

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790878

研究課題名(和文) 骨髄由来細胞動員による動脈硬化進展と組織再生機構の解明

研究課題名(英文) Bone marrow-derived cell mobilization promotes the progression of atherosclerosis and tissue regeneration

研究代表者

佐藤 弥生 (Sato, Yayoi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20327810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化は、白血球のT細胞や単球/マクロファージから分泌される炎症性物質により進展することが知られている。免疫抑制剤であるcyclophosphamide(CPA)は、骨髄抑制により白血球の供給を低下させる。高脂肪食を負荷した動脈硬化モデルマウスで、CPAは初期の動脈硬化巣形成を抑制し、中程度の動脈硬化巣が形成された同マウスにおいては4週間のCPA投与で動脈硬化の進展が抑制された。これは末梢の炎症性T細胞数および炎症性マクロファージ細胞数の低下によるものと考えられた。また、血管組織内に発現するコラゲナーゼの発現低下も認め、膠原組織の維持によるプラークの安定化に寄与している可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis is one of the chronic inflammatory diseases, and the primary cause of heart disease or stroke in western countries. We investigated the effects of cyclophosphamide (CPA), a well-known immunomodulator and anticancer drug, in a murine model of established atherosclerosis. Continuous oral administration of CPA inhibited disease initiation in apolipoprotein E deficient, fed a high fat diet. Continuous CPA administration prevented from macrophage influx into formed atherosclerotic plaques. Here, atheroma progression was not significantly different even though a trend towards less plaque formation was observed in CPA-treated as compared to carrier-treated mice. Chemotherapy regulates lymphoid population like TH1/ TH2 balance in vivo. Additionally, pulse CPA treatment improved plaque stability with the decrease of matrixmetalloproteinase-2 and -9 expression. Our data suggest chemotherapy has a possibility as an optional therapy for advanced atherosclerosis.

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：動脈硬化 マクロファージ T細胞 炎症細胞 コラゲナーゼ cyclophosphamide ApoEノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化巣の形成は、初期段階で、まず骨髄由来の単球や T 細胞を含めた炎症性細胞の傷害血管内皮周囲への動員、集簇がおこり次いで集簇した単球系細胞のマクロファージへの分化、接着分子、血栓誘導因子の発現等を経て最終的には様々な種類の細胞で構成される線維状のプラークが形成される。以前より申請者らのグループは、骨髄由来の単球・マクロファージ系前駆細胞に特異的な細胞表面マーカーとされてきた血管内皮増殖因子受容体 1 (VEGFR1) 陽性細胞を含む、骨髄由来細胞が VEGF あるいは VEGFR1 の特異的リガンドである胎盤成長因子 (PlGF) や VEGF の濃度上昇に応じて末梢組織中に有意に動員され、その一部は血管新生に寄与すること、またこれらの単球・マクロファージ系細胞の動員あるいは PlGF や VEGF の濃度上昇に応じて組織中の血管基底膜等を基質とする各種のマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) が活性化されることを報告した。近年、動脈硬化性粥腫の形成においても血管新生の重要性が示唆されており、末梢血中の血管新生因子濃度も動脈硬化性病変の進展、重症化に伴い上昇するとの報告がある。これらの研究成果は、動脈硬化あるいは組織再生に關与する骨髄由来細胞の動員機構が、主にセリンプロテアーゼに属する線溶系の亢進を起点としていることを示唆している。以上の研究成果を基礎として、申請者は、骨髄由来細胞動態の視点から、生体内で進行する動脈硬化性疾患の病態を捉え、細胞動員の起点は線溶系及び MMP の活性化にあるとの仮説に至った。

2. 研究の目的

前述のように、炎症性細胞の異常集簇は、動脈硬化性プラークの形成を促進する。我々は、骨髄由来細胞の動員機構の起点を各種プロテアーゼの活性化によると考えた。当研究では、MMP 及び線維素溶解系のプロテアーゼ活性制御による炎症性細胞の動態と動脈硬化及び組織再生との関連性の詳細を解明することを主目的とした。また、骨髄由来細胞の動員調節機構が明らかとなれば、各種プロテアーゼ活性の制御によるプラーク形成の抑制、壊死組織再生の促進を目標とした治療法開発基盤の形成までを目的の範疇とした。

3. 研究の方法

動脈硬化性プラーク形成における骨髄由来細胞の動員機構と線溶系プロテアーゼ活性の関連性解明のため、ApoE 遺伝子欠損マウス (ApoE^{-/-}) に高脂肪食負荷を行い、骨髄抑制により末梢への細胞供給を低下させる目的で、免疫抑制剤 (cyclophosphamide) 投与を行った

