

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23890095

研究課題名（和文）マクロファージの分化誘導機構ならびにその生体内における機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of tissue macrophage development and its function in vivo

研究代表者

伊勢 雅子（香山 雅子）(ISE MASAKO (KOHYAMA MASAKO))

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：40598885

研究成果の概要（和文）：組織マクロファージの一つである脾臓に存在する Red pulp マクロファージ(RPM)の分化は、ETS ファミリーに属する転写因子である Spi-C によって制御されている。RPM の分化誘導機構の詳細な解析を行うために、IRES-GFP ノックインマウス及びコンディショナルノックアウトマウスを作成した。作成した Spi-C IRES GFP マウスを用いた解析より、Spi-C の前駆細胞になりうる細胞の同定、および Spi-c の発現を誘導する因子の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：Red pulp macrophage (RPM) is a tissue macrophage which localized in spleen. Spi-C is a transcriptional factor that control RPM development. We made Spi-C IRES-GFP knock-in mouse and Spi-C conditional knockout mice. We identified cells that had a potential to differentiate into RPMs. And also, we found the factor, one of the metabolite of red blood cell, which could induce Spi-C expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：免疫

科研費の分科・細目：ライフサイエンス（共通基礎研究）

キーワード：リンパ球、自然免疫、免疫監視

1. 研究開始当初の背景

様々な組織に存在するマクロファージは細菌感染に対する最前線に位置し、細胞表面のレセプターによって細菌を認識する。ほぼ全てのマクロファージは細菌や死細胞の貪食除去を基本的な機能として持つが、その他

の機能は存在する組織により異なると考えられている。しかしその機能の詳細な分子機構の解析までには至っていない。その理由として組織からの分離が難しいこと（組織への接着能が強い）、単離した後の *in vitro* で培養法が確立されていない（*viability* が低い）と

ということがある。従来のマクロファージの研究は、骨髄細胞をサイトカイン（GM-CSF や M-CSF など）の存在下で培養することにより行われていた。この方法には成熟マクロファージを容易にかつ大量に誘導できるという利点があるが、機能的に画一的なマクロファージしか誘導できず、生体内に存在する「異なる細胞表面マーカーや異なる機能を持つ」組織特異的マクロファージの側面を全く反映していない。この問題を解決するためには *in vivo* の解析システム、つまり各々の組織マクロファージのみを特異的に欠損した動物（マウス）の利用が望ましい。またこのような動物を利用することにより組織マクロファージの分化誘導機構を明らかにできる可能性がある。申請者はこれまで行われていなかった *in vivo* における組織マクロファージの機能解析システムの構築を目指して、組織マクロファージの一つである赤脾臓に存在している RPM の分化誘導を制御している転写因子 Spi-c の同定に成功した。またその遺伝子欠損マウスをつくることにより RPM の脾臓における鉄代謝の役割を世界で初めて明らかにした (Kohyama et. al. Nature 2009)

2. 研究の目的

細菌や死細胞の貪食除去を基本的な機能とするマクロファージはほぼ全ての組織に存在する。その機能は存在する組織により異なることいわれているがその詳細な解析は進んでいない。申請者はいままでの研究により Red pulp macrophage (RPM) の分化を制御している転写因子を既に同定してきた

(Kohyama et. al, Nature 2009)。そこで、本研究では、RPM を組織マクロファージのモデル細胞として、RPM の前駆細胞の分化誘導機構の解析を行い、他の組織マクロファージの分化誘導機構の解明、およびそれらの *in vivo* での機能を解明することを目的とする。

