

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590584

研究課題名(和文) 組織マクロファージの分化機構および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 role in vivo

## 研究代表者

伊勢 雅子(香山雅子)(Kohyama, Masako)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40598885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織マクロファージは機能は存在する組織により異なる。組織マクロファージの分化誘導機構の解析はほとんど行われていない。これまでに脾臓の赤脾髄に存在するマクロファージ(RPM)の分化を特異的に制御する転写因子Spi-Cを同定している。そこで、本研究では組織マクロファージの分化誘導機構の解明を目的として、組織特異的なマクロファージを誘導する組織特異的因子の同定を試みた。RPMをモデル細胞とし、HemeがSpi-cを誘導することを見出した。さらに、Hemeの分解酵素であるHmx1 (HO1) のcKO マウスを用いてマラリア感染におけるRPMの役割についても検討した。

研究成果の概要(英文)：Splenic red pulp macrophages (RPM) degrade senescent erythrocytes and recycle heme-associated iron. The transcription factor SPI-C is selectively expressed by RPM and is required for their development, but the physiologic stimulus inducing Spi-c is unknown. We found that Spi-c regulated the development of bone marrow macrophages (BMM) and that Spi-c expression was induced by heme. Spi-c expression in monocytes was constitutively inhibited by the transcriptional repressor BACH1. These findings are the first example of metabolite-driven differentiation of a tissue-resident macrophage subset and provide new insights into iron homeostasis. Hmx1 (HO-1) is the enzyme that catabolizes free heme into biliverdin, iron, and CO. To analyze the function of RPM in malaria parasite clearance, we infected HO-1 conditional KO mice that lack RPM. Through the analysis of this cKO mice, we found unexpected role of RPM in parasite clearance.

研究分野：免疫学

キーワード：組織マクロファージ 分化

### 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 (Taylor et.al, Ann. rev. Immunol. 2005)。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 *Spic* 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)。

このように分化を制御しているマスタージーンの同定には成功したが、RPM のみに分化する前駆細胞の同定、およびどの組織で、どのようなシグナルによって分化してくるのかは未だ不明である。近年、RPM のマーカーである F4/80 陽性細胞の一部は転写因子 *Foxp3* を発現し、*in vitro* において抑制活性があることが報告され (Manrique SZ, et.al J Exp Med 2011)。これは RPM には鉄代謝以外にも免疫応答において機能を持っている可能性、あるいは、さらなるサブセットに分類できる可能性を示唆するものである。マラリア原虫に感染した赤血球は RPM を含む様々な脾臓に存在するマクロファージによって捕食され、排除されると考えられている。またマラリア感染によって RPM の数が増えることも報告されており、これらはマラリア感染赤血球の代謝産物により RPM あるいはその前駆細胞が活性化されることを示唆している。さらに、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。しかしこれらの因子による RPM の活性化、または分化誘導機構への関わりについては全く調べられていない。

### 2. 研究の目的

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。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 (Taylor et.al, Ann. rev. Immunol. 2005)。しかし組織マクロファージの組織特異的機能解析や分化誘導機構の解析はほとんど行われていない。申請者はこれまでに脾臓の赤脾臓に存在するマクロファージ (Red Pulp Macrophage; RPM) の分化を特異的に制御する転写因子 *Spi-C* を同定している (Kohyama et.al, Nature 2009)。申請者が樹立した *Spi-C* 欠損マウスは RPM のみの特異的に欠損し、他のマクロファージは正常に存在することから、RPM の機能や分化を解析するのに最も適したモデルである。本研究では *Spi-C* 欠損マウスおよび *Spi-C* レポーターマウスを用いて、RPM の分化誘導機構と RPM の機能解析を行う。具体的には 1) RPM の前駆細胞の同定、2) RPM が分化してくる組織の同定および分化誘導シグナルの同定、3) *in vivo* 系を用い RPM の免疫応答における機能、役割の解析を行う。RPM を組織マクロファージのモデル細胞として、組織マクロファージの分化誘導の機構、及びそれらの *in vivo* での機能を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

RPM の前駆細胞が分化してくる組織の同定、および分化を誘導するシグナル (因子) を明らかにするために、既に申請者が作製した *Spic* 遺伝子欠損マウス、及び *Spic* 発現を直接追跡できる GFP ノックインマウスに加え、コンディショナル *Spic* 遺伝子欠損マウス (cKO) を作成する。これらのマウスを用いて、RPM のみに分化しうる能力をもつ前駆細胞 (pRPM) が誘導されてくる組織、およびシグナル (因子) の同定を試みる。*In vitro* で機能を維持したまま組織マクロファージを培養するのが現在の技術では困難なため、作成したマウスを用いた *in vivo* の解析を中心に、組織切片、FACS などで解析を進める。

