

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860330

研究課題名(和文) 制御性ミエロイド細胞の分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying maintaining of intestinal CX3CR1high macrophages homeostasis

研究代表者

香山 尚子 (Kayama, Hisako)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40548814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コントロール(Spi-Cflox/flox)およびLysM-cre; Spi-Cflox/floxマウスの解析により、腸管CX3CR1highマクロファージに発現する転写因子Spi-CがIRF5と結合することにより、腸管炎症惹起性炎症性サイトカインIL-6およびIL-1aの発現を抑制することが、腸管恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We identified that transcription factor Spi-C highly express in intestinal CX3CR1high macrophages. In addition, Spi-C inhibited expression of colitogenic pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1a mRNA through the disruption of IRF5/NF- $\kappa$ B p65 heterodimer formation by directly interacting with IRF5 and thereby maintaining intestinal homeostasis.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：炎症性腸疾患 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性腸疾患 (IBD) は我が国で急激に増加している難治性疾患であり、病因の究明および効果的治療法の開発が望まれている。これまでに、Th1/Th2 細胞のバランスの破綻による T 細胞の機能異常や、Th17 細胞の活性化が IBD の病態に深く関わっていることが解明されている。炎症性腸疾患に於いては獲得免疫系を中心にその原因が研究されてきたが、根本的な原因解明および有効な治療薬の開発には至っていない。近年、自然免疫系の活性異常が IBD をはじめとする炎症性疾患の発症に深く関与することが報告されている。腸管粘膜固有層特異的に局在する自然免疫細胞: CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> 細胞は、抗炎症応答に機能する細胞であることが同定するとともに、その活性異常がマウスの腸炎発症に深く関与することが明らかになっている。しかし、腸管 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> 細胞の恒常性維持に関わる分子メカニズムおよび分化機構の大部分は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

近年、様々な組織に局在する自然免疫細胞の一種マクロファージの機能および分化に関与する転写因子が同定されるとともに、転写因子の発現を誘導する組織特異的なサイトカインもしくは代謝産物が同定され、組織恒常性維持におけるマクロファージの重要性が明らかになっている。そこで、腸管炎症制御において重要な役割を果たす腸管自然免疫細胞 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> 細胞の分化および機能に関与する転写因子を同定するとともにその機能解析を行うことで、腸管組織恒常性維持機構を解明することを目的とし、マウス大腸粘膜固有層 CD103<sup>+</sup>樹状細胞、CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>マクロファージ、CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞、CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>樹状細胞を用いて、DNA マイクロアレイ解析により網羅的に各細胞における転写因子の発現パターンを解析した。その結果、マクロファージのマーカである転写因子 Spi-C が CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>

細胞に高発現することを見出し、CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞が腸管マクロファージの一種であることが明らかになった。さらに、転写因子 Spi-C が CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>マクロファージ特異的に高発現することが明らかになった。また、食餌鉄依存的に腸管自然免疫細胞に Spi-C の発現が誘導されることが明らかとなった。そこで、腸管 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>マクロファージの恒常性維持における転写因子 Spi-C の役割を明らかにすることにより、IBD の発症機構および新規細胞治療法開発の基礎基盤提供を目指し解析を行った。

## 3. 研究の方法

全身で Spi-C が欠損する conventional Spi-C<sup>-/-</sup>マウスは、ほとんどが胎生致死であることが報告されている。そこで、腸管 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>マクロファージにおける Spi-C の機能を明らかにするため、ミエロイド細胞特異的に Spi-C が欠損した (*LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>*) マウスを作成した。*LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>* マウスでは、腸管 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>マクロファージの数は正常であることから、CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>マクロファージの分化に Spi-C は関与しないことが示唆された。そこで、以下に記載する方法で、腸管 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>マクロファージに発現する転写因子 Spi-C による腸管恒常性維持機構について解析を行った。

(1) 腸管炎症における Spi-C の役割を明らかにするため、コントロール (*Spi-C<sup>flox/flox</sup>*) および *LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>* マウスに 1.5% デキストラン硫酸ナトリウムを 7 日間投与し、体重減少を計測するとともに、各マウスの大腸組織切片を用いて病理解析を行った。

(2) Spi-C の標的遺伝子を同定するため、コントロール (*Spi-C<sup>flox/flox</sup>*) および *LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>* マウスから回収した骨髓細胞由来のマクロファージを LPS 刺激し、RNA-seq 解析を行った。

