素センサー

(6/22/2014、一橋大学一橋講堂)

〔図書〕(計1件)

武田憲彦

“マクロファージの食と代謝”

実験医学(増刊) Vol. 32 No. 15, 21-26, 2014

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 憲彦 (TAKEDA, Norihiko)

東京大学・医学部附属病院・循環器内科

特任講師

研究者番号: 40422307