

博士論文

高濃度、高分子ヒアルロン酸存在下における培養による
創傷治癒性 M2d 様マクロファージ誘導に関する研究

澤田昌孝

高濃度、高分子ヒアルロン酸存在下における培養による
創傷治癒性 M2d 様マクロファージ誘導に関する研究

Induction of wound-healing M2d-like macrophages by culture with highly-concentrated,
high-molecular-weight hyaluronic acid

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

感覚・運動機能医学講座

口腔顎顔面外科学分野

指導教員

星和人教授

澤田昌孝

目次

①要旨	5
②序文	6
③方法	10
3-1 動物実験	10
3-2 骨髄細胞および脾臓細胞の採取およびマクロファージへの誘導方法	10
3-3 骨髄および脾臓由来マクロファージの比較	11
3-4 脾細胞の回収とヒアルロン酸存在下での培養	12
3-5 リアルタイム PCR (Real-time PCR)	14
3-6 酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay :ELISA)	16
3-7 CD44 発現の確認	16
3-8 CD44 ノックダウン	17
3-9 細胞遊走能試験 (Migration assay)	19
3-10 貪食能試験 (Phagocytosis assay)	20
3-11 血管新生能試験 (Tube formation assay)	20
3-12 統計	21
④結果	22
4-1 骨髄細胞および脾臓細胞の M1、M2 分極能の比較検討	22

4-2 ヒアルロン酸がマクロファージの M1、M2 マーカー発現に与える影響	29
4-3 ヒアルロン酸がマクロファージの VEGF 発現に与える影響	32
4-4 CD44 ノックダウンがヒアルロン酸存在下培養後のマクロファージの遺伝子発現 に与える影響	37
4-5 ヒアルロン酸がマクロファージの貪食能に与える影響	41
4-6 ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージが血管内皮細胞に及ぼす影響	44
⑤考察	49
⑥結語	57
⑦謝辞	58
⑧参考文献	59

要旨

歯科口腔外科領域において薬剤関連顎骨壊死やインプラント周囲炎等は、感染と組織破壊が存在する難治性疾患である。現在、このような疾患には外科治療が第一選択となることが多く、患者への負担が大きいため、細胞療法などの新たな治療法の確立が望まれている。マクロファージは感染の制御と組織修復の 2 面性を併せ持った細胞として知られ、細胞療法に応用できる可能性を秘めている。今回、ヒアルロン酸溶液を用いて脾臓由来マクロファージから血管新生を特徴とする M2d マクロファージに類似した細胞の誘導に成功した。このマクロファージを用いることで、将来複雑な創傷治癒機構の解明や細胞療法への応用が期待できる。

序文

近年、歯科口腔外科領域において薬剤関連顎骨壊死やインプラント周囲炎等の感染と組織破壊が存在する難治性疾患が問題となっている。このような疾患の治療方法は、現在外科治療が主であるが故に、切除範囲が広範になり、患者の QOL を著しく低下させるため、新たな治療法の確立が望まれている。

昨今、特定の細胞を用いた細胞療法が様々な疾患の治療に応用されている。例えば、脂肪幹細胞をはじめとする間葉系幹細胞を用いた変形性膝関節症や脊椎損傷の治療、T 細胞を用いた難治性の急性リンパ性白血病等に対する CAR-T 細胞療法などである (1) (2)。しかし、このような細胞療法の歯科口腔外科領域の疾患への応用は未だ進んでいない。

感染と組織破壊が併存する疾患への細胞療法には、感染の制御と組織修復の 2 面性を併せ持った細胞が必要であると考えられる。現在細胞療法に広く用いられている間葉系幹細胞は、抗炎症能や組織修復能を特徴としており (1)、感染制御の面で負に働く懸念がある。一方、白血球の一種であるマクロファージは、単球から分化し炎症時や組織修復の両方に寄与する細胞として知られている。マクロファージは 1982 年にロシアのイリヤ・メチニコフによって発見された細胞で (3)、当初は貪食機能を持つ一種類の細胞と考えられていた。その後、in vitro における研究により、M1 マクロファージと M2 マクロファージと

いう 2 種類のサブタイプのマクロファージの存在が明らかとなった (4)。M1 マクロファージは、Th1 細胞が分泌するサイトカインである Interferon-gamma (IFN- γ) や Toll Like Receptor (TLR) -4 リガンドである Lipopolysaccharide (LPS) によって誘導され、炎症反応を促進し、抗菌、抗ウイルス活性や、腫瘍制御能を示す (5)。一方、M2 マクロファージは Th2 細胞が分泌するサイトカインである Interleukin (IL) -4 や IL-13 によって誘導され、炎症反応を抑制し、組織の修復や線維化を促進する (5)。さらに M2 マクロファージは、M2a、M2b、M2c、M2d の 4 種類のサブタイプに分類できるとの報告も存在する (5, 6)。中でも、M2d マクロファージは、IL-4 シグナル伝達とは独立して、アデノシン受容体アゴニスト (5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine : NECA) と LPS によって分化し、血管内皮細胞増殖因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) と IL-10 の高発現が特徴である (7)。誘導時に LPS などを用いる点において、M1 マクロファージを経由して分化している可能性も指摘されている (8)。組織修復過程においては、出現するマクロファージの極性が M1 から M2 に変化し、炎症期から修復期へと移行することが報告されていることから (9)、M1 から移行する M2d マクロファージは、細胞療法に適した細胞であると考えられる。また、M1 マクロファージから M2d マクロファージに至る間の適切な分極段階のマクロファージを調製することで、早期には抗炎症能、

後期には組織修復能を発揮させ、感染制御と組織修復の両方を必要とする薬剤
関連顎骨壊死やインプラント周囲炎などの疾患に対する治療法が確立できる可
能性がある。しかし、M2d マクロファージの誘導法については Christopher
James Ferrante らの報告 (7) が一報あるのみで、確立された分化培養方法があ
るとは言えない。

悪性腫瘍に浸潤、集積したマクロファージは、腫瘍関連（随伴）マクロファ
ージ（Tumor-associated macrophage: TAM）と呼ばれ、M2 マクロファージマー
カーを発現し、さらに VEGF の発現が高いとされる (7)。TAM は、血管新生や
増殖因子の産生によって腫瘍の転移や促進に関与し、腫瘍環境にとって好都合
な環境を形成するため、悪性腫瘍の予後に影響するとの報告が存在する

(10)。VEGF の発現が特徴的なことから、TAM と M2d マクロファージを同一
のものとして表記する報告も存在する (11)。がん微小環境には、多くの細胞に
加え様々な細胞外マトリックスが存在するが、細胞外マトリックス中でも特に
ヒアルロン酸はがん微小環境に様々な分子量や濃度で存在し悪性腫瘍の進展に
関与するとされる (12, 13)。

近年ではヒアルロン酸（Hyaluronic acid : HA）とマクロファージの関係が着
目されている。In vitro の研究では、ヒアルロン酸はその分子量と濃度に応じ
て、マクロファージの表現型を変化させることが報告されている (14, 15,

16)。例えば、低分子量（約 5kDa～200kDa）のヒアルロン酸は、M1 マクロファージへ（14）、高分子量（約 800 kDa～3000 kDa）のヒアルロン酸は、M2 マクロファージへの分極に寄与するとされるが（14）、いずれも低濃度（25 $\mu\text{g/mL}$ ～5 mg/mL ）での検討のみである。しかし高分子量のヒアルロン酸によって誘導された M2 マクロファージの詳しいサブタイプを比較した研究は存在しない。上述の TAM と M2d の類似性、腫瘍微小環境におけるヒアルロン酸の存在からは、ヒアルロン酸を添加した培養により組織修復に適した M2d を誘導できる可能性があるが、そのような報告は見当たらない。

そこで本研究では、高濃度、高分子量のヒアルロン酸で M2d マクロファージを誘導できるのではないかと仮説を立てた。実験に用いたヒアルロン酸は、臨床応用されている高濃度（約 10 mg/mL ）かつ高分子量（約 150 万～390 万 kDa）のスベニール®ディスボ関節注 25 mg を選択した。

まず、マクロファージ研究に一般的に使用される骨髓由来マクロファージと脾臓由来マクロファージの M1、M2 分極能を比較し、使用する細胞源を決定した。その上で、高濃度かつ高分子量のヒアルロン酸存在下で培養した脾臓由来マクロファージのマーカー発現とその機能について解析した。

方法

3-1 動物実験

本研究は、東京大学医学部動物実験委員会の承認（P19-114, P22-014）に基づき行った。6~8 週齢の C57BL6/J 雄マウスを日本クレアから購入し、実験に使用した。

3-2 骨髄細胞および脾臓細胞の採取およびマクロファージへの誘導方法

マウス骨髄細胞は、マウスの大腿骨および脛骨をリン酸緩衝バッファー（phosphate-buffered saline: PBS）あるいは10%ウシ胎児血清（fetal bovine serum: FBS）、1%penicillin/streptomycin（P/S）添加 Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F-12（DMEM-F/12）でフラッシュして採取した（17）。次に、採取した細胞懸濁液を Tris-NH₄Cl 溶液で処理することで赤血球を溶解した（17）。マウスの脾臓細胞は脾臓をセルストレーナーで濾過して回収し、骨髄細胞と同様に Tris-NH₄Cl 溶液で赤血球を溶解した。いずれの細胞についても、その後、20ng/mL の顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF）または 50ng/mL のマクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor: M-CSF）を 10%FBS、1%P/S 添加 DMEM-高グルコース（HEPES 含有）に添加した溶液に再懸濁し、培養皿に播種し、1

週間培養を行った。培地は 3~4 日ごとに交換した。GM-CSF あるいは M-CSF で 1 週間培養した細胞をそれぞれ M1-like、M2-like マクロファージとした (18)。

さらに、M1、M2 マクロファージへの分化誘導を以下のように行った (17)。

M1 マクロファージの誘導には、GM-CSF で 1 週間培養した後にさらに、GM-CSF に加えて 100 ng/mL の LPS と 25 ng/mL の IFN- γ を添加し、24 時間培養した。M2 マクロファージへの誘導は、M-CSF で 1 週間培養した後にさらに、M-CSF に加えて 20 ng/mL の IL-4 を添加し、24 時間培養した (図 1)。

3-3 骨髄および脾臓由来マクロファージの比較

フローサイトメトリー解析を用いて、細胞のマーカー発現について比較を行った。マクロファージを Accutase solution (ナカライテスク社製) で剥離して回収し、1%P/S および 2%FBS を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) 緩衝液に再懸濁した。細胞標識に先立って、精製ラット抗マウス CD16/CD32 (マウス BD Fc ブロック) を細胞懸濁液に加え、室温で 5 分間インキュベートし、Fc レセプターに対する非特異的反応を抑制した。次に、表面タンパク質を染色するため、F4/80-APC-Cy7 (Clone: BM8, BioLegend)、CD206-PE-Cy7 (Clone: MR6F3, eBioscience)、CD80-FITC (Clone: 16-10A1, eBioscience) 抗体を添加し、遮光下、4°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を HBSS バッファーで洗浄後、

1500 rpm にて 5 分間遠心し、Fixation Buffer (R&D Systems) で室温、10 分間固定した。Fixation Buffer を除去するため、細胞を HBSS バッファーで 2 回洗浄した。その後、細胞内タンパクを染色するため、細胞を Permeabilization Buffer/Wash Buffer (R&D Systems) に懸濁し、同時に iNOS-APC (Clone: CXNFT, eBioscience)、Ariginase-1-PE (Clone: A1exF5, eBioscience) 抗体を加え、遮光下、4°C で 30 分間インキュベートした。染色後、細胞を Permeabilization Buffer/Wash Buffer で洗浄後、1500 rpm、5 分間遠心し、Staining Buffer (R&D Systems) に再懸濁して解析に用いた。APC-Cy7ratIgG2a, κ (Clone: RTK2758, BioLegend) 、PE-Cy7rat IgG2b, κ (Clone: eB149/10H5, eBioscience) 、FITCratIgG2a, κ (Clone: RTK2758, BioLegend) 、APCratIgG2a, κ (Clone: RTK2758, BioLegend)、PEratIgG2a, κ (Clone: RTK2758, BioLegend)抗体を陰性コントロールとして用いた。データの取得には BD LSRFortessa™を使用し、データ解析には、FlowJo™を用いた。

