

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08659

研究課題名(和文)好中球によるマクロファージ変容機序の解明～癌と結核の共通分子基盤を切り口にして～

研究課題名(英文) Regulation of macrophages polarization by neutrophils: implication in tuberculosis and cancer pathology

研究代表者

水谷 龍明 (Mizutani, Tatsuaki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：50701843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症反応では、炎症を促進するマクロファージ(M1)に加えて、炎症を抑えるタイプのマクロファージ(M2)が誘導される。M1とM2のバランスは、慢性炎症や癌の悪性化と密接な関係にある。本研究では、結核等細菌感染で生じるM2が、好中球発現分子S100A9により積極的に誘導されることを示し、その分子基盤の一端を明らかにした。また、新規に樹立したS100A9遺伝子欠損マウスを用いて、がんの成長や転移に対するS100A9寄与について検討した。その結果、転移を促す分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症反応を抑制するM2マクロファージは、慢性炎症やがんの発症に深く関わるが、その誘導機序は不明な点が多い。本研究は、癌病態を宿主免疫系と癌との慢性共存状態と捉え、細菌の持続感染病態で得られた好中球によるマクロファージのM2誘導メカニズムを追求し、その分子基盤の一端を明らかにした。好中球に着目した炎症抑制機序はこれまでよく知られておらず、本研究結果の学術的意義は大きい。また、癌病態におけるM2誘導機序の解明は、新たながん治療を開発するために重要な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：After tuberculosis infection, the granuloma formed with heterogeneously activated macrophages. We have specified S100A9-expressing neutrophils were adjacent to immunosuppressive M2 macrophages in the granulomas. This observation suggested that S100A9/neutrophils motivated the M2 polarization in macrophages. To reveal this novel macrophage polarization pathway more explicitly, we generated S100A9 knockout (A9KO) mice and analyzed the BCG infection model as well as tumor xenograft model. Results obtained from A9KO studies revealed that the neutrophil-derived S100A9 could induce the M2 polarization in macrophages. Molecular analyses also specified that S100A9 upregulated anti-inflammatory cytokines followed by M2 macrophages polarization, which was critical for tuberculosis pathology. Besides, we noticed that less significant lung metastatic potential in A9KO compared to WT mice. These results potentially emphasize that S100A9 dependent M2 polarization could operate in the metastasis.

研究分野：免疫学

キーワード：慢性炎症 好中球 マクロファージ がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の悪性化に関わる自然免疫系の細胞といえば、専ら M2 マクロファージを中心に議論されていた (Nature 472: 303, 2011)。その一方で、悪性度が高い進行癌や予後不良の癌組織に、高頻度の好中球浸潤が観察されることが報告され (Nat. Rev. Cancer 16: 431, 2016)、癌に浸潤した好中球が癌の悪性化に何らかの重要な役割を持つことが示唆された。ヒト癌で見られる好中球は、桿状核を有した未熟な骨髄前駆細胞として定義される場合が多く、汎用されている分子マーカーとして S100A9 がある。S100A9 は、細胞障害時に細胞外放出されて周囲の細胞に危険を知らせる、いわば細胞障害関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns) の一種であり、細胞外機能としてサイトカインやケモカインに似た機能が示されてきた。ヒト腫瘍において、M2 マクロファージの誘導にこの S100A9 陽性好中球が関与している可能性も考えられるが、S100A9 と M2 マクロファージとの関連性は報告がなく、ヒト腫瘍組織から回収できる細胞数にも限りがあり、好中球とマクロファージの存在証明にとどまっていた。研究代表者は、これまでにサル・モルモットを用いて結核持続感染が成立するメカニズムを追究してきた。特に、結核の持続感染時に生じる肉芽腫に注目することで、結核菌の持続感染や慢性炎症機序に対する解析を続けてきた。肉芽腫は、癌組織と同様に細胞密度が高い特徴的な病巣で、免疫抑制、低酸素、低栄養という微小環境にあり、癌組織と類似している。また、古くから結核菌が感染後年余にわたって生存できるように病巣部で免疫抑制環境が形成されることが示唆されてきた。実際に研究代表者は、肉芽腫病巣に Arginase1 を発現する M2 マクロファージが存在し、さらにその内部に S100A9 陽性好中球が局在することを見出した。研究開始当初は、S100A9 陽性好中球による直接的な作用によって M2 が誘導されることがプリリミナリな実験で示されており、本研究により、その分子基盤解明を目指した。また、S100A9 を起点とした M2 誘導が形成する免疫抑制環境が、前述のとおり、悪性度が高い癌組織における M2 誘導にあてはまるのではないかと考え、担癌モデルや転移癌モデル動物を活用して、好中球 S100A9 による M2 誘導から生じる癌の悪性化機序について検討した。

