

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15720

研究課題名(和文)分泌型Siglec-9とMCP-1による単球系細胞の炎症組織再生型移行機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of transition from inflammation to regeneration of myeloid cell regulated soluble Siglec-9 and MCP-1

研究代表者

橋本 登 (HASHIMOTO, Noboru)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：90712365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは炎症を誘導するM1型とそれらを抑制し組織修復に働くM2型に分けられる。ケモカインMCP-1と分泌型シアル酸結合レクチンsSiglec-9で構成される新規抗炎症性M2マクロファージ誘導因子が種々の炎症性疾患モデルにおいて抗炎症、組織再生効果をもたらしていることが明らかになっている。本研究課題ではsSiglec-9の抗炎症効果を間質性肺炎、劇症肝炎、アトピー性皮膚炎モデル動物において、種々の炎症性サイトカインの抑制効果と組織改善効果を示すことを明らかにした。sSiglec-9のマクロファージ上のターゲット分子を質量分析法によって解析し、その候補分子として606タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺炎、劇症肝炎、アトピー性皮膚炎など炎症性疾患に対する治療薬はその炎症抑制効果を狙ったものが多く、組織の再生効果を狙ったものはない。本研究では乳歯歯髄幹細胞が分泌する抗炎症組織再生効果を示す分子sSiglec-9とMCP-1に注目し、その効果と標的分子の同定を目指した。これらの詳細なメカニズムが明らかになれば、抗炎症による症状緩和だけでなく組織を修復再生させる画期的な治療法の基盤になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are divided to M1 macrophages involved in pro-inflammation and M2 macrophages involved in the anti-inflammation and tissue repair. An imbalance of M1/M2 polarization associates with homeostatic disruption and disease. We have reported that monocyte-attracting chemokine MCP-1 and soluble sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin (sSiglec)-9 were identified as novel inducers for M2-polarization and their combination repairs several inflammation states of animal models. In this research, sSiglec-9 reduced inflammatory cytokine production in various type of mouse and human macrophages stimulated by IFN gamma and LPS. The combination of sSiglec-9 and MCP-1 ameliorated bleomycin-induced lung fibrosis and D-galactosamine-induced acute liver failure. sSiglec-9 ameliorated ovalbumin-induced atopic dermatitis. We analyzed sSiglec-9 targeting molecules using liquid chromatography-mass spectrometry and identified 606 proteins as candidates of sSiglec-9 binding target.

研究分野：免疫学、糖鎖生物学

キーワード：Siglec-9 炎症 免疫 組織修復 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

白血球の1つであるマクロファージは炎症を誘導するM1型とそれらを抑制し組織修復に働くM2型に分けられ、その円滑な移行は生体の恒常性維持に必須である。一方、それらの破綻が種々の炎症性疾患の発症に関与していることがわかっており、その制御は新規治療ターゲットになりうるとして近年注目されている。我々はヒト乳歯幹細胞培養上精(SHED-CM)がマクロファージをM1型からM2型へ誘導すること、そしてその上清に含まれる分泌型シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン Siglec-9 (sSiglec-9)とMCP-1が新規M2誘導因子である事を発見した。さらに、MCP-1受容体CCR2上の糖鎖がsSiglec-9の標的になっていることを示した。本研究ではその誘導メカニズムと糖鎖を中心とした分子機構を明らかにし、種々の炎症性疾患に対する治療効果及び組織再生を検討して、新規治療戦略の基盤確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究ではすでにM2誘導因子sSiglec-9/MCP-1による治療効果が確認されている肺や肝臓における慢性炎症とそれに伴う線維化に注目し、研究代表者らが明らかにした新規マクロファージM2誘導因子sSiglec-9/MCP-1作用機序の詳細な分子メカニズム解明とその分子標的治療薬開発の検討を目的とする。

### 3. 研究の方法

種々の炎症性疾患に対するsSiglec-9/MCP-1の効果を検討し、その作用機序を明らかにする。そのために以下の検討を行う。

- (1)プレオマイシン誘導間質性肺炎モデル、D-galactose誘発劇症肝炎モデル、ovalbumin誘導アトピー性皮膚炎モデルマウスに対しsSiglec-9、sSiglec-9/MCP-1を投与し、その効果を検討し、作用機序を明らかにすることで単球系細胞の炎症組織再生型移行機構を明らかにする。
- (2)マウスマクロファージ細胞株RAW264.7、マウス骨髄由来マクロファージ、マウス腹腔マクロファージ、ヒト単球由来マクロファージに対する炎症抑制を検討する。
- (3)単球系細胞lysateからsSiglec-9で免疫沈降を行い、その産物に対し質量分析を用い解析し、結合分子を同定する。

### 4. 研究成果

種々の炎症疾患モデル動物に対しsSiglec-9とMCP-1を投与し、その効果と性状を明らかにする。さらにsSiglec-9の標的細胞上分子を質量分析法により明らかにする。そのために以下の検討を行った。