3-4 脾細胞の回収とヒアルロン酸存在下での培養

上述した方法と同様に脾細胞を M-CSF 存在下で 1 週間培養し、得られた細胞が、マクロファージであることをフローサイトメトリーで解析で確認した。

細胞を PBS で数回リンスした後、Accutaze solution (ナカライテスク社製) を

加えて 5 分から 15 分間 37°Cでインキュベート後にピペッティングし、50 mL tube に回収した。さらに PBS で残りの細胞を同じ tube に回収し、1500 rpm で 5 分間遠心分離後に、上清を吸引し、DMEM-高グルコース（HEPS 含有、30 ng/mL M-CSF、10%FBS、1%P/S 添加）に再懸濁した。細胞を 24 well plate に $2.5 \sim 5.0 \times 10^5$ cells/well、もしくは 6 cm dish に $2.5 \sim 5.0 \times 10^6$ cells/well の細胞密度で播種し、37°Cで 1 時間インキュベートした。細胞が接着したことを顕微鏡下に確認した後、上清を吸引し、67%ヒアルロン酸溶液（1×DMEM-高グルコース、10% FBS 、1%P/S、30 ng/mL M-CSF 添加）を 24 well plate の場合 50 μ L、6 cm dish の場合 5 mL 加えた。さらに、乾燥防止のため DMEM-高グルコース（HEPS 含有、30 ng/mL M-CSF、10%FBS、1%P/S 添加）を 24 well plate の場合 200 μ L、6 cm dish の場合 2 mL をヒアルロン酸溶液の上から加え、1 週間培養を行った。培地には 3 ~ 4 日毎にヒアルロン酸溶液の上から上記と同量の DMEM-高グルコース（HEPS 含有、30 ng/mL M-CSF、10%FBS、1%P/S 添加）を添加した。コントロール群は、ヒアルロン酸溶液を添加せず、DMEM-高グルコース（HEPS 含有、30 ng/mL M-CSF、10%FBS、1%P/S 添加）のみで培養を行った。

実験に用いたヒアルロン酸は、臨床応用されている高濃度（約 10 mg/mL）かつ高分子量（約 150 万~390 万 kDa）のスベニール®ディスボ関節注 25 mg を選択した。なお、67%ヒアルロン酸溶液のヒアルロン酸単独の濃度は、6.7 mg/

mL である。

3-5 リアルタイム PCR (Real-time PCR)

ヒアルロン酸存在下で 1 週間培養したマクロファージを回収するため、ヒアルロニダーゼ溶液 (sigma) を加えて 5 分間 37°C でインキュベートし、溶解したヒアルロン酸溶液を吸引、さらに PBS で数回リンスし、ISOGEN (NIPPON GENE CO, LTD, Tokyo, Japan) を用いて、製造会社のプロトコールに従って Total RNA 溶液を回収した具体的には、PBS でリンスした後、ISOGEN を 1 mL 加え、細胞が剥離したことを顕微鏡で確認し、1.5 mL tube へ回収した。ボルテックスを行ってホモジナイズした後に、クロロホルムを 200 μ L 添加し、12000 g、4°C で 15 分間遠心し、RNA を含む水相部分を回収した。次いで、イソプロパノールを水相の 0.8 倍量添加後、再度遠心し、ペレットの形成を確認した。70% エタノールを 1 mL 加えて遠心してペレットを洗浄した後に風乾し、精製水を用いて total RNA を溶解した。得られた total RNA は、PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara Bio, Siga, Japan) を使用して 37°C、15 分間逆転写反応させて cDNA を作製した。その後、7500Fast リアルタイム PCR システム (Applied BioSystems, Carlsbad, CA, USA) を使用し、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて相対的遺伝子発現量を測定した。標的遺伝子の発現量は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

を用いて補正した。

リアルタイム PCR に用いたプライマーの一覧を表 1 に示した。

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマー一覧

Gene	Primer sequences (forward and reverse, 5'-3')	
Ym-1	forward	TACTCACTTCCACAGGAGCAGG
	reverse	CTCCAGTGTAGCCATCCTTAGG
Arginase-1	forward	CATTGGCTTGCGAGACGTAGAC
	reverse	GCTGAAGGTCTCTTCCATCACC
IL-10	forward	CGGGAAGACAATAACTGCACCC
	reverse	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
CD206	forward	GTTACCTGGAGTGATGGTTCTC
	reverse	AGGACATGCCAGGGTCACCTTT
TNF- α	forward	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	reverse	GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
iNOS	forward	GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC
	reverse	CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
CD80	forward	CCTCAAGTTTCCATGTCCAAGGC
	reverse	GAGGAGAGTTGTAACGGCAAGG
VEGF	forward	CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG
	reverse	GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC
CD44	forward	CGGAACCACAGCCTCCTTCAA
	reverse	TGCCATCCGTTCTGAAACCACG

3-6 酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA）

VEGF-A Mouse ELISA Kit（Invitrogen）を用いて、製造会社のプロトコール通りに行った。プロトコールを簡単にまとめると、まずマイクロウェルを Wash Buffer で洗浄し乾燥させ、ヒアルロン酸存在下あるいは非存在下で 1 週間培養した脾臓由来マクロファージの上清と付属の標準希釈液を 50 μ L 加え、室温で 2 時間インキュベートを行った。Wash Buffer で洗浄し乾燥させ、100 μ L の Biotin 希釈溶液を加え、室温で 1 時間インキュベートを行った。Wash Buffer でマイクロウェルを洗浄し乾燥させ、100 μ L の HRP 標識 Streptavidin を加え、室温で 1 時間インキュベートを行った。再度、Wash Buffer でマイクロウェルを洗浄し乾燥させ、100 μ L の TMB Substrate Solution を加え、室温で 30 分間インキュベートを行った。その後、Stop Solution を加え反応を停止させ、プレートリーダーで 450 nm の波長で吸光度を測定した。

3-7 CD44 発現の確認

フローサイトメトリーを用いて CD44 発現を解析した。ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージを Accutase solution（ナカライテスク社製）で剥離して回収し、1%P/S および 2%FBS を含む HBSS 緩衝液に再懸濁した。細胞標識に先立って、精製ラット抗マウス CD16/CD32（マウス BD Fc ブロック）を細

胞懸濁液に加え、室温で 5 分間インキュベートし、Fc レセプターに対する非特異的反応を抑制した。次に、表面タンパク質を染色するため F4/80-FITC (Clone: BM8, BioLegend)、CD44-APC (Clone: IM7, eBioscience) 抗体を添加し、遮光下、4°Cで 30 分間インキュベートした。その後、細胞を HBSS バッファーで洗浄後、1500 rpm、5 分間遠心を行い、細胞を回収し、再び HBSS バッファーに再懸濁した後、生細胞と死細胞を区別するために DAPI 染色を行った。FITCratIgG2a, κ (Clone: RTK2758, BioLegend)、APCratIgG2a, κ (Clone: RTK2758, BioLegend) 抗体を陰性コントロールとして用いた。データの取得には BD LSRFortessa™、データ解析には FlowJo™を用いた。

3-8 CD44 ノックダウン

骨髓細胞および脾臓細胞の採取およびマクロファージへの誘導方法に示した通りに、脾臓由来マクロファージを培養した。マクロファージを回収した後、6 well plate に 1.0×10^6 cells/well の細胞密度で播種し、細胞が接着するまで 37°Cでインキュベートを行った。その後、下記に示す通りに siRNA 試薬を調整し、ノックダウンを行った。

CD44 (HCAM) siRNA と Control siRNA (FITC-conjugate) は SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. から購入したものをを用いた。まず CD44 ノックダウン群

対して使用する CD44 siRNA トランスフェクション試薬混合溶液 (CD44 siRNA Transfection Regent mixture) とコントロール群に対して使用する Control siRNA トランスフェクション試薬混合溶液 (Control siRNA Transfection Regent mixture) の調整を行った。最初に、CD44 の粉末を滅菌精製水で溶解させ、10 μ M の CD44 siRNA 溶液 (CD44 siRNA duplex) を作製した。次に siRNA Transfection Medium (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY,INC.) 100 μ L あたり CD44 siRNA duplex を 2 μ L 加えた溶液 (siRNA 溶液 A) を作製した。続いて、siRNA Transfection Medium 100 μ L あたり 6.0 μ L の siRNA Transfection Regent (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY,INC.) を加えた溶液 (siRNA 溶液 B) を作製した。siRNA 溶液 A と siRNA 溶液 B をピペッティングして穏やかに混合し、室温で 15 ～45 分間インキュベートし、CD44 siRNA Transfection Regent mixture (siRNA 溶液 A + siRNA 溶液 B) を作製した。Control siRNA Transfection Regent mixture は、siRNA Transfection Medium 100 μ L あたり Control siRNA (FITC-conjugate, 10 μ M) を 2 μ L 加えた溶液 (Control siRNA 溶液 A) と siRNA Transfection Medium 100 μ L あたり 6.0 μ L の siRNA Transfection Regent を加えた溶液 (siRNA 溶液 B) を上述した方法と同様に混合、インキュベートし作製した。その後、6 well plate に接着した脾臓由来マクロファージの培地を吸引し、1 $\times$ DMEM-F/12 で細胞を 1 回洗浄した後に再び培地を吸引し、CD44 siRNA Transfection Regent mixture と Control

siRNA Transfection Regent mixture をそれぞれ 1 mL/well 加え、37°Cで 5 ～ 7 時間培養を行った。そこから 1×DMEM (2% P/S、2% FBS)を 1 mL 加え、さらに 18 ～ 24 時間培養を行った後、培地を吸引し、CD44 ノックダウン群とコントロール群の細胞それぞれに、67%ヒアルロン酸溶液を加えて、1 週間培養を行った。ノックダウンの確認は、リアルタイム PCR を用いて行った。

3-9 細胞遊走能試験

CytoSelect™24-well Cell Migration Assay Kit (CELL BIOLABS,INC.) を用いて行った。ヒアルロン酸存在下で培養後のマクロファージを Lower chamber に $2.5 \sim 5.0 \times 10^5$ cells/well の細播密度で播種し、接着を顕微鏡下で確認した後、底面が 8 μ m pore size のポリカーボネートメンブレンになっている upper chamber を上から装着した。Upper chamber (インサート)に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) を 2.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種し、24 時間培養した。その後、インサートの内側から培地を慎重に吸引し、綿棒で拭いて非遊走細胞を除去した。インサートを Cell Stain Solution 400 μ L を含む well に移し、10 分間室温でインキュベートし、インサートの外側に移動した細胞を染色した。インサートをビーカーの水の中で数回洗い、余剰な染色液を洗い流し、その後自然乾燥させた。インサートを空の well に移し、well あたり

200 μ L の Extraction Solution を加え、オービタルシェーカー上で 10 分間インキュベートし、染色した細胞を回収した。各サンプルから 100 μ L を 96 well plate に移し、プレートリーダーで OD 560 nm を測定した。

3-10 貪食能試験

ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージを 6 cm dish に $2.5 \sim 5.0 \times 10^6$ cells/well の細胞密度で播種し、latex beads- IgG-FITC complex を加えた培地を 1.5 mL 添加し、37°C で 2 時間貪食させた。Beads が細胞内に取り込まれていることを蛍光顕微鏡下で確認し、Accutaze solution（ナカライテスク社製）で細胞を回収して HBSS バッファーに再懸濁した。F4/80-APC（Clone: BM8, BioLegend）抗体を 100 μ L あたり 1.0 μ L 添加し、遮光下、4°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を HBSS バッファーで洗浄後、1500 rpm、5 分間遠心を行い、細胞を再び HBSS バッファーに懸濁してフローサイトメトリー解析を行った。

3-11 血管新生能試験

Angiogenesis Assay kit（abcam）を用いて行った。HUVEC を ECM ゲルを加えた 96 well palte に $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ cells/well で播種し、ヒアルロン酸存在下あるいは非存在下で培養したマクロファージの馴化培地（Conditioned Medium）を用い

て2時間、37°Cで培養を行った。その後、1×Staining Buffer で染色して蛍光顕微鏡で観察を行った。画像の解析には IMARIS ver 10.1(オックスフォード・インストルメンツ)を用い、形成された血管の Total length、Total Branching Length、Total Segments Length、Mean Mesh Size、Branching Interval を評価した。

3-12 統計

統計解析には JMP Pro ソフトウェアバージョン 16.0.0 を使用した。すべてのデータは平均±SD として表示した。2群間の比較検定は t 検定を用い、多群間比較検定には、まず一元配置分散分析を行い、事後検定として Turkey 検定を用いた。P<0.05 が統計的に有意であるとした。*：P<0.05 として表記した。

結果

4-1 骨髄細胞および脾臓細胞の M1、M2 分極能の比較検討

図 1-A に実験の模式図を示す。骨髄細胞及び脾細胞は不均一な集団であり、1 週間の拡大培養後もマクロファージ以外の細胞が含まれている可能性があるため、まず成熟マクロファージのマーカーとして知られる F4/80 で標識を行った。骨髄および脾臓由来 M1 マクロファージ、M2 マクロファージはいずれも骨髄由来マクロファージで F4/80 の mean fluorescence intensity (MFI) が高く、細胞数も多かった (図 2, a, b, c, d)。F4/80 陽性マクロファージの内、M1 マクロファージ、M2 マクロファージのマーカーを解析した。M1 マクロファージの解析マーカーには CD80、iNOS、M2 マクロファージの解析マーカーには CD206、Arginase-1 を用いた。骨髄由来 M1 マクロファージと脾臓由来 M1 マクロファージの比較では、CD80 は、MFI が骨髄由来 M1 マクロファージで高く、陽性細胞数も骨髄由来 M1 マクロファージで多かった (図 3, g, h)。iNOS は、細胞数に差はなかったものの、MFI は骨髄由来 M1 マクロファージで高かった (図 3, i, j)。次に、骨髄由来 M2 マクロファージと脾臓由来 M2 マクロファージの比較を行った。CD206 は陽性細胞数に差はなかったが、MFI は骨髄由来 M2 マクロファージで高かった (図 4, g, h)。Arginase-1 は、MFI と陽性細胞数いずれも脾臓由来 M2 マクロファージで高かった (図 4, i, j)。これらの解析のサマリーを表 2 に示す。

