

令和 5 年 3 月 1 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06406

研究課題名(和文)常在マクロファージのM1・M2分極化，器官定着機構とホーミング能に関する研究

研究課題名(英文) Properties of steroidogenesis, M1/M2 polarization, and adhesion to niche-forming cells in tissue-resident macrophages

研究代表者

小川 和重 (Ogawa, Kazushige)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：60231221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：精巣間質マクロファージ(M₁)の培養増殖と肺間質M₁および肝常在M₁の継代培養増殖に成功した。精巣間質M₁がアンドロゲン受容体を発現しプロゲステロン(P4)産生能を有すること，またP4合成量はcAMPにより有意に増大し，M1分極誘導時に有意に減少することを明らかにした。M1分極誘導時に肺間質M₁にiNOS(M1分極マーカー)発現が誘導されるが，arginase 1(M2分極マーカー)発現レベルは定常時と同等で，動員M₁にはない特性を明らかにした。肝常在M₁におけるEphA/ephrin-AとEphB/ephrin-Bシグナルは類洞内皮細胞の模擬膜表面への接着増強に働く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

精巣間質マクロファージ(M₁)のプロゲステロン(P4)産生は世界初の知見である。ライディッヒ細胞のテストステロン産生・分泌において精巣間質M₁のP4を介した局所的な制御機構の存在が示唆されるため，精巣間質M₁のP4産生制御は不妊治療のシーズになる。肺間質M₁は分化途中の肺胞M₁と考えられてきたため，研究は進んでいない。開発した方法では大量の肺間質M₁が得られるため，今後の研究への活用が期待できる。肝常在M₁の定着機構は不明であったが，EphA/ephrin-A，EphB/ephrin-Bシグナルを介する肝常在M₁接着増強を見出した研究結果から，定着機構の一端が解明されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Testicular interstitial macrophages, lung interstitial macrophages, and liver tissue-resident macrophages were successfully propagated by mixed culturing with the respective organ-specific stromal cells. It was newly found that (i) testicular interstitial macrophages expressed the androgen receptor and produced progesterone whose production was significantly upregulated by cAMP and an adrenergic agonist, and downregulated by M1 polarization inducers; (ii) lung interstitial macrophages treated with the M1 polarization inducers induced to express iNOS (a typical marker of the M1 phenotype) and stably expressed arginase 1 (a typical marker of the M2 phenotype), which was constantly expressed at the steady-state, although recruited macrophages do not highly express both molecules at the same time; (iii) EphA/ephrin-A and EphB/ephrin-B molecular system induced to promote the adhesion of liver tissue-resident macrophages to the mimic surface of sinusoidal endothelial cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：組織在住マクロファージ 精巣間質マクロファージ 肺間質マクロファージ クッパー細胞 ニッチ
プロゲステロン Eph ephrin

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ (M ϕ) は動員 M ϕ と常在 (組織在住) M ϕ に分類できる。動員 M ϕ は血中の単球が炎症部位に浸潤・分化した細胞で、自然免疫や組織修復などに働く。常在 M ϕ は組織・器官の形成・維持や自然免疫を担う。最近の研究で、常在 M ϕ の多くは胎生 M ϕ (胎生期に前駆細胞が各器官に浸潤・生存適所 (ニッチ) に定着し分化した M ϕ) に由来し、自己増殖することが明らかにされた (Sieweke & Allen, *Science*, 2013 など)。病態解明の一環として、M ϕ の分極化を *ex vivo* で解析する研究が活発化しているが (Murray et al, *Immunity*, 2014 など)、通常、両 M ϕ を識別せず一括して解析しているため、常在 M ϕ の M1/M2 分極動態は分かっていない。

