

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15716

研究課題名（和文）マクロファージの獲得免疫制御におけるケモカイン受容体会合分子FROUNTの役割

研究課題名（英文）Immune regulation by chemokine-receptor associating molecule FROUNT

研究代表者

遠田 悦子 (Etsuko, Toda)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00589327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内分子FROUNT（フロント）は、マクロファージの炎症局所への遊走を引き起こすケモカイン受容体CCR2とCCR5に結合し、細胞遊走を促進する分子である。これまでにFROUNTがマクロファージの遊走・集積の制御を介して炎症性疾患の病態に重要な役割を果たすことを明らかにしてきたが、FROUNTの獲得免疫応答制御における役割は不明であった。本研究では、疾患モデルを想定した各種刺激に対するマクロファージの刺激応答性に対するFROUNT欠損の影響を解析し、FROUNTが獲得免疫応答の制御に関わるサイトカインの刺激依存的な発現誘導においても重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージは炎症の引き金となって感染防御に働いたり、組織修復を促進するなど多様な働きで生体防御・維持に寄与する一方、炎症による組織傷害や、がん増生を助長するなど病態の悪化に働いてしまうことがある。そのため、マクロファージの機能を制御することによりがんや炎症性疾患を治療する試みが注目されている。本研究はマクロファージの動きを制御するケモカイン受容体会合分子FROUNTに着目して、マクロファージによる獲得免疫応答制御機構におけるFROUNTの新たな機能を明らかにし、マクロファージの動きと免疫応答の双方を制御可能な効果的ながん・炎症性疾患治療法につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The intracellular molecule FROUNT binds to the chemokine receptors CCR2 and CCR5, triggering macrophage migration to inflammatory sites. FROUNT has been shown to play an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases through the regulation of macrophage migration and accumulation. However, the role of FROUNT in the regulation of adaptive immune responses is unknown. In this study, we analyzed the effect of FROUNT-deficiency on the responsiveness of macrophages to various stimuli. We found that FROUNT deficiency did not affect macrophage differentiation. However, FROUNT deficiency altered the cytokine production patterns of macrophages to various stimuli, suggesting its relevance to the regulation of adaptive immune responses.

研究分野：免疫細胞生物学

キーワード：ケモカイン受容体 サイトカイン マクロファージ FROUNT

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージは自然免疫の担当細胞として、感染や組織の傷害を感知していち早く感染・傷害部位に集積し、サイトカインの産生、リンパ球への抗原提示、増殖因子、血管新生因子等の産生を介して宿主の炎症・免疫応答において多大な影響力をもつ細胞である。マクロファージは組織環境の様々な刺激に応答して異なる性質に分極化し、IFN- $\gamma$ やLPSなどの刺激によって誘導されるM1マクロファージ、IL-4、IL-10、TGF- $\beta$ などの刺激によって誘導されるM2マクロファージに大別される。M1マクロファージは炎症応答を惹起して感染に対する防御に働くが、関節リウマチなどの自己免疫疾患においては、IL-6、IL-12、TNF等の炎症性サイトカインを産生して疾患の増悪に関与する。M2マクロファージはIL-10、TGF- $\beta$ 、PDGF等を産生して抗炎症、組織修復に働く一方、がん微小環境においては、IL-10などの免疫抑制性サイトカインによる免疫抑制作用、増殖因子によるがん細胞の増殖促進、VEGFやMMP等を介した血管新生促進により、がん促進性に働く。このようにマクロファージの多様な性質は、生体防御・維持に寄与する一方で疾患増悪の原因ともなり、マクロファージの機能制御が治療標的として注目されている。