解析したマーカーのうち、Arginase-1 は創傷治癒との関連が数多く報告されている (19~22)。以下の実験においては創傷治癒性マクロファージである M2d の誘導を目的としているため、Arginase-1 の発現が比較的高い脾臓由来マクロファージを用いることとした。

図 1

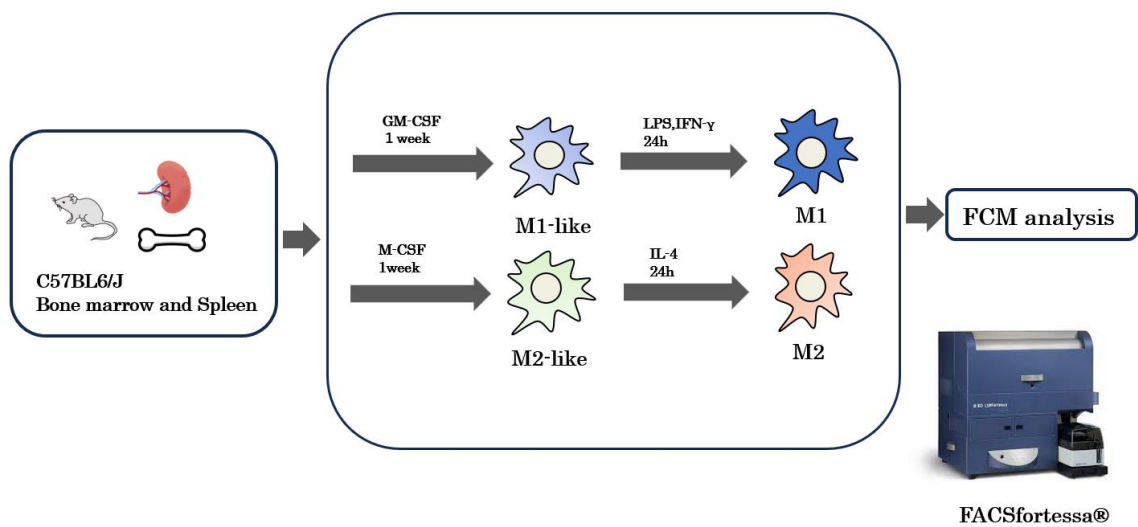


図 1 骨髄細胞および脾細胞からマクロファージを誘導する方法と解析方法

6~8 週齢の C57BL6/J の雄マウスから、骨髄および脾臓を単離し、GM-CSF または M-CSF で 1 週間培養を行った。GM-CSF で 1 週間培養し、さらに IFN- γ 、LPS を加え 24 時間培養したものを M1 マクロファージ、M-CSF で 1 週培養し、さらに IL-4 を加え 24 時間培養したものを M2 マクロファージと定義し、フローサイトメトリー解析を行った。

図 2

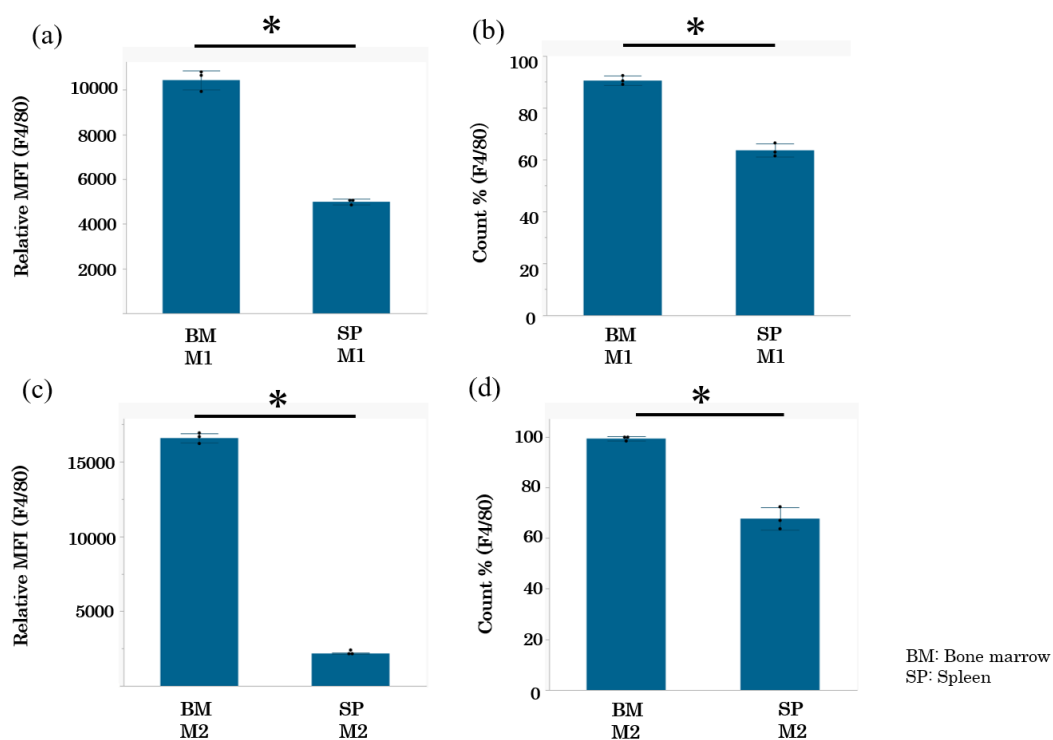


図 2 骨髄および脾臓由来 M1 マクロファージと M2 マクロファージの F4/80 の

発現解析

図 1 に示す方法で、骨髄および脾臓からそれぞれ M1 マクロファージと M2 マクロファージを誘導し、成熟マクロファージのマーカである F4/80 の MFI と細胞数の割合をフローサイトメトリーで解析した。

骨髄および脾臓由来 M1 マクロファージにおける F4/80 の MFI (a) と F4/80 陽性細胞数の割合 (b)、骨髄および脾臓由来 M2 マクロファージにおける F4/80 の MFI (c) と F4/80 陽性細胞数の割合 (d)。n=3, mean±SD, *: P < 0.05

図 3

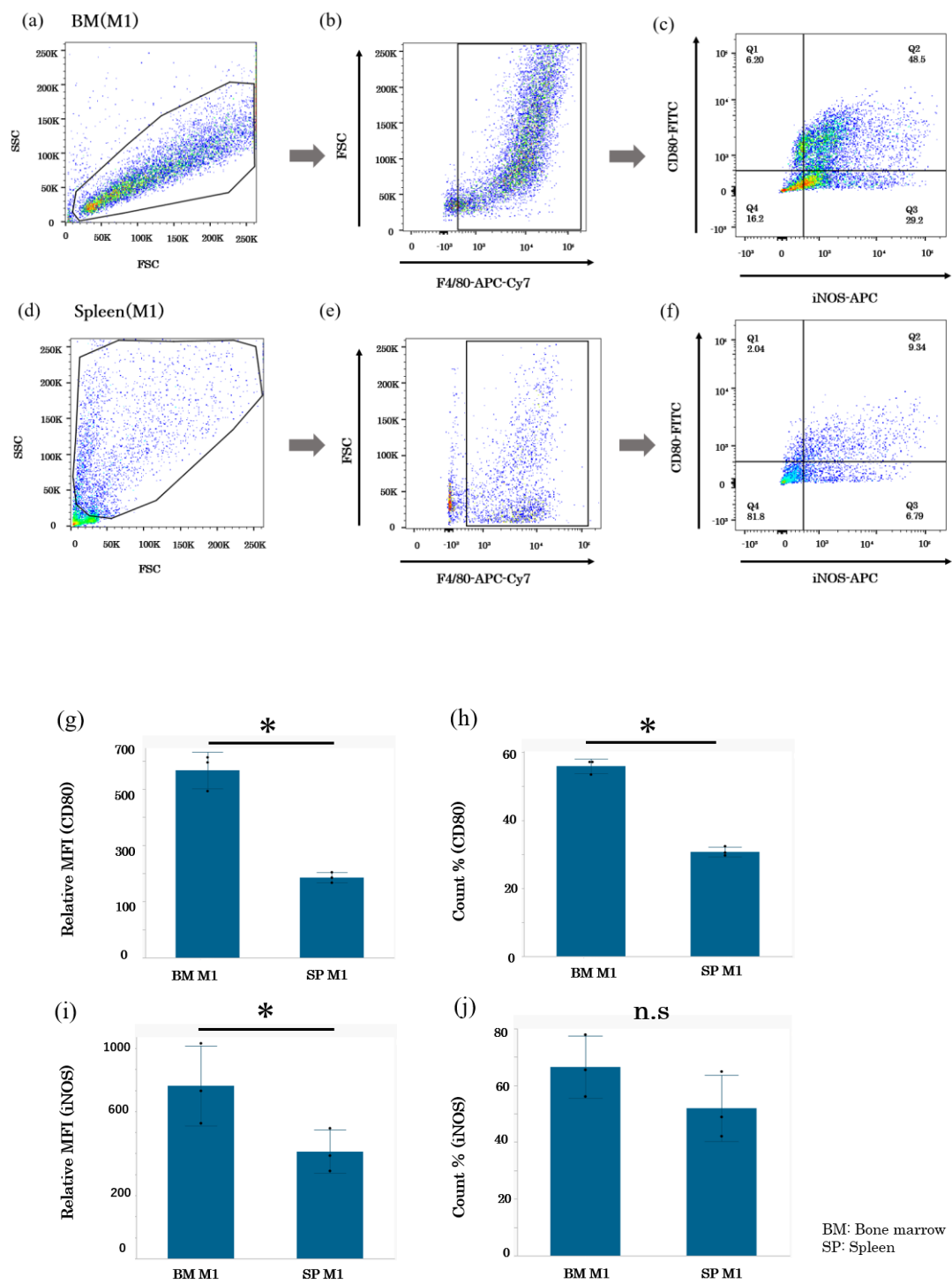


図 3 骨髄および脾臓由来 M1 マクロファージの細胞マーカーの発現解析

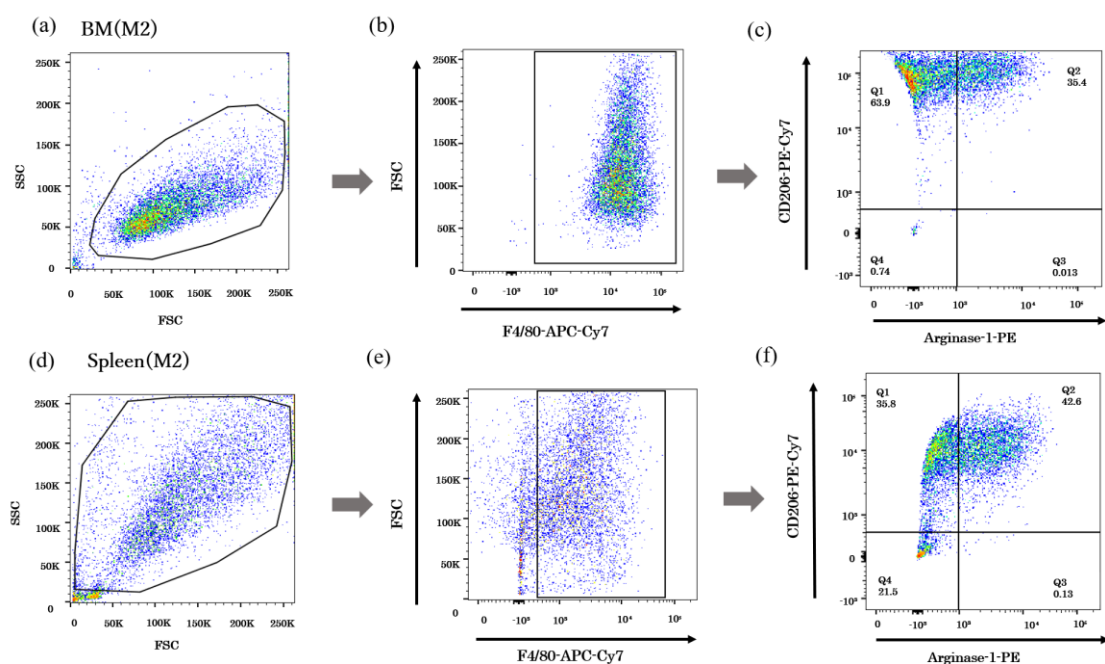
図 1 に示す方法で、骨髄および脾臓からそれぞれ M1 マクロファージを誘導

し、まず細胞集団をゲーティングし (a, d)、成熟マクロファージのマーカである F4/80 でマクロファージをゲーティングした後 (b, d)、M1 マクロファージマーカーである CD80、iNOS の発現をフローサイトメトリーで解析した (c, f)

。

骨髄および脾臓由来 M1 マクロファージにおける CD80 の MFI (g) と CD80 陽性細胞数の割合 (h)、および iNOS の MFI (i) と iNOS 陽性細胞数の割合 (J)。n=3, mean±SD, *: P<0.05

