

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16384

研究課題名(和文) M1マクロファージからM2マクロファージへの形質転換を介した大動脈瘤治療の試み

研究課題名(英文) administration of M2 macrophages suppresses expansion of aortic aneurysms in mice

研究代表者

緒方 藍歌 (OGATA, Aika)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：70718311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤の外科的・内科的治療には限界があり、新たな治療法の開発が望まれる。病理像では慢性炎症を呈し炎症性M1マクロファージ(M1MF)が集積する。抗炎症性M2マクロファージ(M2MF)も集積するが、M1/M2比が高値を示す。M1MFをM2MFへ形質転換を誘導しM2MF優位にすることが、大動脈瘤治療戦略として成り立つ可能性がある。

M2MF共培養により、M1MFの炎症性遺伝子発現の低減やactive MMP-2、-9酵素活性の低下を示した。M2MFを大動脈瘤モデルマウスに投与すると、炎症性タンパク発現量の低下や抗炎症性タンパク発現量の増加、M1/M2比の低下がみられ、大動脈瘤治療効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化や生活習慣病人口の増加に伴い、大動脈瘤罹患患者数は増加している。大動脈瘤は、大動脈が瘤のように膨らむ疾患で、動脈硬化が主な原因となる。瘤は自然に退縮することなく、破裂した場合は生命に危険が及ぶ。標準治療である人工血管置換術は、破裂予防効果は絶大だが、手術侵襲が大きい。また、手術対象患者は高齢化しており、ハイリスク症例では術後合併症などを考慮すると、手術を躊躇することも少なくない。従って、超低侵襲な大動脈瘤治療法の開発は国民的課題である。本研究成果は、臨床的意義を考慮すれば超低侵襲な大動脈瘤治療法への布石となり得る。

研究成果の概要(英文)：Aortic aneurysm (AA) is a serious and life-threatening disease. Although significant advances have been made in open surgery and endovascular repair, no medical therapies are available to prevent AA growth. Appearance of many M1MF is observed along with secretion of proinflammatory cytokines and chemokines in AA progression. Equal proportions of M1/M2 leads to aneurysm stability, whereas increased population of M1MF predisposes the aneurysm to rupture. We hypothesized that inducing the high dominant localization of M2MF at the lesion site of AA and regulating the M1/M2 ratio might be a therapeutic strategy of AA treatment. M1MF had significantly decreased gene expressions by M2MF co-culture. M2MF exhibited significant decrease MMP-9 compared with AA tissue mono-culture. Administration of M2MF inhibited AA expansion through the improvement of inflammatory reaction with the dominance of M2MF. This study provides that M2MF administration might be useful for the treatment of AA.

研究分野：心臓血管、再生医療

キーワード：大動脈瘤 炎症 マクロファージ 形質転換

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化や生活習慣病人口の増加に伴い、大動脈瘤罹患患者数は増加している。厚生労働省人口動態統計平成27年「大動脈瘤及び解離」での、総死亡数に対する割合は1.3%を占める。大動脈瘤が破裂した場合、生命に危険が及ぶ。標準治療である人工血管置換術の破裂予防効果は絶大だが、手術侵襲が大きく、手術死亡率・合併症発症率が低くない。また、手術対象患者は高齢化しており、ハイリスク症例では術後合併症などを考慮すると、手術を躊躇することも少なくない。従って、低侵襲な大動脈瘤治療法の開発は国民的課題である。

大動脈瘤の主因は動脈硬化で、病理像では慢性炎症を呈し、血管壁強度を担うエラスチン繊維の構造破壊が顕著に観察される。これは、血管壁に集積した炎症性マクロファージ(M1MF)を中心とした炎症性細胞が産生する、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2、-9やエラスターゼによる組織破壊に起因する。また、炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6、腫瘍壊死因子:TNF-)などを産生し、エラスチンを含む細胞外基質の分解と炎症反応を繰り返す。

研究代表者らは、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell:MSC)が持つ抗炎症作用や免疫抑制能に着目し、大動脈瘤モデルマウスにMSCを静脈内投与したところ、炎症抑制や細胞外基質合成促進を介した一過性の大動脈瘤縮小効果が得られたことを報告した。MSCによる治療メカニズムには、MSCパラクリン作用が示唆され、大動脈瘤病変部位で直接作用しているのはMSCではなく、抗炎症性M2マクロファージ(M2MF)であると推察できた。そこで、通常、大動脈瘤病変部位には、炎症性M1マクロファージ(M1MF)が集積している。したがって、M1MFをM2MFへ形質転換を誘導しM2MF優位にすることが、治療戦略として成り立つ可能性がある。