#### (1)間質性肺炎

マウス間質性肺炎モデルにおいて分泌型Siglec-9とMCP-1は体重減少を抑制し、肺組織の改善を誘導することがわかった。(大学院生との共同研究)さらに、その時に肺組織においてM2型のマクロファージの集積と炎症状態の抑制、肺胞内細胞の抗炎症効果を見出した。マウス間質性肺炎モデルにおいて分泌型Siglec-9とMCP-1は体重減少を抑制し、肺組織の改善を誘導することがわかった。さらに、その時に肺組織においてM2型のマクロファージの集積と炎症状態の抑制、肺胞内細胞の抗炎症効果を見出した。

#### (2)劇症肝炎

D-galactosamine誘発劇症肝炎モデルラットに対し肝臓破壊を確認したのちにsSiglec-9/MCP-1を投与すると肝再生促進作用を示すことを報告している。さらにsSiglec-9とMCP-1は種々の炎症性サイトカイン等の発現を抑制することを明らかにしている。(引用文献1)

#### (3)炎症性マクロファージ制御

上記の結果からsSiglec-9とMCP-1は抗炎症、組織再生効果を示すことが明らかになっている。そこでsSiglec-9単独の効果を検討するためにマウスマクロファージ由来細胞株RAW264.7、マウス腹腔マクロファージ、M-CSFで誘導したヒト正常単球由来マクロファージに対する分泌型Siglec-9の抗炎症効果

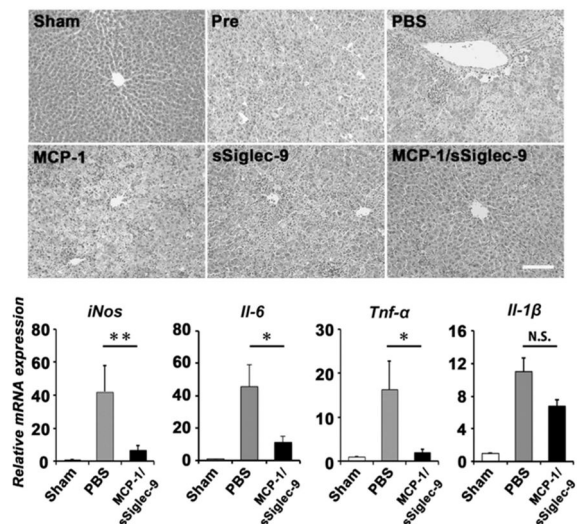


図 1. sSiglec-9/MCP-1 は劇症肝炎の症状を改善させる

を検討した。その結果、sSiglec-9 は IFN $\gamma$  と LPS による炎症性サイトカインの誘導を抑制することがわかった。このことから炎症組織において Siglec-9 単剤でも炎症抑制が引き起こされることが明らかになった。

#### (4)アトピー性皮膚炎モデル

卵白アルブミン (OVA) とアジュバント (Alum) を週一回、3 回免疫した雌性 Balb/c の背中に 1 週間 OVA 接触刺激を行い、AD モデルマウス (OVA-AD) を作成した。可溶性 Siglec-9 を尾静脈から投与し、再度 1 週間 OVA 接触刺激を行った。その結果、皮膚組織における表皮と内皮の肥厚が有意に抑制された。sSiglec-9 を含む乳歯歯髄幹細胞培養上清 SHED-CM を投与した AD マウス脾臓のヘルパー T 細胞の分布をフローサイトメトリー法により解析した。その結果、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-4<sup>+</sup> の細胞である Type 2 helper T cell (Th2) の分布が可溶性 Siglec-9 含有 SHED-CM 投与群で減少していた。AD の病態では異常増殖する表皮細胞において IL-4/IL-13 シグナルによる STAT3 の活性化がみられる。SHED-CM 投与群では対照群に比べ STAT3 の活性化 (p-STAT3) 陽性細胞が減少していた。

#### (5)マクロファージ上 Siglec-9 標的分子の探索

マウス骨髄間質細胞を M-CSF で誘導した骨髄由来マクロファージに対し可溶性 Siglec-9 と MCP-1 で刺激した細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、F4/80 と CD206 発現細胞が対象群では 7% 陽性であったのに対し、可溶性 Siglec-9 と MCP-1 処理群では 35% 陽性になっていた。また平均蛍光強度も約 6 倍高くなっていることがわかった。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 とマウス骨髄由来マクロファージ上の Siglec-9 のリガンド糖鎖キャリアタンパクの同定を行うために、細胞溶解サンプルに Siglec-9-Fc を加え Protein A beads で pull-down した産物に対し、そのタンパク成分の LC/MS による網羅的解析を行った。その結果、コントロールサンプル と合わせて 606 タンパクが同定された。現在、その中で Siglec-9 特異的なタンパクを絞り込み、その意義を検討している。

#### <引用文献>

Takanori Ito, Akihito Yamamoto et al., Secreted Ectodomain of SIGLEC-9 and MCP-1 Synergistically Improve Acute Liver Failure in Rats by Altering Macrophage Polarity, Sci rep. 2017, 7:44043