図 4



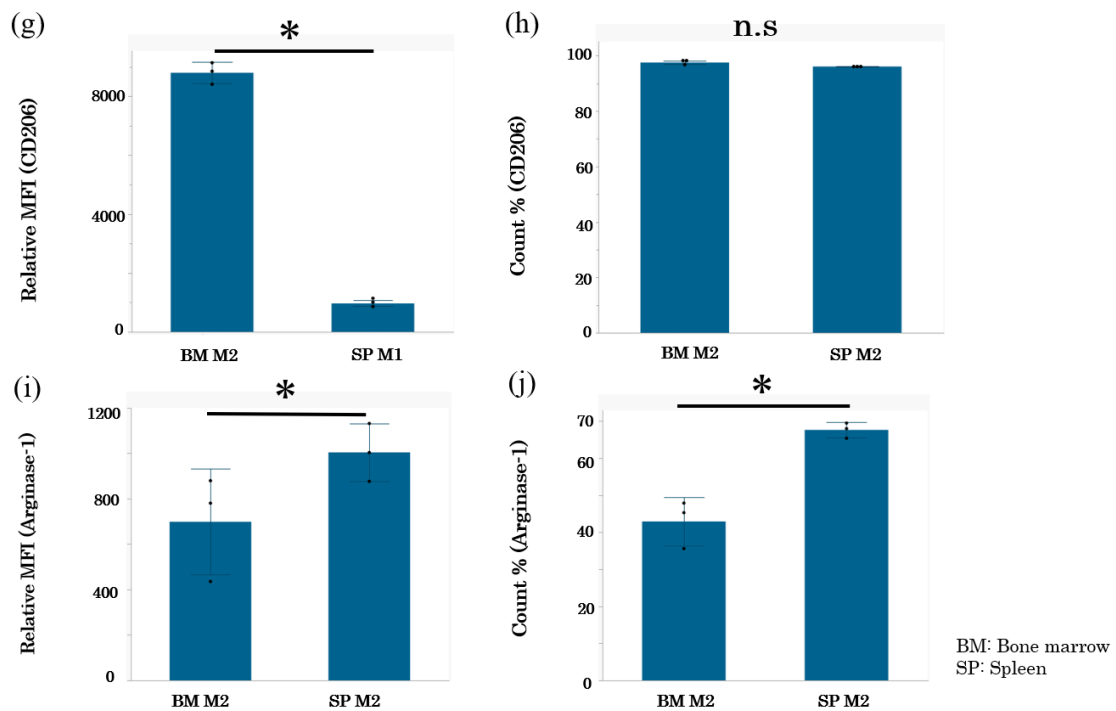


図 4 骨髄および脾臓由来 M2 マクロファージの細胞マーカーの発現解析

図 1 に示す方法で、骨髄および脾臓からそれぞれ M2 マクロファージを誘導し、まず細胞集団をゲーティングし (a, d)、成熟マクロファージのマーカーである F4/80 でマクロファージをゲーティングした後 (b, d)、M2 マクロファージマーカーである CD206、iNOS の発現をフローサイトメトリーで解析した (c, f)。

骨髄および脾臓由来 M2 マクロファージにおける CD206 の MFI (g) と CD206 陽性細胞数の割合 (h)、および Arginase-1 の MFI (i) と Arginase-1 陽性細胞数の割合 (j)。n=3, mean±SD, *: P<0.05

表 2 骨髄および脾臓由来マクロファージの比較のまとめ

Subtype	CD80	iNOS	CD206	Arginase-1
M1	BM> SP	BM>SP(MFI, number n.s)		
M2			BM>SP(MFI,number n.s)	BM<SP

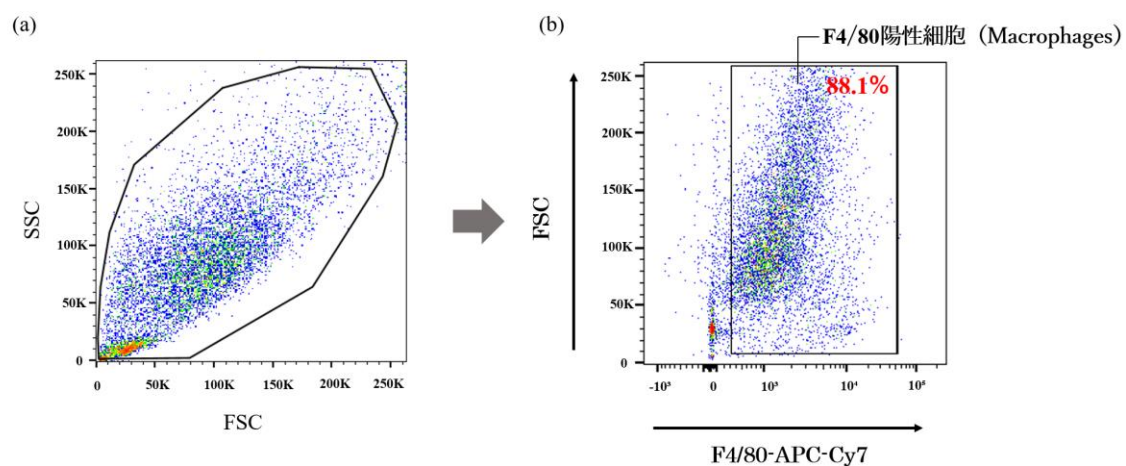
4-2 ヒアルロン酸がマクロファージの M1、M2 マーカー発現に与える影響

図 2-A に実験の概要を示す。まず予備検討にて 20%、50%、67%、80%ヒアルロン酸溶液を作製し、脾臓由来マクロファージを各溶液の存在下で培養した。脾臓由来のマクロファージの割合は、予備検討の結果フローサイトメトリーで 88.1%であった（補足図 1）。20%ヒアルロン酸溶液は、M2 マクロファージマーカーの発現が低く 80%ヒアルロン酸溶液は操作性の観点から除外した。検討の結果、67%ヒアルロン酸溶液が、M2 マクロファージマーカーの発現が高値であったことから 67%のヒアルロン酸溶液を採用した。代表的なグラフを補足図 2 に示す。ヒアルロン酸存在下の培養がマクロファージの分極状態に与える影響を検討するために、まずリアルタイム PCR により、M2 マクロファージマーカーの発現を検討した。ヒアルロン酸なしで培養したコントロールと比較して、67%ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージは M2 マクロファージマーカーである Ym-1、Arginase-1 の発現が有意に高値であった（図 6, a, b）。一方、他の M2 マクロファージマーカーである IL-10、CD206 の発現には有意差を認めなかった（図 6, c, d）。次に、M1 マクロファージマーカーである、iNOS、TNF- α 、CD80 の発現を検討した。その結果、2 群間では発現に有意差を認めなかった（図 6, e, f, g）。これらの結果から、ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージは、コントロールと比較してやや M2 よりの分極状態を示すと考えられ

た。

なお、ヒアルロン酸存在下で培養した細胞を回収する際に、マクロファージのみを選択しているわけではないため、マクロファージ以外の細胞の RNA も含まれている可能性が考えられた。

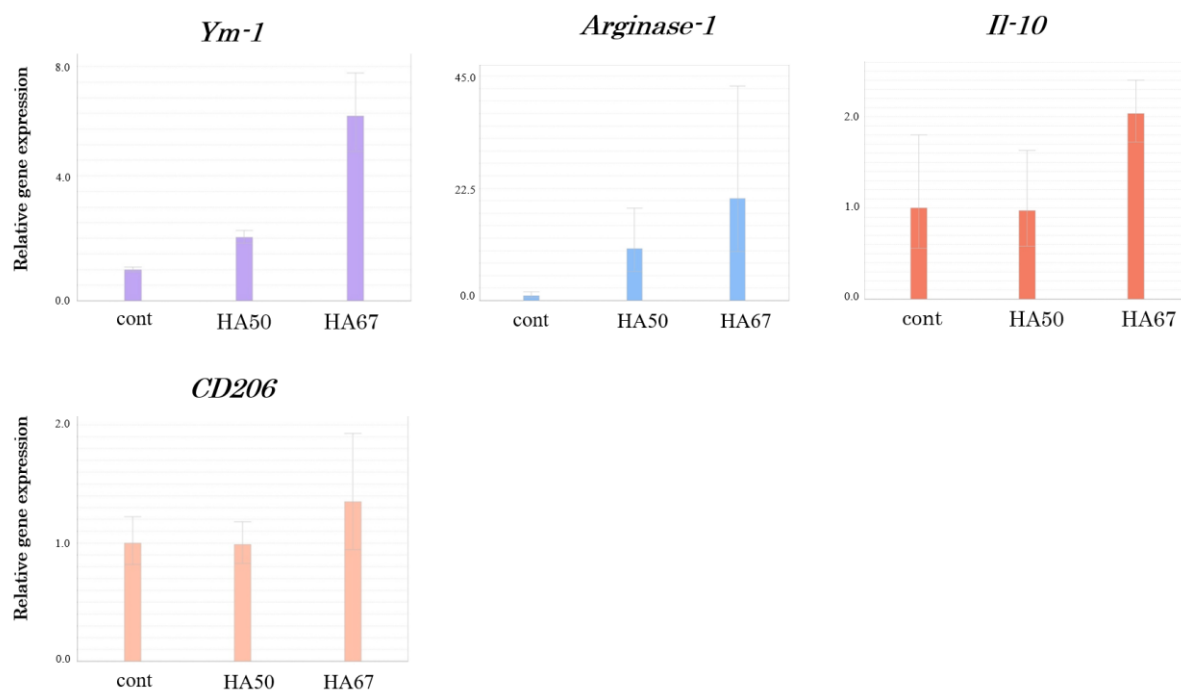
補足図 1



補足図 1 脾細胞を M-CSF で 1 週間培養して得られた細胞の F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) の割合 (代表図)

図 1 の方法の示す方法で、脾臓から M-CSF で 1 週間培養した後、F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) をフローサイトメトリーで解析した。細胞集団をゲーティング (a) した後の、F4/80 陽性細胞数の割合 (b)。

補足図 2



補足図 2 ヒアルロン酸溶液濃度の予備検討（代表グラフ）

図 1 に示す方法で、脾臓から M-CSF で 1 週間培養したマクロファージを、ヒアルロン酸を添加せずに培養した群（cont）と 50%ヒアルロン酸溶液で培養した群（HA50）、67%ヒアルロン酸溶液で培養した群（HA67）で、M2 マクロファージマーカーの遺伝子発現をリアルタイム PCR で比較した。

4-3 ヒアルロン酸がマクロファージの VEGF 発現に与える影響

M2d マクロファージは、VEGF が高発現していることを特徴とするとの報告がある (7)。ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージについて、VEGF の発現をリアルタイム PCR にて解析した。その結果、ヒアルロン酸添加により VEGF の遺伝子発現が有意に高値となった (図 6, h)。また、培養上清中の VEGF タンパク質を ELISA を用いて定量した。遺伝子発現と同様に、ヒアルロン酸添加により VEGF のタンパク質量が高値となった。VEGF 濃度は、コントロールで 629 pg/mL、ヒアルロン酸添加群で 1685 pg/mL であり、コントロールの約 2.5 倍であった (図 7)。この結果および前項の結果から、高濃度、高分子ヒアルロン酸存在下での培養により、VEGF 高発現の M2 マクロファージ、すなわち M2d マクロファージを誘導できる可能性が示唆された。

図 5

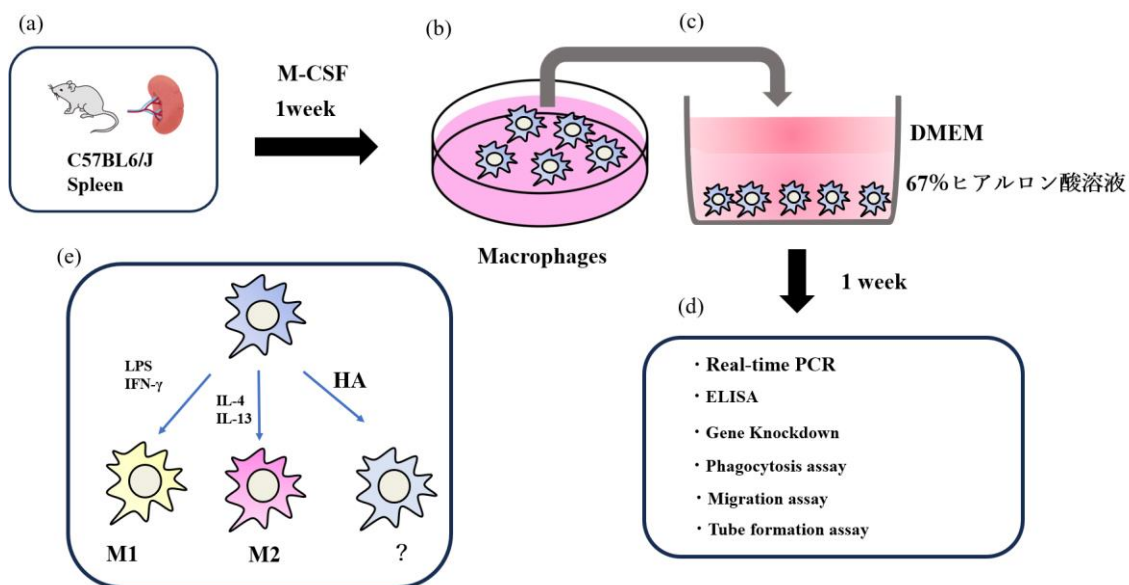


図 5 67%ヒアルロン酸溶液存在下で脾臓由来マクロファージを培養する方法と解析方法

図 1 に示す方法と同様に、脾細胞からマクロファージを誘導した。誘導後の細胞はほとんどがマクロファージであり、その割合は 88.1%であった（補足図 1）。67%ヒアルロン酸溶液存在下で脾臓由来マクロファージを 1 週間培養した後（c）、様々な解析を用いてその特徴と機能を明らかにした（d, e）。