(1) 実験 1

動脈硬化初期巣への CPA の効果を見るため、ApoE^{-/-} マウスに高脂肪食を投与と同時に CPA を経口投与する CPA 投与群と非投与群の対象群にわけて 12 週間飼育を行った。12 週時に末梢血、脾臓細胞、腹腔内細胞、血清、大動脈などの組織を採取し解析を行った。具体的には、上行大動脈～大腿動脈までの大動脈を採取し、動脈硬化巣形成を定量的に評価した。大動脈弁輪部は病理組織学的解析のため、凍結およびホルマリン標本とし、HE、oil-re-O などの各種組織染色およびマクロファージ、平滑筋細胞、プロテアーゼなどの免疫組織染色を行った。大動脈からはプロテアーゼの検出のため、ザイモグラフィも行った。また、末梢血、脾臓細胞、腹腔内細胞を採取し、それぞれの細胞成分を FACS にて解析した。

(2) 実験 2

形成された動脈硬化巣への CPA の効果を見るため、ApoE^{-/-} マウスに高脂肪食を 14 週間投与した後に、18 週までの 4 週間 CPA を投与する CPA 投与群と非投与の対照群に分けた。18 週時に実験 1 と同様に各種組織を採取し解析を行った。

4. 研究成果

(1) ApoE^{-/-} マウスに高脂肪食を負荷と同時に CPA を投与した群での動脈硬化巣形成について初期の動脈硬化巣の形成がみこまれる 12 週間まで観察を行った。

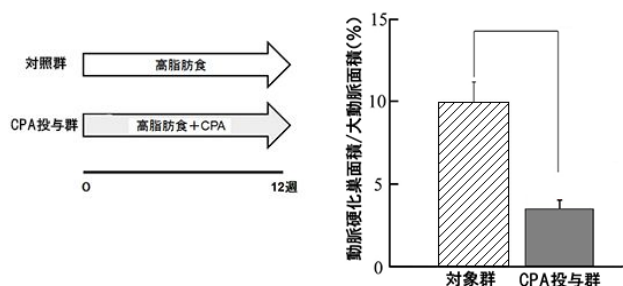


図 1 実験 1 のプロトコールと大動脈内動脈硬化巣面積の比較

末梢血の白血球数はCPA投与2週間目より低下し、対照群と比較し約20%程度の数値で推移した。体重はCPA投与群で減少傾向にあったが、活動性や食量には大きな変化は認められなかった。12週目の時点で大動脈組織を解析したところ、CPA投与群では対照群に比べ明らかに動脈硬化巣(プラーク)の形成は抑制されていた。(図1、 $P<0.05$ 、 $n=7$) 病理学的検討では、CPA投与群では、大動脈弁輪部レベルで血管内皮下のマクローファージ浸潤および泡沫細胞沈着の低下が認められた。血清中の脂質値(総コレステロール値、LDLコレステロール値、HDLコレステロール値)に変化は認められず、FACSによる解析で末梢血、脾臓細胞、腹腔内細胞の単球/マクローファージ系細胞数の減少を認めたことより、骨髄抑制による単球/マクローファージ系細胞数の減少による動脈硬化巣の形成抑制と考えられた。

(2) 次の実験として、形成された動脈硬化巣へのCPAの効果について検討を行った。Apoe(-/-)マウスに高脂肪食を14週間負荷後、18週までの4週間CPAを投与した群と非投与の対照群で動脈硬化巣の変化を観察した。4週間のCPA投与を行ったマウスでは動脈硬化巣の退縮は認められなかったものの、新規の動脈硬化の形成抑制は認められた。(図2、 $P<0.05$ 、 $n=10$)

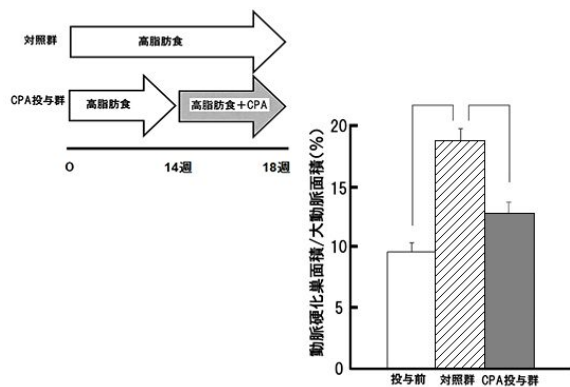


図2 実験2のプロトコールと大動脈内動脈硬化巣面積の比較

病理学的に比較したところ、CPA投与群では、大動脈弁輪部レベルでの血管内皮下の泡沫細胞沈着の低下が認められた。また、MMP-9の染色を行ったところ、CPA投与群ではMMP-9の主要な供給源と考えられるマクローファージでの発現は認められず、少量のMMP-9がプラーク内の中膜側に認められた。ザイモグラフィで上行大動脈から横隔膜上の胸部大動脈までのMMP-9およびMMP-2の発現を確認したところ、CPA投与群ではいずれの発現も低下を認めた。

(3) 動脈硬化進展抑制の機序として、炎症性細胞であるマクローファージおよびT細胞の影響を見るため、末梢血、脾臓細胞、腹腔内細胞での構成細胞の変化について評価を行っ

