

論文の内容の要旨

論文題目 血管リモデリングにおけるマクロファージの働き

氏名 相馬 桂

近年、生活習慣の欧米化に伴い動脈硬化性疾患の患者数が増加している。動脈硬化性病変は既存の血管がその周囲環境の変化からリモデリングを引き起こした病変である。これまで動脈硬化性病変に対しては、カテーテル治療、バイパス術などが行われてきたが、瀰漫性の狭窄や微小血管病変に対してはこれらの治療では限界がある。そこで最近、血管新生療法が注目されるようになってきたが、この治療法で再生できた血管は未熟で脆弱であるなどの問題が残っており、発達途上の段階である。また、血管リモデリングが問題となる病態は動脈硬化性疾患のみではない。現在、日本人の死因の第1位は悪性新生物であるが、腫瘍の進展、予後を大きく左右するのも腫瘍内の血管新生と血管の構造変化であることが知られている。このように、血管形成および血管のリモデリングは様々な病態の進行に関与している。これらの血管が関与する疾患に対して、病態に応じて血管異常を是正すること、特に血管新生、血管リモデリングを制御して病状を改善する治療法の開発が急務である。以上の背景から、私は成熟した機能的な血管を再生する効率よい血管治療法を開発するためには、今一度血管の未熟化と成熟化のメカニズムを解明する必要があると考えた。

血管新生の過程においてはまず未熟で透過性の亢進している階層性のない血管が形成された後、リモデリング過程により壁細胞などに裏打ちされた成熟した機能的な血管となる。管腔構造の形成、および成熟化にはそれぞれ多数の血管新生誘導因子が関わっている。中でも血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とその受容体(VEGFR)シグナルは特に血管新生の重要な制御系であり、虚血性疾患に対する血管新生療法や血管増殖性疾患における血管新生抑制療法においても VEGF シグナルを介するアプローチが利用されている。VEGF-A は血管内皮細胞の生存と増殖、細胞遊走を引き起こし、血管新生、血管透過性亢進を誘導する分泌性タンパクである。内皮細胞以外の細胞種に対しては、モノサイト、マクロファージの遊走促進、造血細胞の分化、活性制御などの役割も担っている。また、VEGFR1 も内皮細胞のみならずモノサイト、マクロファージをはじめとする血球系細胞にも発現し、炎症細胞の遊走に関与する。

マクロファージは血管新生、血管リモデリングに重要な役割を果たしていることが知られている。既に、マクロファージを欠失させたマウスでは虚血性網膜症モデルにおいて病的血管新生が抑制される、腫瘍血管の異常化が抑制されるなどの報告がある。マクロファージは生体内で

様々な表現型を示しており、その中で主に炎症を惹起する M1 マクロファージと炎症終息にかかわる M2 マクロファージに分類することができる。血管新生においてモノサイトやマクロファージが重要な役割を担っていることは明らかになってきているが、どのマクロファージの亜集団がどのように血管の未熟化あるいは成熟化を引き起こすかは明らかになっていない。

そこで本研究では未熟な血管新生モデルとして腫瘍血管新生モデルを用いてマクロファージの極性と挙動を解析することで未熟な血管新生および血管成熟化におけるマクロファージの働きを解析することを目的とした。

形成初期の小さな腫瘍病変は無血管でも酸素供給が維持されているが、腫瘍の増大と共に腫瘍内に低酸素環境が惹起され、新たな血管新生が誘導される。この現象は *angiogenic switch* と呼ばれている。通常、腫瘍が $2\text{-}3\text{mm}^3$ を超えて増大するには *angiogenic switch* が起こることが必要であると言われている。本実験系においては、腫瘍が増大し、 300mm^3 を超える時点で、腫瘍内低酸素領域が減少した。この時点で *angiogenic switch* に似た現象が起こり血管の過剰増殖が起こっていると考え、この時期の腫瘍内マクロファージおよび血管新生増殖因子に注目した。

腫瘍内のマクロファージ/モノサイトの亜集団を分類する方法は未だ確立されていないため、本研究ではこれまで他の臓器で用いられてきた分類法の 1 つを用いて、CD11b 陽性、Ly6G 陰性の血球系細胞のうち F4/80 陽性細胞をマクロファージ(一部モノサイトを含む)、Ly6C high を M1 マクロファージ/モノサイト、Ly6C low を M2 マクロファージとして定義した。本研究により私は未熟な血管新生の過程において、Ly6C high の M1 マクロファージ/モノサイトが比較的酸素濃度の高い領域に集積する一方、Ly6C low の M2 マクロファージが低酸素領域に集積することを確認した。