図 6

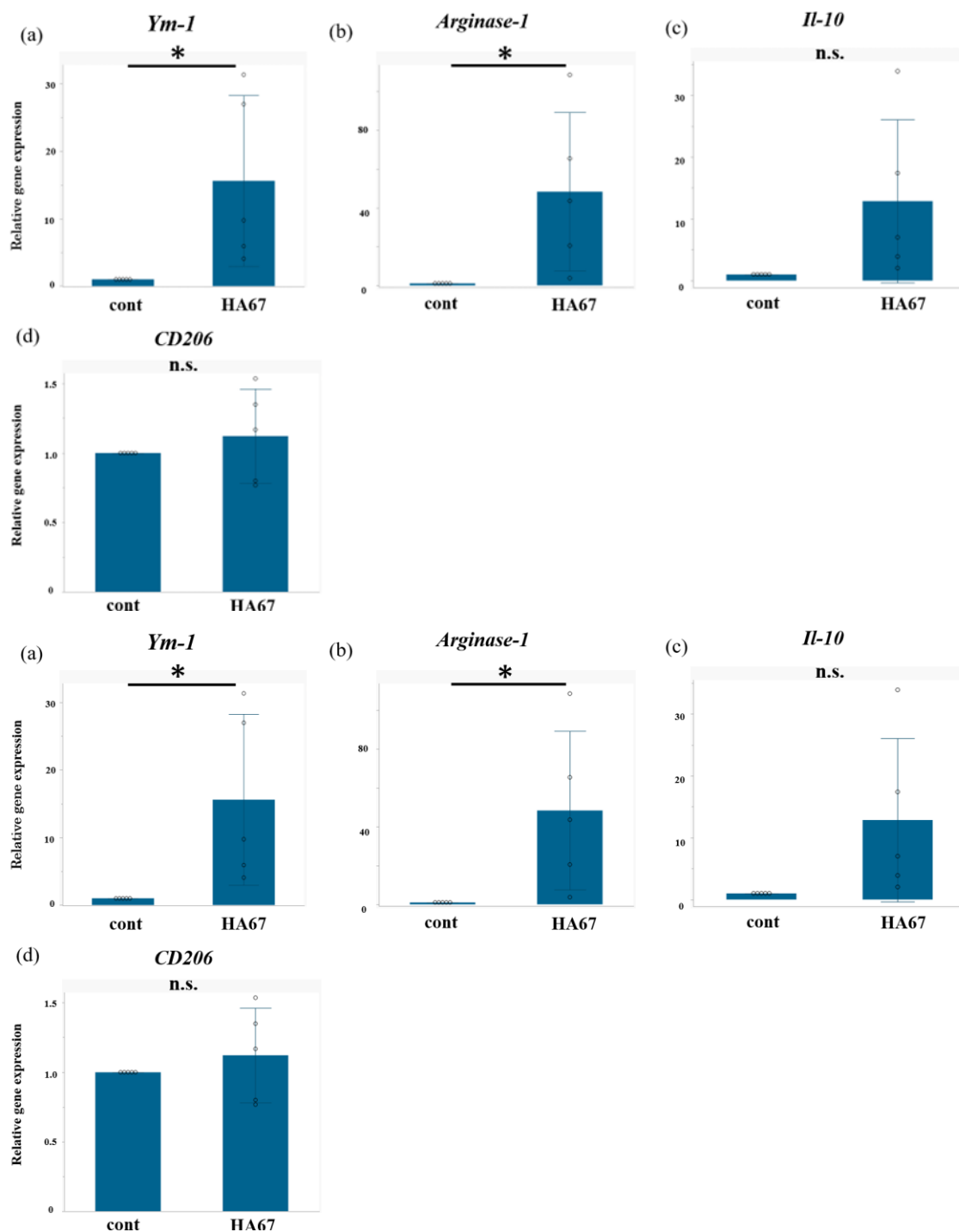


図 6 67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージの遺伝

子発現の変化

図 5 に示した様に、脾臓由来マクロファージを 67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養し、遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で解析した。

67%ヒアルロン酸溶液存在下で 1 週間培養した脾臓由来マクロファージ (HA67) とヒアルロン酸を添加せずに培養した脾臓由来マクロファージ (cont) の M2 マクロファージマーカー (a, b, c, d)、M1 マクロファージマーカー (e, f, g) および VEGF (h) の遺伝子発現の比較。n=5, mean±SD, *: P<0.05

図 7

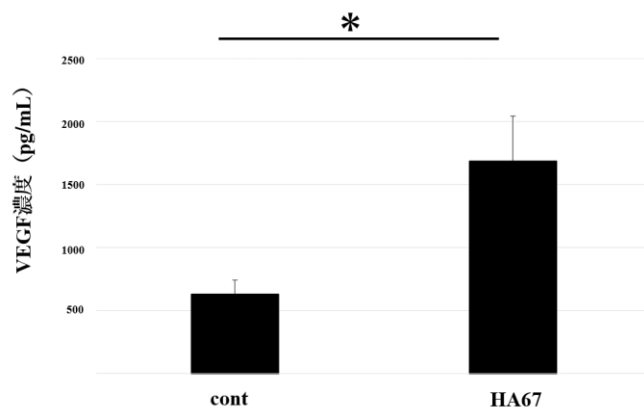


図 7 67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージの上清に含まれる VEGF の濃度

67%ヒアルロン酸溶液の存在下で培養したマクロファージ (HA67) とヒアルロン酸を添加せずに培養した脾臓由来マクロファージ (cont) の上清中に含まれる VEGF の濃度を ELISA で測定した。n=3, mean±SD, *: P<0.05

4-4 CD44 ノックダウンがヒアルロン酸存在下培養後のマクロファージの遺伝子発現に与える影響

ヒアルロン酸添加が遺伝子発現に影響を与えるメカニズムを検討するために、ヒアルロン酸の代表的なレセプターとして知られる CD44 受容体の脾臓由来マクロファージにおける発現をフローサイトメトリーで確認した。その結果、脾臓由来マクロファージのほとんどは CD44 を発現していた (図 8)。

次に、CD44 siRNA を用いて CD44 をノックダウンさせた脾臓由来マクロファージと、Control siRNA を用いて処理した脾臓由来マクロファージを準備し、それぞれ 67%ヒアルロン酸溶液存在下で 1 週間培養し、リアルタイム PCR でマクロファージマーカーの遺伝子発現を確認した (図 9)。その結果、CD44 をノックダウンした群では、コントロール群と比較して CD44 の遺伝子発現が約 50% に抑制されていることを確認した (図 10, a)。また、CD44 がノックダウンされた群では、ヒアルロン酸添加で有意に上昇していた Ym-1、Arginase-1、VEGF の遺伝子発現が、コントロール群と比較して有意に抑制されていた (図 10, b, c, f)。ヒアルロン酸添加で有意ではないが上昇していた IL-10 も CD44 ノックダウンで有意に低下した (図 10, d)。CD206 についても有意な変化はなかった (図 10, e)。これらの結果から、ヒアルロン酸は CD44 を介してマクロファージの遺伝子発現に変化を与えていることが示唆された。

図 8

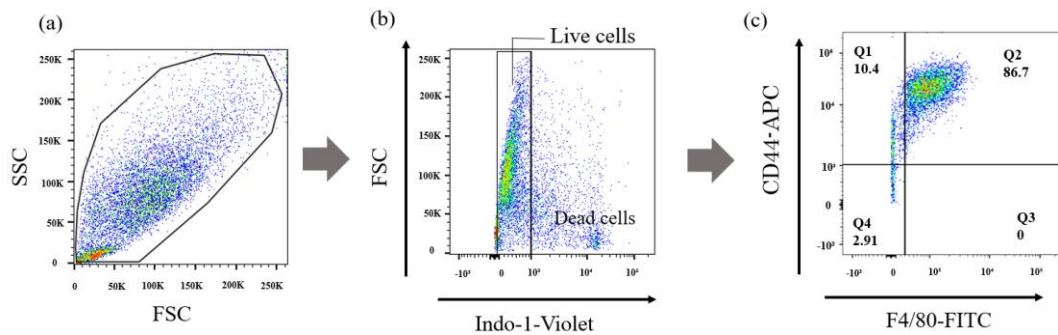


図 8 脾臓由来マクロファージの CD44 陽性細胞数の割合（フローサイトメトリー解析）

図 1 に示す方法と同様に、脾細胞からマクロファージを誘導した。誘導したマクロファージの CD44 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

まず細胞集団をゲーティングし (a)、生細胞をゲーティングした後 (b)、成熟マクロファージのマーカである F4/80 でマクロファージと CD44 の両陽性の細胞の割合 (c)。

図 9

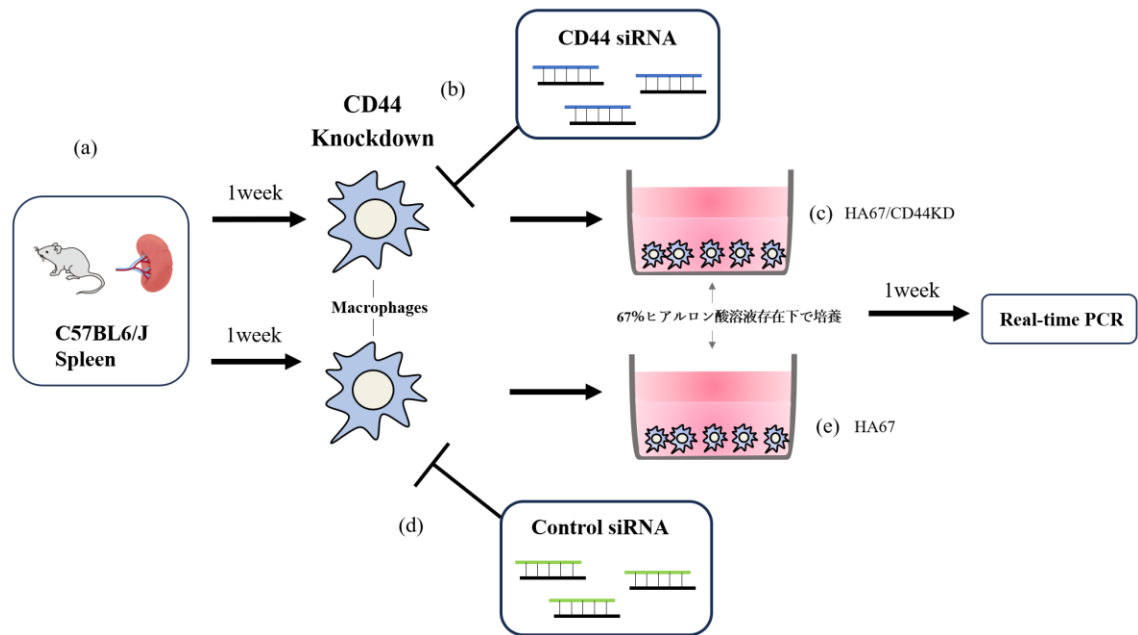


図 9 脾臓由来マクロファージの CD44 をノックダウンさせ、67%ヒアルロン酸溶液と培養する方法

図 1 に示す方法と同様に、脾細胞からマクロファージを誘導した。(a) その後、CD44 siRNA で脾臓由来マクロファージの CD44 をノックダウンさせ (b)、67% ヒアルロン酸溶液で培養した群 (HA67/CD44 KD) (c) と、Control siRNA で処理した脾臓由来マクロファージ (d) を 67%ヒアルロン酸溶液で培養した群 (HA67) (e) を用意し、培養した後、リアルタイムタイム PCR で遺伝子発現の変化を比較した。

