

主論文の要旨

Montelukast, a Cysteinyl Leukotriene Receptor 1 Antagonist, Induces M2 Macrophage Polarization and Inhibits Murine Aortic Aneurysm Formation

システイニルロイコトリエン拮抗薬であるモンテルカストは大動脈瘤モデルマウスにおいて M2 マクロファージを誘導し大動脈瘤形成を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導：古森 公浩 教授)

川井 陽平

【緒言】

大動脈瘤の発生機序として動脈硬化を主体とした局所の慢性炎症と matrix metalloproteinase(MMP)-2 や MMP-9 による細胞外マトリクスの分解が関連していることが報告されている。治療は手術しかないが、手術適応とならない小瘤径の大動脈瘤や手術リスクが高い症例においては現在のところ治療方法がない。そのため、大動脈瘤に対する薬物治療が必要とされている。近年システイニルロイコトリエン(cys-LTs)が大動脈瘤形成に関与していることが示唆されている。アラキドン酸代謝の 5-lipoxygenase (5-LO) pathway の産物である cys-LTs が cys-LT1 受容体を介して MMP を誘導し、大動脈瘤形成を促すと言われている。最近、喘息やアレルギー性鼻炎の治療で用いられるロイコトリエン拮抗薬であるモンテルカスト(Mont)の心血管疾患に対する有効性が報告されている。また、抗炎症作用のある M2 マクロファージが大動脈瘤形成を抑制することも知られており、M2 マクロファージが薬物治療の標的となり得ることも報告されている。しかし、大動脈瘤における Mont に対するマクロファージの挙動に言及した報告はない。今回我々は Mont のマクロファージに対する作用と大動脈瘤に対する治療効果を検討した。

【対象及び方法】

1) In vitro; TNF- α で刺激したマウス由来マクロファージ(M1 マクロファージ)を Mont(2 μ M, 20 μ M)と共に培養し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を qRT-PCR にて解析した(n=6)。さらに Mont(20 μ M)を添加したマクロファージ(M0 マクロファージ)の IL-10 及び Arginase-1 の遺伝子発現及び細胞表面抗原をそれぞれ qRT-PCR、Flow Cytometry にて分析し、IL-10 を ELISA にて測定した(n=3)。

2) In vivo; 24 週以上の雄の ApolipoproteinE^{-/-} (ApoE^{-/-})マウスに対し浸透圧ポンプを使用してアンギオテンシン II を連続 28 日間持続皮下注しマウス大動脈瘤モデルを作製した。Mont 群(n=7)には Mont 10mg/kg/day を、生食群(n=7)には生理食塩水を、ポンプを移植した日から連続 28 日間投与した。28 日後に解析した。評価項目として、大動脈瘤径、Elastica Van Gieson 染色による瘤壁の中膜のエラスチンの割合、MMP 活性、ELISA による炎症性サイトカイン、瘤壁の免疫蛍光染色による M1 及び M2 マクロファージを測定した。

【結果】

1) In vitro; Mont(20 μ M)は M1 マクロファージの MMP-2 [Mont(-) vs 20 μ M; 0.94 ± 0.06 vs 0.64 ± 0.06 , $p < 0.01$]、MMP-9 [Mont(-) vs 20 μ M; 26.5 ± 3.18 vs 16.7 ± 1.56 , $p < 0.05$]、IL-1 β [Mont(-) vs 20 μ M; 1.37 ± 0.12 vs 0.56 ± 0.11 , $p < 0.01$]の遺伝子発現を有意に抑制した。Mont(2 μ M)では有意差を認めなかった。Mont(20 μ M)は M0 マクロファージの IL-10 [Mont(-) vs Mont+; 0.13 ± 0.03 vs 0.40 ± 0.02 , $p < 0.01$]、Arginase-1 [Mont(-) vs Mont+; 0.87 ± 0.05 vs 3.35 ± 0.30 , $p < 0.01$]の遺伝子発現を有意に促進した。さらに、Mont(20 μ M)は M0 マクロファージの Arginase-1 [Mont(-) vs Mont+; 17.8 ± 1.20 vs 38.5 ± 3.76 , $p < 0.05$]の

細胞表面抗原発現を有意に促進し、IL-10 を有意に増加させた[Mont(-) vs Mont+; 31.4 ± 0.40 pg/ml vs 75.7 ± 1.29 pg/ml、 $p < 0.05$]。