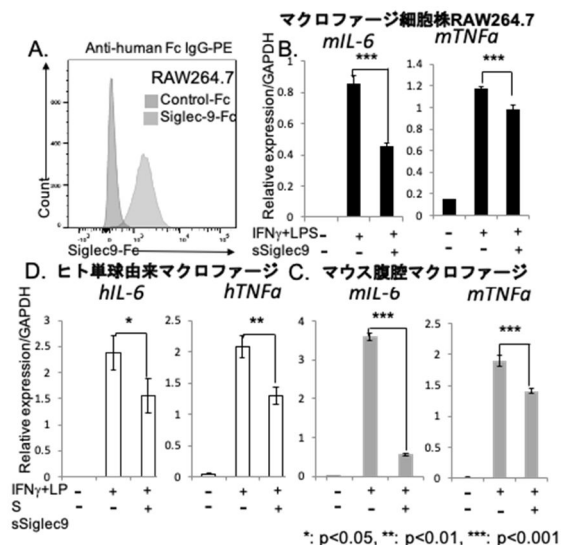


図 2.単球系に対するsSiglec-9の抗炎症効果

AD の病態では異常増殖する表皮細胞において IL-4/IL-13 シグナルによる STAT3 の活性化がみられる。SHED-CM 投与群では対照群に比べ STAT3 の活性化 (p-STAT3) 陽性細胞が減少していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furukawa Koichi, Ohmi Yuhsuke, Ji Shuting, Zhang Pu, Bhuiyan Robiul H., Ohkawa Yuki, Tajima Orië, Hashimoto Noboru, Furukawa Keiko	4. 巻 1861
2. 論文標題 Glycolipids: Essential regulator of neuro-inflammation, metabolism and gliomagenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta	6. 最初と最後の頁 2479 ~ 2484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2017.06.007	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 Esaki Nobutoshi, Ohkawa Yuki, Hashimoto Noboru, Tsuda Yuhsuke, Ohmi Yuhsuke, Bhuiyan Robiul H., Kotani Norihiro, Honke Koichi, Enomoto Atsushi, Takahashi Masahide, Furukawa Keiko, Furukawa Koichi	4. 巻 109
2. 論文標題 ASC amino acid transporter 2, defined by enzyme-mediated activation of radical sources, enhances malignancy of GD2-positive small-cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 141 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13448	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 Furukawa Koichi, Ohmi Yuhsuke, Tajima Orië, Ohkawa Yuki, Kondo Yuji, Shuting Ji, Hashimoto Noboru, Furukawa Keiko	4. 巻 156
2. 論文標題 Gangliosides in Inflammation and Neurodegeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Progress in Molecular Biology and Translational Science	6. 最初と最後の頁 265 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.pmbts.2018.01.009	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 Bhuiyan Robiul H., Ohmi Yuhsuke, Ohkawa Yuki, Zhang Pu, Takano Maiko, Hashimoto Noboru, Okajima Tetsuya, Furukawa Keiko, Furukawa Koichi	4. 巻 397
2. 論文標題 Loss of Enzyme Activity in Mutated B4GALNT1 Gene Products in Patients with Hereditary Spastic Paraplegia Results in Relatively Mild Neurological Disorders: Similarity with Phenotypes of B4galnt1 Knockout Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 94 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.11.034	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 Hashimoto Noboru, Ito Shizuka, Tsuchida Akiko, Bhuiyan Robiul H., Okajima Tetsuya, Yamamoto Akihito, Furukawa Keiko, Ohmi Yuhsuke, Furukawa Koichi	4. 巻 294
2. 論文標題 The ceramide moiety of disialoganglioside (GD3) is essential for GD3 recognition by the sialic acid-binding lectin SIGLEC7 on the cell surface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10833 ~ 10845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.007083	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 Furukawa Koichi, Ohmi Yuhsuke, Ohkawa Yuki, Bhuiyan Robiul H., Zhang Pu, Tajima Oriie, Hashimoto Noboru, Hamamura Kazunori, Furukawa Keiko	4. 巻 110
2. 論文標題 New era of research on cancer associated glycosphingolipids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1544 ~ 1551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14005	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 Nao Ogasawara, Fumiya Kano, Noboru Hashimoto, Hiroki Mori, Yao Liu, Linze Xia, Takuma Sakamaki, Hideharu Hibi, Tsutomu Iwamoto, Eigi Tanaka, Akihito Yamamoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental temporomandibular joint osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 831 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2020.03.010	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 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本 登、河原林啓太、Liu Yao、山本 朗仁
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞由来培養液を用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける治療効果の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 登、伊藤 静香、土田 明子、Robiul H. Buiyan、岡島 徹也、山本 朗仁、古川 圭子、大海 雄介、古川 鋼一
2. 発表標題 シアル酸結合レクチン Siglec7 のガングリオシド GD3 認識に対する セラミド構造の影響
3. 学会等名 第 38 回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 登、加納 史也、河原林啓太、Liu Yao、山本 朗仁
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞由来培養液における皮膚炎モデルマウス治療効果因子のプロテオーム解析
3. 学会等名 第 19 回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----