図 10

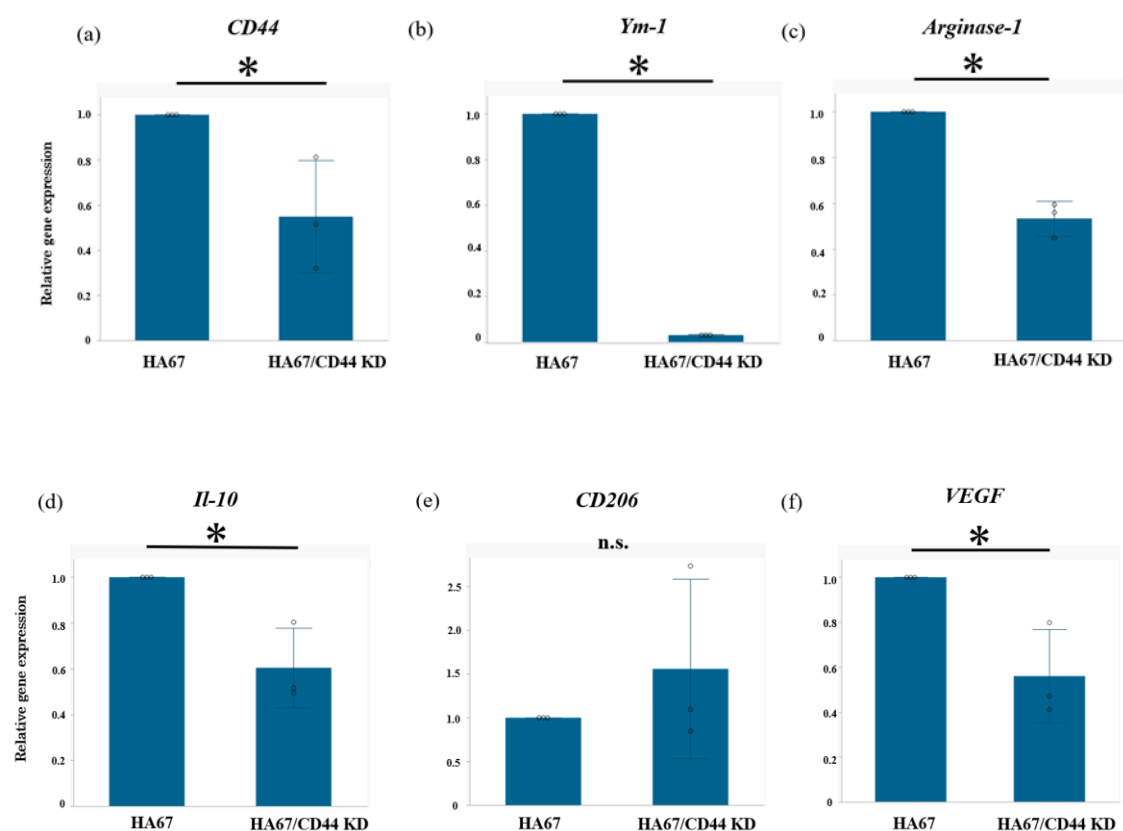


図 10 CD44 ノックダウンが 67%ヒアルロン酸溶液中で培養した脾臓由来マクロファージの遺伝子発現に与える影響

CD44 siRNA で脾臓由来マクロファージの CD44 をノックダウンさせ、67%ヒアルロン酸溶液中で培養した群 (HA67/CD44 KD) と、Control siRNA で処理した脾臓由来マクロファージを 67%ヒアルロン酸溶液中で培養した群 (HA67) の CD44 (a)、M2 マクロファージマーカー (b, c, d, e) と VEGF (f) の遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR の比較。n=3, mean±SD, *: P<0.05

4-5 ヒアルロン酸がマクロファージの貪食能に与える影響

図 6 で示されたように、マクロファージのヒアルロン酸添加培養により M2 マーカーの一部が上昇（図 6, a, b）していた一方、M1 マーカー発現には有意差が認められなかった（図 6, e, f, g）。分極状態はマクロファージの貪食能にも影響を与えるため、ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージの貪食能を評価した。ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージに、latex beads- IgG-FITC complex を 2 時間貪食させ、フローサイトメトリー解析を行った（図 11）。フローサイトメトリー解析では、生細胞中の FITC 陽性細胞の割合と MFI を算出した。その結果、67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養したマクロファージとコントロールでは、FITC 陽性細胞の割合と MFI に有意な差はなく、貪食能に差は認めなかった（図 12, g, h）。

図 11

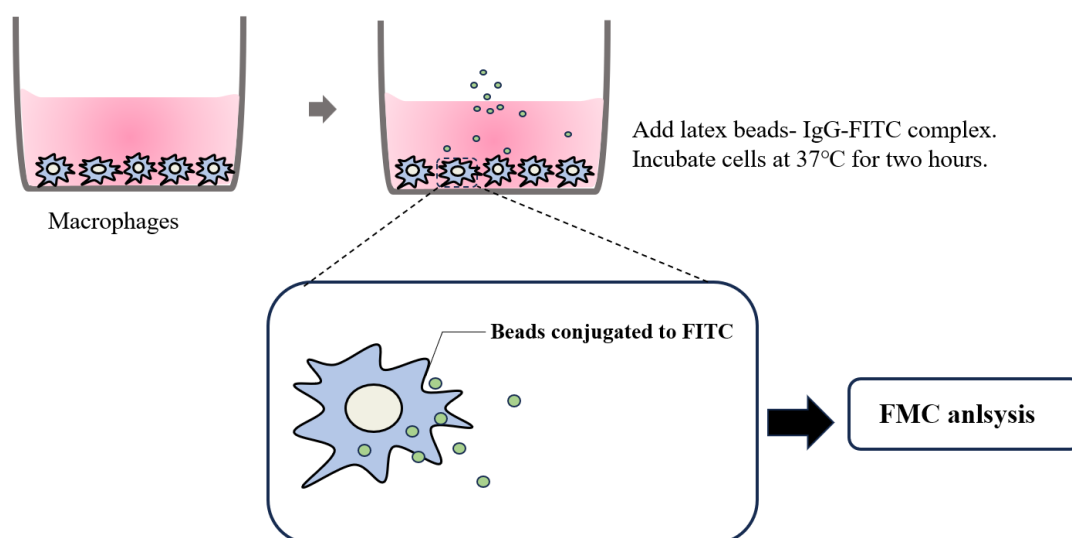


図 11 67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージの貪食能の評価

67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージとヒアルロン酸を添加せずに培養した脾臓由来マクロファージの上清に、FITC 標識されたビーズ（Beads-FITC complex）を2時間貪食させ、フローサイトメトリー解析を行った。

図 12

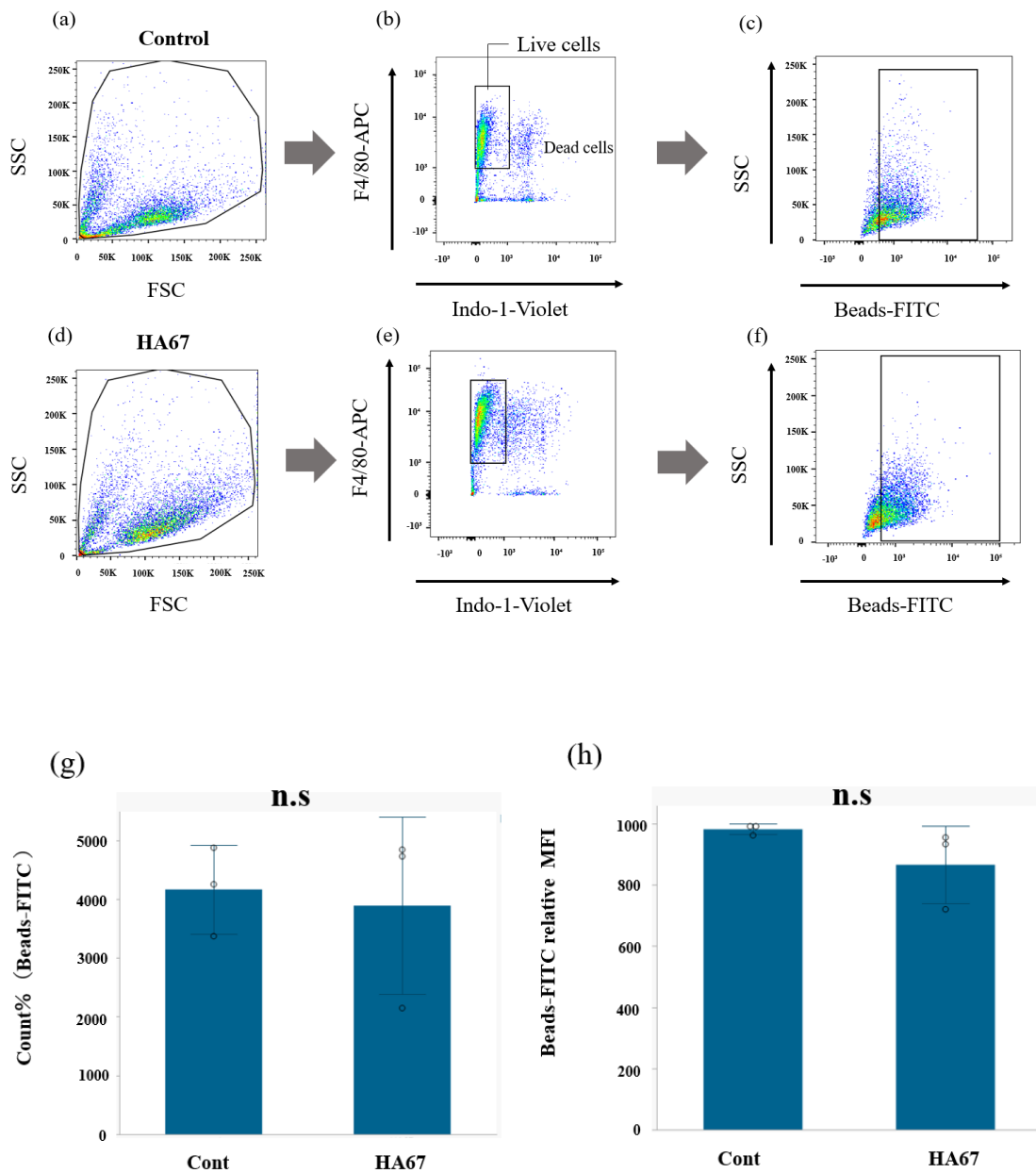


図 12 67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージの
Binds-FITC 陽性細胞数の比較

図 11 に示した通りに、Binds-FITC を貪食させた後、細胞を回収しフローサイト
メトリー解析を行った。まず、細胞集団をゲーティングし (a, d)、生細胞中の

F4/80 陽性細胞をゲーティングした後 (b, e) の FITC 陽性の細胞の割合 (c, f) を調べた。FITC 陽性細胞数 (g) と FITC relative MFI (h) の比較。

n=3, mean±SD, *: P<0.05

4-6 ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージが血管内皮細胞に及ぼす影響

ヒアルロン酸添加により VEGF の発現が上昇していたことから、ヒアルロン酸存在下で培養したマクロファージが血管内皮細胞に及ぼす影響を検討した。

まず、マクロファージがヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の Migration に及ぼす影響を検討した。その結果、67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養したマクロファージは、コントロールよりも HUVEC の遊走能を有意に亢進させた (図 13, b)。

次に、血管網形成に与える影響を検討するため、Tube formation assay を行った。67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養したマクロファージとコントロールの馴化培地を用いて HUVEC の培養を行った。馴化培地に含まれる VEGF 濃度は、ELISA で測定した結果から、ヒアルロン酸添加群で 1685 pg/mL、コントロール群で 629 pg/mL であった。通常、HUVEC の培養に用いる培地 (例: EBM™-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit™, Promo Cell 社) には、VEGF が 500

pg/mL 含まれるが、さらに高濃度の VEGF の効果を検証する目的で、それぞれの馴化培地に VEGF (500 pg/mL) を加えた群を設け、合計 4 群で比較を行った。

4 群全てで、血管形成の各パラメーター (Total Branching Length、Total Segments Length、Mean Mesh Size、Branching Interval) に有意差を認めなかった (図 14, c, d, e, f, g)。

