

令和元年8月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08531

研究課題名(和文) 抑制型PILR の単球浸潤における役割及びその生体内での生理的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of role of PILRalpha in monocyte infiltration and of its physiological significance in vivo

研究代表者

伊勢 雅子(香山雅子)(Kohyama (Ise), Masako)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40598885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性の細胞表面分子であるPILR がLy6c陰性の単球に高発現し、単球のインテグリンのシグナルを制御していることを明らかにした。また、PILR が細胞細胞接着に關与するインテグリンのシグナルを制御することで、脂肪組織や肝臓への単球の浸潤を負に制御していることを明らかにした。さらに、aged PILR 遺伝子欠損マウスが加齢とともに強皮症様のフェノタイプも示し、皮膚における炎症性リンパ球の浸潤にPILR 分子が關与している可能性も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代病とも言えるメタボリックシンドロームに關連する疾患において、疾患局所に浸潤し組織固有の機能を持ったマクロファージに分化する能力を有する単球が注目されている。申請者らはPILR 分子が単球の組織への浸潤を抑制的に制御していることが明らかにした。このことは逆に、脂肪組織あるいは肝臓への単球の浸潤を防ぐことができれば、肥満や肝臓の纖維化を抑制できることを意味している。つまり申請者らによって明らかとなったPILR 分子による単球の動態の制御によって、これらの疾患の予防あるいは治療に繋げられる成果だと考えている。

研究成果の概要(英文)：Paired immunoglobulin-like type 2 receptor (PILR) is an inhibitory receptor that is mainly expressed on myeloid cells, and negatively regulates neutrophil infiltration during inflammation. However, its role on monocyte has remained unknown. Under both steady-state and inflammatory conditions, monocytes migrate into tissues and differentiate into macrophages. Macrophages in adipose and liver tissues play important roles in tissue homeostasis and pathogenesis of metabolic diseases. We found that PILR controls monocyte mobility through regulating integrin signaling and inhibiting CD99-CD99 binding. Moreover, we found that *Pilra*^{-/-} mice develop obesity and hepatomegaly with fibrosis, and the numbers of macrophages in adipose and liver tissues are significantly increased in *Pilra*^{-/-} mice. These data suggest that immune inhibitory receptor, PILR, plays an important role in the prevention of obesity and liver fibrosis.

研究分野：免疫学

キーワード：単球 浸潤 肥満

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

運動不足や過食により発症する肥満が急増しており、それに起因する糖尿病、高血圧、高脂血症、心血管疾患はメタボリックシンドロームとして注目されている。メタボリックシンドロームをはじめとする代謝病の分子メカニズムを目指している研究の多くは、代謝サイドからの研究がほとんどである。肥満といった慢性炎症などの場合、組織中に存在するマクロファージが活性化されるのみならず血中から単球が浸潤しマクロファージに分化することで、その病態を悪化あるいは逆に治癒させる方向に働く事が分かってきており、疾患における単球の役割の重要性が指摘されている。

我々はこれまでに、組織マクロファージやその前駆細胞の一つである単球の分化誘導機構、及び生体内での役割を研究してきた。そして、脾臓に存在する組織マクロファージの一つである Red pulp macrophage(RPM)の分化を規定している転写因子 Spic の同定に成功した(*Nature*, 2009)。さらに、各組織特有のシグナルが組織特異的なマクロファージの分化を規定しているという仮説のもとに研究を進め、赤血球の代謝産物の一つであるヘムが Spic の発現を誘導することを見出して来た(*Cell*, 2014)。さらに、我々はこれまでに抑制性ペアー型レセプターである PILR α 分子が、好中球の細胞表面に高発現していること、及び炎症局所への浸潤を抑制し過剰な炎症が起こらないようにしていることを明らかにしてきた(*Nature Immunol*, 2012)。また単球は細胞表面分子の発現の違いおよび機能の違いにより2つに分類されるが、これまでにいずれのサブセットも細胞表面膜分子である PILR α を強く発現していることを見いだした(未発表)ものの、未だ単球に於ける PILR α の機能は明らかになっていない。これまでリンパ球の浸潤を制御する分子としてセレクチンやインテグリンなどが知られている。しかし、これらの分子は単球のみならず、T 細胞などの他の免疫細胞の浸潤も制御する分子であり、単球の組織への浸潤を特異的に制御する細胞表面分子はこれまで知られていない。さらに、PILR α 遺伝子欠損(PILR $\alpha^{-/-}$)マウスは加齢とともにメタボリックシンドローム様の疾患を発症し、脂肪組織や肝臓に於いて単球やマクロファージが増加することを見いだしている(未発表)。すなわち、PILR α は単球の肥満をはじめとするメタボリックシンドロームにおける役割を解析するに適したモデルといえる。単球の組織への浸潤における PILR α の役割の解明、及び PILR α による単球浸潤が与えるメタボリックシンドロームへの影響の解析を通し、単球が関与している疾患の治療につなげることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では我々が樹立した PILR α 遺伝子

