

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18299

研究課題名(和文)極性を有するマクロファージ投与による重症虚血肢の血流改善効果の検討

研究課題名(英文)The examination of blood flow improvement effect in murine model of hindlimb ischemia by administration of polar macrophages

研究代表者

西中村 瞳 (Hitomi, NISHINAKAMURA)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：90597692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：M-CSF存在下で培養したM-M 投与による虚血肢マウス血流改善効果の作用機序をIL-10 KO M-M を用いることにより明らかにした。WT M-M 投与の患側において、IL-6タンパクが、投与細胞なし及びIL-10 KO M-M 投与群に比べて有意に高い値を示し、血流改善の過程で投与細胞が産生するIL-10によりIL-6タンパクの発現調節が行なわれる可能性がある。次にin vitroで血管・リンパ管新生と形成の評価を共培養の系で行った結果、IL-10 KO M-M との共培養ではリンパ管内皮細胞の管腔新生・形成に低下が認められたことから、投与細胞に発現するIL-10の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移植による血管再生治療は重症下肢虚血における重要な治療戦略であるが、投与細胞群による虚血肢の細胞が受ける影響及び血管・リンパ管新生に対する作用機序は不明な点が多い。これまでに我々はM-CSF存在下で培養したF4/80陽性細胞(M-M) 投与による虚血肢血流改善効果を見出してきたが、本研究ではIL-10 KO M-M を用いることにより細胞治療におけるIL-10の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：IL-10 KO M-M was used to elucidate the mechanism of action of improving blood flow in hind limb ischemia by administration of M-M cultured in the presence of M-CSF. IL-6 protein shows significantly higher values in the affected side after WT M-M administration than in the non-administered cells and IL-10 KO M-M -administered groups, and IL-10 produced by the administered cells may regulate the expression of IL-6 protein. Next, in vitro evaluation of angiogenesis and lymphangiogenesis was carried out in a co-culture system. As a result, co-culture with IL-10 KO M-M showed a decrease the formation of lymphatic endothelial cells. From these results, it was suggested that IL-10 expressed in the treated cells was involved.

研究分野：細胞移植

キーワード：マクロファージ 血管新生 リンパ管新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症やバージャー病の患者数は 500 万人を超える。その 10~20%の患者は薬物療法、経皮的血管形成術、バイパス術などの既存の治療法では効果が不十分で、重症虚血肢へと進行する。その結果、毎年 1 万人を超える患者が治療不可能となり、下肢切断を余儀なくされる。1997年に末梢血中の CD34 陽性細胞が血管内皮前駆細胞(EPC)であると提唱され、自己 EPC を虚血部位に移植する臨床試験が行われた。一定の有用性が認められたが、患者が高齢であったり高血圧、糖尿病などの基礎疾患がある場合、末梢血循環 EPC の数が減少し、さらにその細胞機能は低下しており、十分な治療効果は得られなかった。2000年には自己骨髄単核球細胞 (EPC を含む) を虚血肢へ移植する臨床試験が行われ、有効性、安全性が確認された (TACT trial)。全身麻酔下にて少なくとも 1×10^9 個の骨髄単核球を得るため、約 500~1000ml の骨髄液採取を行い、分離、濃縮の作業後に虚血四肢骨格筋 50 箇所へ投与されるが、EPC を移植する場合と同じ問題を抱え、無効例が 20%~30%の割合で存在する。これらの細胞移植治療の問題点は以下の通りである。

- EPC を移植する場合、基礎疾患を有した患者から採取する細胞数及び機能が一定ではない
- 自己骨髄単核球細胞を移植する場合、大量の骨髄採取を必要とする
- 患者の病態、移植する細胞の状態、細胞治療効果の有無などの関係が不明である

これらを解決できる細胞移植治療は、重症虚血肢の治療に効果的で、世間に幅広く定着する治療となり得る。我々は選択的で有効的な新しい細胞治療を確立するべく、マウス下肢虚血モデル(左側下肢の大腿動脈/静脈を結紮・切離する)を用いて研究を進めてきた。

まず骨髄細胞中の CD11b (単球系細胞のマーカー) 陽性細胞群に着目した。虚血下肢骨格筋 3 箇所に CD11b 陽性細胞群を移植した場合、コントロール(生理食塩水を投与した群)及び CD11b 陰性細胞移植群比べ、 1×10^6 個の細胞数で有意な血流改善効果が認められた。これは骨髄細胞群の 1×10^7 個の血流改善効果と同等であり、血流改善効果が認められた下肢では血管新生、リンパ管新生が増加していた (Nishinakamura et al. *J Vasc Surg.* 2013; 57:1090-9)。

次に CD11b 陽性の単球系細胞の中に多く含まれるマクロファージ(M ϕ)に着目した。in vitro で再現性よく M ϕ を分化・誘導する 2 通りの方法を選択した。野生型(WT)マウスの少量の骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)存在下で 7 日間培養、増殖させる(M-M ϕ)方法、または、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)存在下で 7 日間培養、増殖させる(GM-M ϕ)方法である。いずれの方法でも F4/80 (M ϕ のマーカー) 陽性 M ϕ を得ることが可能である。各々の細胞集団を下肢の虚血部位に移植した場合、CD11b 陽性細胞よりもさらに数が少ない 1×10^5 個の細胞を移植することでコントロールに比べて血流改善効果が認められた [図 1]。