(3) Spi-C が標的遺伝子を制御するメカニズムの解析を行った。

#### 4. 研究成果

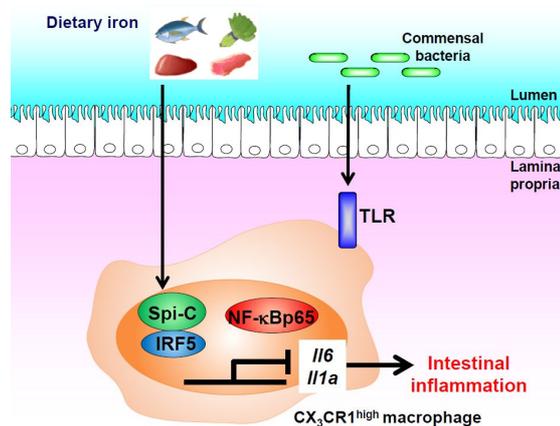
(1) コントロール (*Spi-C<sup>flox/flox</sup>*) および *LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>* マウスに 1.5% デキストラン硫酸ナトリウムを 7 日間投与し、体重減少を計測するとともに、各マウスの大腸組織切片を用いて病理解析を行った。その結果、コントロールマウスに比べ *LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>* マウスにおいて体重が著しく減少するとともに、腸管炎症の増悪化が示された。これらの結果より、腸管自然免疫細胞に発現する Spi-C が腸管炎症抑制に機能することが示された。

(2) マクロファージに発現する Spi-C がどのようにして腸管炎症を抑制するかを明らかにするためコントロールおよび *LysM-cre; Spi-C<sup>flox/flox</sup>* マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養することによりマクロファージを誘導し、Spi-C 発現を誘導するため heme で 18 時間処理した。その後、LPS 刺激を 4 時間行い、RNA-seq 法により網羅的な transcriptome 解析を行った。その結果、コントロール細胞に比べ Spi-C 欠損マクロファージでは 85 遺伝子の発現が顕著に上昇することが示された。85 遺伝子には、腸管炎症を誘導することが報告されている炎症性サイトカイン IL-6、IL-1a が含まれていた。

(3) Spi-C が腸管炎症を惹起する炎症性サイトカイン IL-6 および IL-1a を転写レベルで負に制御する分子機構を解明するため、Ingenuity Pathway Assay を用いて、Spi-C 欠損マクロファージで LPS 刺激依存的に発現が上昇していた 85 遺伝子の upstream regulators の同定を試みた。その結果、predicted upstream regulators に転写因子 IRF5 が含まれることが明らかになった。これ

までの報告により、IRF5/NF- $\kappa$ B p65 のヘテロダイマーが IL-6 および IL-1a の発現を正に制御することが明らかになっており、Spi-C が IRF5/p65 依存的な転写開始を抑制することが示唆された。そこで、HEK293 細胞に His-tagged Spi-C 発現ベクター、HA-tagged IRF5 発現ベクターをトランスフェクションした後、anti-NF- $\kappa$ B p6 抗体により免疫沈降を行い IRF-5 と NF- $\kappa$ B p65 の結合について解析を行った結果、Spi-C 存在下では、IRF5 と NF- $\kappa$ B p65 の結合が顕著に抑制されることが示された。また、Spi-C は IRF5 と結合する一方、NF- $\kappa$ B p65 とは結合しないことが示された。さらに、His-tagged Spi-C を過剰発現させたマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を LPS 刺激したのち anti-IRF5 抗体および anti-NF- $\kappa$ B p65 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。その結果、コントロール細胞株では、LPS 刺激依存的に IL-6 プロモーター NF- $\kappa$ B site に IRF5 および NF- $\kappa$ B p65 が導員されるのに対し、Spi-C 発現細胞株では IRF5 および NF- $\kappa$ B p65 の導員が顕著に抑制されていた。

(1)~(3)の結果より、食餌鉄依存的に腸管 CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> マクロファージに発現する転写因子 Spi-C が IRF5 と結合することにより IL-6 や IL-1a などの炎症性サイトカイン産生を抑制することが、腸管炎症抑制に重要であることが明らかとなった(下図)。



#### 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1) CD163<sup>high</sup> CD160<sup>high</sup> cells regulate human intestinal homeostasis through suppression of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation.

ポスター、香山尚子、Soumik Barman、竹田 潔、第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5-7日、沖縄

(2) Dietary iron and transcription factor Spi-C regulate gut homeostasis through maintenance of CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells. Poster, Hisako Kayama, Kiyoshi Takeda, International Congress of Immunology, 21-26 August 2016, Melbourne

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

香山 尚子 (KAYAMA, Hisako)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：40548814