

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293089

研究課題名(和文)炎症制御性マクロファージによる組織傷害抑制機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of tissue injury by inflammation-regulating Macrophages

研究代表者

田中 正人(Tanaka, Masato)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：00294059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CD169陽性マクロファージによる免疫制御機構の解明を試みた。CD169陽性細胞特異的に蛍光標識した遺伝子改変マウスを用いて同細胞の動態を解析するとともに、同細胞の腎虚血再灌流傷害や腸炎モデルにおける病理的役割を明らかにした。さらに、CD169陽性マクロファージの性質を決定づける特異的転写因子を同定し、この転写因子が同マクロファージ特異的ケモカインであるCCL8の転写を制御していることが分かった。さらに、この転写因子は、他の転写因子と拮抗し転写を抑制することで、抗炎症や組織修復関連遺伝子の発現を抑制していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reveal the mechanisms of immune regulation by CD169-positive macrophages. We analyze the localization and character of these CD169-positive macrophages in various tissues using CD169-Cre-YFP mice. We also examined the pathological roles of these macrophages in ischemic-reperfusion injury of kidney and DSS-induced colitis. In addition, we identified a CD169-positive macrophage-specific transcription factor. We found that this transcription factor not only promotes CCL8 production, but also suppresses gene expression related to anti-inflammation or tissue repair in these macrophages.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症 マクロファージ 虚血再灌流傷害

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織マクロファージの多様性と CD169 陽性マクロファージ

マクロファージや樹状細胞といった食細胞は、他の免疫細胞と異なり、定常的に各組織に常在している。これらの食細胞は、侵入した病原体や自己の死細胞を認識すると、これらを貪食し状況に応じた免疫応答を惹起する。近年、生体内の各組織には、機能や局在の異なるマクロファージサブセットが存在し、これらが協調して炎症や免疫応答を制御していることが明らかとなってきた。組織常在マクロファージは従来、血液中の単球が分化した細胞と考えられてきたが、最近になって、その一部は、胎生期に yolk sac から移動してきたマクロファージ幹細胞から分化することが報告され、前駆細胞レベルでの多様性も指摘され始めている。

我々はこれまでに、マクロファージによる死細胞貪食の分子機構を明らかにし、死細胞を貪食したマクロファージが、自己免疫寛容やがん免疫活性化を誘導することを報告した。さらに、これらの免疫応答に CD169 分子を発現する二次リンパ組織に局在するマクロファージサブセットが重要な役割を担っていることをつきとめた。この CD169 マクロファージは、輸入リンパ管が開放するリンパ洞や、血流の開放部である脾臓の辺縁帯などのリンパ組織の最前線に局在し、同部位に到達した死細胞や異物を選択的に貪食し免疫応答を誘導することが分かった。これらの知見により、CD169 マクロファージは、各免疫器官において他の組織や外界との境界領域に局在し、免疫応答の初動や他の免疫細胞の動態制御を担うセンチネルマクロファージサブセットであるという新しい概念が確立しつつある。

(2) マクロファージの組織傷害における役割

虚血再灌流傷害では、低酸素とそれに続く活性酸素発生により実質細胞や血管内皮細胞が細胞死を起こす。これに加えて細胞傷害を検知したマクロファージ等の免疫細胞が炎症を惹起し、さらなる組織傷害をひきおこすと考えられている。この炎症の制御には、組織マクロファージと単球由来のマクロファージの両方が関与していると考えられているが、その役割の詳細は明らかになっていない。

我々は本研究課題の申請と前後して、CD169 遺伝子座に Cre recombinase 遺伝子を挿入したマウスを作製し、これを ROSA26-YFP マ

ウスと交配することにより、CD169 マクロファージを蛍光標識できるマウス (169-Cre/ROSA-YFP マウス) の開発に成功した。このマウスの解析により CD169 マクロファージは、上記の二次リンパ組織以外にも、腎臓等の実質臓器の血管内皮細胞直下に特異的に局在していることを見出した。免疫染色により、この CD169 マクロファージは血管壁内腔に接着していることが明らかとなったことから、本マクロファージが血管障害に起因する組織傷害を感知し、炎症を制御する細胞である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景および研究の進捗を踏まえて、腎臓の虚血再灌流傷害における CD169 マクロファージの炎症抑制機構を明らかにすることを目的とした。さらに、前述の 169-Cre/ROSA-YFP マウスを用いて、各組織における CD169 陽性マクロファージの生理的、病理的役割、およびその形質を決定する分子基盤の解明を試みた。

3. 研究の方法

CD169 マクロファージに特異的に蛍光タンパクを発現する遺伝子改変マウス (CD169-Cre-YFP マウス) CD169-DTR マウスは、以前に作製したものをを用いた。CD169 陽性マクロファージ特異的な転写因子の同定には、DNA microarray 法を用いた。当該転写因子の欠損マウスは、胎生致死のため、欠損マウスの胎仔肝臓細胞を用いて、キメラマウスを作製し解析を行った。その他の方法については、研究成果の項目に結果とともに記載する。