単球を動員 M ϕ に分化させる方法は確立しているため、動員 M ϕ に関する *in vitro* の研究は進んでいる。一方、常在 M ϕ も主要な器官からの分離法が報告され、*ex vivo* 解析が行われている。「常在 M ϕ の自己増殖性」が判明して以降、ミクログリアとクッパー細胞の改良培養法が報告されているが (Roy, *Brain Res*, 2018; Zeng et al, *PLOS One*, 2013 など)、常在 M ϕ の継代培養法は見当たらず、大量の常在 M ϕ の実験利用は困難なため研究は進んでいない。肺胞 M ϕ と肺間質 M ϕ は肺の常在 M ϕ であるが、両 M ϕ を区別せず解析している研究が多く、同一器官内の異なる常在 M ϕ 間に相互移行があるか分かっていない。

M ϕ の移植治療の研究は始まりつつある。肺蛋白症モデルマウス (肺胞 M ϕ の機能不全に起因) に動員 M ϕ を移植し病態・症状の改善を示した報告 (Suzuki et al, *Nature*, 2014) などが散見される。また、M2 型 M ϕ による M1 型 M ϕ のアポトーシス誘導を明示した報告から (Wan et al, *Hepatology*, 2014)、難治性の慢性炎症性疾患の治療手段として M2 型 M ϕ の移植が検討対象になりうる。この状況から、常在 M ϕ の器官特性、ニッチの特性、定着機構、M1/M2 型分極化特性は M ϕ が関与する各種疾患の病態解析の基盤になるため、これらを解明することは喫緊の課題と考えられる。

2. 研究の目的

精巣、肺、肝臓の常在 M ϕ の特性を調べることが第一の目的で、常在 M ϕ の移植が治療手段になるか可能性も探る。代表者は汎用性の高い常在 M ϕ の継代培養増殖法を開発した (特開 2019-17291)。この方法は「M ϕ ニッチとなる細胞の増殖に伴う常在 M ϕ の増殖法」で、常在 M ϕ の器官特性はニッチ形成細胞との混合培養により維持できると考えられるため、器官特性維持の検証も研究目的になる。精巣常在 M ϕ においては、性ステロイド合成の観点から性状を調べる。動員 M ϕ では *in vitro* で分極化させる方法のガイドラインが示され (Murray et al, *Immunity*, 2014)、各種疾患の病態解析の一環として M1・M2 分極化動態を調べる研究が行われているが、常在 M ϕ の *in vitro* 解析は始まって間もない状況にある。肺常在 M ϕ を材料に、M1・M2 分極化の性状を調べる。クッパー細胞は類洞内に局在・定着しているが、その定着機構は十分に解明されていない。代表研究者は単球 / M ϕ に発現する Eph/ephrin が接着制御することを明らかにしている。肝常在 M ϕ では、Eph/ephrin の類洞内皮細胞への接着制御を中心に調べることを目的にした。目的の 1 つである常在 M ϕ のホーミング能に関する研究は、コロナ禍の影響を受け研究を十分に進めることが出来なかった。

3. 研究の方法

(1) 常在 M ϕ の増殖と分離

成体の雄マウスを使用した。白膜除去した精巣、細切した肺および肝臓の細胞を 0.5mg/mL のコラゲナーゼで分散させ、精巣の間質細胞、肺の細胞、肝臓の細胞を 10% FBS 含有 DMEM で培養した。1 匹当たり精巣で 1 枚、肺で 3 枚、肝臓で 5~6 枚の組織培養用ディッシュ (T ディッシュ; 10 cm ϕ) に播種し、10~14 日間培養した。肺、肝臓では 1:3 の希釈率で継代培養し、継代数 1~数代の細胞を使用した。増殖した混合細胞を細菌用ペトリディッシュ (P ディッシュ) に播種し、選択的に接着する M ϕ を分離した。肺胞 M ϕ は気道洗浄液の細胞から P ディッシュへの接着細胞として分離した。

M ϕ と共に増殖した細胞をニッチ形成細胞と見なし、0.1% トリプシン数分処理で T ディッシュから容易に剥離する細胞、または、クロドロン酸内包リボソームを添加し M ϕ を選択的に死滅させた後の細胞を回収し実験に使用した。類洞内皮細胞は遠心法により分離した肝非実質細胞から接着性の違いを利用して M ϕ を除去した後、微小血管内皮細胞用培養液 (EBM-2MV, Lonza) で増殖する細胞として回収し、実験に使用した。

