

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06234

研究課題名(和文)線維症マウスモデルにおける疾患特異的M2マクロファージの研究

研究課題名(英文)Study of disorder-specific macrophage involved in fibrosis

研究代表者

佐藤 荘 (Satoh, Takashi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60619716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、様々な疾患の発症や増悪に重要な役割を果たしている疾患特異的M2マクロファージの研究を、線維症モデルを用いて行う。  
最近の我々の研究からM2マクロファージは様々な病態に対応して複数種のもの存在していることを解明した。申請者は次に線維症を病態モデルとして取り上げ、M2マクロファージの研究を行った。その結果、病態が進行する際に疾患部で増殖するM2マクロファージ様の細胞集団を発見した。本研究ではその細胞の性格の解析、更にこの細胞の分化に関与する分子基盤を解明し、どの様に病態の悪化にこの細胞群が寄与しているかを明らかにすることを目的としている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to investigate the character of disorder-specific M2 macrophages, which acts an important role in development and exacerbation of various corresponding diseases.  
Recent our studies have revealed that various macrophage subtypes were existed in our body. Next, we focused on fibrosis as a pathological model and studied M2 macrophages. As a result, we found a M2 macrophage-like cell population that proliferates in the diseased part as the disease state progresses. In this research, we identify critical molecule of the cells and clarify the differentiation mechanism of the pro-fibrotic cells. Also, we examine how this cell type contributes to the onset of fibrosis.

研究分野：免疫学

キーワード：疾患特異的マクロファージ 線維症 アレルギー メタボリックシンドローム 自然免疫 疾患 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

申請者のM2マクロファージに対する興味は、従来、病原体を認識し、炎症を起こすことにより非自己を排除する役割を持つマクロファージが、炎症を抑える役割をも担っているという相反する現象に感銘をうけ、マクロファージの研究をきっかけにM2マクロファージの研究に携わった事に端を発している。これまでの研究で、アレルギー物質により活性化されるM2マクロファージはJmjd3によるIrf4の発現誘導が重要であることを明らかにした(Satoh, T. et al. Nat. Immunol. 2010; 11: 936-944)。当初、M2マクロファージの種類や機能が分かっていなかったために、全てのM2マクロファージはJmjd3によって分化制御されていると考えていた。しかしながらその後の研究から、組織常在型M2マクロファージはJmjd3に非依存的に分化することがわかり、更にこれらのタイプのM2マクロファージはTrib1によって分化制御を受けているという新規の分化機構を突き止め、この細胞が抹消組織の恒常性維持を担っていることを報告した(Satoh, T. et al. NATURE 2013; 495: 524-528)。これらの研究や最近の知見から、生体内には様々な種のM2マクロファージが存在しており、各々が異なる分化経路を辿る、全く異なる細胞である可能性が示唆された。

そこで、次のターゲットの疾患としてブレオマイシンのような抗がん剤の投与による肺線維症の病態モデルに着目した。まず、アレルギーに関わるM2マクロファージやメタボリックシンドロームに関わる組織常在型M2マクロファージが肺線維症の発症に関与しているかを検討した。その結果、我々が作製したJmjd3 KOマウス及びTrib1 KOマウスにおいてブレオマイシン投与による肺線維症の病態が野生型と同程度発症し死亡した事と、疾患部位には病体進行に伴ってこれまでとは異なる性質のM2型のマクロファージが確認されたことから、この疾患に関わる第3のM2マクロファージサブタイプの存在が推測された。このような経緯から申請者は、肺線維症の進行と共に局所で増加する新規な線維症関連型M2マクロファージの細胞の分化機構や活性化機構といった分子基盤を解明し、さらには肺線維症の発症メカニズムの一部を明らかにしたいという思いから本研究の着想をするに至った。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、肺線維症の発症に関わるM2マクロファージのサブセットの同定やそれらが分化する過程における遺伝子変化を追及する。具体的には、以下の項目を研究期間内に達成する目標とする。

(1) 発見した線維化期における疾患特異的M2マクロファージにおけるこの細胞の分化・活性化関連遺伝子の検索及び同定を行い、更にCrispR/Cas9によるKOマウスの作製及