#### ● 前駆細胞の機能解析

*Spic*-IRES-eGFP マウスを用い、GFP (*Spic*) の発現を指標に RPM の前駆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。また、GFP 発現および同定したマーカー

ー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。また前駆細胞をセルソーターにて分離し、in vitroにおいてはGM-CSFあるいはM-CSFとともに培養しマクロファージへの分化能を、in vivoの系としてradiationを施さないマウス(非炎症状態)への adoptive transfer の系を用いて前駆細胞の Red pulp macrophage への分化能を検討する。

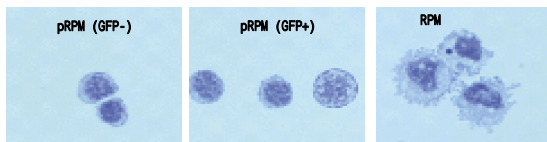


図 1. RPM 及び RPM 前駆細胞

● 鉄代謝産物の RPM 分化誘導および活性化機構との関係

RPM には古い劣化した赤血球や感染している赤血球を貪食し、鉄のリサイクルを行う機能を有すると考えられている。リサイクルの過程で産生されてくるビリベルジンなどのヘム代謝産物が、Spi-c の発現を誘導するかを検討する。

● マラリア感染による RPM の活性化機構の解析

マウスに感染したマラリアの一部は脾臓のマクロファージ及び DC によって排除され、同時に RPM の細胞数が増えるという報告はあるが、その詳細な機構は分かっていない。マラリア感染によって RPM が活性化(増殖)する機構の解析は、RPM の分化誘導シグナルの同定にもつながると考えられる。そこで GFP ノックインマウスにマラリアを感染させ、感染による RPM の挙動を、組織切片、FACS にて GFP の発現を活性化の指標にして検討する。さらにはヘモゾインなどのマラリア感染赤血球の代謝産物やビリベルジンといったヘム代謝産物による、RPM および pRPM の活性化への影響、およびそれらの機能への影響についても検討する。

● コンディショナル Spi-c ノックアウトマウス(cK0)の作成

申請者が既に作成した Spi-c 遺伝子欠損(KO)マウスは胎生致死のため(Kohyama et.al, *Nature* 2009)、同時に多数の KO マウスを準備することは困難である。しかし感染実験あるいはマウスへの細胞移入実験においては、同時に多数の遺伝子欠損マウスを準備する必要がある。そこで、Spi-c コンディショナルノックアウトマウスの作成を行う。Tie2-Cre、CD11b-cre、F4/80-Cre、Lyzs-cre マウスなどと掛け合わせるにより、目的の細胞でのみ Spi-c の発現を阻害できる。ジーンターゲットング、ES 細胞へのインジェクション、キメラマウスの作成、及びマウスのスクリーニングまでを初年度で完成させる。

平成 25 年度以降

- Spi-c の発現を誘起する因子を RNAi など欠損させたり、あるいは中和抗体などを用いシグナルをブロックし、Spi-c の発現が阻害されることなどを in vitro で確認する。
- 作成した Spi-c cK0 マウスを用い、同定した前駆細胞を移入し、その分化能を in vivo で確認する。さらに、この Spi-c cK0 マウスを用いてマラリア感染実験を行い、マラリア感染と RPM の役割について検討する。
- RPM および pRPM の分化誘導機構の解析から得られた知見をもとに、他の組織マクロファージ(マクログリア、腸管内マクロファージなど)の分化誘導機構を解析し、生体内におけるそれらの細胞の役割の解明を行う。

4. 研究成果

1) Spi-c 発現細胞を in vivo や live で追跡できるシステムとして Spic-IRES-eGFP マウスを作成した。

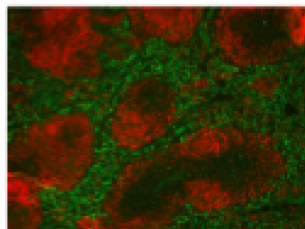


図 2. Spi-c GFP マウス脾臓における GFP の発現  
green: GFP, red: B220

2) この Spic-IRES-eGFP マウスを用いて RPM の前駆細胞の一部は骨髄に存在していることを明らかにした。

3) さらに Spi-c の発現を誘導してくる生理的な因子として、赤血球の代謝産物である Heme の同定に成功した(*Cell*, 2014, 156(6): 1223-1234)。