2) In vivo; Mont 群で有意に瘤径拡大が抑制した(生食群 vs Mont 群; 2.44 ± 0.15 mm vs 1.59 ± 0.20 mm、 $p < 0.01$)。また、エラスチン分解が有意に抑えられ(生食群 vs Mont 群; 45.0 ± 3.04 % vs 56.1 ± 1.62 %、 $p < 0.05$)、MMP2 活性も有意に低下していた(生食群 vs Mont 群; 1234 ± 199 μ M vs 734 ± 71 μ M、 $p < 0.05$)。Mont 群で IL-6 は有意に抑制されており(生食群 vs Mont 群; 95.4 ± 21.2 pg/ml vs 34.3 ± 7.70 pg/ml、 $p < 0.05$)、TIMP-2 は有意に増加していた(生食群 vs Mont 群; 400 ± 69.8 pg/ml vs 725 ± 82.6 pg/ml、 $p < 0.05$)。さらに、Mont 群の瘤壁で有意に M1 マクロファージが低下し(生食群 vs Mont 群; 23.8 ± 1.20 % vs 13.1 ± 0.72 %、 $p < 0.05$)、M2 マクロファージが有意に増加していた(生食群 vs Mont 群; 7.51 ± 1.84 % vs 14.7 ± 1.72 %、 $p < 0.05$)。

【考察】

5-LO pathway の産物である cys-LTs の動脈硬化への関与や腹部大動脈瘤の形成に関わっていることがこれまでの研究で示唆されている。cys-LTs がマクロファージの cys-LT1 受容体を介して MMP-2 や MMP-9 を産生することが作用機序と考えられている。

選択的 cys-LT1 受容体拮抗薬である Mont が MMP-2 や MMP-9 の発現を低下させて動脈硬化の進展を抑制することが動物実験で報告され、最近では、Gennaro らは大動脈瘤モデルマウスにおいて Mont が MMP-9 や macrophage inflammatory protein-1 α を阻害することにより大動脈瘤形成を抑制すると報告している。

本研究では、Vitro 実験にて Mont は TNF- α で活性化されたマクロファージの MMP-2、MMP-9、IL-1 β の遺伝子発現を有意に抑制した。これにより、Mont が動脈瘤関連因子の遺伝子レベルでの抑制作用を有することが明らかとなった。Mont と共培養したマクロファージの IL-10 及び Arginase-1 の遺伝子発現、Arginase-1 の細胞表面抗原、IL-10 濃度を有意に増加させたことにより、Mont が M2 マクロファージを誘導することが明らかとなった。大動脈瘤モデルマウスの瘤壁の免疫蛍光染色において、Mont 投与群では炎症マクロファージである M1 マクロファージが低下し、抗炎症マクロファージである M2 マクロファージが増加していた。本研究の結果から、M2 マクロファージが増加することが大動脈瘤の瘤径拡大を抑制するメカニズムであると考えられた。

大動脈瘤モデルマウスにおいて Mont 投与群では、TIMP-2 は有意に増加していた。これが MMP-2 活性の抑制につながったと考えられた。さらに、in vitro 実験では MMP-9 の遺伝子発現が有意に抑制されていたが、in vivo 実験では MMP-9 の活性に有意差を認めなかった。MMP-9 はマクロファージ以外にも好中球、線維芽細胞、血管内皮細胞からも産生されることが知られているため、これらの細胞が今回の結果に影響したものと思われる。

本研究にはいくつかの限界がある。1 つ目は、in vivo 実験において Mont の投与量が実臨床で使用される用量よりも多いことである。過去に報告された論文を参考にして本研究でも 10mg/kg/day とした。2 つ目は、1 種類の大動脈瘤モデルのみを使用した

ことである。大動脈瘤モデルは塩化カルシウムによる大動脈瘤誘導やエラスターゼ灌流により誘導するモデルなどがあるが、ApoE^{-/-}マウスにアンジオテンシンⅡを持続皮下注することで誘導される大動脈瘤モデルが最も動脈硬化に起因したヒトの大動脈瘤の病態と類似していることが報告されているため、本研究において使用した。

【結論】

本研究により、ApoE^{-/-}マウスによる大動脈瘤モデルにおいて、ロイコトリエン拮抗薬であるモンテルカストは M2 マクロファージを誘導し大動脈瘤径拡大を抑制することが明らかとなった。