(2) Flow cytometry による発現解析

増殖させた M ϕ を材料に、CD11b, CD11c, CD64, CD68, CD86, CD115, CD116, CD169, CD184, CD206, F4/80, Ly6C, Merck MHC II, Siglec-F 発現を検討した。肝常在 M ϕ のインテグリン発現、類洞内皮細胞のインテグリンリガンド発現を調べた。

(3) RT-PCR, qPCR による発現解析

精巣 M ϕ における、ステロイドホルモン合成関連分子、性ステロイド受容体と転写因子 15 種類

(常在 M ϕ の特異性を賦与), 肺常在 M ϕ における転写因子 15 種類と *Tgfb1*, *Tgfb2*, 肝常在 M ϕ における Eph と ephrin, インテグリン α 鎖と β 鎖, ケモカイン受容体の発現を調べた。精巣, 肺と肝臓のニッチ形成細胞における M ϕ 増殖因子, 精巣ニッチ形成細胞における性ステロイド受容体, 肝臓ニッチ形成細胞における Eph と ephrin, インテグリンリガンドとケモカインの発現を調べた。

(4) M ϕ のプロゲステロン合成

精巣 M ϕ の培養液に含まれるプロゲステロン (P4) 濃度を ELISA で測定した。対照として, 肝臓 M ϕ , 脾臓 M ϕ と肺 M ϕ の培養上清を使用した。cAMP (50 μ M), Isoproterenol (1 μ M), M1 分極誘導剤 (20ng/mL LPS+50ng/mL IFN γ) 添加後の P4 濃度を検討した。

(5) M ϕ におけるギャップ結合の局在

免疫蛍光染色により CD206 と F4/80 (M ϕ マーカー), HSD3B (ライディッヒ細胞マーカー) を用いて, 精巣におけるギャップ結合分子 Cx43 の局在を検討した。

(6) M ϕ における M1・M2 分極特性

培養液に M1 分極誘導剤 (20ng/mL LPS+ 50ng/mL IFN γ), M2 分極誘導剤 (20ng/mL IL4) を添加 4 時間と 24 時間後の肺間質 M ϕ を材料に iNOS (M1 マーカー) と arginase 1 (M2 マーカー) 発現を Flow cytometry で検討した。

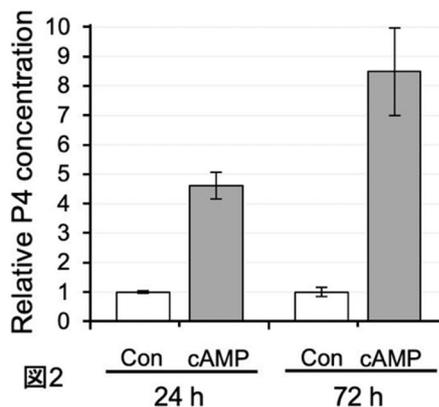
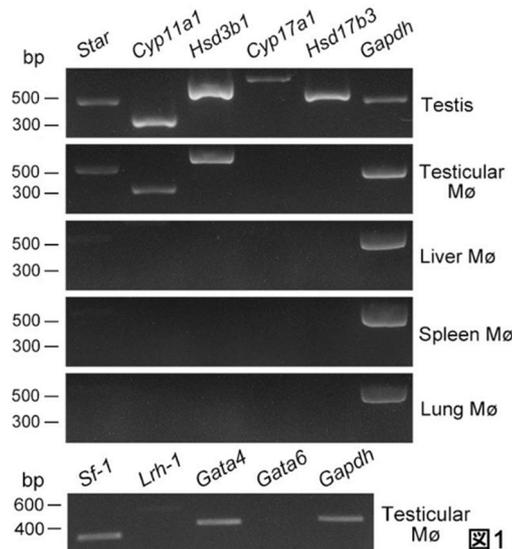
(7) M ϕ の Eph/ephrin シグナルと接着

