

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04068

研究課題名（和文）組織傷害におけるマクロファージの形質転換機構とその意義

研究課題名（英文）Mechanisms of phenotypic changes in macrophages during tissue injury

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） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：組織傷害の2つの局面（炎症期と修復期）で、マクロファージは異なる役割を担う。しかし、マクロファージがどのようにして、それぞれの局面に合わせて形質を変化させるのか、その形質転換の機構は明らかになっていない。本研究では、このマクロファージの形質転換機構の解明を目指した。その結果、CD169マクロファージにおいては、c-MafとNrf2の転写活性のバランスが変化することによって、マクロファージの形質転換が起こることを明らかにした。さらに、Ym1陽性単球が、組織傷害の修復期に骨髄で増産され、局所において炎症抑制および組織修復に寄与する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

マクロファージは、組織傷害や炎症時に、外界の刺激や環境に素早く対応し、機能的、構造的な変化を起こすことが知られているが、その分子機構は不明な点が多かった。本研究の成果は、特定の転写因子がマクロファージの形質転換に分子スイッチとして働くことを明確に示しており、マクロファージの可塑性および組織傷害の病理を理解する上で有用な知見である。また、得られた知見は将来的に、炎症制御や組織修復促進を目的とした新たな疾患治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Macrophages play diverse roles in tissue injury. However, it remains unknown how these macrophages change phenotype according to each phase of tissue injury. This research aimed to reveal mechanisms of phenotypic changes in macrophages during tissue injury. As a result, we demonstrated that two transcriptional factors, c-Maf and Nrf2, determine the phenotype of CD169 macrophages during tissue injury. Furthermore, we identified a novel subpopulation of Ly6C-positive monocytes (Ym1-positive monocytes) in mice. Ym1-positive monocytes are generated in bone marrow during the phase of tissue repair, and contribute to resolution of inflammation and tissue repair in damaged tissues.

研究分野：免疫学

キーワード：マクロファージ 組織傷害 形質転換 単球

1. 研究開始当初の背景

感染や虚血再灌流により組織傷害が起こると、炎症が誘導される。炎症は組織傷害の原因の排除に貢献するが、一時的に組織の傷害を悪化させるという負の側面も有する。一方、組織傷害の原因が排除されると、炎症は速やかに収束し、代わって組織の再生や修復が行われる。これら炎症期と修復期は、多くの急性組織傷害で共通に見られる2つの局面である。この2つの局面の病理には、それぞれ、複数の細胞が協調的に関わっているが、どちらの局面においてもマクロファージが中心的な役割を担う。組織に常在するマクロファージは、炎症期において、細胞死や病原体の侵入を最初に感知し、炎症性サイトカインの産生を行う。一方で、修復期には、炎症制御因子や組織修復因子を産生して、炎症の収束や組織修復を司る。これら2つの局面ではマクロファージの遺伝子発現パターンも大きく異なる。このようにマクロファージは組織傷害の2つの局面で全く異なる役割を担うが、どのようにして、各局面に適した形質に変化するのか、その形質の転換機構はほとんど分かっていない。

我々は研究開始以前に、マクロファージによる死細胞貪食の分子機構、および、その免疫学的意義を明らかにしてきた。さらに、死細胞に対する免疫応答に、脾臓やリンパ節に局在するCD169陽性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見いだした。研究開始当時は、CD169マクロファージを蛍光標識したマウス(CD169-Cre/ROSA-YFP マウス)および同マクロファージを選択的に消去できるマウス(CD169-DTR マウス)を用いた解析により、CD169 マクロファージが腸管にも存在し、腸炎の誘導に必須の細胞であることを見いだした。すなわち、粘膜固有層の比較的深層に局在するCD169 マクロファージは、腸上皮細胞の傷害を最初に感知し、CCL8 ケモカインを産生することによって、炎症を惹起することを明らかにした。

