

## 終了報告書〈概要〉

施設・所属: 九州大学大学院医学研究院循環器内科学氏名 古賀純一郎

概要の構成は自由ですが、研究目的、研究手法、研究成果などを1ページでまとめてください。  
(図表・写真などの貼付を含む、日本語)

【背景】動脈硬化性疾患(心筋梗塞、脳梗塞、静脈グラフト閉塞など)はその症例数が年々、増加しており、一度、発症すると生命に関わるもしくは Quality of life を大きく損なうことが多く、その発症機序の解明と新規治療の開発は急務である。動脈硬化の病態において単球・マクロファージが中心的役割を果たしており、その病態には IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ を発現するいわゆる M1 マクロファージが重要な役割を果たしていると考えられているが、これらマクロファージの分化が分子レベルでどのように制御されているかは不明であった。相川研究室ではヒト末梢血単核球がマクロファージに分化する過程で Notch ligand のひとつ、Delta-like ligand 4 (Dll4) の発現増加を認めることを見だし、Dll4/Notch シグナルが ERK、NF- $\kappa$ B を活性化することを報告した (Circulation 2007)。また、同研究室では実際の高脂血症マウスに生じる慢性動脈硬化において Dll4 阻害抗体の投与がマクロファージ集積ならびに病変形成を抑制することを明らかにした (PNAS 2012)。しかし、血管内皮細胞も Dll4 を高発現しており、生体内におけるマクロファージ Dll4 の役割は不明であった。また、Dll4 阻害治療の臨床応用を考えると、Dll4 の長期阻害は現時点で報告されている消化器症状(下痢など)を含む副作用の懸念があり、血管傷害後再狭窄や静脈グラフト不全などのより短期間に病変形成を来たす疾患の方が、臨床応用を視野に入れると有利であるものと考えられた。

【目的】そこで Notch 経路がマクロファージ活性化を介し動脈硬化性疾患を促進するとの仮説を検証し、詳細な機序を明らかにするため、以下の実験を計画した。特に Dll4 阻害治療の臨床応用を視野に入れ、より短期間に病変形成が進行する静脈グラフト不全モデルを選択した。

【研究手法】生体内で Dll4/Notch シグナルを阻害する手段として Dll4 阻害抗体を用いた。また、マクロファージ Dll4 の生体内における役割を明らかにするため、マサチューセッツ工科大学との共同研究により作成した siRNA 封入マクロファージ選択的脂質ナノ粒子(LNP)を使用した。12 週齢より高脂肪食を負荷した LDL 受容体欠損マウス(ドナー)から下大静脈を摘出し同週齢の高脂肪食負荷 LDL 受容体欠損マウス(レシピエント)の右頸動脈に移植した。血管径が細径なためレシピエントの頸動脈断端にカフを通し、その上にレシピエントの下大静脈をかぶせ結紮することにより静脈グラフトを植え込んだ。移植後 28 日目に静脈グラフトを採取し病理組織学的解析を行った。また、一部のマウスではマクロファージ浸潤、MMP 活性化の程度を評価するため近赤外線イメージングを行った。In vitro ではマウス腹腔マクロファージを用い Dll4 の過剰発現、中和抗体による Notch 受容体との結合阻害が各種サイトカイン産生に与える影響を検討した。

【研究成果】Dll4 阻害抗体の投与により静脈グラフト植込み後 4 週目の内膜肥厚が抑制された。免疫組織学的解析の結果、Dll4 阻害抗体は内膜へのマクロファージ集積ならびに内膜細胞(マクロファージ、平滑筋細胞)の増殖を抑制した。近赤外線イメージングでは Dll4 阻害によりマクロファージ集積、MMP 活性ともに減少を認め、picrosirius red 染色後、偏光顕微鏡下に行った観察では Dll4 阻害により内膜内の細径コラーゲン線維の減少を認めた。これらの結果は内膜において MMP によるコラーゲン分解が Dll4 阻害により抑制され、病変安定化がもたらされたことが示唆された。In vitro の検討では Dll4 プラスミドの導入により IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 等の M1 マクロファージ関連遺伝子の発現亢進を認め、Dll4 阻害抗体の添加によりこれら遺伝子の発現抑制を認めた。siRNA 封入 LNP を用いた検討ではマクロファージ Dll4 のノックダウンにより抗体治療と同様に内膜肥厚が抑制された。マクロファージと血管平滑筋細胞を用いた検討では Dll4 プラスミドを導入したマクロファージの上清は対照群に比べ平滑筋細胞の遊走、増殖を促進した。また、平滑筋分化マーカーであるミオシン軽鎖の遺伝子発現は抑制された。

以上の結果は静脈グラフト不全においてマクロファージ Dll4 は M1 マクロファージへの分化を誘導し、さらに液性因子を介し平滑筋細胞の増殖、遊走、脱分化を引き起こすことにより内膜肥厚を促進することを示唆するものと考えられた。