た。末梢血では、CPA投与群において白血球細胞数の明らかな減少を認め、T細胞、単球/マクローファージ系細胞のいずれも数の減少を認めた。動脈硬化においては、炎症性細胞であるTH1細胞や古典的マクローファージに分類されるM1細胞の関与が大きいことは前述のとおりである。特にこれらの細胞が細胞浸潤を誘導するプロテアーゼの供給源となっていることも明らかにされている。CPA投与群で実験1および2のマクローファージ分画を解析したところ、いずれの実験において対照群とCPA投与群の間で、炎症性マクローファージ(M1)の細胞数の低下を認めた。しかし、抗炎症性マクローファージ(M2)の細胞数は、実験2では有意差が認められたが、実験1では低下傾向はあるものの有意差は認められなかった。(図3、 $P<0.05$ 、 $n=3$ および $n=4$)

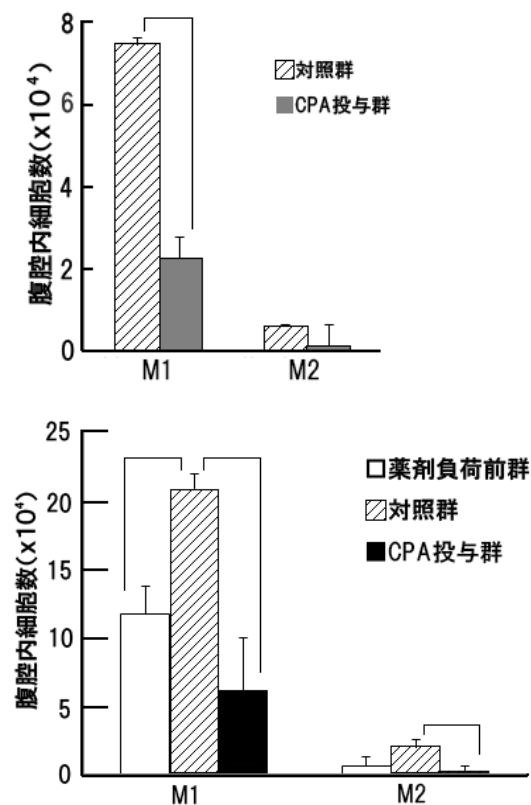


図3 腹腔内マクローファージ数の変化 (上: 実験1、下: 実験2 M1: 炎症性マクローファージ、M2: 抗炎症性マクローファージ)

単球/マクローファージ系の遊走を促進するT細胞系分画について比較を行ったところ、炎症性T細胞のTH1はいずれの実験系においても有意差をもって細胞数の減少をみとめたが、抗炎症性T細胞のTH2では数の減少は認めるものの、有意差は認められなかった。(図4、 $P<0.05$ 、 $n=3$)

以上より、免疫抑制剤CPAによる動脈硬化進展抑制作用は、T細胞系を介したマクローファージ細胞数のコントロールによるものと考えられた。今回はM1/M2のバランスはCPAでは変化は認められなかった。

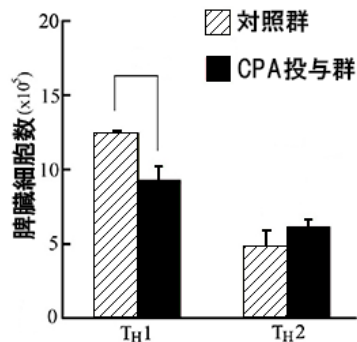
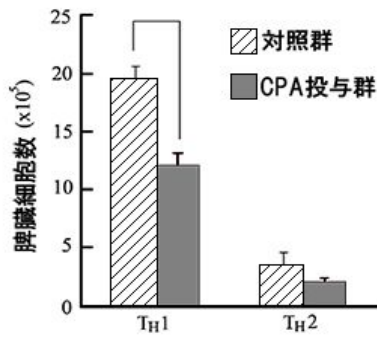


図4 脾臓細胞内のT細胞分画
 (上: 実験1、下: 実験2、
 TH1: 炎症性T細胞、TH2: 抗炎症性T細胞)

また、大動脈弁輪部の動脈硬化巣において実験2では膠原組織の維持が認められ、CPAによる末梢炎症性細胞の減少がMMP-2、MMP-9といったコラゲナーゼの低下をおこし、プラークの安定化につながっている可能性が示唆された。

以上のことより、CPAは末梢血のT細胞、単球/マクロファージ系細胞の抑制による動脈硬化巣の進展抑制および、プラークの安定化による病態の安定に寄与する可能性が示唆された。

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1件)

Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice.

Tahiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohiki-koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyama T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K

Blood 2012 Jun28;119(26) 6382-93

査読有

doi: 10.1182/blood-2011-12-399659.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 弥生 (SATO, Yayoi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号: 20327810