2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、腸炎をはじめとした組織傷害におけるCD169 マクロファージの形質の転換の分子機構と、その病理的意義の解明を目指す。具体的には、(1) CD169 マクロファージの形質決定に関わる転写因子の同定と機能解析(2) 組織傷害の炎症期と修復期のマクロファージにおける形質転換機構の解明(3)同機構の病理的意義、を明らかにすることにより、組織傷害におけるマクロファージの形質転換の実体を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

CD169マクロファージの分化および特性を決定する転写因子の探索では、各臓器よりCD169陽性および陰性マクロファージを調製し、その遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイ法等により解析した。マクロファージにおけるc-Mafの役割を明らかにするために、野生型およびc-Maf欠損マウスの胎仔肝臓細胞(血液幹細胞を含む)を、放射線照射した野生型マウスに移植した。このマウスのCD169マクロファージの分化や局在は、フローサイトメトリーや免疫染色により解析した。また、移植マウスの骨髄細胞を調製し、M-CSF存在下で培養することにより、骨髄由来マクロファージを誘導して、実験に用いた。

組織傷害の修復期に傷害局所に集積する単球およびマクロファージの解析には、DTRを発現したB16メラノーマ細胞をマウスに移植し、がんが一定の大きさに達した後に、DTを投与することで、がん細胞死を誘導する実験系を用いた。新規単球サブセット(Ym1⁺Ly6C⁺単球)の解析には、Ym1発現細胞を可視化できるマウス(Ym1-Venusマウス)を作製し、同細胞の組織傷害における役割を明らかにする目的で、Ym1発現細胞を誘導的に消去できるマウス(Ym1-DTRマウス)を作製した。

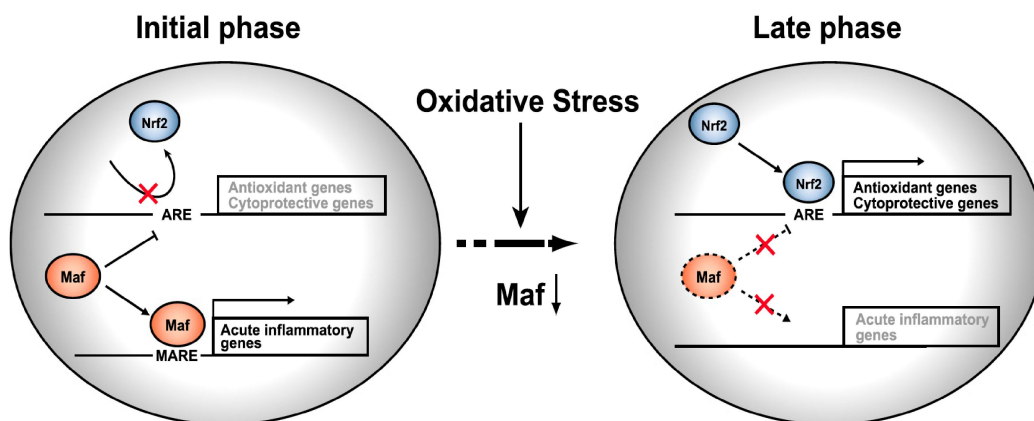
4. 研究成果

(1) CD169マクロファージの形質転換における転写因子の役割

我々は、これまでに腸管に局在するCD169マクロファージが、腸炎において、急性期にCCL8を産生して炎症を惹起することを見いだした。本研究では、その形質の決定に重要な転写因子の同定を目指した。その結果、CD169マクロファージに特異的に発現する転写因子として、c-Mafを同定した。c-Maf欠損マウスの胎仔肝臓を移植したマウスの解析結果より、c-MafはCD169マクロファージの分化や局在には全く関与していないことが分かった。一方で、この移植マウスでは腸炎時の血清CCL8濃度が著しく低下すること、および、c-Maf欠損マクロファージではLPS刺激によりCCL8がほとんど産生されないことを見いだした。さらに、CCL8遺伝子のプロモーター解析の結果より、c-MafがCCL8遺伝子の発現を正に制御していることが明らかとなった。