Stripe cell adhesion assay により Eph/ephrin が接着に及ぼす影響を検討した。ephrin-A1-Fc, EphA2-Fc, ephrin-B1-Fc または EphB4-Fc をストライプ状に吸着させた後に ICAM1 を全面に吸着させたカバーガラスを作製し, その上に肝 M ϕ を播種して, Eph, ephrin の活性化が接着性に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 精巣間質 M ϕ のプロゲステロン産生

精巣間質の細胞を混合培養することで精巣 M ϕ の増殖に成功した。増殖させた精巣 M ϕ は CD11b, CD68, CD115, CD169, CD206, F4/80, Merck 陽性 / CD116, MHC II 陰性であることを Flow cytometry で明らかにした。精巣には peritubular M ϕ と間質 M ϕ が常在するが, peritubular M ϕ は CD11b, F4/80, MHC II 陽性 / CD115, CD206 陰性, 間質 M ϕ は CD11b, CD115, CD206, F4/80, Merck 陽性 / MHC II 陰性と報告されている。従って, M ϕ マーカー発現は精巣間質 M ϕ の性状に完全に一致した。増殖させた精巣 M ϕ はステロイドホルモン合成関連分子 *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Sf-1*, *Gata4* を発現し (図 1), プロゲステロン (P4) が培養上清に含まれていたことから, 精巣間質 M ϕ の P4 産生が明らかになった。同様な方法で増殖させた肺, 肝臓, 脾臓の常在 M ϕ の培養上清には P4 は認められなかったため, P4 産生は精巣間質 M ϕ の特性であることが実証された。これまでに, 免疫細胞のステロイド代謝能は報告されているが, ステロイド新生の報告は認められない。また, 精巣間質 M ϕ の P4 合成量は cAMP と β 作動薬により有意に増大し (図 2), M1 分極化誘導剤で有意に減少すること, qPCR により cAMP は *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Sf-1*, *Gata4* 発現を有意に上昇させることも明らかになった。免疫染色により精巣間質 M ϕ とライディッヒ細胞はギャップ結合を形成していること, RT-PCR により精巣間質 M ϕ にはアンドロゲン受容体 (*Ar*) を発



現していることも明示した。分化状態を維持してライディッヒ細胞を培養することは困難で, CYP17A と HSD17B 発現が消失してテストステロン (T) 産生能が失われ, P4 を産生する細胞へと脱分化することが報告されている。精巣間質 M ϕ と共に増殖した精巣間質細胞は *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Sf-1*, *Lrh-1*, *Gata4* および *Ar*, *Pgr* を発現していたが *Lhcgr* の発現は認められなかった。従って, この細胞は脱分化したライディッヒ細胞の可能性が高いと考えられた。また, M ϕ 増殖因子 *Csfl*, *Il34* を発現していたことから M ϕ ニッチの性状を有することも判明した。P4 はライデ

イチヒ細胞の T 産生を抑制することが報告されている。この報告と本研究結果から、ライディッヒ細胞の T 産生は視床下部-下垂体軸による制御機構に加え、精巣間質 M ϕ から産生される P4 を介した局所的な制御機構の存在が示唆された (図 3)。ライディッヒ細胞が産生する T は精子形成に不可欠なため、精巣間質 M ϕ の P4 産生制御は不妊治療のシーズになると考えられる。