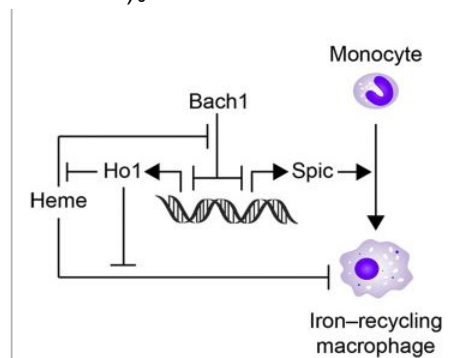


図 3. 赤血球代謝産物 Heme による Spi-c 発現の制御

4) Spi-c コンディショナルノックアウトマウスを作成し、RPM でのみ Spi-c の発現を消失させることで胎生致死を回避することに

成功した。そしてこの Spi-c f/f x CD11b cre マウスの解析から、RPM はマラリア原虫のクリアランスには必須ではないことを明らかにした（投稿準備中）。

5 )RPM は生体内において Heme を分解し鉄をリサイクルする細胞として重要であり、H0-1 は Heme の代謝に関与する分子である。この H0-1 をミエロイド系の細胞でのみ特異的に欠損するマウスの解析により、マラリア原虫のクリアランスにおいて H0-1 が重要な働きを担っていることを明らかにした（投稿準備中）。

#### 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 9 件)

Kohyama M, Matsuoka S, Shida K, Sugihara F, Aoshi T, Kishida K, Ishii KJ, Arase H. Monocyte infiltration into obese and fibrilized tissues is regulated by PILR . *Eur J Immunol*. 2016. In press, 査読有

Doi: 10.1002/eji.201545897.

Bednarski JJ, Pandey R, Schulte E, White LS, Chen BR, Sandoval GJ, Kohyama M, Haldar M, Nickless A, Trott A, Cheng G, Murphy KM, Bassing CH, Payton JE, Sleckman BP. RAG-mediated DNA double-strand breaks activate a cell type-specific checkpoint to inhibit pre-B cell receptor signals. *J Exp Med*. 2016. 213(2): 209-223, 査読有

Doi: 10.1084/jem.20151048.

Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H. Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *J Biol Chem*. 2015. 290(32): 19833-19843, 査読有

Doi: 10.1074/jbc.M114.635508.

Tanimura K, Jin H, Suenaga T, Morikami S, Arase N, Kishida K, Hirayasu K, Kohyama M, Ebina Y, Yasuda S, Horita T, Takasugi K, Ohmura K, Yamamoto K, Katayama I, Sasazuki T, Lanier LL, Atsumi T, Yamada H, Arase H.

2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2015. 125(18): 2835-2844, 査読有

Doi: 10.1182/blood-2014-08-593624.

Kishida K, Kohyama M, Kurashima Y, Kogure Y, Wang J, Hirayasu K, Suenaga T, Kiyono H, Kunisawa J, Arase H. Negative regulation of DSS-induced experimental colitis by PILR . *Int*

*Immunol*. 2015. 27(6): 307-314, 査読有

Doi: 10.1093/intimm/dxv004.

Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system.

*Microbiol Immunol*. 2014. 58(9): 513-522, 査読有

Doi: 10.1111/1348-0421.12180.

Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria.

*Cell Host Microbe*. 2014. 15(5): 551-563, 査読有

Doi: 10.1016/j.chom.2014.04.008.

Haldar M, Kohyama M, So AY, Kc W, Wu X, Briseño CG, Satpathy AT, Kretzer NM, Arase H, Rajasekaran NS, Wang L, Egawa T, Igarashi K, Baltimore D, Murphy TL, Murphy KM. Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell*. 2014. 156(6): 1223-1234, 査読有

Doi: 10.1016/j.cell.2014.01.069.

Jiang Y, Arase N, Kohyama M, Hirayasu K, Suenaga T, Jin H, Matsumoto M, Shida K, Lanier LL, Saito T, Arase H. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int Immunol*. 2013. 25(4): 235-246, 査読有

Doi: 10.1093/intimm/dxs155.