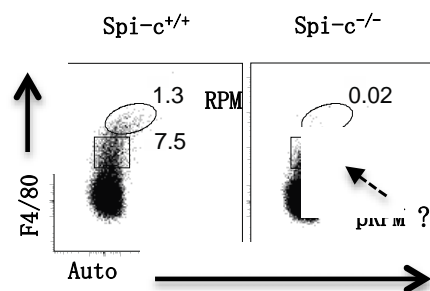


図1. Spi-c ノックアウトマウス脾臓における FACS による F4/80 発現の解析

3. 研究の方法

(1) Spi-C コンディショナルノックアウトマウスの作成

Spi-C ノックアウトマウスは胎生致死であり、メンデルアンの法則よりも低い割合でしかノックアウトマウスを得る事ができない。さらに B6 に 6 世代以上バッククロスを行うと、ノックアウトを得る事はできなくなる。RPM の生体内での役割を調べるには、同時に多数のマウスが必要となる。In vivo における RPM の役割を解析するために、コンディショナルノックアウトマウスの作成を試みる。

(2) Spi-c-IRES-eGFP マウスを用い、GFP (Spi-c) の発現を指標に Red pulp macrophage の前駆細胞をスクリーニングし、その細胞の細胞表面分子をフローサイトメトリーあるいは組織切片で検討し、マーカーとなりうる分子を同定する。さらには形態の特徴について

でも検討する。また、GFP 発現を指標に生体内のどこの組織（脾臓、骨髄、血中など）で誘導されてくるかを調べる。

(3) 同定した細胞が Red pulp macrophage の特徴を有するマクロファージに分化する能力を有するか否かを adoptive transfer の in vivo の系にて検討する。

(4) Spi-C の発現を誘導する因子の同定。
近年ヘム酸素添加酵素(HO-1)遺伝子欠損マウスにおいて、赤脾臓および肝臓のマクロファージが欠損していることが報告された(Kovtunovych G, et. al Blood 2010)。従って、ヘムの代謝産物（ビリベルジン、鉄など）が RPM の分化を誘導している可能性が考えられる。そこでこれらの因子によって Spi-C の発現が誘導されるのかを、SPI-C IRES-GFP ノックインマウスを用いて in vitro 及び in vivo にて検討を加える。

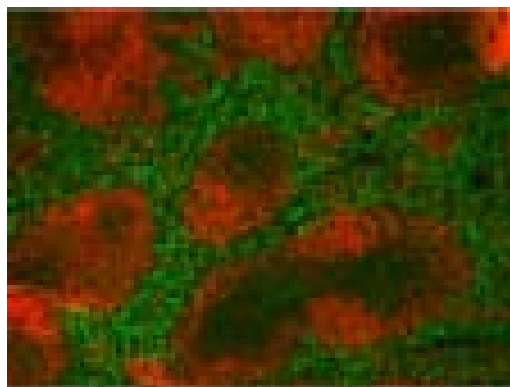


図 Spi-C IRES GFP マウスの脾臓における GFP の発現 green: GFP, red: B220

4. 研究成果

(1) 臓器あるいは細胞特異的に Spi-C の発現

を欠損させることのできるコンディショナルノックアウトマウスの作成を行った。現在様々な Flox マウスと交配できる段階にある。

(2) Red pulp macrophage よりも GFP の発現が低いに優位に GFP 発現、つまり Spi-C を発現している細胞の同定に成功した。さらに、この GFP 陽性細胞は単核球と成熟マクロファージの中間のような形体をした細胞であった。従って、Red pulp macrophage の前駆細胞の可能性があり、現在、それらの分化能の解析を in vitro および in vivo で行っている。

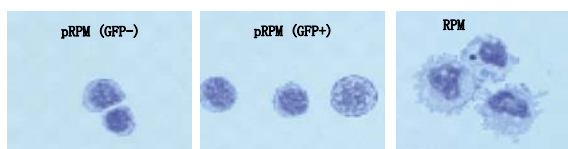


図2. RPM及びdRPM前駆細胞の形態

(3) Spi-C IRES-GFP ノックインマウスの脾臓細胞を用いた実験より、赤血球の代謝産物の一つである鉄によって Spi-C の発現が誘導されることを明らかにした。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 香山雅子、Red pulp macrophage の脾臓に存在する前駆細胞の同定、第40回日本免疫学会学術集会、2011. 11. 27、幕張メッセ (千葉県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 雅子 (香山 雅子) (ISE MASAKO
(KOHYAMA MASAKO))

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員 (常
勤)

研究者番号 : 40598885