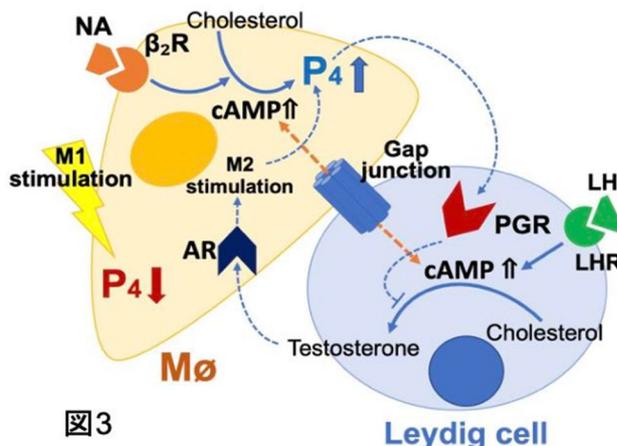


図3

(2) 肺間質 M ϕ ニッチの M1/M2 分極特性

BALB/c および C57BL/6 マウスの肺細胞を混合培養することで肺常在 M ϕ の増殖に成功した。増殖させた両マウスの肺 M ϕ は CD11b, CD64, CD206 強陽性 / CD11c, CD68, CD86, CD115, CD169, CD184, F4/80, Merck 陽性 / Ly6C, MHC II, Siglec-F 陰性で、CD11c, CD68, CD169 の発現パターンと F4/80, CD206 の発現レベルは両マウス間に差異が認められることを Flow cytometry で明らかにした。肺には肺胞 M ϕ と 2 種類の肺間質 M ϕ が常在する。肺胞 M ϕ は CD11b 陰性 / Siglec-F 強陽性であること、肺胞中隔に局在する肺間質 M ϕ は CD206 陰性 / MHC II 陽性で自己増殖性を示さず、気管支周囲に局在する肺間質 M ϕ は CD206 陽性 / MHC II 陰性で自己増殖性を有することが報告されている。従って、増殖させた肺 M ϕ は気管支周囲に局在する肺間質 M ϕ の性状と一致した。

肺細胞の混合培養により肺間質 M ϕ と共に線維芽様細胞が増殖した。この肺線維芽様細胞は、M ϕ の性状を付与する因子 *Tgfb1* と M ϕ 増殖因子 *Csf1*, *Il34* を発現し、M ϕ ニッチの性状を有していた (図 4)。増殖させた肺間質 M ϕ と肺胞 M ϕ (気道洗浄液から回収) における常在 M ϕ の特異性を賦与する代表的な転写因子 15 種類の発現パターンを RT-PCR で比較した。*Smad3* と *Spic* は肺間質 M ϕ のみ、*Pparg* は肺胞 M ϕ のみに発現していたが、7 分子は両 M ϕ に発現していた。また、両 M ϕ とも *Tgfb1* と *Tgfb2* を発現していた (図 4)。TGFB-TGFBR の自己分泌機構と PPAR γ は肺胞 M ϕ の特性に関与することが報告されているため、肺間質 M ϕ に PPAR γ 発現を誘導させれば、肺胞 M ϕ の代替として使用できる可能性があると考えられた。

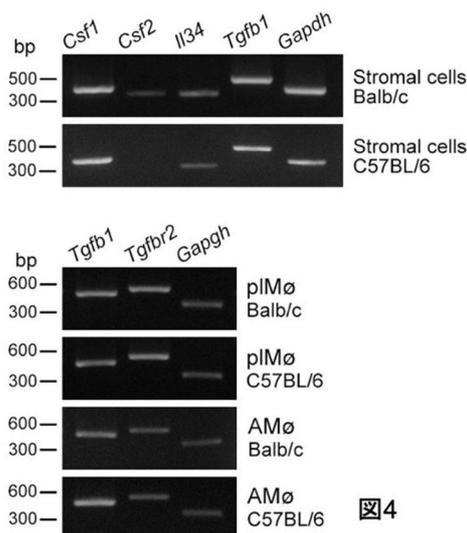


図4

動員 M ϕ において BALB/c は M2 型、C57BL/6 は M1 型分極が強く現れる系統と報告されている。肺間質 M ϕ における M1 型・M2 型分極特性を BALB/c と C57BL/6 マウス間で比較した。両マウスの肺間質 M ϕ ともに非常に高いレベルで arginase 1 (M2 マーカー) を発現し、M1 および M2 分極誘導時にも発現レベルに差がないこと、対照群に iNOS (M1 マーカー) 発現は認められず、M1 分極誘導時に BALB/c より C57BL/6 の方が短時間で強い iNOS 発現誘導が起こること、従って、M1 分極誘導時には arginase 1 と iNOS を同時に発現する特性が認められ、常在 M ϕ である肺間質 M ϕ は動員 M ϕ とは異なる性質を示すことが明らかになった (図 5)。