び解析をおこなう。また、同定した疾患関連分子と相互作用する遺伝子の同定とその解析により、線維症を疾患特異的M2マクロファージの側面から理解する

(2) (1)で同定した疾患特異的M2マクロファージのin vivoイメージングによる、M2マクロファージと疾患発症・増悪の関係性の解明

(3) (1)において得られる遺伝子発現情報をシステムバイオロジーを応用した線維症関連M2マクロファージ内遺伝子発現パターンの網羅的解析を行う。

## 3. 研究の方法

申請者はこれまでの研究から、ブレオマイシンの投与後の線維化期に増殖し、線維症の病態の発症・増悪に関わると考えられるM2マクロファージを同定した。初年度はこの新規M2マクロファージにおける遺伝子発現をマイクロアレイを用いて検討し、これまで蓄積してきたその他の疾患特異的M2マクロファージのマイクロアレイデータと比較検討することで、線維化に関与するM2マクロファージ内で特異的に変化する疾患関連遺伝子の候補を抽出する。得られた候補遺伝子をノックダウン(KD)システムで安価で簡易的に疾患への関与をin vivoスクリーニングし、ポジティブな結果が得られた分子に関してはCrispR/Cas9の系を用いてKOマウスを作成し、その遺伝子の機能解析を行う。また相互作用分子の同定や、マーカー分子を指標としたルシフェラーゼアッセイも行い、線維化を制御する分子の同定も行う。

さらに次年度は、初年度に作成したKOマウスから線維症関連M2マクロファージを回収し、遺伝子発現パターンを抽出する。これらのデータからシステムバイオロジーを応用して、その細胞内で大きく変化する遺伝子を抽出し、hierarchical clusteringを行って、前年度に作成したデータと比較検討し、新たな疾患関連遺伝子を探索する。それらの遺伝子をKDシステムでin vivoスクリーニングを行い、疾患関連遺伝子の更なる同定を試みる。またMRIを用いて病態とM2マクロファージの可視化を行い、目的の遺伝子の欠損状態がどのように疾患の発症・増悪と関係しているかを検討する。

## 4. 研究成果

(1) 肺線維症の線維化期における疾患特異的マクロファージの同定と機能解析

同定した線維化の発症に関わると考えられる細胞の移植後において、線維化の増悪の程度をCol1a1やActa2の測定、Azan染色やハイドロキシプロリンの量を測定することにより解析した。その結果、この細胞を移植すると線維化がコントロール群よりも増悪することが分かった。そこで、この細胞の制御因子を同定するために、マイクロアレイを

実施した。この細胞や他のマクロファージの網羅的遺伝子発現パターンの解析結果から、分化に重要な因子として NFIL6 を同定した。このマウスは所持していた系統であったために予定していた KD は行わずに、免疫系でだけ NFIL6 が欠損下 KO マウスを樹立し、線維化が発症するか検討を行った。その結果、野生型は線維症を発症したことに対し、免疫系でのみ NFIL6 が欠損したマウスは非常に強く線維化耐性を示した。この KO マウスでどのような免疫学的な phenotype があるかを検討した所、Msrl+ Ceacam1+ Mac1+ Ly6C-F4/80- で表される細胞が完全に欠損していた。また、この細胞は通常のマクロファージと異なり、2 核様の核と顆粒球が所持している顆粒を持ち合わせていることが分かった。そこで、私達はこの細胞が新しい細胞であると考え、Segregated nucleus containing atypical monocyte (SatM) と名前を付けた(図 1)。

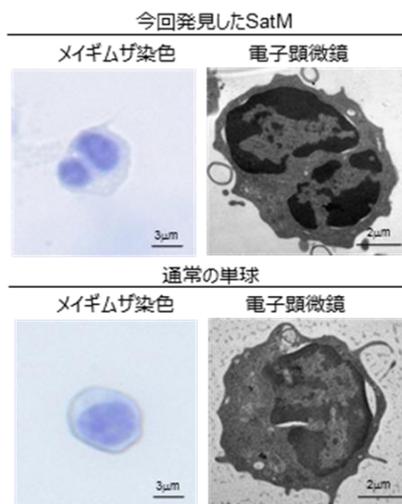


図1 新しく発見されたSatMの形態

(2) 線維症疾患特異的 M2 マクロファージ SatM における病態進行に対する遺伝子発現の網羅的解析

(1) で得られたマイクロアレイの結果を用いて、クラスター解析をおこなった。現在、病態の進行とともに変化する遺伝子発現パターンを抽出済みである。これまで得られている他の疾患特異的マクロファージのデータと比較し、更に SatM で機能する分子を抽出し、新たな制御候補因子を既に複数同定している。また、この網羅的遺伝子発現データを用いて、pathway 解析 (IPA) を行い、他のマクロファージや顆粒球とは異なることを証明した。

(3) 線維症疾患特異的 M2 マクロファージの分化、及び活性化に関わる新規分子の同定と機能解析

予定通り Y2H スクリーニングをおこなったが、(1) で得られた分子が転写因子であったために、結合する新規な分子を得ることが非常に困難を極めた。現在、質量分析解析により、結合する分子の同定を試みている。また成果(2)の bioinformatics 解析により、制御候補因子が複数同定されている。

(4) MRI を用いた病態及び、線維症疾患特異的 M2 マクロファージの可視化

MRI を用いて病態の可視化を野生型と KO マウスとで比較し、世界で初めて、造影剤無しで炎症・線維化の像を捉えることができた。この解析により、野生型及び KO マウスで同一個体を使って経時的に解析することができ、どの時点から両者に差がみられるのかを明らかにすることができた。細胞イメージングに関しては現在、プローブの選定を行っている。