4. 研究成果

(1) 腎虚血再灌流傷害における CD169 マクロファージの役割

我々は、CD169 マクロファージを誘導的に消去できるマウス (CD169-DTR マウス) では、腎虚血再灌流傷害が劇症化し、腎不全のため 2 日以内に全例が死亡することを見いだした。CD169 マクロファージ非存在下では腎虚血再灌流により激しい炎症が誘導されることから、CD169 マクロファージは腎虚血再灌流に伴う炎症を負に制御し、過度の組織傷害を防ぐ働きがあると想定された。そこで、我々は、腎虚血再灌流傷害における CD169 マクロファージの役割を検討した。CD169 マクロファージ消失マウスにおける虚血再灌流傷害の免疫細胞の動態を、野生型マウス

と比較検討した。その結果、CD169 マクロファージ消失マウスでは、著明な好中球浸潤が見られたこと、さらに Gr-1 抗体投与により好中球を消失させると、腎虚血再灌流傷害の劇症化が著明に改善することから、好中球浸潤が腎虚血再灌流傷害の劇症化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。この CD169 マクロファージ非存在下での過度の好中球浸潤の原因を明らかにするために、好中球の遊走および浸潤に関与する因子の腎臓における発現量を検討した。CD169 マクロファージ消失マウスでは、いくつかのケモカインの上昇が見られたが、いずれも腎虚血再灌流傷害後の変化であり、CD169 マクロファージ消失の直接的な効果であるかどうか断定することはできなかった。一方で、接着因子である ICAM-1 の発現は、腎虚血再灌流傷害前の CD169 マクロファージ消失マウスで著明に上昇していた。ICAM-1 中和抗体投与により腎虚血再灌流傷害の劇症化が著明に改善したことから、これが本マウスにおける過度の好中球浸潤の原因である可能性が考えられた。さらに CD169 マクロファージ消失マウスから分取した単核球は、野生型に比し、血管内皮細胞の ICAM-1 発現を有意に増加させることも分かった。これらの知見から、CD169 マクロファージは血管内皮細胞の ICAM-1 発現を調節することにより、過度の炎症の惹起を阻止している可能性が考えられた。

(2) CD169 陽性マクロファージの性質を決定する因子の同定

我々は 169-Cre/ROSA-YFP マウスの解析により、CD169 陽性マクロファージが腸管の粘膜固有層にも局在することをつきとめた。このマクロファージは粘膜固有層の比較的深部に局在していることから、通常の生理的条件下では、腸上皮の死細胞や腸内細菌には暴露されないと考えられた。さらに我々は CD169-DTR マウスを用いた解析等により、このマクロファージが、炎症に関与するケモカイン CCL8 を特異的に産生することにより、腸炎の増悪に寄与していることを明らかにした。CD169 陽性マクロファージは、その特異的な局在や機能から判断して、特定の転写因子によってその分化・機能が規定されている可能性が考えられたため、CD169 マクロファージの機能や局在を決定する転写因子を探索した。その結果、機能制御を司る転写因子の候補として特定の因子を同定した。この転写因子は、定常状態の腸管マクロファージ

の中で、CD169 マクロファージに特異的に発現していることが分かった。この転写因子の欠損マクロファージ（転写因子欠損マウスの胎仔肝臓を用いた骨髄キメラマウスから調製）を用いた解析により、この転写因子が、腸の CD169 陽性マクロファージ特異的のケモカインである CCL8 の転写を制御していることが分かった。さらに、転写因子欠損マクロファージにおける網羅的な遺伝子発現解析の結果、この転写因子は、CD169 マクロファージにおける炎症促進因子の発現を正に制御するだけでなく、プロモーター上で他の転写因子と拮抗し転写を抑制することで、抗炎症や組織修復関連遺伝子の発現を抑制していることが分かった。さらに、炎症の後期では、同マクロファージにおける当該転写因子の発現量が急激に低下し、それにより他の転写因子の抑制が解除されて、抗炎症や組織修復関連遺伝子の発現が亢進することが分かった。これらの知見より、CD169 マクロファージは、組織傷害の局面の変化に応じて、転写因子の発現量を制御し、その形質を転換していることが分かった。