*In vitro*において、単球からのM2MFへの分化やM1MFからのM2MFへの形質転換には、IL-4やIL-13、IL-10、TGF- β 1などが用いられる。また、M2MFはIL-4、IL-10、TGF- β 1やエクソソームを産生することが知られている。したがって、瘤病変部位におけるM1MFからM2MFへの形質転換起因物質として、M2MF誘導因子(IL4/IL13)、M2MF細胞自身、M2MF培養上清、M2MF由来エクソソームが有用ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、IL4/IL13、M2MF、M2MF培養上清(M2MF-CM)、M2MF由来エクソソーム(M2MF-exo)を用い、瘤病変部位でのM1MFからM2MFへの形質転換を介した大動脈瘤治療効果について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*: マクロファージ細胞に対する各起因物質による抗炎症効果とM1MF形質転換の確認

マウスマクロファージ(J774A.1)を用い分化誘導前をM0MFとした。M0MFからM1MFへの分化誘導はLPSを用いた。M0MFからのM2MFへの分化誘導にはIL-4、IL-10、TGF- β 1を用いた。超遠心分離法により、M2MFの培養上清からM2MF-exoを回収した(図1)。各起因物質(IL4/IL13、M2MF-CM、M2MF-exo、M2MF)を培養培地に添加または共培養した。各培養条件下のM2MFからtotal RNAを抽出し、定量RT-PCRにてiNOS、IL-1、IL-6、TNF- α 、MCP-1、Arginase-1、Ym-1、IL-10、TGF- β 1の遺伝子発現変化を調べた。

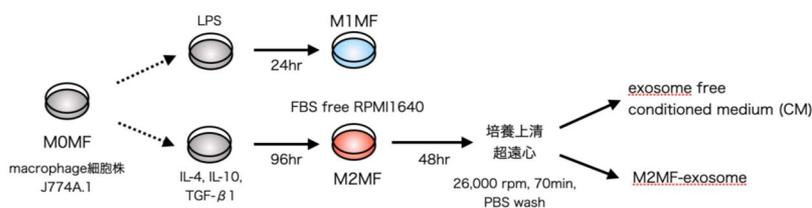


図1 マクロファージ分化誘導とエクソソーム分離方法

(2) *Ex vivo*: 大動脈瘤組織に対する各起因物質による抗炎症効果とM1MF形質転換の確認

6ヶ月齢以上のapolipoprotein E遺伝子欠損マウスに、皮下埋植の浸透圧ポンプから1000ng/min/kg Angiotensin-II(ATII)4週間持続注入による大動脈瘤モデルマウスを用い、大動脈瘤病変部位を採取した。各起因物質を培養培地に添加または共培養したのち、組織からタンパクを抽出し、MMP-2、MMP-2酵素活性量を測定した。

(3) *In vivo*: M2MF投与による大動脈瘤治療効果

大動脈瘤を発症したマウスに、(1)および(2)で効果が得られた起因物質M2MFを腹腔内投与した(M2MF群)。対照群には生理食塩水(saline群)を用いた。0,4,6,8週間後に、エコーで瘤最大短径を継時的に測定した。屠殺後、肉眼所見、顕微鏡下瘤径測定、生化学的評価(ELISAによる瘤組織中タンパク発現量定量測定;IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , IGF-1, TGF-

1, TIMP-1, TIMP-2) MMP-2, -9 酵素活性測定を行った。また、MF 形質転換については、組織切片の M1MF と M2MF 蛍光免疫染色評価を行った。

4. 研究成果

(1) *In vitro*: マクロファージ細胞に対する各起因物質による抗炎症効果と M1MF 形質転換の確認

図 2 に各培養条件で培養したマクロファージの形態観察結果を示す。IL4/IL13、M2MF-CM、M2MF-exo では、紡錘状細胞が見られた。M2MF-exo では、細胞内に取り込まれている様子が観察された。

M1MF 単独培養に比べ、起因物質 IL4/IL13 と M2MF は、iNOS, IL-6 遺伝子発現量が低減した。また、M2MF は MCP-1 遺伝子発現量が最も低減した。一方、M2MF は TGF- β 1 遺伝子発現量が上昇した (図 3)。