図 13

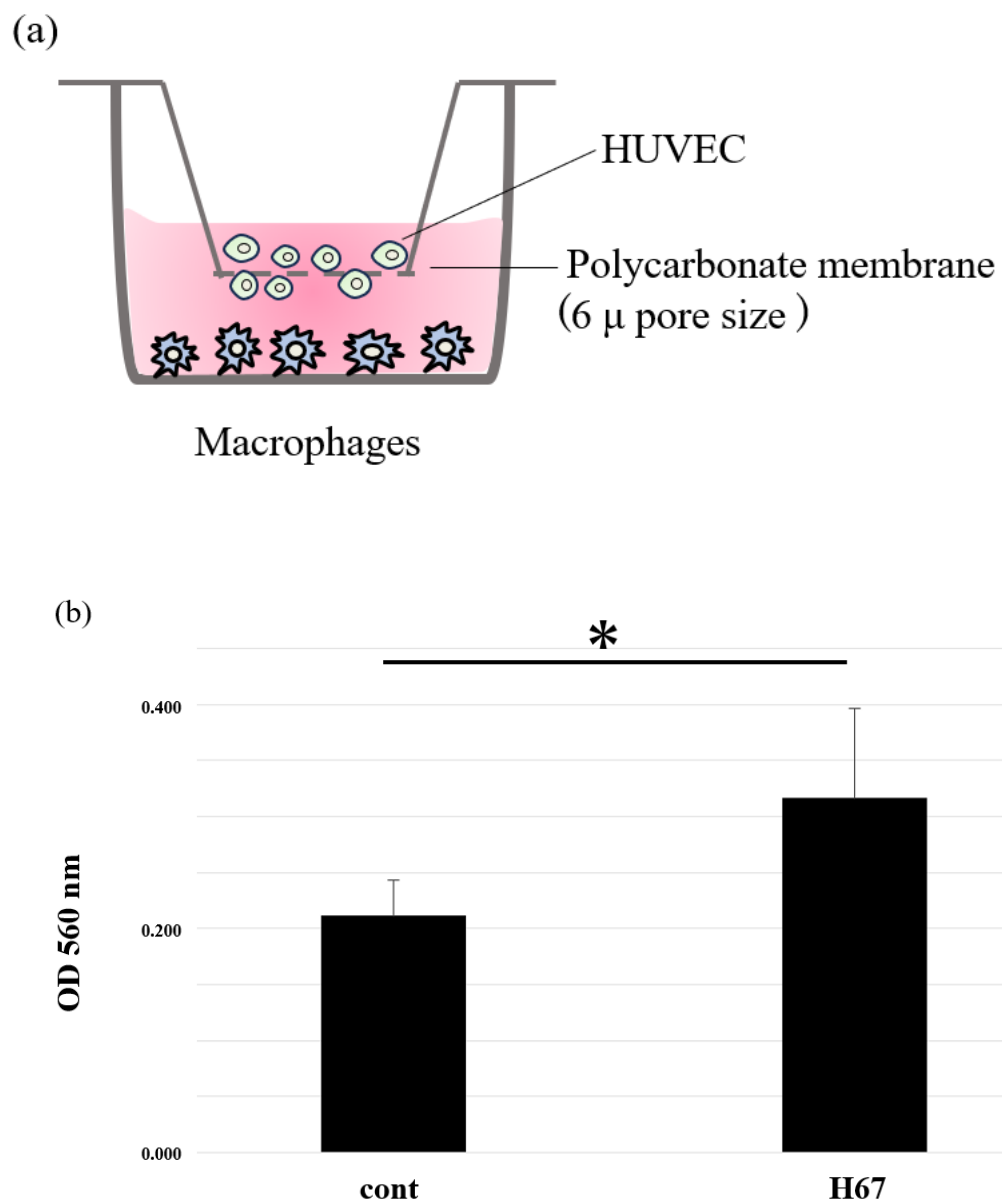


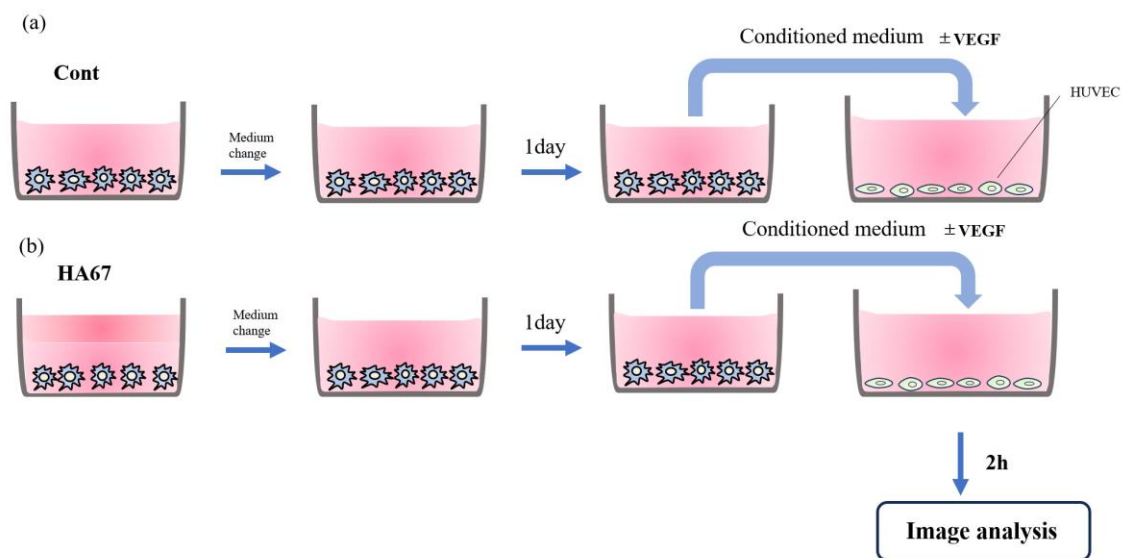
図 13 67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージが HUVEC の遊走能に及ぼす影響 (Migration assay)

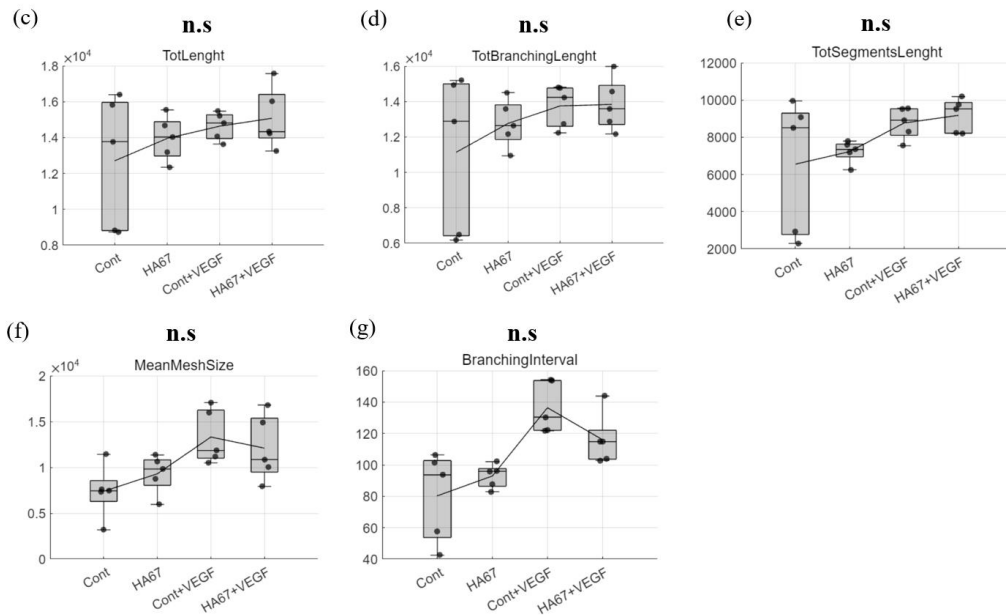
67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージと HUVEC の

共培養の方法 (a)。24 時間後に、遊走した HUVEC を染色し、プレートリーダーで OD 560 nm で測定 (b) した。

n=3, $\pm$ SD, *: P<0.05

図 14





106

図 14 67%ヒアルロン酸存在下で培養した脾臓由来マクロファージが HUVEC の血管新生に与える影響 (Tube formation assay)

67%ヒアルロン酸存在下で培養した脾臓由来マクロファージ (HA67) とヒアルロン酸を添加せずに培養したマクロファージ (cont) の培養液を DMEM に交換し、24 時間培養を行った馴化培地に VEGF (500 pg/mL) を加えた群と加えない群をそれぞれ用意し HUVEC を 2 時間培養した (a, b)。

血管形成の各パラメーター Total Branching Length (c)、Total Segments Length (d)、Mean Mesh Size (e)、Branching Interval (f) を定量化した。

n=3, mean±SD, *:P<0.05

考察

F4/80 は別名 EMR1 および Gpf480 と呼ばれ、マクロファージの表面にのみ発現し、成熟マクロファージの汎用マーカーとして広く知られている (23)。骨髄、脾臓、腹腔マクロファージの 3 種類を比較した先行研究 (24) では、F4/80 を発現する細胞の割合は骨髄から誘導されるマクロファージが最も多かった。培養期間が骨髄で 7 日間、脾臓で 1 日間である点は本研究と異なるが、骨髄細胞から F4/80 を発現する細胞が最も多く得られたことは本研究結果と一致する (図 2, b, d)。

M1 マクロファージへの分化に関しては、骨髄由来 M1 マクロファージの方が脾臓由来 M1 マクロファージよりも CD80 と iNOS の MFI が高く、CD80 陽性細胞数も多く、骨髄由来マクロファージの方が M1 マクロファージへ分化しやすいことが示唆された (図 3, g, h, I, j)。先行研究 (25) では、LPS で活性化された脾臓由来 M1 マクロファージは、IL-6、IL-12、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現が、骨髄由来 M1 マクロファージよりも高いことが示されており、本研究の結果とは逆に脾臓由来マクロファージが M1 マクロファージへと分化しやすいことを示唆しているが、本研究で用いたマーカーと誘導方法が異なるため、さらなる検討が必要である。体内で炎症反応が誘発された際の単球/マクロファージの動態は、主に骨髄由来の単球が血中からリクルートされる (26)。

さらに LPS、TNF- α 、IFN- γ などのサイトカインにより M1 マクロファージへ分極し、炎症初期時に異物貪食や感染防御に働くため (27)、骨髓由来の単球の方が M1 マクロファージへ分極しやすい能力を有していることは理にかなっている。一方で、脾臓にも単球は貯蔵されており、その貯蔵量は、循環している単球よりも多く (28)、特定の炎症条件下、例えばアテローム性動脈硬化 (29) や虚血性心筋損傷 (30) の際は、脾臓由来の単球が循環血液中に動員され炎症部位にリクルートされるとの報告もある。

M2 マクロファージへの分化に関しては、CD206 の MFI が骨髓由来 M2 マクロファージで高く、Arginase-1 は脾臓由来 M2 マクロファージで MFI が高く、陽性細胞数が多かった (図 4 g, h, I, j)。先行研究では、骨髓と脾臓で M2 マクロファージ分極への差はないとされているが (25)、指標となるマーカーと誘導方法が異なるため、さらなる検討が必要である。CD206 は、I型膜タンパク受容体であり、ウイルス、細菌、真菌表面上のマンノース受容体に結合し、マクロファージによるエンドサイトーシスを誘導する (31)。今回、骨髓由来 M2 マクロファージの方が、脾臓由来 M2 マクロファージよりも CD206 の発現が高かったことを踏まえると、骨髓由来 M2 マクロファージの方が、エンドサイトーシスの機能が高いことが示唆される。

Arginase-1 は、肝臓に最も多く発現している尿素回路関連酵素の一つであり、

アンモニアを解毒する過程で、アルギニン尿素とオルニチンへ分解する加水分解酵素である (32)。また創傷治癒の促進にも関与しているとの報告も多数存在する (19,20)。加齢に伴うヒトやマウスの治癒遅延 (21,22) には Arginase-1 の遺伝子発現の低下が関連しているとの報告もある。Arginase-1 を発現している細胞には、マクロファージやケラチノサイトが知られているが、特にマクロファージの中でも抗炎症性の機能を持つ M2 マクロファージの特異マーカーとして知られている (6)。脾臓由来 M2 マクロファージで Arginase-1 の発現が高かったことを踏まえると、脾臓由来 M2 マクロファージは、骨髄由来 M2 マクロファージよりも創傷治癒を促進する可能性が示唆された。そのため、創傷治癒性の M2d マクロファージ誘導法を検討する本研究においては、脾臓由来マクロファージを選択した。しかし、M2d マクロファージは分極過程において M1 マクロファージを経由すると考えられていることを考慮すると、骨髄由来マクロファージの方が適していた可能性も否定できない。今後は、骨髄由来マクロファージについても M2d マクロファージへの分極能を評価し、脾臓由来マクロファージとの比較を行う必要がある。

67%ヒアルロン酸溶液存在下で培養した脾臓由来マクロファージは、M2 マクロファージのマーカーである Ym-1、Arginase-1、また血管新生マーカーとして知られる VEGF の発現が高いことが特徴的であった (図 6, a, b, h)。一般的には

M2 マクロファージは Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 によって誘導されるが、本研究で得られたマクロファージは、このようなサイトカインの依存なしに M2 マクロファージへ分化することが示唆された。VEGF の発現が特徴的なことから、M2d マクロファージや TAM と類似したマクロファージが得られたと考えられたが、今回は様々なマーカーについてコントロールとの比較を行ったのみであるため、様々なマーカーの陽性/陰性を決定し、マクロファージのサブタイプを同定するには、今後フローサイトメトリーでの検討が必要である。

ヒアルロン酸の受容体としては、CD44、TLR4、RHAMM などが知られている。中でも CD44 は、最も一般的なヒアルロン酸の受容体であり、その機能としてはヒアルロン酸との接着と脱離を繰り返しによるリンパ球のローリング (33)、発生時の四肢形態形成 (34)、創傷治癒 (35)、悪性腫瘍の浸潤や転移に関与するとされがん幹細胞マーカー (36) として知られている。また CD44R、CD44W、CD44S、CD44H、および CD44E などの 5 つのアイソフォームが存在する。CD44H はがん組織に高レベルで発現しており、腫瘍の進行に関与することが示唆されている (36)。CD44 は生体内でのほとんどすべての細胞に発現しており (37)、脾臓由来マクロファージにおいても、CD44 がタンパク質レベルで発現していることをフローサイトメトリーで確認できた (図 8)。しかし、上述の CD44 のアイソフォームに関しては、今後検討する必要がある。