マクロファージにおける VEGF-A が血管の未熟化に重要な役割を果たしていることは既に表示されているが、マクロファージ亜集団においてどの細胞が VEGF-A を分泌しているのかは明らかでなかった。本研究において、私は腫瘍内で比較的酸素濃度の高い領域、即ち血管周囲に集積している M1 マクロファージ/モノサイトの集団で *Vegf-a* の mRNA 発現が高いことを明らかにした。

さらに、マクロファージにおいてケモカインレセプターとして機能する VEGFR1 が M1 マクロファージ/モノサイトの遊走において重要な役割を果たしていることを明らかにした。即ち、VEGFR1 を骨髓球系特異的に欠失したマウス (*LysM-Cre+Vegfr1^{flx/flx}* マウス) では腫瘍内への M1 マクロファージ/モノサイトの集積のみが低下しており、M2 マクロファージの集積に変化がなかった。また、腫瘍内の血管は成熟化し、腫瘍体積の増大も見られた。VEGFR1 を発現する M1 マクロファージ/モノサイトの存在が血管の未熟化を促進していることが明らかになった。このマクロファージは VEGF-A を同時に発現しており、VEGFR1 は、VEGF-A を分泌するマクロファージを腫瘍内に遊走させることで血管の未熟化を引き起こしていることが示唆された。最近、骨髓球系特異的に VEGF-A を欠失したマウスにおける *xenograft* モデルでは、腫瘍血管が成熟化

し腫瘍が増大したという報告がなされている。これは本研究の *LysM-Cre+Vegfr1^{flox/flox}* マウスの表現型と一致している。さらに、*Vegfr1* を発現するマクロファージは腫瘍内の比較的酸素濃度の高い領域に存在しながら *Vegf-a* を発現していることから、比較的酸素濃度の高い領域に存在するマクロファージから分泌される VEGF-A が腫瘍血管の未熟化を引き起こしている可能性があると考えている。

腫瘍随伴マクロファージについてのこれまでの報告では腫瘍内 M2 マクロファージにおける VEGF-A の役割が注目されており、M2 マクロファージが低酸素シグナルに応答して VEGF-A を発現し、腫瘍内の血管新生を引き起こすと考えられてきた。しかし、本研究の検討により酸素濃度の高い領域に存在するモノサイトおよびマクロファージがより多くの *Vegf-a* を発現していることが明らかになった。また、酸素濃度の高い領域で *Vegf-a* を発現するマクロファージの浸潤低下が血管成熟化を引き起こしたことから、血管成熟度の制御には VEGF-A を発現するマクロファージの位置が重要であることが示唆された。

血球系細胞における VEGFR1 の働きとしては近年 VEGFR1 のチロシンキナーゼドメイン欠損マウス(TK-/-)の解析が行われてきた。VEGFR1TK-/-マウスの骨髄を移植したマウスの腫瘍では腫瘍内への血球系細胞の遊走低下と腫瘍内新生血管の減少を認め腫瘍が小さくなると報告されている。本研究での *LysM-Cre+Vegfr1^{flox/flox}* マウスの腫瘍では腫瘍内の M1 マクロファージ、モノサイトの集積が減少し、血管の成熟化と腫瘍の拡大を認めた。本研究での表現型はマクロファージ、モノサイト特異的な VEGFR1 の働きを示し、VEGFR1TK-/-マウスの表現型は T 細胞、B 細胞など全ての血球系細胞を含めた VEGFR1 の働きを示していると考えられる。マクロファージ以外の血球系細胞における VEGFR1 の役割はマクロファージにおける VEGFR1 の役割と異なっている可能性がある。

本研究の新規性は、マクロファージ、モノサイト特異的な VEGFR1 欠失マウスを作成し、腫瘍移植モデルでマクロファージにおける VEGFR1 の役割を個別解析したという点である。私は VEGFR1 が M1 マクロファージ、モノサイトの腫瘍内への遊走に寄与することで腫瘍血管の未熟化を引き起こしていることを明らかにした。また、M1 マクロファージ/モノサイトは酸素濃度の高い環境下で VEGF-A を発現することが明らかになった。血管周囲のマクロファージの VEGF-A が血管を未熟化させている可能性が示唆された。

腫瘍血管新生においては VEGFR1 を介するシグナルが VEGF-A を持つマクロファージを遊走させ腫瘍血管の未熟化を引き起こすことが明らかになった。今後は、正常な血管新生においてマクロファージの VEGFR1 がどのように働いているのか、創傷治癒モデルにおいて検討することを考えている。今後、創傷治癒モデルで未熟な血管が形成されてから血管が成熟化する過程において、VEGFR1、VEGF-A を発現するマクロファージの挙動を空間的、時間的に追跡することで血管リモデリングの正常化、未熟化のメカニズムの違いを解明できると考えている。