〔学会発表〕(計 16 件)

Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohyama Masako, Suenaga Tadahiro, Sasazuki Takehiko, Arase Hisashi. MHC class II molecules expose autoantibody epitopes on autoantigens. 第 44 日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2015 年 11 月 20 日

Kohyama Masako, Matsuoka Sumiko, Arase Noriko, Arase Hisashi. PILR negatively regulates monocyte infiltration into the skin. 第 44 日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2015 年 11 月 19 日

Fuminori Sugihara, Masako Kohyama, Hisashi Arase. Monitoring cell

behavior in vivo by using magnetic resonance imaging with florin contrast agent. 第44日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2015年11月18日  
Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Saito Fumiji, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi. Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in ANCA-associated vasculitis. 第44日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2015年11月18日  
日和良介、大村浩一郎、荒瀬規子、金暉、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、齋藤史路、岩谷博次、渥美達也、寺尾知可史、三森経世、荒瀬尚、MPO/HLA class 複合体は顕微鏡的多発血管炎における自己抗体の標的である、第43回日本臨床免疫学会総会、神戸国際会議場(神戸)、2015年10月22日  
香山尚子、香山雅子、竹田潔、食餌鉄依存的な腸管CX3CR1high制御性ミエロイド細胞維持機構、第43回日本臨床免疫学会総会、神戸国際会議場(神戸)、2015年10月22日  
Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Matsuoka Sumiko, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi. Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in microscopic polyangiitis. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都), 2014年12月12日  
Kohyama Masako, Kishida Kazuki, Arase Hisashi. PILR negatively regulates size of adipose tissue by controlling monocyte mobility. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都), 2014年12月11日  
Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Nakamaru Yuji, Imatani Yoshinori, Katayama Ichiro, Arase Hisashi. MHC class II-restricted recognition of self-antigen/MHC class II complexes by autoantibodies. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都), 2014年12月10日  
Hui Jin, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Tadahiro

Suenaga, Fumiji Saito, Kenji Tanimura, Sumiko Matsuoka, Kosuke Ebina, Kenrin Shi, Shinsuke Yasuda, Tetsuya Horita, Ryosuke Hiwa, Kiyoshi Takasugi, Koichiro Ohmura, Hideki Yoshikawa, Takashi Saito, Tatsuya Atsumi, Takehiko Sasazuki, Ichiro Katayama, Lewis L. Lanier, Hisashi Arase, Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Specifically Recognize IgG Heavy Chain Complexed with HLA-DR, Which is Strongly Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility. The 15th Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris(France), Jul. 13<sup>th</sup>, 2014.  
金暉、荒瀬規子、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、松岡須美子、齋藤隆、Lewis L. Lanier、荒瀬尚、MHCクラス分子によって細胞外へ輸送された細胞内ミスフォールド蛋白質が自己抗体の標的分子である、第24回 Kyoto T cell Conference、京都大学(京都)、2014年5月17日  
Kohyama Masako, Wang Jing Kishida Kazuki, Arase Hisashi. PILR negatively regulates monocyte mobility. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月13日  
Jin Hui, Arase Noriko, Kohayama Masako, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Matsumoto Maki, Shida Kyoko, Suenaga Tadahiro, Saito Takashi, Katayama Ichiro, Lanier Lewis L., Arase Hisashi. Rheumatoid factor binding to IgG heavy chain presented on HLA-DR is associated with Rheumatoid Arthritis susceptibility. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月13日  
Tanimura Kenji, Suenaga Tadahiro, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Arase Noriko, Kohayama Masako, Ebina Yasuhiko, Yasuda Shinsuke, Horita Tetsuya, Katayama Ichiro, Atsumi Tatsuya, Yamada Hideo, Arase Hisashi. 2-glycoprotein I presented on MHC class II molecules are recognized by autoantibodies in antiphospholipid syndrome. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月13日  
Kishida Kazuki, Kohyama Masako, Kurashima Yosuke, Wang Jing, Hirayasu Kouyuki, Suenaga Tadahiro, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Arase Hisashi. PILR negatively regulates DSS induced experimental colitis. 第

42 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉), 2013年12月12日  
Jiang Y, Arase N, Kohyama M, Hirayasu K, Suenaga T, Jin H, Matsumoto M, Shida K, Lanier LL, Saito T, Arase H. Transport of misfolded ER proteins to the cell surface by MHC class II molecules. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸国際会議場(神戸), 2012年12月6日

〔図書〕(計 1件)

香山雅子、「脾臓マクロファージサブセットの機能」(細胞工学)、秀潤社、31巻11号、1210-1213

〔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〕

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

香山 雅子 (KOHYAMA, Masako)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：40598885