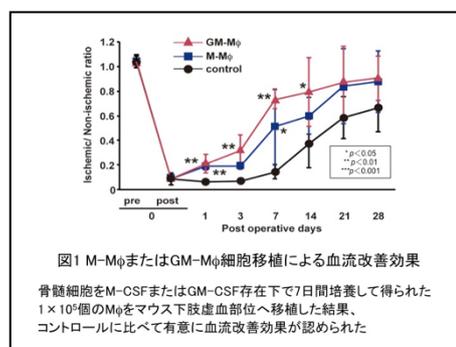


図1 M-M ϕ またはGM-M ϕ 細胞移植による血流改善効果

骨髄細胞をM-CSFまたはGM-CSF存在下で7日間培養して得られた 1×10^5 個のM ϕ をマウス下肢虚血部位へ移植した結果、コントロールに比べて有意に血流改善効果が認められた

また虚血部位へ M-Mφまたは GM-Mφの移植を行った下肢組織中では抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現がコントロールに比べて有意に増加していた [図 2]。さらに興味深いことに M-Mφおよび GM-Mφに発現するサイトカインを比較した結果、両者は全く異なる両極端な性質を有した [図 3] [表 1] (*Nishinakamura et al. PLoS ONE 2014 Sep 9;9(9):e106987*)。一般的に、Mφは置かれた状況によって機能や形態を変え、組織の恒常性維持や免疫反応などに寄与する。その様々な性質は環境の変化に応じて可逆的で、変化しうることから『極性を有する』と言われる。以上より本研究では次の実験を進める。

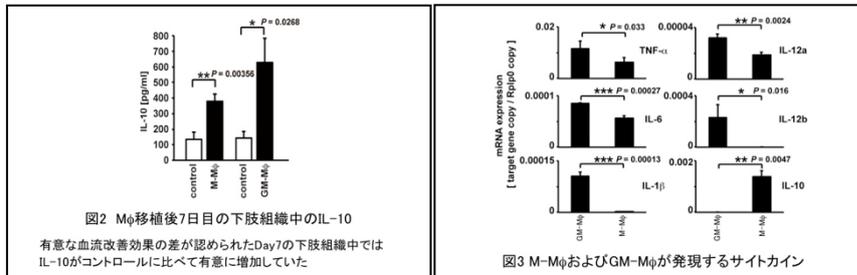


図2 Mφ移植後7日目の下肢組織中のIL-10

有意な血流改善効果の差が認められたDay7の下肢組織中ではIL-10がコントロールに比べて有意に増加していた

図3 M-MφおよびGM-Mφが発現するサイトカイン

表1 M-MφとGM-Mφの性質

細胞の種類	細胞の特徴
M-Mφ (M-CSFで培養)	炎症性サイトカインIL-6, TNF-α, IL-1βなどの発現が低い 抗炎症性サイトカインIL-10の発現が高い 免疫抑制化、炎症反応抑制に働く
GM-Mφ (GM-CSFで培養)	炎症性サイトカインIL-6, TNF-α, IL-1βなどの発現が高い 抗炎症性サイトカインIL-10の発現が低い 免疫活性化、炎症反応惹起に働く

2. 研究の目的

少量の骨髄細胞から培養・増殖させた極性を有するマクロファージ(M-Mφ)をマウス下肢虚血部位へ移植する細胞治療を行う。移植する M-Mφの機能解析、血管・リンパ管構築の解析を行い、下肢虚血の血流改善効果における IL-10 の重要性について明らかにする。IL-10 遺伝子欠損マウスを用いて極性を有する M-Mφ移植の機序を詳細に調べる事により、将来的に基礎疾患を有する患者に対して低侵襲であり、選択的かつ有効的な細胞治療方法の開発へ繋げる。

3. 研究の方法

- 下肢虚血マウスに極性を有する M-Mφを移植して血流改善効果を検討した。IL-10 遺伝子欠損 (KO) マウスの虚血肢モデル、もしくは IL-10 KO マウス由来の M-Mφを移植して比較検討を行なった。
- IL-10 KO マウス由来 M-Mφを移植後、患側下肢組織中の炎症性・抗炎症性サイトカインの発現を調べた。
- M-Mφによる In vitro での管腔形成能力を検討した。
- これまでに得られた M-Mφ移植治療の結果を全て照らし合わせた。

4. 研究成果

IL-10 KO マウスを用いて M-Mφ 移植を行い、血流改善効果の検討を行なった。その結果を図 4 に示す。M-Mφ に発現する IL-10 の重要性が明らかになった。

次に IL-10 KO 由来の M-Mφ 移植を行い、血流改善効果の検討を行った。同時に患側下肢組織において血管内皮細胞・リンパ管内皮細胞のマーカである

CD31, LYVE-1 の蛍光免疫染色を行った。その結果を図 5 に示す。IL-10 KO M-Mφ 移植では未処置であるコントロールと同程度の血流改善効果であった。

