

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24004

研究課題名(和文) 全身性強皮症におけるM4マクロファージの役割

研究課題名(英文) The roles of M4 macrophages in Systemic Sclerosis.

研究代表者

井関 ゆう子 (Iseki, Yuko)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50723045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性強皮症(SSc)は、皮膚やさまざまな臓器の線維化、血管内皮障害、免疫異常を主要3病態とする原因不明の膠原病である。単球及びマクロファージがSScの病態に重要な役割を果たすことが報告されています。本研究では、SSc末梢血中のM4単球/マクロファージの割合が健常人と比較して有意に高いことが明らかとなった。CXCL-4によって誘導されたM4単球/マクロファージがSScの病因において重要な役割を果たす可能性があることが示唆された。しかし、M4単球/マクロファージに特徴的なマーカーは確立されておらず、今後さらに分析する必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は難治性の膠原病であり、治療法が確立されていないのが現状である。

M4単球/マクロファージが全身性強皮症の病態に関与している事が判明すれば、M4単球/マクロファージを標的とする新規治療の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Systemic scleroderma (SSc) is a collagen disease of unknown cause, with fibrosis of the skin and various organs, vascular endothelial damage, and immune disorders. It has been reported that monocytes and macrophages play an important role in the pathogenesis of SSc. Here we identified that the percentage of M4 monocytes / macrophages in peripheral blood in patients with SSc is significantly higher compared to those in healthy controls. It was suggested that CXCL-4 induced M4 monocyte/macrophage may play important roles in pathogenesis of SSc. However, the markers characteristic of M4 monocytes / macrophages have not been established, and further analysis should be necessary in the future.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：全身性強皮症 単球 マクロファージ CXCL4

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

SSc は皮膚および諸臓器の線維化、血管内皮障害、免疫異常を主要3病態とする原因不明の膠原病である。現在まで TGF- $\beta$ 1 や PDGF など線維化シグナル分子を標的とした治療が行われるも、いずれも有効性が認められず、新規治療薬の開発が望まれている。

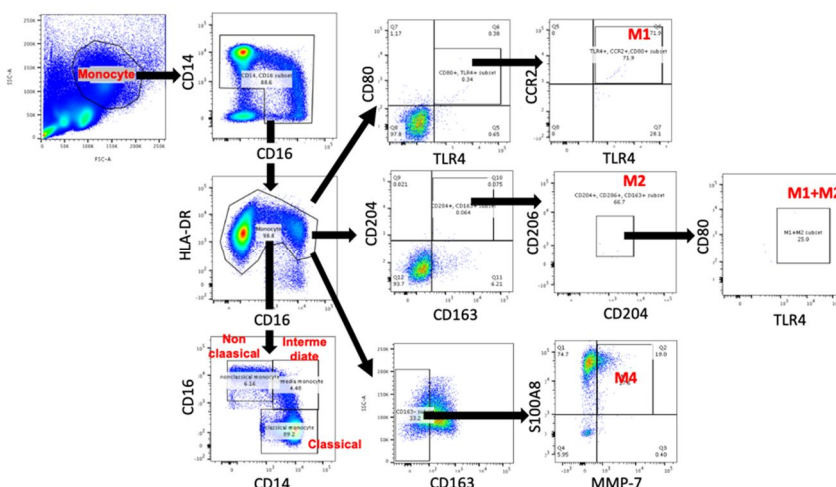
近年、マクロファージ、特に M2 マクロファージと線維化病態との関連性が多く報告され、マクロファージを介した線維化の機序に注目が集まっている。2010年にマクロファージの新たなフェノタイプとしてCXCL4により誘導される M4 マクロファージの存在が提唱された (J Immunol 2010; 184:4810-4818)。2014年にはSSc、特に発症早期びまん型(diffuse cutaneous; dc)SSc患者においてCXCL4が高値であり、有用なバイオマーカーであることが報告された(N Engl J Med. 2014 Jan 30; 370(5): 433-443)。CXCL4は、血小板の顆粒中に存在し、血小板の活性化とともに放出される。SScにおいては、以前より血小板の慢性的な活性化が報告されており、血小板由来因子による血管内皮細胞の活性化が線維化病態の形成に関与していると言われている(Curr Opin Rheumatol 2007; 19 (6):574-9)。また、2018年には形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell; pDC)がTLR8を介してCXCL4を産生し、皮膚の線維化を誘導することが報告された(Sci Transl Med 2018 Jan 10;10:(423))。しかしながら、検索する限りSScの病態とM4マクロファージの関連性を追求した論文はなく、M4マクロファージがSSc発症早期の病態形成に関与している可能性を考え分子機構を解明することとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、SScの病態に重要と考えられているCXCL4により誘導されると報告されているM4マクロファージの特徴及びSSc病態における役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