■ = 線維化 13日後 (線維化期)

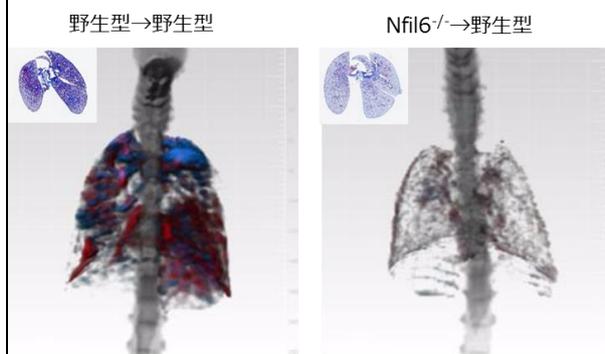


図2 SatM欠損下では線維化は強く抑制される (MRI)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

なし

[学会発表] (計 18 件)

(1) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性 ~基礎研究から臨床応用への第一歩~、口頭、第 767 回 生医研セミナー、2018/2/28、国内

(2) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージサブタイプの機能的多様性-基礎研究から臨床研究への第一歩-、口頭、第 2 回 IRF Academy in Miyazaki Univ.、2018/2/27、国内

(3) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性、口頭、名古屋 TKP カンファレンスセンター、2018/2/17、国内

(4) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性 ~基礎研究から臨床応用へ~、口頭、第 60 回神戸血液病研究会、2018/2/10、国内

(5) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性と臨床への応用への第一歩、口頭、第 7 回 Hepato-Diabetology Conference、

2018/2/9、国内

(6)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性、口頭、京都大学 皮膚科 第 31 回免疫セミナー、2018/1/30、国内

(7)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性 =臨床への応用への第一歩=、口頭、京都府立医科大学第 4 回免疫セミナー、2018/1/26、国内

(8)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージと臓器連関、口頭、脳心血管抗加齢研究会 2017、2017/12/16、国内

(9)佐藤 荘、Functional diversity of various disorder-specific macrophage subtype、口頭、第 79 回日本血液学会学術集会、2017/10/20、国内

(10)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性の基礎研究と臨床応用、口頭、第 45 回日本臨床免疫学会、2017/9/28、国内

(11)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性 ~臨床応用への第一歩~、口頭、新潟分子心血管セミナー、2017/7/27、国内

(12)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性と臨床への応用への第一歩、口頭、NEXT Forum 2017、2017/7/19、国内

(13)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性とその臨床への応用、口頭、第 38 回日本炎症・再生医学会、2017/7/19、国内

(14)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性、口頭、第 13 回血液学若手研究者勉強会、2017/7/1、国内

(15)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性と分化機構の研究、口頭、第 27 回日本樹状細胞研究会、2017/6/30、国内

(16)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性と臨床への応用の第一歩、口頭、肝疾患研究部セミナー、2017/5/19、国内

(17) Takashi Satoh、Functional diversity of disorder-specific macrophage subtype、口頭、CVMW 2016、2016/12/16、国内

(18) Takashi Satoh、Functional diversity of various disorder-specific macrophage subtype、口頭、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016/12/5、国内

〔図書〕(計 5 件)

(1)佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性~線維症型マクロファージ SatM~、分子呼吸器病 vol.22 No. 1 P.22-24、先端医学社、2018/3/1

(2) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージ、CLINICAL CALCIUM vol. 27 No. 6 P75(845)-80(850)、医薬ジャーナル社、2017/6/28

(3) 佐藤 荘、疾患特異的マクロファージの機能的多様性と分化メカニズム、実験医学 V o l . 3 5 N o . 9 P 1476-1479、羊土社、2017/6/1

(4) 佐藤 荘、慢性炎症性疾患の新たな展開・慢性炎症疾患と疾患特異的マクロファージサブタイプの機能多様性、最新医学 V o

l . 71 11 月増刊号 P.2183-2189、最新医学社、2016/11/25

(5) 佐藤 荘、マクロファージのすべて・M2 マクロファージの機能的多様性~疾患特異性とマクロファージサブタイプとの関連~、医学のあゆみ vol.259 No. 5 P359-364、医薬出版、2016/10/29

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

(1) 高校生のための Winter School2017@微研、2017 年 12 月 25 日、あたらしいマクロファージのせかい -RPG を現実で進める 3 の方法- (佐藤 荘)

(2) サイエンスカフェ・オンザエッジ、2017 年 4 月 30 日、病気ごとに異なる、新種マクロファージの発見 (佐藤 荘)

ホームページ等

<http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 荘 (SATO, Takashi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号: 60619716

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し