我々は次に、c-Maf欠損マクロファージの遺伝子発現プロファイルの解析により、CCL8の他にIL-10やFgl2といった遺伝子が、c-Mafにより正に制御されていることを見いだした。一方で、c-Maf欠損により、SLPIやVEGFaといった遺伝子群の発現が有意に亢進することを見いだした。これらの発現亢進遺伝子のいくつかは、別の転写因子であるNrf2により正に制御されていることが報告されていた。そこで我々は、これらの遺伝子のプロモーター解析を行い、c-MafとNrf2が拮抗作用を有することを見いだした。

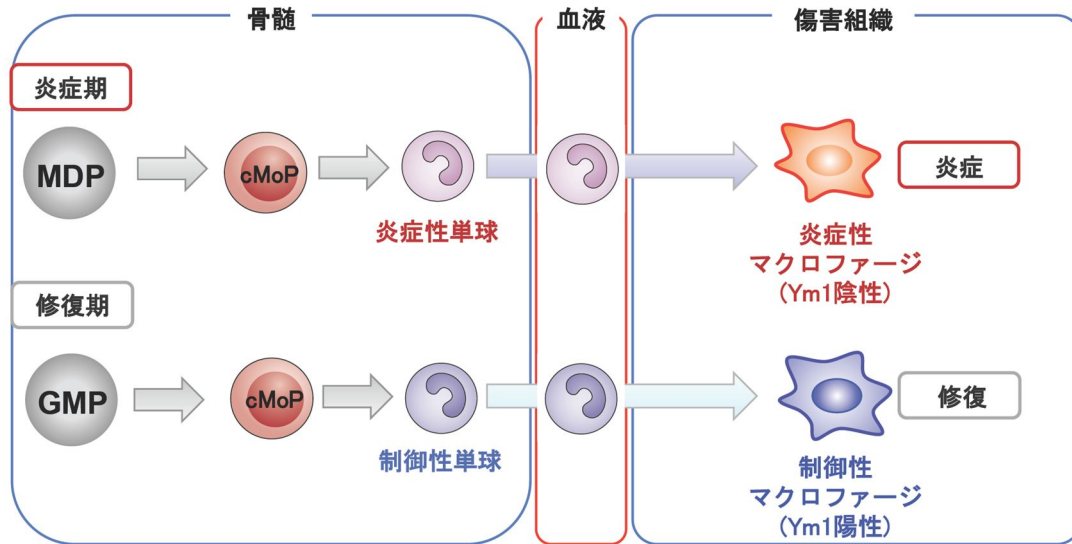
我々はさらに、腸炎の炎症期から修復期への移行に際し、CD169マクロファージにおけるc-Maf発現量が変化することを見いだした。すなわち、マクロファージに炎症刺激が加わると、c-Maf依存的なサイトカイン産生が見られると同時に、c-Mafが転写レベルおよびタンパクレベルでその量が減少し、その結果としてc-Mafと拮抗関係にある別の転写因子であるNrf2による転写活性が、相対的に上昇することを明らかにした。Nrf2は酸化ストレスに対する耐性や抗炎症に関与する転写因子であることから、c-MafとNrf2の転写活性のバランスが変化することによって、CD169マクロファージが修復期に適応した形質を獲得することが明らかとなった。



(2) 修復期に出現する炎症抑制性単球の同定

我々は、本研究の遂行の過程で、組織傷害の修復期に傷害局所に集積する単球およびマクロファージの解析を端緒として、マウス骨髄並びに血液中のLy6C陽性単球の中に、新規単球サブセット (Ym1⁺Ly6C⁺単球) が存在することを見いだした。Ym1発現細胞を可視化できるマウス (Ym1-Venusマウス) を作製し解析したところ、Ym1⁺Ly6C⁺単球は、健常時には骨髄および末梢血中のLy6C陽性単球のわずか5%程度しか存在しないが、LPS投与により全身炎症を誘導すると、回復期の骨髄で急激に増産されることが分かった。さらに、Ym1⁺Ly6C⁺単球は、腸炎モデルの回