健康人およびSSc患者の末梢血から比重遠心法を用いて末梢血単核球を分離した。マルチカラーフローサイトメトリーにてCD14<sup>+</sup>、Classical、Intermediate、Non classical、M1(CD80<sup>+</sup>,CCR2<sup>+</sup>,TLR4<sup>+</sup>)、M2(CD163<sup>+</sup>,CD206<sup>+</sup>,CD204<sup>+</sup>)、M1+M2(CD163<sup>+</sup>,CD206<sup>+</sup>,CD204<sup>+</sup>,CD80<sup>+</sup>,CCR2<sup>+</sup>,TLR4<sup>+</sup>)、M4(CD163<sup>+</sup>,S100A8<sup>+</sup>,MMP7<sup>+</sup>)単球/マクロファージ分画の解析を行った。



また、健康人の末梢血から比重遠心法を用いて末梢血単核球し、さらに磁気ビーズ法によ

りCD14<sup>+</sup>単球を分離した。分離したCD14<sup>+</sup>単球をG-CSF、G-CSF+IFN- $\gamma$ +LPS、G-CSF+IL-4+IL-13、CXCL4により分化誘導したM0、M1、M2、M4マクロファージにおけるCD14、CD80、CD163、S100A8、MMP-7の発現を解析し、各マクロファージにおける特徴的のマーカ-を検討した。

#### 4. 研究成果

1) CD14<sup>+</sup> Monocyte、Classical Monocyte、Intermediate Monocyte、Non Classical Monocyte、M1 Monocyte、M1+M2 Monocyteの割合はSSc患者と健常人において有意差を認めなかったが、M2 Monocyteの割合はSSc患者において有意に高かった。また、CD163<sup>-</sup> Monocyte及びM4 Monocyte(CD163<sup>-</sup>, S100A8<sup>+</sup>, MMP7<sup>+</sup>)の割合はSSc患者において有意に高い結果であった(図1)。

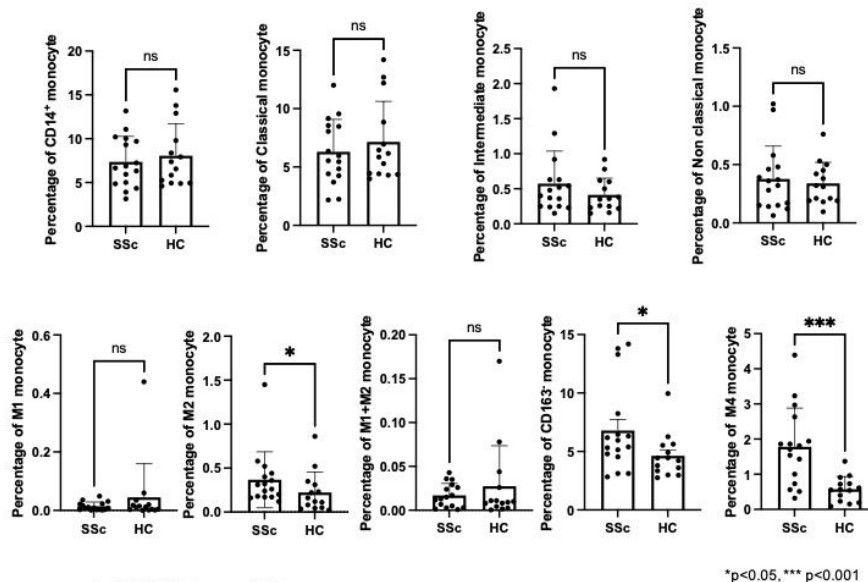


図1. 各種単球分画の割合

今回SScと健常人の末梢血単核球の単球分画において、既存の単球フェノタイプに加え、新規フェノタイプであるM4マクロファージの割合を解析した。既報通り、M2 Monocyteの割合は健常人に比べてSScで増加していた。2018年にSoldanoらによりSSc患者の末梢血中においてM1及びM2両方のマーカ-が共発現している単球(M1+M2 Monocyte)が増加していると報告された(Ann Rheum Dis.2018;77(12):1842-1845)。しかし、今回の検討においてはM1+M2 Monocyteの割合について有意差が認められなかった。もともとM1+M2 Monocyteの割合が極めて低いこと、解析症例数が少ないこと、今回用いたマーカ-が既報のものとは異なることなどの理由から有意差が出なかった可能性が考えられた。さらに、SScではCD163<sup>-</sup> Monocyte及びM4 Monocyteの割合が高いことが明らかとなった。これらの結果から、CD163<sup>-</sup> monocyte及びM4 MonocyteがSScに特徴的な単球フェノタイプであり、病態に関与している可能性が示唆された。今後さらに解析症例数を増やし、自己抗体、合併症や罹病期間との関連性について解析する予定である。

