

研究種目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	HMGB-1 による癌血管新生誘導機構におけるマクロファージの関与	
研究者所属・氏名	研究代表者： 小堀 宅郎 共同研究者： なし	

## 1. 研究目的・内容

マクロファージは、組織障害を誘導する M1 型と組織の再生・修復に関与する M2 型の二つのフェノタイプに分類される。M1 マクロファージは殺細胞性を示す一方、M2 様マクロファージの tumor-associated macrophage (TAM) は、血管新生の誘導等により癌増殖を促進する。

High mobility group box-1 (HMGB-1) は壊死細胞やマクロファージの核内から放出され、腫瘍組織で高発現し癌細胞の増殖促進と抑制の相反する作用を示す。また、HMGB-1 は血管新生を促進することも知られている。しかしながら、HMGB-1 がマクロファージを介して血管新生を誘導する機序は不明である。

HMGB-1 が M2 マクロファージの活性化を介して癌血管新生を促進し、腫瘍増殖に関与するという仮説を証明するため、本研究課題では、炎症性メディエーターがマクロファージ M1/M2 分化へ及ぼす影響と、それらのマクロファージによる血管新生の変化について解析するための評価系の確立を行った。

## 2. 研究経過及び成果

マウス由来単球細胞の RAW264.7 細胞を用い、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  または Interleukin (IL)-10 刺激によって M1/M2 型マクロファージへとそれぞれ分化させた。細胞表面の M1 および M2 マーカーの発現量は、flow cytometry で測定した。マクロファージの血管新生作用は、マウス由来血管内皮細胞の b.End5 細胞との共培養による *in vitro* matrigel tube formation assay で解析した。

エンドキシンにより誘導されるマクロファージ由来炎症性メディエーターとして著名な IL-18 と HMGB-1 が、マクロファージの分化へ及ぼす影響について検討した。IL-18 の併用刺激は、IL-10 単独刺激と比較して RAW264.7 細胞表面の CD163 (M2 マーカー) 発現量を有意に増加させた。一方、TNF- $\alpha$  による M1 マーカーの発現増加作用に影響しなかった。また予備実験の結果、TNF- $\alpha$  による CD86 (M1 マーカー)、IL-10 による CD163 (M2 マーカー) の発現増加作用が、HMGB-1 との共刺激によってそれぞれ増幅されることを確認した。

次に、M1/M2 分化させたマクロファージが、血管新生へ及ぼす影響について検討した。IL-10 と IL-18 で刺激した RAW264.7 細胞と b.End5 細胞を共培養した結果、IL-10 単独刺激の場合と比較して、管腔面積および管腔長が有意に増加した(図 1)。したがって、IL-18 はマクロファージの M2 分化を増強し、血管新生作用を促進する可能性が示された(図 2)。

本助成金により、種々のメディエーターによるマクロファージ M1/M2 分化へ及ぼす影響と、それらのマクロファージによる血管新生の変化について解析するための評価系が確立できた。

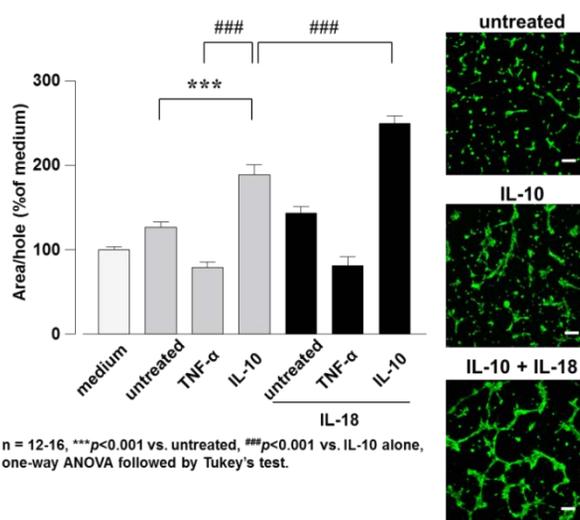


図 1. マクロファージとの共培養による血管管腔形成の変化

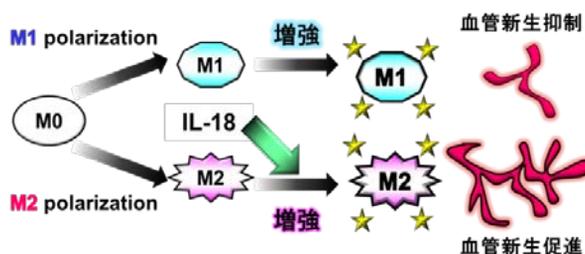


図 2. IL-18 がマクロファージ分化と血管新生へ及ぼす影響

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

本年度に確立した実験評価系を用い、HMGB-1 がマクロファージの M1/M2 分化あるいは M1/M2 分化の増強機構のいずれに影響を及ぼすかについて、flow cytometry で解析する。同様に、HMGB-1 で分化させたマクロファージと血管内皮細胞を共培養し、管腔形成の変化を *in vitro* matrigel tube formation assay を用いて評価する予定である。また、新たに *in vivo* 実験系として、担がんマウスの腫瘍周辺組織に集簇したマクロファージのフェノタイプの解析や HMGB-1 の発現・局在解析を進めたい。さらに、HMGB-1 の機能抑制あるいはマクロファージ分化機構への作用を抑制する因子の探索も行いたいと考えている。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日(予定を含む)
第 128 回 日本薬理学会 近畿部会	口頭	2015 年 11 月 20 日
第 89 回 日本薬理学会年会	ポスター	2016 年 3 月 10 日