

## 第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－

### 研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	九州大学 循環器病未来医療研究センター
氏 名	古賀 純一郎
研 究 テーマ	Notch リガンドによるマクロファージ機能制御と動脈硬化における役割解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

#### 【研究目的】

動脈硬化を基盤として発症する虚血性心疾患は近年、症例数が増加し日本人の死因の中でも大きな比率を占めている。Notch シグナルは発生段階において様々な細胞の分化を制御するが、近年、種々の疾患にも関与することが明らかになりつつある。申請者は Notch シグナルのマクロファージ機能制御、動脈硬化の病態における役割を明らかにするため本研究を行った。

#### 【方法・結果】

以上の目的を達成するため、*in vitro* での各 Notch リガンド機能のスクリーニングを行った。*In vitro* での検討の結果、マクロファージ活性化に関わる Notch リガンドが明らかとなれば、動脈硬化の病態における役割を生体レベルで明らかにするため、Notch リガンドの阻害抗体を動脈硬化モデルマウスに投与し検討を行った。

#### 1. Notch リガンド Delta-like ligand 1 (Dll1)はマクロファージ活性化を誘導する

腹腔内マクロファージを用いた検討では LPS、IFN- $\gamma$  刺激により誘導された炎症性マクロファージにおいて Dll1 発現が誘導された。同マクロファージにおいて Dll1 の機能阻害を行うと炎症性マクロファージ関連分子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、iNOS)の発現が抑制された。一方、リコンビナント Dll1 は炎症性マクロファージ関連分子の発現を誘導した。

#### 2. Dll1 機能阻害はマウス血管傷害後内膜肥厚を抑制する

血管傷害後内膜肥厚における Dll1 シグナルの役割を明らかにするため 12~20 週齢の野生型マウス(C57Bl/6)の大腿動脈にワイヤー傷害を行った。血管傷害後、Dll1 阻害抗体(250 $\mu$ g、週 2 回)投与し、28 日目の内膜肥厚を病理組織学的に定量した。対照群には isotype IgG を投与した。その結果、Dll1 阻害抗体投与群において内膜肥厚、血管周囲線維化が抑制された。

#### 3. Dll1 機能阻害は高脂血症マウスにおいて動脈硬化プラークの形成を抑制する

高脂肪食負荷により生じる粥状硬化病変の形成における Dll1 の役割を明らかにするため 8 週齢のオス ApoE 欠損マウスに 12 週間の高脂肪食負荷を行った。高脂肪食負荷後の大動脈基部プラークでは Mac-3 陽性マクロファージに一致して Dll1 の高発現を認めた。高脂肪食開始後、Dll1 阻害抗体を 250 $\mu$ g 腹腔内投与(週 2 回)した結果、プラークサイズの縮小、Oil red O 陽性エリアの縮小を認めた。また、Dll1 阻害抗体投与群において Mac-3 陽性マクロファージ集積の減少を認めた。

#### 【結語】

以上の結果により Dll1 を介するマクロファージ活性化が動脈硬化の病態を促進することが示唆された。Dll1 阻害抗体を用いた治療は活性化マクロファージの関わる血管病に対する新規治療となることが期待される。

## 第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－

## 研究成果報告書(追加助成) &lt;詳細&gt;

所 属	九州大学 循環器病未来医療研究センター
氏 名	古賀 純一郎
研究テーマ	Notch リガンドによるマクロファージ機能制御と動脈硬化における役割解明

## 目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

**【背景】**

動脈硬化を基盤として発症する虚血性心疾患は近年、症例数が増加し日本人の死因の中でも大きな比率を占めている。Notch シグナルは発生段階における細胞分化制御に関わるが、出生後も各種疾患の病態に関与することが明らかになりつつある。Notch リガンドのひとつ Delta-like ligand 4 (Dll4)が炎症性マクロファージへの分化を誘導し動脈硬化を促進することを我々は近年、明らかにした(*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015)。しかし、Notch シグナルによるマクロファージの活性・分化制御機構の全体像は未だ不明である。故に、マクロファージ Notch リガンドがマクロファージ活性化、動脈硬化の病態において果たす役割を明らかにするため本研究を立案した。

**【目的】**

本研究の目的は Notch シグナルがマクロファージ活性化、動脈硬化の病態において果たす役割を明らかにすることである。具体的には培養マクロファージを用い炎症性マクロファージへの分化誘導を制御する Notch リガンドを同定し、同リガンドの動脈硬化の病態における役割を生体レベルで明らかにする。以上を通じ、Notch シグナルを標的とする新規動脈硬化治療の可能性を探索する。