長い間、肺間質 M ϕ は分化途中の肺胞 M ϕ と考えられてきたため、研究は進んでいない。開発した方法では大量の肺間質 M ϕ が得られるため、今後の研究への活用が期待できる。

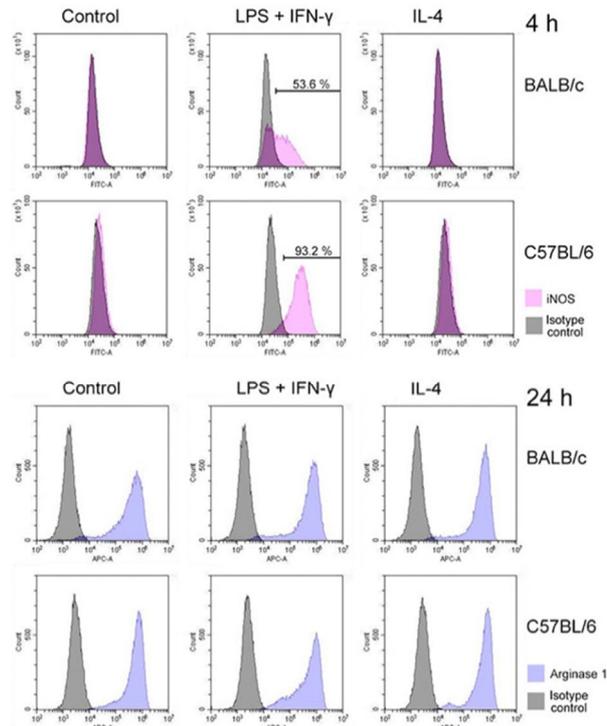


図5

(3) 肝常在 M ϕ の定着機構と Eph/ephrin

C57BL/6 マウス肝臓から分散させた細胞を混合培養すると肝常在 M ϕ (クッパー細胞) と線維芽様細胞が増殖して共培養状態となり、継代培養も可能であった。増殖した肝常在 M ϕ は数種類の EphA, ephrin-A, EphB と ephrin-B, 数種類のインテグリン α 鎖と β 鎖, 数種類のケモカイン受容体を発現していること, 類洞内皮細胞は 1 種類から数種類の EphA, ephrin-A, EphB と ephrin-B, インテグリンリガンド, ケモカインを発現していることを RT-PCR で明らかにした。類洞内皮細胞に肝常在 M ϕ が接触すれば EphA/ephrin-A と EphB/ephrin-B シグナルが発生し, ケモカイン/ケモカイン受容体シグナルによりインテグリンが活性化されインテグリン/インテグリンリガンドで接着すると考えられた。増殖した肝線維芽様細胞は, ケモカインを発現していること, また, 類洞内皮細胞および肝線維芽様細胞は M ϕ 増殖因子 *Csf1* と *Il34*, 増殖した肝常在 M ϕ はその受容体 *Csf1r* を発現しており, 両細胞は M ϕ ニッチの性状を有していることも判明した。Flow cytometry によりインテグリン α 鎖と β 鎖とインテグリンリガンドのタンパク質発現も確認した。

Stripe cell adhesion assay により肝常在 M ϕ における EphA, ephrin-A, EphB, ephrin-B シグナルは ICAM1 吸着基質への接着を有意に増強させることが判明した (図 6, 7)。肝常在 M ϕ の類洞内皮細胞上への定着機構の一端が解明できたと考えられ, EphA/ephrin-A, EphB/ephrin-B シグナル制御により肝常在 M ϕ の定着性を制御できる可能性が示唆された。