次に患側下肢に発現する炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA およびタンパク量を経時的に比較した。その結果を図 6 に示す。細胞移植後 1 日目においてコントロール群に比べて野生型 (WT) M-Mφ 投与群では IL-6 タンパクが有意に増加した。また WT M-Mφ 投与群に比べて IL-10 KO M-Mφ 投与群では IL-6 が有意に減少していた。以上の結果から血流改善の過程で移植細胞が産生する IL-10 により IL-6 の発現調節が行われている可能性がある。また、*in vitro* における血管・リンパ管内皮細胞の管腔形成の評価では血管内皮細胞のみの場合に比べて WT M-Mφ との共培養では血管内皮細胞の管腔形成能が増加した。WT に比べて IL-10 KO M-Mφ との共培養ではリンパ管内皮細胞の管腔形成能が低下していた。図 7 に示す。移植する M-Mφ の機能解析、血管・リンパ管構築の解析を行い、下肢虚血の血流改善効果における IL-10 の重要性が明らかになった。今後は、糖尿病などの基礎疾患がある場合、IL-10 を指標として分化・誘導させたどのような細胞の移植を行うのか適切なものかを考え、選択的かつ有効的な細胞治療方法の開発へ繋げる。

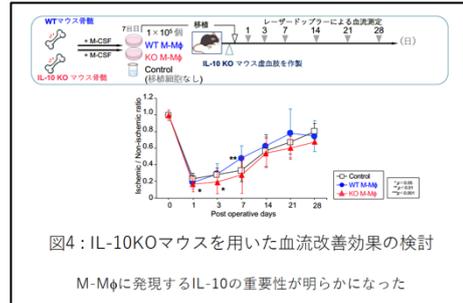


図 4: IL-10KOマウスを用いた血流改善効果の検討
M-Mφに発現するIL-10の重要性が明らかになった

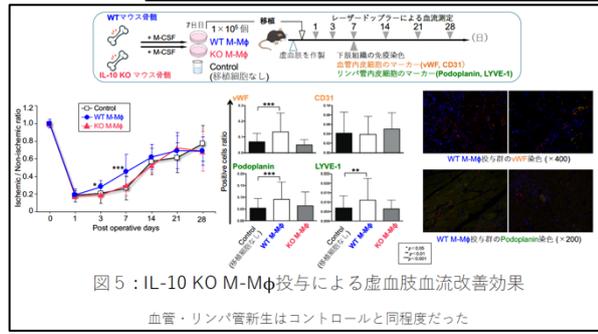


図 5: IL-10 KO M-Mφ 投与による虚血肢血流改善効果
血管・リンパ管新生はコントロールと同程度だった

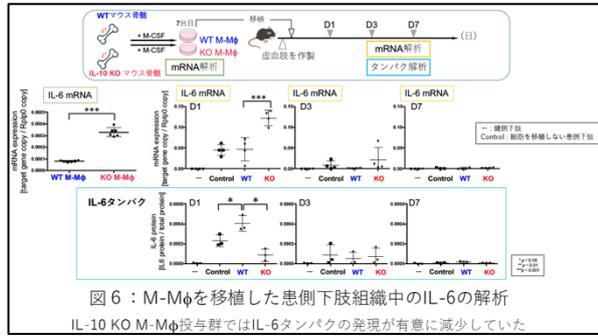


図 6: M-Mφ を移植した患側下肢組織中の IL-6 の解析
IL-10 KO M-Mφ 投与群では IL-6 タンパクの発現が有意に減少していた

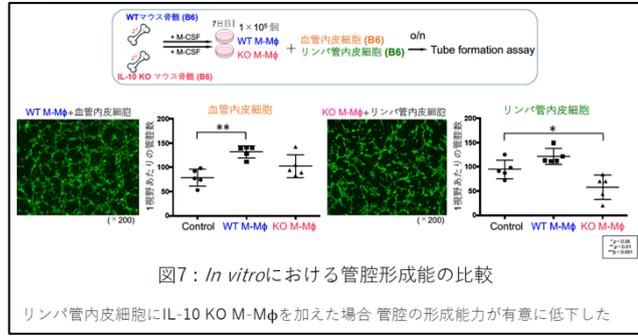


図 7: *In vitro* における管腔形成能の比較

リンパ管内皮細胞に IL-10 KO M-Mφ を加えた場合 管腔の形成能力が有意に低下した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Itoh Takeshi、Nishinakamura Hitomi、Kumano Kenjiro、Takahashi Hiroyuki、Kodama Shohta	4. 巻 12
2. 論文標題 The Spleen Is an Ideal Site for Inducing Transplanted Islet Graft Expansion in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0170899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西中村 瞳、秦優子、高橋宏幸、松岡泰祐、桑原豪、伊東威、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 マクロファージ投与による虚血肢マウス血流改善効果の作用機序
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 西中村 瞳、伊東 威、小玉 正太	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日本移植学会	5. 総ページ数 5
3. 書名 移植	

1. 著者名 西中村 瞳、伊東 威、吉松 軍平、小玉 正太	4. 発行年 2017年
2. 出版社 北隆社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----