欠損マウス、抗体及び PILR α -Ig fusion タンパクなどを駆使して、以下を明らかにする。

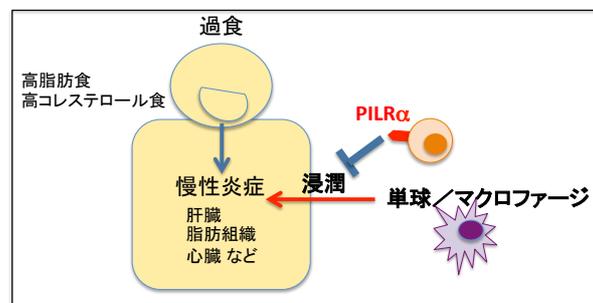
● メタボリックシンドロームにおける PILR α 分子の役割の解明:

PILR $\alpha^{-/-}$ マウスは加齢とともに体重が増加し、また肝臓も肥大化し同時に繊維化も進む(未発表)。

PILR $\alpha^{-/-}$ マウスの解析を中心にこれらの原因を明らかにする。具体的には、脂肪組織や肝臓の病態局所に浸潤する細胞を FACS および組織学的に検討し、メタボリックシンドロームにおける PILR α 分子の役割を明らかにする。

● PILR α 分子による単球の動態制御機構の解析:

ケモカインに対する単球の動態を PILR α がどのような機構で制御しているかを明らかにする。具体的には細胞の浸潤に重要な Rolling・Adhesion・Transmigration のどのステップに関与しているのかを、およびセレクチン/インテグリンとの関係を中心に解析を進める。さらに動態を視覚的に捉えるため二光子顕微鏡および MRI を利用して単球の動態を追跡し、PILR α の単球の機能における役割を明らかにする。



3. 研究の方法

メタボリックシンドロームにおける PILR α 分子の役割の解析

- PILR α マウスにおいて加齢とともに体重の増加が激しくなるだけでなく、体内脂肪および肝臓の肥大が観察される(未発表)。さらにこれらの組織における、マクロファージおよび単球の数もノックアウトマウスで増加している。加齢による病状進行には時間がかかるため、単球の役割の詳細な解析を難しくする。そこで肥満や動脈硬化モデルとして利用されている ApoE マウスと PILR α マウスとを交配した ApoE \times PILR α マウスを作製し、まずその表現型を解析する。具体的には、高脂肪食あるいは高コレステロール食を与え、体重変化、脂肪組織、動脈硬化の病態変化を検討する。さらには、心臓、脂肪組織、あるいは肝臓などの組織への単球、マクロファージの浸潤を FACS および組織染色にて検討する。また、ApoE \times PILR α マウスより単球を分離し、その形態や機能について *in vitro* で検討する。同時に血清中の肥満及び肝機能に関するパラメーターについても検討する。



図1. 加齢PILR α -/-マウス(10ヶ月)では脂肪組織の肥大が認められる

PILR α 分子の単球の組織への浸潤における役割の解析

PILR α の有無によるモノサイトの各組織への移行(浸潤)を *in vivo* にて比較するために、PILR α マウスマウスの血中および骨髄より単球を分離し B6 マウスあるいは肥満誘導マウスに移入し、脾臓、肝臓および脂肪組織への移行を FACS、組織切片、さらには MRI や二光子顕微鏡にて検討する。

- PILR α 分子がセレクチン、インテグリンのリガンドとの結合を阻害する、またはインテグリンシグナルを抑制する事で、血中から組織への浸潤を制御している可能性が考えられる。これらの可能性を検討するために、まずインテグリンやセレクチンをリガンドとしているかを PILR α -Ig を用いて FACS にて検討する。
- PILR α によるインテグリンシグナルの制御を検討するために、単球を PILR α マウスの血液または骨髄より単離し、MCP-1 などのケモカインなどで刺激し、インテグリン活性化の変化をインテグリンのリガンドである ICAM1-Ig を用いて FACS にて検討する。さらに、リンパ球の組織への浸潤の最後のステップである transmigration に重要な CD99 分子が、PILR α のリガンドの一つであることから、CD99 のホモダイマー形成に対する PILR α の役割について CD99-Ig および PILR α -Ig を用いて FACS にて検討する。