マクロファージの炎症局所への集積には遊走因子ケモカインとその受容体であるケモカイン受容体が必須な役割を担う。マクロファージの前駆細胞である末梢血単球は炎症・傷害組織から産生されるケモカインなどの遊走因子に応答して組織に遊走し、マクロファージに分化する。我々のグループで見出した細胞内分子 FROUNT (フロント) は、単球・マクロファージに発現するケモカイン受容体 CCR2 と CCR5 に結合し、細胞遊走を促進する分子である。( *Nature Immunol.* 2005:827, *J. Immunol.* 2009:6387, *Biochem. J* 2014: 313, *FEBS J.* 2014:5552 )。我々のグループが作出した欠損マウスを用いた病態モデル解析より、がん・炎症性疾患において FROUNT 欠損により劇的な改善がみられること、FROUNT の発現量が疾患の増悪化に密接に関わることを明らかにした ( *Nature Communications* 2020:609 )。一方で、マクロファージの遊走制御だけでは説明のつかない予想外の結果として、FROUNT 欠損マウスにおいてマクロファージサブセットに変化がみられること、炎症時に誘導される T 細胞サブセットの構成に変化が生じるなど、FROUNT が獲得免疫応答の制御にも関わる可能性が示唆された。FROUNT がどのようにマクロファージの性質を制御し、獲得免疫応答を調節するかを明らかにすることで、FROUNT 欠損による炎症性疾患の劇的な改善の機序解明につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

マクロファージは周囲のサイトカイン環境や、低酸素状態など、外的要因に応じてサイトカイン産生パターンの異なる M1 型、M2 型などの異なる分極化を示し、獲得免疫応答の方向性に影響を及ぼす。炎症モデルで見出された FROUNT 欠損によるマクロファージ分極化の変化が、マクロファージの内因性の応答性の変化によるものであるかを明らかにするために、*in vitro* で FROUNT 欠損マウス骨髄由来マクロファージの各種刺激に対する応答 ( サイトカイン産生、活性化マーカーの変化 ) を解析する。さらに、マクロファージの刺激応答について、T 細胞分化誘導に関わる因子に着目し、FROUNT 欠損による変化を明らかにし、FROUNT 欠損マウスにおける炎症性 T 細胞サブセットの変化につながるマクロファージの特性を見出す。FROUNT が関与するマクロファージの機能について個体レベルでの意義を明らかにするため、マクロファージ特異的 FROUNT 欠損マウスを用いて、定常状態あるいはがん・炎症性疾患モデルにおけるマクロファージの性質の変化、およびマクロファージにおける FROUNT 欠損による病態改善効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄由来マクロファージ (BMDM) の調製

マクロファージを含むミエロイド系細胞特異的に FROUNT を欠損する LysM-Cre\_FROUNT $^{flx/flx}$  マウスの大腿骨・脛骨より骨髄細胞を採取し、ACK 溶液で溶血後、10 ng/ml M-CSF + 10%FBS-RPMI、またはマウス線維芽細胞株 L-929 の培養上清を 10% 添加した 10%FBS-RPMI 中で 37 °C、5%CO $_2$  条件で培養した。培養開始後 3 日目に同一組成の新鮮な培地と交換し、浮遊細胞は除去した。6 日目に、分化した骨髄由来マクロファージを Accutase を用いてディッシュより剥離して回収し、細胞数を計数後、アッセイ用プレートに播種した。1 日後、血清不含 0.1%BSA-RPMI に置換し、各種刺激を加えた。コントロールマクロファージとして LysM-Cre ( FROUNT $^{flx}$  部位を有しない ) マウス骨髄細胞から分化誘導したマクロファージを用いた。

### (2) BMDM の刺激前後の遺伝子発現変化の解析

分化誘導したマクロファージを 6 ウェルプレートに播種し、M1 マクロファージ誘導刺激としてリポ多糖 (LPS、O111:B4)、M2 マクロファージ誘導刺激としてリコンビナント IL-4 を加えた。5 時間後に、上清を除去し、RNA 精製キット付属の細胞溶解バッファを添加して細胞ライセートを回収した。ライセートよりトータル RNA を精製した。次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析によるトランスクリプトーム解析を実施した。さらに RNA-seq 解析データを用いて、コントロールマウス由来マクロファージとの発現比較により発現変動遺伝子を抽出し、KEGG および

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて、T細胞分化・活性化・遊走に関わる経路における遺伝子の変動を解析した。

### (3) ミエロイド系細胞特異的 FROUNT 欠損マウスを用いた病態モデル解析

ミエロイド系細胞特異的 FROUNT 欠損マウス (LysM-Cre\_FROUNTflox/flox) を用いて、マクロファージにおける FROUNT 欠損の病態への影響を解析するため、担癌モデルにおける腫瘍増生、関節炎モデルにおける関節炎の発症・進行をコントロールマウスと比較した。担癌モデルでは、マウス肺がん細胞株あるいはメラノーマ細胞株を皮下に移植し、腫瘍径を週 2 回測定して腫瘍増生の経時変化を測定した。コラーゲン誘導関節炎モデル (CIA) はニワトリ II 型コラーゲンを 3 週間の間隔を空けて 2 回、アジュバントとともに尾部に皮下免疫することで発症させた。炎症組織に浸潤するマクロファージにおける M1・M2 マクロファージマーカーの発現をフローサイトメトリーにより解析した。