**【方法】****1. Notch リガンド阻害抗体を用いたマクロファージ分化制御機構の解明**

各 Notch リガンド(Jagged 1, Jagged 2, Dll1, Dll3)の阻害抗体が炎症性(M1)マクロファージ関連分子(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS)、非炎症性・修復性マクロファージ(M2)関連分子(Arginase-1, Ym1)の発現に与える影響を検証した。具体的にはマウス腹腔内マクロファージを *ex vivo* で各 Notch リガンドの阻害抗体と共に 24 時間、培養した後、LPS 10ng/mL+IFN- $\gamma$ 10ng/mL による M1 マクロファージへの分化誘導、IL-4 10 ng/mL による M2 マクロファージへの分化誘導を行った。24 時間後、上記分子の発現を real-time PCR 法にて半定量した。

**2. リコンビナント Notch リガンド蛋白によるマクロファージ分化誘導**

各 Notch リガンドのリコンビナント蛋白を用い、マクロファージの gain-of-function を行う。Notch シグナルを活性化するため培養ディッシュにリコンビナント Notch リガンドを固相化し(immobilized Notch ligand)、マクロファージの Notch シグナル活性化を誘導する。

**3. M1 マクロファージへの分化誘導が Notch リガンド発現レベルに及ぼす影響の検討**

上記にて Notch リガンドが M1 マクロファージへの分化誘導を起こすことが明らかとなれば、反対に M1 マクロファージへの分化誘導が Notch リガンドの発現を誘導するか否か、real-time PCR 法、Western blotting 法にて確認する。

**4. 動脈硬化巣におけるマクロファージ Notch リガンドの発現**

*In vitro* において Notch リガンドによるマクロファージ活性化が明らかとなれば、動脈硬化巣において Notch リガンドの発現が誘導されるか否か、病理組織学的検討を行う。具体的には各 Notch リガンドを免疫組織化学的手法により染色し Notch リガンドを発現する細胞を同定する。

**5. 血管傷害後新生内膜形成における Notch リガンド阻害抗体の効果検証**

雄 C57Bl/6J マウスの大腿動脈に径 0.38 mm のガイドワイヤーを挿入し内皮剥離、血管拡張を行う。術後より週 2 回、Notch リガンド阻害抗体(ハムスター由来、250 μg/回)の腹腔内投与を行う。対照群には IgG を投与する。28 日後に大腿動脈を摘出し、新生内膜肥厚の程度を病理組織学的に定量・比較する。また、Notch リガンド阻害による内膜肥厚抑制作用が確認されれば血管傷害後早期(3 日目、7 日目)の血管において炎症細胞(主に単球・マクロファージ)の免疫組織学的染色を行い、傷害部位への炎症細胞浸潤を抑制するか否か明らかにする。

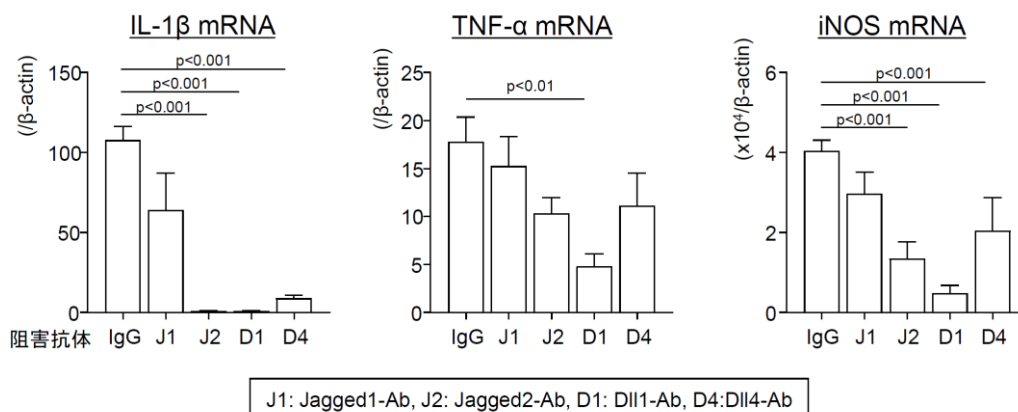
**6. 高脂血症マウスモデルにおける粥状硬化病変形成への影響**

次に、高脂血症マウスに生じる粥状硬化病変に対する効果を明らかにするため ApoE 欠損マウスを用いる。8 週齢の雄 ApoE 欠損マウスに高脂肪食負荷を 12 週間行い、週 2 回 Notch リガンド阻害抗体(ハムスター由来、250 μg/回)の腹腔内投与を行う。対照群には同量の IgG を腹腔内投与する。大動脈摘出後、Oil red O 染色を行い、プラーク面積を定量、比較する。

**【結果】**

**1. Dll1 阻害は M1 マクロファージ関連分子の発現を抑制する**

各 Notch リガンドの阻害抗体を用い、M1/M2 マクロファージ関連分子の発現に与える影響を検討した。その結果、Dll1 阻害抗体は LPS+IFN $\gamma$  刺激マクロファージにおいて M1 マクロファージ関連分子 TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$  の発現を抑制した(右図)。