復期にも、その割合が劇的に増加し、局所において炎症抑制性、および組織修復性の遺伝子発現を示すことが明らかになった。さらに、Ym1発現細胞を誘導的に除去できるマウス（Ym1-DTRマウス）を作製し、腸炎の修復期に同細胞を除去すると、組織修復の明らかな遅延が見られた。これらの結果から、Ym1陽性単球は組織傷害の修復期に骨髄で増産され、局所において炎症抑制および組織修復に寄与すると結論づけた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Wei Q, Boulais PE, Zhang D, Pinho S, Tanaka M, Frenette PS.	4. 巻 133
2. 論文標題 Maea expressed by macrophages, but not erythroblasts, maintains postnatal murine bone marrow erythroblastic islands.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1222-1232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2018-11-888180	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 該当する
1. 著者名 Kikuchi K, Iida M, Ikeda N, Moriyama S, Hamada M, Takahashi S, Kitamura H, Watanabe T, Hasegawa Y, Hase K, Fukuhara T, Sato H, Kobayashi EH, Suzuki T, Yamamoto M, Tanaka M, Asano K.	4. 巻 201
2. 論文標題 Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 635-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1800040.	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 Ikeda N, Asano K, Kikuchi K, Uchida Y, Ikegami H, Takagi R, Yotsumoto S, Shibuya T, Makino-Okamura C, Fukuyama H, Watanabe T, Ohmuraya M, Araki K, Nishitai G, Tanaka M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Emergence of immunoregulatory Ym1(+)/Ly6C(hi) monocytes during recovery phase of tissue injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Immunol	6. 最初と最後の頁 eaat0207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.aat0207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deguchi Y, Nishina T, Asano K, Ohmuraya M, Nakagawa Y, Nakagata N, Sakuma T, Yamamoto T, Araki K, Mikami T, Tanaka M, Nakano H.	4. 巻 505
2. 論文標題 Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established Il11-deficient mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 453-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.09.128.	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 Asano K, Kikuchi K, Tanaka M.	4. 巻 164
2. 論文標題 CD169 macrophages regulate immune responses toward particulate materials in the circulating fluid.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 77-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy050.	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 Shinde PV, Xu HC, Maney SK, Kloetgen A, Namineni S, Zhuang Y, Honke N, Shaabani N, Bellora N, Doerrenberg M, Trilling M, Pozdeev VI, van Rooijen N, Scheu S, Pfeffer K, Crocker PR, Tanaka M, Duggimpudi S, Knolle P, Heikenwalder M, Ruland J, Mak TW, Brenner D, Pandya AA, Hoell JI, Borkhardt A, Haussinger D, Lang KS,	4. 巻 92
2. 論文標題 Tumor Necrosis Factor-Mediated Survival of CD169(+) Cells Promotes Immune Activation during Vesicular Stomatitis Virus Infection.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 1637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01637-17	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 該当する

1. 著者名 Yotsumoto S, Muroi Y, Chiba T, Ohmura R, Yoneyama M, Magarisawa M, Dodo K, Terayama N, Sodeoka M, Aoyagi R, Arita M, Arakawa S, Shimizu S, Tanaka M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal, Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15668-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 Wang D, Li Q, Yang Y, Hao S, Han X, Song J, Yin Y, Li X, Tanaka M, Qiu CH.	4. 巻 40
2. 論文標題 Macrophage Subset Expressing CD169 in Peritoneal Cavity-Regulated Mucosal Inflammation Together with Lower Levels of CCL22.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1191-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-017-0562-0.	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 該当する

1. 著者名 Piao X, Yamazaki S, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Nakabayashi O, Kurosawa T, Mikami T, Tanaka M, Van Rooijen N, Ohmuraya M, Oikawa A, Kojima Y, Kakuta S, Uchiyama Y, Tanaka M, Nakano H.	4. 巻 65
2. 論文標題 Depletion of myeloid cells exacerbates hepatitis and induces an aberrant increase in histone H3 in mouse serum.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 237-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.28878.	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 Perez OA, Yeung ST, Vera-Licona P, Romagnoli PA, Samji T, Ural BB, Maher L, Tanaka M, Khanna KM.	4. 巻 2
2. 論文標題 CD169+ macrophages orchestrate innate immune responses by regulating bacterial localization in the spleen.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.aah5520.	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 該当する