## 4. 研究成果

### (1) FROUNT 欠損マクロファージの分化誘導

ミエロイド系細胞特異的 FROUNT 欠損マウスおよびコントロールマウスより調製した骨髄細胞を M-CSF 添加培地、あるいはマウス線維芽細胞株 L-929 培養上清の添加培地で 7 日間培養し、マクロファージへの分化誘導を行った結果、いずれの条件においても、FROUNT 欠損マウス由来骨髄細胞はコントロール由来骨髄細胞と同様にマクロファージ様細胞に分化することが判明した。分化誘導したマクロファージ様細胞の F4/80、CD68 の発現は FROUNT 欠損マウス由来とコントロール由来で同程度であった。

### (2) FROUNT 欠損マクロファージの刺激応答性の解析

FROUNT 欠損マクロファージとコントロールマクロファージに LPS または IL-4 を添加し、5 時間後に回収した細胞溶解液よりトータル RNA を精製し、RNA-seq 解析を実施した。FROUNT 欠損マクロファージでコントロールに対して発現が変動する遺伝子を Fold change  $\geq$  |2| かつ  $P$ -value  $<$  0.05 のクライテリアで抽出した。その結果、LPS 刺激、IL-4 刺激でそれぞれ 2,819 遺伝子、2,134 遺伝子を検出した。コントロールマクロファージにおいて、M1 マクロファージを誘導する LPS 刺激条件において、無刺激に対して NOS2、CD86 等の M1 マクロファージマーカーの発現が誘導されていることを確認した。IL-4 刺激に対しては、M2 マクロファージマーカーである Arg1、Ym1、CD206 (MRC1) の発現が誘導されていることを確認した。F4/80、CD68 等のマクロファージマーカーの発現は刺激による変動は認められなかった。それぞれの刺激条件において、FROUNT 欠損マクロファージにおいても、M1、M2 マクロファージの誘導刺激に対する各分極化マーカーの発現誘導が認められた。一方、CD86 等の M1 マクロファージマーカーの発現低下を認めた。M2 マクロファージマーカーの発現は、変動しないものと、変動するものが存在することが判明した。がんモデルで発現低下を認めた CD206 の発現は、LPS 刺激、IL-4 刺激においては FROUNT 欠損による低下は認められなかった。なお、刺激に用いた LPS、IL-4 のそれぞれの受容体 TLR4、IL-4R (CD124) の発現量は、FROUNT 欠損による変化は認められなかった。発現変動遺伝子のパスウェイ解析の結果、Th17 細胞の誘導・維持に関与するサイトカインとして、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-23 の低下、Th1 誘導に必要な IL-12 の発現低下が LPS 刺激条件において認められた。これらの結果から、FROUNT はマクロファージにおける T 細胞サブセット誘導に必要なサイトカイン、特に Th17 の誘導・維持に必要な因子の発現に関与することが判明した。

### (3) マクロファージにおける FROUNT 欠損の個体レベルにおける影響

ミエロイド系細胞特異的 FROUNT 欠損マウスおよびコントロールマウスにマウス肺がん細胞株またはメラノーマ細胞株を移植して、腫瘍増生と、腫瘍浸潤細胞のフローサイトメトリー解析を実施した。その結果、ミエロイド系細胞における FROUNT 欠損により、がん増生が有意に低下するとともに、CIA においては、関節炎の発症と進行が抑制されていた。炎症組織に浸潤するマクロファージのフローサイトメトリー解析の結果、マクロファージにおける CD86、MHC class II、CD206 の発現が低下していた。In vitro の培養マクロファージの遺伝子発現変化と一部異なる点については、in vivo の結果はマクロファージの遊走活性と組織における分化、活性化の結果を複合的に捉えているためであると考えられた。