CD44 の siRNA を用いたノックダウン実験では、Ym-1、Arginase-1、VEGF の発現亢進は、CD44 の受容体シグナルによって誘導されることを明らかにした (図 10)。しかし、ノックダウン効率はリアルタイム PCR で約 50% のため、決して高くはない。そのため今後、Western Blot を用いてタンパク質レベルで CD44 がノックダウンされているかどうかの確認が必要である。また TLR4、RHAMM など他のヒアルロン酸受容体の関与についても今後明らかにする必要がある。

67% ヒアルロン酸溶液存在下で培養したマクロファージの特性については Phagocytosis assay、Migration assay、Tube formation assay を用いて評価した。過去の報告では、IL-4 や IL-13 で刺激された骨髄由来 M2 マクロファージの方が骨髄由来 M1 マクロファージと比較して大腸菌の貪食能が有意に高いことや (38)、M-CSF で誘導したマクロファージは、GM-CSF で誘導したマクロファージよりもリツキシマブでオプソニン化された B 細胞性慢性リンパ性白血病細胞の貪食能が有意に高いとの報告がある (39)。一方で、IL-4 によって誘導された M2 マクロファージは、髄膜炎菌の貪食能が低下するとの報告 (40) も存在する。また、高分子量 (46 万 kDa ~ 280 万 kDa) ヒアルロン酸存在下でマウス腹腔マクロファージを培養した研究では、濃度依存的に貪食能が低下したとの報告も存在する (41)。しかし、本研究ではマクロファージはヒアルロン酸添加によりやや M2 寄りの特性を示すと考えられたが、Phagocytosis assay では貪食能の差を

認めなかった。過去の文献では M2 マクロファージのうち M2a で貪食能が高いことが示されているが (38,40)、本研究においてヒアルロン酸添加により得られたマクロファージの分極傾向はこれとは異なる (M2d) ことが関係している可能性がある。一方、Migration assay では、HUVEC の遊走能の上昇が認められ (図 13, b)、VEGF 発現亢進 (図 6, h) によるものと考えられた。しかし、Tube formation assay では、血管新生に有意差は認めなかった (図 14, c, d, e, f, g)。血管新生には、VEGF 以外の血小板由来成長因子や線維芽細胞成長因子等の様々な因子が影響 (42) しており、本研究におけるマクロファージではこれらの発現が変化している可能性がある。また、血管構造は短時間しか維持できず、観察中も血管構造が次々に破壊されたため、実験のバラつきも大きく、有意差が出なかった可能性も考えられる。今後は、血管構造が完成した段階で、細胞を固定して観察する必要があると考えられた。

以上より、67%ヒアルロン酸存在下で培養されたマクロファージは、Ym-1、Arginase-1、VEGF の発現が亢進を特徴とするマクロファージであり、特に VEGF の発現亢進を認める点で、M2d マクロファージ、TAM と類似することが明らかになった。M2d マクロファージは、アデノシン受容体のアゴニストと LPS で誘導されるとされるが、報告が一報しかない様に培養方法が確立されているとは言えなかった。本研究においては、ヒアルロン酸によって M2d 様マク

ロファージに分化誘導できる事が示唆された。

M2d マクロファージは、創傷治癒に関与するとの報告が存在する (8)。創傷治癒においては、マクロファージが炎症型の M1 マクロファージから抗炎症型の M2 マクロファージに変化することが重要であることが知られている (43)。

例えば、慢性静脈性下腿潰瘍モデルにおいて、デキストラン鉄を投与すると、M1 マクロファージの活性化状態が維持されることにより、M2 マクロファージへのスイッチングが起こらず創傷治癒が遅延する (44)。また、創傷治癒モデルへのマクロファージの細胞療法において、様々な試みがなされているが、期待した効果が得られているとは言い難い。例えば、糖尿病モデルマウス(db/db マウス)に、IL-4 で誘導した M2a マクロファージや IL-10 で誘導した M2c マクロファージを投与した研究では、いずれのマクロファージも創傷治癒を遅延させた (45)。また、胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来の M2 マクロファージは創傷治癒を遅延させる (46) との報告もあり、M2 マクロファージの細胞投与が必ずしも、創傷治癒を促進するとは限らないことが示唆されている。しかし、これらについては、M2 マクロファージの別のサブタイプを用いれば創傷治癒を促進できる可能性も十分に考えられる。上述したように M2d マクロファージは、M1 マクロファージを経由して分化するとの報告がある。これは、創傷治癒において M1 マクロファージから M2 マクロファージへスイッチングが起こる過程に類

似している。つまり、この M2d マクロファージに類似した Ym-1、Arginase-1、VEGF 陽性のマクロファージは、細胞療法に用いることにより創傷治癒を促進させられる可能性を秘めている。

細胞療法を臨床応用する際には、その細胞源として比較的容易に採取ができる自己血や他家血に含まれる単球を使用することが考えられる。そのため、骨髓由来マクロファージにおいても脾臓由来マクロファージと同様にヒアルロン酸で M2d 様のマクロファージが誘導可能かどうかを検討する必要がある。今後は、ヒアルロン酸溶液存在下で得られた Ym-1、Arginase-1、VEGF 陽性の脾臓由来マクロファージをマウス創傷治癒モデルに投与し、創傷治癒機構におけるマクロファージの役割の解明を研究課題としていきたい。さらには、薬剤関連顎骨壊死やインプラント周囲炎などの、感染制御と創傷治癒の両者が必要な疾患のモデルマウスに対し、M2d、あるいは M1 から M2d に至る分極状態のいずれかの段階のマクロファージを投与することで、これらのより複雑な病態の改善が可能であるか、検討を進めていきたい。

結語

本研究では、ヒアルロン酸溶液を用いて脾臓由来のマクロファージから M2d マクロファージに類似した細胞の誘導に成功した。このマクロファージは、細胞療法の供給源や創傷治癒機構におけるマクロファージの役割の解明の一助となる可能性を秘めている。

本研究の一部は、下記の学術雑誌に受理された。

A Comparative Study of Macrophages Derived from Bone Marrow and Spleen

Masataka Sawada, Keigo Kubota, Kazuto Hoshi and Atsuhiko Hikita

***International Journal of Oral Care* January 20; 2024**

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導を受け賜りました東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学講座口腔顎顔面外科学分野星和人教授ならびに東京大学大学院医学系研究科臨床幹細胞生物学講座の疋田温彦特任教授に深甚なる謝意を表します。また、常に励ましの言葉を頂きました東京大学大学院医学系研究科組織幹細胞・生命歯科学講座古村眞教授、研究のアドバイスを頂きました久保田恵吾先生、研究の協力を頂きました教室員の皆様に衷心より感謝申し上げます。最後に、陰ながら研究を支えてくれた家族に感謝致します。

参考文献

1. Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*, 8(8), 886.
2. Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood cancer journal*, 11(4), 69.
3. Underhill, D. M., Gordon, S., Imhof, B. A., Nunez, G., & Bousso, P. (2016). Élie Metchnikoff (1845–1916): celebrating 100 years of cellular immunology and beyond. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 651-656.
4. Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604.
5. Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L. K., & Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps—myth or reality?. *Clinical Science*, 137(15), 1067-1093.
6. Röszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of inflammation*, 2015.
7. Ferrante, C. J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B. N., Hasko, G., Outram, S., & Leibovich, S. J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Rα) signaling. *Inflammation*, 36, 921-931.
8. Ferrante, C. J., & Leibovich, S. J. (2012). Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Advances in wound care*, 1(1), 10-16.

9. Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., ... & Scharffetter-Kochanek, K. (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(3), 985-997.
10. Cassetta, L., & Pollard, J. W. (2018). Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 17(12), 887-904.
11. Shan, K., Feng, N., Cui, J., Wang, S., Qu, H., Fu, G., ... & Chen, Y. Q. (2020). Resolvin D1 and D2 inhibit tumour growth and inflammation via modulating macrophage polarization. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(14), 8045-8056.
12. Sato, N., Kohi, S., Hirata, K., & Goggins, M. (2016). Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: Once again in the spotlight. *Cancer science*, 107(5), 569-575.
13. Ooki, T., Murata-Kamiya, N., Takahashi-Kanemitsu, A., Wu, W., & Hatakeyama, M. (2019). High-molecular-weight hyaluronan is a hippo pathway ligand directing cell density-dependent growth inhibition via PAR1b. *Developmental cell*, 49(4), 590-604.
14. Rayahin, J. E., Buhrman, J. S., Zhang, Y., Koh, T. J., & Gemeinhart, R. A. (2015). High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS biomaterials science & engineering*, 1(7), 481-493.
15. Lyle, D. B., Breger, J. C., Baeva, L. F., Shallcross, J. C., Durfor, C. N., Wang, N. S., & Langone, J. J. (2010). Low molecular weight hyaluronic acid effects on murine macrophage nitric oxide production. *Journal of biomedical materials research Part A*, 94(3), 893-904.

16. Kuang, D. M., Wu, Y., Chen, N., Cheng, J., Zhuang, S. M., & Zheng, L. (2007). Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 110(2), 587-595.
17. Miyamoto, Y., Kubota, K., Asawa, Y., Hoshi, K., & Hikita, A. (2021). M1-like macrophage contributes to chondrogenesis in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), 21307.
18. Buchacher, T., Ohradanova-Repic, A., Stockinger, H., Fischer, M. B., & Weber, V. (2015). M2 polarization of human macrophages favors survival of the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PloS one*, 10(11), e0143593.
19. Crompton, R. A., Williams, H., Campbell, L., Kheng, L. H., Saville, C., Ansell, D. M., ... & Cruickshank, S. M. (2022). An epidermal-specific role for arginase1 during cutaneous wound repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 142(4), 1206-1216.
20. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in immunology*, 5, 532.
21. Campbell, L., Saville, C. R., Murray, P. J., Cruickshank, S. M., & Hardman, M. J. (2013). Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(10), 2461-2470.
22. Hardman, M. J., & Ashcroft, G. S. (2008). Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome biology*, 9(5), 1-17.

23. Waddell, L. A., Lefevre, L., Bush, S. J., Raper, A., Young, R., Lisowski, Z. M., ... & Hume, D. A. (2018). ADGRE1 (EMR1, F4/80) is a rapidly-evolving gene expressed in mammalian monocyte-macrophages. *Frontiers in immunology*, 9, 2246.
24. Zhao, Y. L., Tian, P. X., Han, F., Zheng, J., Xia, X. X., Xue, W. J., ... & Ding, C. G. (2017). Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 18(12), 1055.
25. Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T. K., ... & Harris, D. C. (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC immunology*, 14(1), 1-10.
26. Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613.
27. Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L. K., & Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps—myth or reality?. *Clinical Science*, 137(15), 1067-1093.
28. Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., ... & Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940), 612-616..
29. Robbins, C. S., Chudnovskiy, A., Rauch, P. J., Figueiredo, J. L., Iwamoto, Y., Gorbatov, R., ... & Swirski, F. K. (2012). Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 125(2), 364-374.

30. Hofmann, U., & Frantz, S. (2014). Immunity strikes: heart failure as a systemic disease. *European heart journal*, 35(6), 341-343.
31. Gazi, U., & Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, 214(7), 554-561.
32. Yang, Z., & Ming, X. F. (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in immunology*, 5, 533.
33. DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J., & Siegelman, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1119-1130.
34. Toole, B. P. (1991). Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition* (pp. 305-341). Boston, MA: Springer US.
35. Acharya, P. S., Majumdar, S., Jacob, M., Hayden, J., Mrass, P., Weninger, W., ... & Puré, E. (2008). Fibroblast migration is mediated by CD44-dependent TGF β activation. *Journal of cell science*, 121(9), 1393-1402.
36. Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., & Syahir, A. (2021). CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. *Biomolecules*, 11(12), 1850.
37. Lesley, J., Hyman, R., & Kincade, P. W. (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Advances in immunology*, 54, 271-335.

38. Kapellos, T. S., Taylor, L., Lee, H., Cowley, S. A., James, W. S., Iqbal, A. J., & Greaves, D. R. (2016). A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochemical pharmacology*, 116, 107-119.
39. Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., ... & Golay, J. (2009). M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *The Journal of Immunology*, 182(7), 4415-4422.
40. Varin, A., Mukhopadhyay, S., Herbein, G., & Gordon, S. (2010). Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(2), 353-362.
41. Forrester, J. V., & Balazs, E. A. (1980). Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, 40(3), 435.
42. Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653-660.
43. Sindrilaru, A., & Scharffetter-Kochanek, K. (2013). Disclosure of the culprits: macrophages—versatile regulators of wound healing. *Advances in wound care*, 2(7), 357-368.
44. Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., ... & Scharffetter-Kochanek, K. (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(3), 985-997.

45. Jetten, N., Roumans, N., Gijbels, M. J., Romano, A., Post, M. J., de Winther, M. P., ... & Xanthoulea, S. (2014). Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. *PloS one*, 9(7), e102994.
46. Dreymueller, D., Denecke, B., Ludwig, A., & Jahnen-Dechent, W. (2013). Embryonic stem cell-derived M2-like macrophages delay cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 21(1), 44-54.