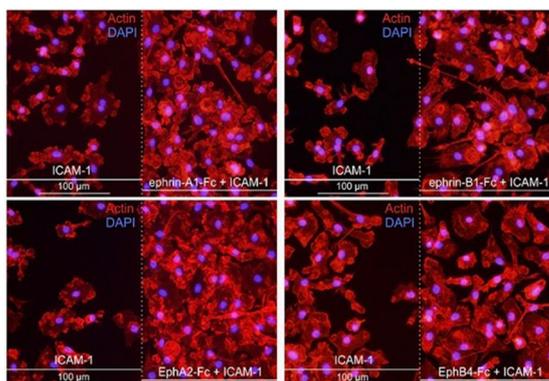


図6

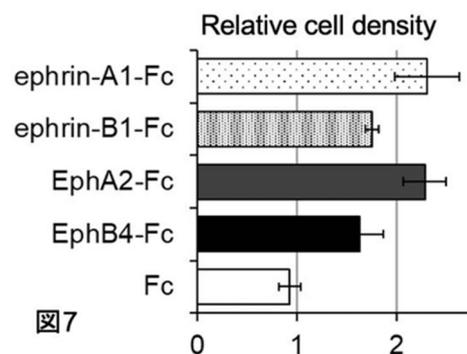


図7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamauchi, S., Yamamoto, K., Ogawa, K.	4. 巻 10 (2)
2. 論文標題 Testicular macrophages produce progesterone de novo promoted by cAMP and inhibited by M1 polarization inducers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10020487	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 -
1. 著者名 Tsurutani, M., Horie, H., Ogawa, K.	4. 巻 9 (9)
2. 論文標題 Cell properties of lung tissue-resident macrophages propagated by co-culture with lung fibroblastic cells from C57BL/6 and BALB/c mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9091241	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 -
1. 著者名 Ogawa, K., Tsurutani, M., Hashimoto, A., Soeda, M.	4. 巻 20 (1)
2. 論文標題 Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Immunology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12865-019-0314-z	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 -
1. 著者名 Kohara, S., Ogawa, K.	4. 巻 10 (12)
2. 論文標題 Eph/ephrin promotes the adhesion of liver tissue-resident macrophages to a mimicked surface of liver sinusoidal endothelial cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10123234	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川和重, 山内佐和子
2. 発表標題 精巢組織在住マクロファージのプロゲステロン産生とその制御機構
3. 学会等名 第127日本解剖学会総会・全国学術集会（箕面市）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴谷真悠, 堀江 遼, 小川和重
2. 発表標題 肺間質マクロファージの培養・増殖法と性状解析
3. 学会等名 第127日本解剖学会総会・全国学術集会（箕面市）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上美聖, Alam Jahagir, 小川和重
2. 発表標題 卵巣常在マクロファージの初代培養と性ステロイド産生能
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（江別市）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内佐和子, 小川和重
2. 発表標題 精巣常在マクロファージのプロゲステロン産生能
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（江別市）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江 遼, 鶴谷真悠, 小川和重
2. 発表標題 肺から培養・増殖させた肺間質マクロファージの性状解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会(江別市)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古原 翔, 小川和重
2. 発表標題 クッパー細胞の接着分子, 接着制御分子Eph, ephrinの発現と器官定着性
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会(山口市)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川和重, 山本皓介
2. 発表標題 精巣マクロファージの継代培養増殖・分離とステロイドホルモン産生能について
3. 学会等名 第95回日本解剖学会近畿支部学術集会(吹田市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古原 翔, 小川和重
2. 発表標題 クッパー細胞のEph, ephrinシグナルが接着に及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本解剖学会近畿支部学術集会(吹田市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古原 翔, 山本皓介, 小川和重
2. 発表標題 クッパー細胞のEph, ephrin発現とEph/ephrinシグナルが接着に及ぼす影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会(つくば市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本皓介, 小川和重
2. 発表標題 増殖・分離した精巢常在マクロファージの性状解析とステロイドホルモン産生能
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会(つくば市)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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