以上より、FROUNT 欠損マウスの骨髄細胞においてもマクロファージへの分化能は保持されるが、FROUNT 欠損マクロファージでは、刺激に対する応答性が変化しており、T 細胞の分化に関わるサイトカインの刺激依存的な発現誘導においても重要な役割を果たすことが明らかとなった。研究代表者らはこれまでに、ケモカイン受容体細胞内会合分子 FROUNT がマクロファージの遊走・集積の制御を介して炎症性疾患の病態に重要な役割を果たすことを明らかにし、阻害剤を用いた研究で、FROUNT を標的とした炎症性疾患治療の可能性を見出してきた。本研究により、ケモカイン受容体シグナル制御分子がマクロファージの活性化を制御するという、新しい知見を得た。今後は、サイトカイン発現制御における FROUNT の関与について詳細を明らかにしていきたい。マクロファージは生体防御や組織修復に働く一方で、炎症による組織傷害や、がん増生の促進など病態の悪化にも働くという多面性から、マクロファージの機能を制御することによりがんや炎症性疾患を治療する試みが注目されている。FROUNT は、そのような疾患増悪に働くマクロファージの制御標的として期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 遠田悦子、寺島裕也	4. 巻 47
2. 論文標題 マクロファージの動きを制御するFROUNTによるがん免疫応答の修飾作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 52-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 遠田悦子、寺島裕也	4. 巻 53
2. 論文標題 アルコール依存症治療薬ジスルフィラムによるがん抑制効果の分子標的	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuya Terashima, Etsuko Toda, Kouji Matsushima et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Targeting FROUNT with disulfiram suppresses macrophage accumulation and its tumor-promoting properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14338-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kouji Matsushima
2. 発表標題 A cell migration-promoting molecule FROUNT regulates macrophage activation
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠田 悦子、寺島 裕也、清水 章、松島 綱治
2. 発表標題 ケモカイン受容体会合分子FROUNTのがん進展への関与と治療応用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kouji Matsushima
2. 発表標題 A chemokine signal amplifier FROUNT regulates tumor cell-mediated macrophage activation and migration to tumor sites
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠田悦子、寺島裕也、松島綱治
2. 発表標題 ケモカイン受容体シグナル促進分子FROUNT（フロント）の関節リウマチ病態への関与
3. 学会等名 第18回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kaori Esaki, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa and Kouji Matsushima
2. 発表標題 A molecular approach to block interaction between chemokine receptor and cytosolic regulator FROUNT for the control of monocyte/macrophage migration
3. 学会等名 KeystoneSymposia-Uncovering Mechanisms of Immune-Based Therapy in Cancer and Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kouji Matsushima
2. 発表標題 Blocking tumor-promoting macrophages by interrupting the interaction of chemokine receptors and a cytoplasmic regulatory protein FROUNT
3. 学会等名 第45回内藤カンファレンス (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Etsuko Toda, Kouji Matsushima
2. 発表標題 A chemokine signal amplifier FROUNT promotes tumor progression by facilitating migration and activation of tumor-associated macrophages
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Etsuko Toda, Yuya Terashima and Kouji Matsushima
2. 発表標題 A therapeutic target site in chemokine receptors which is essential for binding with a cytoplasmic regulator FROUNT for regulating leukocyte chemotaxis
3. 学会等名 Keystone symposia-Lymphocytes and their Roles in Cancer (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Etsuko Toda, Yuya Terashima, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa and Kouji Matsushima
2. 発表標題 A pivotal region for FROUNT-mediated chemotactic signaling that is shared by inflammatory chemokine receptors CCR2 and CCR5
3. 学会等名 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠田悦子、寺島裕也、松島綱治
2. 発表標題 ケモカイン受容体会合分子FROUNTの担癌状態における発現量変化とマクロファージ動態に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第26回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 遠田悦子、寺島裕也、板倉明司、奥村和弘、永瀬浩喜、松島綱治
2. 発表標題 単球・マクロファージの遊走促進分子FROUNTを標的としたがん微小環境制御
3. 学会等名 第21回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 遠田悦子、寺島裕也、松島綱治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 267
3. 書名 がん免疫療法の個別化を支える新・腫瘍免疫学 (I-1-10 がん免疫応答に関わるサイトカイン・ケモカイン)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本医科大学 解析人体病理学教室ホームページ  <a href="https://pathology-nms.org/">https://pathology-nms.org/</a>          東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門ホームページ  <a href="https://k-matsushimalab.org/">https://k-matsushimalab.org/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------