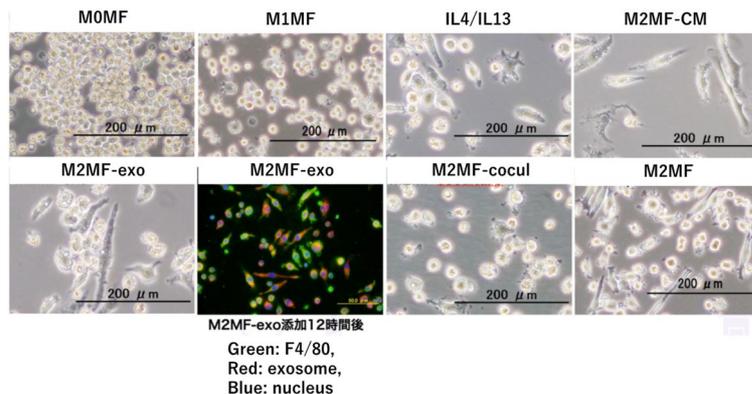


図2 マクロファージ分化誘導とエクソソーム取り込み後の顕微鏡観察

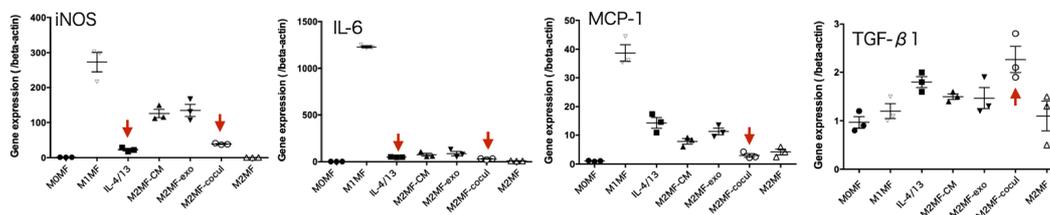


図3 各起因物質で培養したM1MFの遺伝子発現比較

(2) *Ex vivo*: 大動脈瘤組織に対する各起因物質による抗炎症効果と M1MF 形質転換の確認
大動脈瘤組織単培養群に比べ、M2MF-exo および M2MF で active MMP-2 と active MMP-9 酵素活性が低下傾向を示した (図 4)。

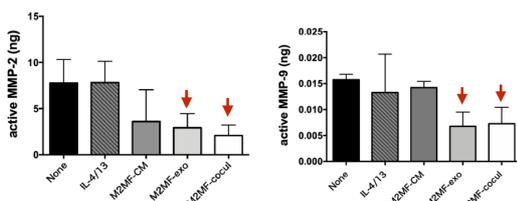


図4 各起因物質で培養した大動脈瘤組織のMMPs酵素活性比較

(3) *In vivo*: M2MF 投与による大動脈瘤治療効果

In vitro および *Ex vivo* の結果から、M2MF が M1MF の特異的遺伝子発現 (iNOS, IL-6, MCP-1) の低減、TGF- β 1 遺伝子発現の上昇、active MMP-2, -9 酵素活性の低下を示したことから、M2MF 投与による大動脈瘤治療効果を調べた。

大動脈瘤径は 8 週後において、エコーおよび顕微鏡下の計測において saline 群に比べて M2MF 群で有意な瘤径拡大抑制を示した。組織中タンパク発現量定量測定では、IL-1, IL-6, MCP-1, TNF- α , MPC-1 の低下、IL-4, IL-10 の増加が見られた。MMPs 酵素活性測定では、active MMP-9 が有意に低下した。蛍光免疫染色では、瘤組織に浸潤した M1MF/M2MF 比が低下した。また、投与 M2MF の大動脈瘤への遊走が見られた。

以上のことから、M2MF は共培養により M1MF の形質転換を誘導し、大動脈瘤治療に有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緒方藍歌、成田裕司、藤本和朗、碓氷章彦
2. 発表標題 大動脈瘤に対する抗炎症性M2マクロファージ投与の効果
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緒方藍歌、芦田真一、藤本和朗、碓氷章彦、成田裕司
2. 発表標題 抗炎症性M2マクロファージによる大動脈瘤治療の可能性
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緒方藍歌、成田裕司、藤本和朗、碓氷章彦
2. 発表標題 抗炎症性マクロファージによる大動脈瘤治療の可能性
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緒方藍歌、成田裕司、碓氷章彦
2. 発表標題 抗炎症性マクロファージによる大動脈瘤治療効果の検討
3. 学会等名 第19回再生心臓血管外科治療研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------