**2. マクロファージ Dll1 刺激は M1 マクロファージ関連分子の発現を誘導する**

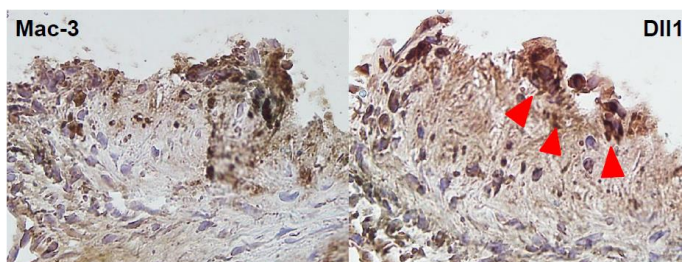
次に Dll1 により M1 マクロファージへの分化誘導が生じるか検討した。リコンビナント Dll1 蛋白存在下にマクロファージを培養した結果、Notch 標的遺伝子である Hes-1 の誘導を認め、マクロファージ Notch シグナルの活性化が示唆された。同マクロファージにおいて IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現を real-time PCR 法にて半定量した結果、Dll1 によりいずれの分子の発現も誘導された。

**3. LPS+IFN- $\gamma$  刺激はマクロファージにおいて Dll1 の発現を誘導する**

培養マクロファージにおいて M1 マクロファージへの分化誘導により Dll1 の発現が誘導されるか real-time PCR 法、Western blotting 法にて検討を行った。その結果、LPS+IFN- $\gamma$  刺激により mRNA レベル、蛋白レベルのいずれにおいても Dll1 発現の誘導が確認された。

**4. 高脂肪食負荷 ApoE 欠損マウスのプラークマクロファージは Dll1 を発現する**

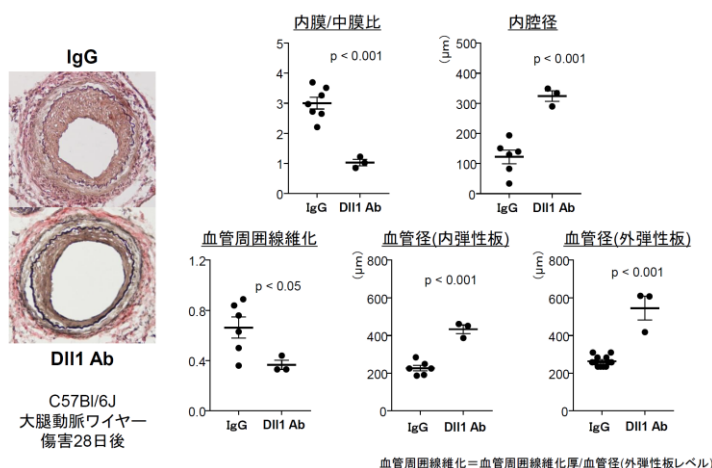
生体内において活性化マクロファージが Dll1 を発現するか否か検討するため ApoE 欠損マウスに 24 週間の高脂肪食負荷を行った。免疫組織学的検討では大動脈弁基部のプラーク内に Dll1 を高発現する Mac-3 陽性マクロファージを認めた(右図 ▲)。



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

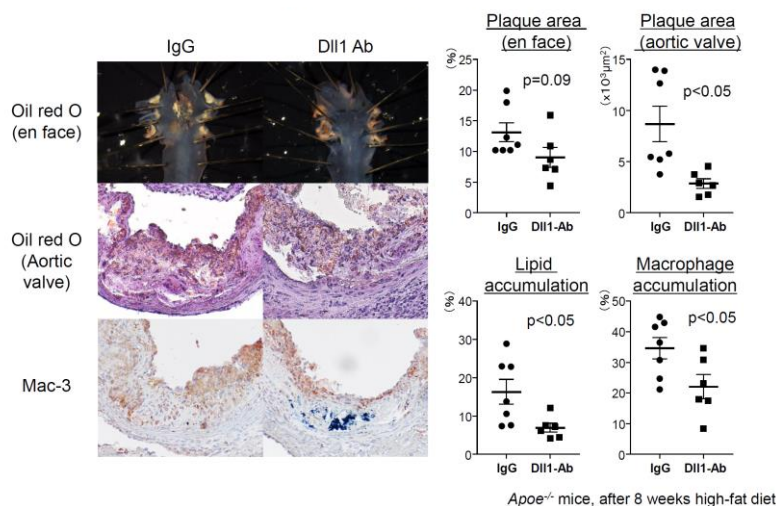
**5. Dll1 機能阻害はマウス血管傷害後内膜肥厚を抑制する**

血管傷害後内膜肥厚における Dll1 シグナルの役割を明らかにするため 12 ~ 20 週齢の野生型マウス (C57Bl/6) の大腿動脈にワイヤー傷害を行った。血管傷害後、Dll1 阻害抗体 (250 $\mu$ g、週 2 回) 投与し、28 日目の内膜肥厚を病理組織学的に定量した。対照群には isotype IgG を投与した。その結果、Dll1 阻害抗体投与群において内膜肥厚、血管周囲線維化が抑制された (右図)。