2) 従来M1マクロファージのマーカ-としてはCD80<sup>+</sup>、M2マクロファージのマーカ-としてはCD163<sup>+</sup>が使用されることが多い。2015年のErbelがM4マクロファージのマーカ-としてCD163<sup>-</sup>、S100A8<sup>+</sup>、MMP-7<sup>+</sup>が有用であると報告している。今回M4マクロファージのマーカ-としてS100A8及びMMP-7が実際にCXCL4で誘導されるM4マクロファージの特徴的なマーカ-として有用であるかどうかを調べる目的に、G-CSF、G-CSF+IFN- $\gamma$ +LPS、G-CSF+IL-4+IL-13、CXCL4により分化誘導したM0、M1、M2、M4マクロファージにおけるCD14、CD80、

CD163、S100A8、MMP-7の発現を解析した。M0、M1、M2 マクロファージについては既報の通り特徴的マーカーの上昇を認めた。しかし、M4 マクロファージの特徴的マーカーとして報告されているS100A8及びMMP-7については、M0、M1、M2、M4 マクロファージ全てにおいて陽性となることが明らかとなった。CD163については、既報通りM4 マクロファージで陰性であった。今回の解析では、M4 マクロファージの表現型としてはCD14<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup>CD80<sup>-</sup>S100A8<sup>+</sup>MMP-7<sup>+</sup>であった。今回解析したマーカーではM0、M1、M2、M4 マクロファージを区別するには不十分であり、M4 マクロファージに特徴的なマーカーを再度検討する必要があると考えられた。今後異なる誘導コンディションにより誘導されたマクロファージの遺伝子発現を網羅的に解析することにより特徴的マーカーの抽出が可能となる可能性が示唆された。近年、M1やM2といった状態変化のみならず、疾患特異的サブタイプが存在することが報告されている。長年、SScの線維化病態にはM2 マクロファージが重要な役割を果たしていると言われていたが、近年M1/M2両者のマーカーを有するマクロファージが増加していることが報告された(Ann Rheum Dis.2018;77(12):1842-1845)。M4を含めたM1/M2以外のフェノタイプ/サブタイプがSSc病態に重要である可能性が示唆された。

#### 参考文献：

Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophage. J Immunol 2010;184(9):4810-4818

Erbel C, Tyka M, Helmes CM, Akhavanpoor M, Rupp G, Domschke G, Linden F, Wolf A, Doesch A, Lasitschka F, Katus HA, Gleissner CA. CXCL-4-induced plaque macrophage can be specifically identified by co-expression of MMP-7+S100A8+ in vitro and in vivo. Innate Immun 2015;21(3):255-65

Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, Bockler D, Katus HA, Ley K. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophage. Circ Res.2020;106(1):203-11

van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, Farina GA, Stifano G, Mathes AL, Cossu M, York M, Collins C, Wenink M, Huijbens R, Hesselstrand R, Saxne T, DiMarzio M, Wuttge D, Agarwal SK, Reveille JD, Assassi S, Mayes M, Deng Y, Drenth JP, de Graaf J, den Heijer M, Kallenberg CG, Bijl M, Loof A, van den Berg WB, Joosten LA, Smith V, de Keyser F, Scorza R, Lunardi C, van Riel PL, Vonk M, van Heerde W, Meller S, Homey B, Beretta L, Roest M, Trojanowska M, Lafyatis R, Radstake TR. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. N Engl J Med. 2014 Jan 30; 370(5): 433-443

Soldano S, Trombetta AC, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Brizzolara R, Montagna P, Sulli A, Paolino S, Pizzorni C, Smith V, Cutolo M. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2018 Dec 77;12:1842-1845

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Zhixing Jiang , Yuko Ota , Yuichiro Shirai, Yoshioki Yamasaki, Masataka Kuwana   |
| 2. 発表標題<br>The effects of nintedanib on peripheral blood immune cell phenotypes in patients with systemic sclerosis associated with interstitial lung disease (SSc-ILD) |
| 3. 学会等名<br>第65回日本リウマチ学会総会・学術集会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|