1. 著者名 Li Q, Wang D, Hao S, Han X, Xia Y, Li X, Chen Y, Tanaka M, Qiu CH.	4. 巻 8
2. 論文標題 CD169 Expressing Macrophage, a Key Subset in Mesenteric Lymph Nodes Promotes Mucosal Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2017.00669.	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 該当する

1. 著者名 Itoh M, Suganami T, Kato H, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, Goto T, Asakawa M, Hidaka I, Sakugawa H, Ohnishi K, Komohara Y, Asano K, Sakaida I, Tanaka M, Ogawa Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 CD11c+ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 92902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.92902.	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 Arai Y, Takahashi D, Asano K, Tanaka M, Oda M, Ko SBH, Ko MSH, Mandai S, Nomura N, Rai T, Uchida S, Sohara E.	4. 巻 7
2. 論文標題 Salt suppresses IFN γ inducible chemokines through the IFN γ -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 46580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46580	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 Nagata S, Tanaka M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Programmed cell death and the immune system.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Rev Immunol	6. 最初と最後の頁 333-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nri.2016.153	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 Miyagawa Takuya, Hasegawa Kana, Aoki Yoko, Watanabe Takuya, Otagiri Yuka, Arasaki Kohei, Wakana Yuichi, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Yamaguchi Hideki, Tagaya Mitsuo, Inoue Hiroki	4. 巻 218
2. 論文標題 MT1-MMP recruits the ER-Golgi SNARE Bet1 for efficient MT1-MMP transport to the plasma membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3355 ~ 3371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201808149	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 Camara Abdouramane, Cordeiro Olga G., Alloush Farouk, Sponsei Janina, Chypre M?lanie, Onder Lucas, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Yagita Hideo, Ludewig Burkhard, Flacher Vincent, Mueller Christopher G.	4. 巻 50
2. 論文標題 Lymph Node Mesenchymal and Endothelial Stromal Cells Cooperate via the RANK-RANKL Cytokine Axis to Shape the Sinusoidal Macrophage Niche	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1481.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2019.05.008	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 該当する

1. 著者名 Dodo Kosuke, Kuboki Erika, Shimizu Tadashi, Imamura Ryu, Magarisawa Megumi, Takahashi Masahiro, Tokuhiro Takuto, Yotsumoto Satoshi, Asano Kenichi, Nakao Shuhei, Terayama Naoki, Suda Takashi, Tanaka Masato, Sodeoka Mikiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a Water-Soluble Indolylmaleimide Derivative IM-93 Showing Dual Inhibition of Ferroptosis and NETosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00142	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7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 The role of immunoregulatory monocytes in the recovery phase of tissue injury
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 Resolution of inflammation and tissue repair by immunoregulatory monocytes.
3. 学会等名 Cytokines2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 ネトーシスと脂質酸化
3. 学会等名 第26回 日本Cell Death学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 酸化脂質によるneutrophil extracellular trap の形成
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ形成における脂質酸化の関与
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 ネトーススにおけるリン脂質酸化の関与
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正人
2. 発表標題 免疫制御性単球の同定と組織傷害における役割
3. 学会等名 第40回日本炎症再生医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 S.Nagata & H.Nakano (eds.) Tanaka M, Nishitai G, et al.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 SPRINGER-VERLAG	5. 総ページ数 183
3. 書名 Current Topics in Microbiology & Immunology, Vol.403 p.171-183 Immune Regulation by Dead Cell Clearance.	

〔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
研究 分担者	大村谷 昌樹 (Ohmuraya Masaki) (60398229)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
連携 研究者	高橋 智 (Takahashi Satoru) (50271896)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	