### 2. 研究の目的

癌に浸潤した好中球は、多様なシグナルを受容することで癌の生育や転移を助長する機能が誘導される。従って、癌微小環境によって特異的に誘導された好中球の生物学的特質の解明が癌克服の重要な糸口となる。研究代表者は、慢性炎症病態の成立基盤に関する研究を展開していたところ、結核持続感染で生じる肉芽腫において S100A9 陽性の好中球サブセットが、免疫抑制型 M2 マクロファージを誘導することを突き止めた。S100A9 陽性好中球及び M2 マクロファージは、悪性度が高い癌において高頻度の浸潤が見られ、癌悪性化と密接な関係にあり、上述の結核研究から得られた知見が癌微小環境においても作動する可能性が高い。そこで本研究では、結核研究で得られた「好中球 S100A9 によるマクロファージ変容」について詳細な分子機序を明らかにし、その分子機序の「癌への応用」を検証する。

### 3. 研究の方法

先行研究では、モルモット肉芽腫モデルから、肉芽腫内部に M2 マクロファージと好中球が集合する特殊な微小環境を見出している。特に、M2 マクロファージの誘導に関わる鍵分子として好中球発現分子 S100A9 が関連することを発見した。本研究では、好中球で高発現する S100A9 分子によるマクロファージの極性制御の分子機序の解明に加えて、癌をはじめとした慢性疾患における重要性を検証する。これまでのモルモットを用いた研究体制から、主としてマウスを研究対象とすることで、生体レベルから分子レベルに至る詳細な機序解明を目指した。主たる研究方法を下記 (1) ~ (3) に示した。

#### (1) S100A9 遺伝子欠損マウス (A9KO) の作製

A9KO 作製は、CRISPR/Cas9 技術を利用した。具体的には、マウス S100A9 遺伝子と gRNA 配列設計ツール ChopChopHarvard (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>) を用いて gRNA 設計を行った。作製した gRNA と hCas9 を発現するプラスミドベクター (pX330-S100A9) を C57/BL6 マウスの受精卵にインジェクションし、最終的に 8 匹の F0 世代を得た。得られた F0 世代の尾からゲノム DNA を精製し、シーケンス解析を行い S100A9 遺伝子上に生じた in/del 変異導入を検出した。

#### (2) マウス BCG 投与におけるマクロファージ及び好中球解析

BCG (Tokyo 株) は 7H9 培地で培養し、 $1 \sim 2 \times 10^8$  cfu/mL のストックを作製した。マウス BCG 感染モデルは、投与量:  $0.1 \sim 5 \times 10^7$  cfu/マウス、投与経路: 皮下、腹腔、静脈などの複数経路を検討した。BCG 投与後の皮膚、肺、肝臓などの臓器は外科的単離からコラゲナーゼ等で細胞を回収し、腹腔投与群は腔内洗浄液を回収することで、BCG 投与後のマクロファージや好中球の活性化や浸潤度について免疫組織化学染色、Western blot、ELISA、FACS、qRT-PCR、細胞免疫染色 (IF) を用いて解析した。

#### (3) マウス担癌モデルにおけるマクロファージ及び好中球解析

野生型又は S100A9 遺伝子欠損マウスに対して、B16F10 細胞などを皮下接種又は静脈投与し、皮下における癌の成長、肺などへの遠隔臓器における転移を組織学的に解析した。また、

B16F10 細胞が観察された臓器をコラゲナーゼなどで処理し、分取した細胞を用いてフローサイトメトリ及び qRT-PCR を用いて、マクロファージや好中球の浸潤率やその性質について(2)と同様の手法で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) A9KO の作製

得られた F0 世代のゲノムシーケンスの結果、8 匹中 5 匹のマウスにおいて S100A9 遺伝子上に in/del 変異導入が認められた。これらの変異導入マウスのうち 3 匹 (個体 A, B, C) は、両アリルに異なる in/del 変異が生じていた。これら 6 種類の in/del 変異のうち、変異型#1 は 1 アミノ酸置換であり、フレームシフトは起こらないと考えられた。タンパク質発現欠損が予想できるものは 5 種類 (変異型#2 ~ #6) であった。変異型#2 は 104 から 127 番目までの塩基がデリベーションされた結果、39 番目のアルギニンがロイシンへ置換され、フレームシフトが生じて 9 アミノ酸先に終止コドンが生じると考えられた。#3 は 122 番目の塩基がデリベーションされて 41 番目のメチオニンがアルギニンに置換され、フレームシフトにより 9 アミノ酸先に終止コドンが生じていると考えられた。#4 は ACAAATG という配列が GAATCA へと置きかわり、40 番目のグルタミンがアスパラギンへと置換され、フレームシフトが起こって 10 アミノ酸先に終止コドンが生じていると考えられた。#5 は 123 番目と 124 番目の塩基の間に T がインサートされ、その結果 41 番目のメチオニンがイソロイシンに置換され、フレームシフトにより 16 アミノ酸先に終止コドンが生じていると考えられた。#6 は 74 から 125 番目までの塩基がデリベーションされ、その結果 27 番目のグルタミン酸がヒスチジンに置換され、フレームシフトにより 6 アミノ酸先に終止コドンが生じていると考えられた。そこで、野生型マウスと各 F0 世代の交配により、上記 5 種のヘテロ変異体 (F1 世代) を得たのち、各変異体のホモ系統を樹立し、骨髓細胞を用いたウェスタンブロットングで S100A9 発現を確認したところ、全系統でタンパク発現が失われていた。このうち、#6 系統を繁殖維持することとして以下の実験に A9KO として用いた。