(3) Ly6c 陽性単球の炎症における役割

骨髄・血液内の単球には2つの細胞集団が存在しており、以前は Ly6c 陽性単球が炎症を惹起する細胞であるのに対し、Ly6c 陰性は組織マクロファージの前駆細胞として、組織の恒常性維持に寄与すると考えられてきた。しかし、最近になって、Ly6c 陰性単球は、組織マクロファージの前駆細胞として働くだけでなく、血管壁内面に接着しながらゆっくりと移動し、組織の傷害を迅速に感知し炎症を制御する役割を担う可能性が報告された。単球の中にも CD169 陽性細胞がごく一部存在することから、単球が腎虚血再灌流傷害における炎症および傷害の抑制に関与している可能性がある。このような背景のもと、我々は Ly6c 陽性単球のみに発現する細胞表面分子の遺伝子座に DTR cDNA を挿入したノックインマウスを作製し、Ly6c 陽性単球の非存在下における炎症病態の解析を行った。興味深いことに Ly6c 陽性単球を消去したマウスでは、炎症モデルマウスにおいて、むしろ炎症が増悪することが明らかとなった。これらのことから、Ly6c 陽性単球は、炎症応答を促進するだけでなく、負に制御する可能性があることが明らかとなった。

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)

[雑誌論文](計10件)

1. Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. **Nat Rev Immunol**. 17:333-340.2017 査読有 doi:10.1038/nri.2016.153
2. Yoshida T, Tanaka M, (他3名, 4番目) Autophagy suppresses cell migration by degrading GEF-H1, a RhoA GEF. **Oncotarget**. 7(23):34420-9.2016. 査読有 doi:10.18632/oncotarget.8883
3. Matsushita T, Tanaka M, (他9名, 7番目). Regulation of B cell differentiation by the ubiquitin-binding protein TAX1BP1. **Sci Rep**. 6:31266. 2016. 査読有 doi:10.1038/srep31266
4. Motomura Y, Tanaka M, (他9名, 4番目). Identification of Pathogenic Cardiac CD11c+ Macrophages in Nod1-Mediated Acute Coronary Arteritis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 35:1423-33. 2015. 査読有 doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304846
5. Karasawa K, 他9名, Tanaka M. Vascular-Resident CD169-Positive Monocytes and Macrophages Control Neutrophil Accumulation in the Kidney with Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**. 26:896-906. 2015. 査読有 doi: 10.1681/ASN.2014020195.
6. Inoue H, Tanaka M, (他11名, 9番目) gamma-SNAP stimulates disassembly of endosomal SNARE complexes and regulates endocytic trafficking pathways. **J Cell Sci**. 128:2781-94. 2015. 査読有 doi:10.1242/jcs.158634.
7. Asano K, 他10名, Tanaka M. Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. **Nat Commun**. 6:7802. 2015. 査読有 doi:10.1038/ncomms8802
8. Yonekawa A, Tanaka M, (他10名, 8番目) Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. **Immunity**. 41:402-13.2014. 査読有

doi:10.1016/j.immuni.2014.08.005

9. Taguchi K, 他10名, Tanaka M, Miyoshi I, Kohri K. Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. **Journal of the American Society of Nephrology**. 25(8):1680-97. 2014. 査読有 doi: 10.1681/ASN.2013060675
10. Ravishankar B, Tanaka M, (他9名, 8番目) Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 111(11):4215-20. 2014. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1320924111

[学会発表](計11件)

1. 田中正人、CD170 陽性マクロファージによる死細胞貪食と免疫制御、千里ライフサイエンスセミナーK4、2016/11/15、千里ライフサイエンスセンタービル(大阪)
2. 田中正人、組織マクロファージによる炎症制御機構、第31回日本 Shock 学会総会、2016/10/6、東京ドームホテル
3. 田中正人、CD169 陽性マクロファージによる死細胞貪食と炎症制御、第89回 生化学会大会、2016/9/25、仙台国際センター
4. 田中正人、組織傷害における CD169 マクロファージの役割、Cell Death 学会、2016/9/9、きゅりあん品川
5. 田中正人、The role of CD169 macrophages in the regulation of inflammation、IMS-JSI International Symposium on Immunology 2016、2016/6/17、パシフィコ横浜
6. 田中正人、Immunoregulation by CD169 Macrophages、MMCB2016、2016/6/4、ソラシティ(東京)
7. 田中正人、細胞死を起点とする生体応答、第44回 日本免疫学会、2015/11/20、SORA 札幌コンベンションセンター
8. 田中正人、The Role of CD169 Macrophages in immune Regulation、KAI 2015 Fall Conference、2015/11/12、Sejong University Convention Center
9. 田中正人、死細胞貪食による免疫制御、第31回 Wako ワークショップ、2015/11/4、東京カンファレンスセンター(品川)
10. 田中正人、The role of CD169 macrophages in dead cell clearance and inflammatory regulation、Japan Australia

Meeting on Cell Death、2015/10/21-23、
Walter Eliza Hall Melbourne

11. 田中正人、CD169 マクロファージによる
死細胞貪食と炎症制御、第23回 Cell
Death 学会、2014/7/19、東京医科歯科大
学

〔図書〕(計1件)

1. 田中正人 他、
Curr Top Microbiol Immunol.
Apoptotic and Non-apoptotic Cell Death
2015. 171-183.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正人 (TANAKA, Masato)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：00294059

(2) 研究分担者

大村谷 昌樹 (OHMURAYA, Masaki)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60398229