**6. Dll1 機能阻害は高脂血症マウスにおいて動脈硬化プラークの形成を抑制する**

高脂肪食負荷により生じる粥状硬化病変の形成における Dll1 の役割を明らかにするため 8 週齢のオス ApoE 欠損マウスに 12 週間の高脂肪食負荷を行った。高脂肪食負荷後の大動脈基部プラークでは Mac-3 陽性マクロファージに一致して Dll1 の高発現を認めた。高脂肪食開始後、Dll1 阻害抗体を 250 $\mu$ g 腹腔内投与し(週 2 回)た結果、プラークサイズの縮小、Oil red O 陽性エリアの縮小を認めた。また、Dll1 阻害抗体投与群において Mac-3 陽性マクロファージ集積の減少を認めた (右図)。



**【考察並びに今後の課題】**

以上の結果から Dll1 はマクロファージ活性化を抑制し動脈硬化性疾患の新規治療標的となることが示唆された。一方、Notch シグナルは生体内において様々な細胞の分化・増殖に関わり長期的・全身的な機能抑制は副作用の出現につながる可能性が懸念されるため、Notch シグナルを標的とする新規治療の臨床応用のためには対象とする疾患の選択やマクロファージ選択的に Notch シグナルの機能抑制を行うための薬剤送達システム (Drug delivery system: DDS) の開発などが必要である。

**第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－**  
**研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	九州大学 循環器病未来医療研究センター
氏 名	古賀 純一郎

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。</li> <li>・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。</li> <li>・ 国内外雑誌を問わない。</li> <li>・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Nakano T, Fukuda D, <u>Koga J</u> , Aikawa M. Delta-Like Ligand 4-Notch Signaling in Macrophage Activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016 Oct;36(10):2038-47.
2	Honda K, Matoba T, Antoku Y, <u>Koga J</u> , Ichi I, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Lipid-Lowering Therapy With Ezetimibe Decreases Spontaneous Atherothrombotic Occlusions in a Rabbit Model of Plaque Erosion: A Role of Serum Oxysterols. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Apr;38(4):757-771.
3	
4	
② <論文 PDF 添付なし>	
1	Tokutome M, Matoba T, Nakano Y, Okahara A, Fujiwara M, <u>Koga J</u> , Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. PPAR $\gamma$ -targeting Nanomedicine Promotes Cardiac Healing After Acute Myocardial Infarction by Skewing Monocyte/Macrophage Polarization in Preclinical Animal Models. Cardiovasc Res. 2018. (in press)
2	Katsuki S, Matoba T, <u>Koga J</u> , Nakano K, Egashira K. Anti-inflammatory Nanomedicine for Cardiovascular Disease. Front Cardiovasc Med. 2017 Dec 22;4:87.
3	Mao Y, <u>Koga J</u> , Tokutome M, Matoba T, Ikeda G, Nakano K, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin to Monocytes/Macrophages Inhibits Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction by Inhibiting Monocyte-Mediated Inflammation. Int Heart J. 2017 Aug 3;58(4):615-623.

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2018年8月26日	ESC Congress 2018. Okahara A, Matoba T, <b>Koga J</b> , Fujiwara M, Funamoto D, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Nanoparticle-mediated simultaneous targeting of mitochondria and inflammatory monocytes protects the brain from ischemia-reperfusion injury in mice.
2	2017年11月11日	AHA Scientific Session 2017. Okahara A, Matoba T, <b>Koga J</b> , Fujiwara M, Funamoto D, Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Simultaneous Targeting of Mitochondria and Inflammatory Monocytes Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Mice.
3	2017年8月26日	ESC Congress 2017. Honda K, Matoba T, <b>Koga J</b> , Nakano K, Tsutsui H, Egashira K. High cholesterol diet and angiotensin II induce spontaneous atherothrombotic occlusion of balloon-injured rabbit femoral arteries; effects of lipid-lowering therapies.
4	2018年3月25日	第82回日本循環器学会学術集会. <b>古賀 純一郎</b> , 梅津 隆太, 的場 哲哉, 筒井 裕之, 江頭 健輔. Macrophage dynamin-related protein 1, a mitochondrial fission protein, accelerates inflammation and neointimal thickening after vascular injury.
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		