##### (2) マウス BCG 感染モデルにおける S100A9 依存的マクロファージの活性化

BCG 炎症モデルは、腹腔投与、皮内投与、静脈投与、皮内投与の 4 種類の方法を用いて、それぞれ投与後の炎症応答時期における好中球及びマクロファージに焦点を絞って、解析作業をした。上記の投与方法のうち、腹腔又は皮下投与モデルでは、投与後 24 時間以内に投与箇所好中球の顕著な浸潤が観察され、その後 1 週間程度において好中球とマクロファージが混在する細胞浸潤が観察された。従って、これらの炎症モデルは、1 週間程度まで好中球とマクロファージのダイレクトな相互作用が炎症箇所生じていると考えられ、先行研究のモルモット肉芽腫モデルにおける好中球マクロファージ相互作用を反映する環境として類似性が高いと判断した。そこで、BCG 腹腔投与を行った 5-6 日後の野生型又は S100A9 遺伝子欠損マウス腹腔内に浸潤したマクロファージを分取し、複数の解析手法 (qRT-PCR, ウェスタンブロット、ELISA, IF) で解析したところ、S100A9 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比して、M2 マクロファージ (Arginase1+CD206+IL10+) の有意な減弱が確認された。そこで、野生型マウス骨髓細胞から M-CSF 添加培地で誘導したマクロファージに対して、BCG 腹腔投与後に腔内から回収した好中球を共存培養させたところ、野生型好中球との共培養で見られる M2 誘導が、A9KO 好中球では有意に減少した。これらの結果は、モルモット組織学研究の観察結果を裏付けるものであり、BCG 誘導性好中球による S100A9 依存的 M2 誘導能が明らかとなった。この S100A9 依存的 M2 誘導の分子機序を明らかにするために、BCG 腹腔投与後に腔内に遊走された野生型及び A9KO 好中球を高純度に精製し、RNA 成分を抽出し、考え得る M2 誘導遺伝子の発現レベルを比較した。qRT-PCR の結果、A9KO 好中球において M2 極性を制御するサイトカイン IL-10 の発現が野生型に比べて有意に減少していた。先ほどの共培養実験において、IL-10 受容体をブロックする抗体で処理すると、野生型で誘導される M2 マクロファージが抑制された。S100A9 による IL-10 誘導分子機序について明らかにするべく、A9KO 好中球を活用した網羅的発現遺伝子解析 (RNAseq) を実施し、IL-10 産生に関連する分子群の抽出を完了した。

##### (3) マウス担癌モデルにおける S100A9 依存的マクロファージの活性化

野生型又は S100A9 遺伝子欠損マウスに対して、B16F10 細胞を皮下接種し、3 週間程度、癌の成長をモニタリングしたところ、野生型マウスに比して S100A9 遺伝子欠損マウスにおいて癌の成長速度が有意に増強されることが観察された。癌に浸潤したマクロファージをセルソーターで分離し、M2 マーカー遺伝子の発現レベルを qRT-PCR 及び FCAS で解析したところ、S100A9 遺伝子欠損マウスにおいては、代表的な M2 マーカー発現 (Arg1, CD206) が有意に上がっており、一方で M1 マーカー遺伝子 (NOS2, CD86) が減弱していた。一見して BCG

モデルから想定した S100A9 による M2 誘導と矛盾する結果を得た。一方、B16F10 静脈投与実験においては、野生型で生じる肺転移が、A9KO マウスでは観察されず、血中または肺における癌細胞の生存、生着を S100A9 がサポートすることを示唆した。静脈投与によって生じる M2 マクロファージ誘導については未解析であり、その関連性については結論が得られていない。

本研究の結果、好中球 S100A9 が、抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現をコントロールし、好中球近傍のマクロファージを M2 マクロファージに誘導するといった一連の生体反応を個体レベルで捉えることに成功した。一方で、A9KO のメラノーマ担癌モデルの接種箇所における一連の解析からは、細菌感染で得られた知見とは相反する S100A9 依存的 M1 マクロファージの誘導が観察され、癌の生着や増殖を抑制する機能が明らかとなった。一方で、転移の観点においては、S100A9 が癌転移を促進する因子であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷龍明、吉岡佑弥、杉田昌彦
2. 発表標題 肉芽腫形成を制御するS100A9
3. 学会等名 第29回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷龍明、吉岡佑弥、大内結貴、森田大輔、杉田昌彦
2. 発表標題 結核肉芽腫形成を制御する好中球機能の解明
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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	杉田 昌彦  (Sugita Masahiko)  (80333532)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授    (14301)	