単球の組織への浸潤における PILR α 分子の視覚的な解析

- *in vivo* でモノサイトの挙動を追跡するために、CX3CR1 分子の GFP ノックインマウス((CX3CR1 GFP マウス)と PILR α ノックアウトマウスを交配し CX3CR1^{flp} \times PILR α マウスを作成し、GFP の発現を追跡することでモノサイトの挙動を可視化できる系を立ち上げる。そしてこのマウスの定常状態、および LPS、ケモカイン刺激による炎症反応誘導時における単球の挙動を二光子顕微鏡にて検討する。血管内における動態の観察は皮膚(耳)で行うだけでなく、脂肪組織および肝臓へも応用し、組織への浸潤も検討する。さらに、高脂肪食を与え肥満を誘導したマウスでも同様な検討を行う。

PILR α による抑制シグナルの解析

- 細胞内シグナルの生化学的手法による解析(免疫沈降、ウエスタンブロット等)には大量の細胞が必要となる。このためノックアウトマウスの血液や骨髄からのモノサイトの単離では繰り返しの実験が難しい。これを回避するために、まず CRISPR の技術を用いて PILR α 分子を発現する単球細胞株(IC-21, WEHI273,1 など)より、PILR α 遺伝子をノックダウンした細胞を作成する。作成したセルライ

ンを用いて、PILR α 分子による細胞内シグナル伝達の制御を、種々のシグナル伝達分子のリン酸化を中心に検討する。

PILR α 分子の発現制御機構の解析

PILR α 分子の発現制御については全く分かっていない。そこで PILR α の発現を制御している分子(シグナル)の同定も含めた発現制御機構の解析を、PILR α -/-マウスの解析を中心に行う。

4. 研究成果

現代病とも言えるメタボリックシンドロームに関連する疾患において、疾患局所に浸潤し組織固有の機能を持ったマクロファージに分化する能力を有する単球が注目されている。申請者はこれまでに抑制性の細胞表面分子である PILR α が好中球の動態を負に制御していることを明らかにしてきた。マウスにおける単球は Ly6c の発現によって、大きく二つのサブセットに分類される。申請者は PILR α が単球の両サブセットに発現しており、とりわけ Ly6c ネガティブの単球に高発現していることを見出した。このことより、好中球と同様に PILR α が単球の組織への浸潤を制御している可能性が考えられたので、単球の組織への浸潤における PILR α の役割について検討した。その結果、単球においても細胞-細胞の接着に関与するインテグリンのシグナルを PILR α が制御していることを明らかにした。さらに、PILR α がインテグリンのシグナルを制御することで、脂肪組織や肝臓への単球の浸潤を負に制御していることも明らかにした(Eur J Immunol, 2016)。この成果をもとに aged PILR α 遺伝子欠損マウスの解析を進めたところ、予想外にも加齢とともに強皮症様のフェノタイプも示し、強皮症における炎症性リンパ球の浸潤に PILR α 分子が関与している事を明らかにした(投稿中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- ① 香山雅子, 脾臓や肝臓の組織マクロファージとその分化制御機構, 炎症と免疫, 査読無, 2018, 26(3):192-196.
- ② Kayama H, Kohyama M, Okuzaki D, Motooka D, Barman S, Okumura R, Muneta M, Hoshino K, Sasaki I, Ise W, Matsuno H, Nishimura J, Kurosaki T, Nakamura S, Arase H, Kaisho T, Takeda K. Heme ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis through providing intestinal macrophages with noninflammatory profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有, 2018, 115(33):8418-8423. DOI: 10.1073/pnas.1808426115.
- ③ Saito F, Hirayasu K, Satoh T, Wang CW, Lusingu J, Arimori T, Shida K, Palacpac NMQ, Itagaki S, Iwanaga S, Takashima E, Tsuboi T, Kohyama M, Suenaga T, Colonna M, Takagi J, Lavstsen T, Horii T, Arase H. Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors. Nature. 査読有, 2017, 552(7683):101-105. DOI: 10.1038/nature24994.
- ④ 香山雅子, 組織マクロファージのサブセット, 周産期医学, 査読無, 2017, 47(12):1547-1553.
- ⑤ Hiwa R, Ohmura K, Arase N, Jin H, Hirayasu K, Kohyama M, Suenaga T, Saito F, Terao C, Atsumi T, Iwatani H, Mimori T, Arase H. Myeloperoxidase/HLA Class II Complexes Recognized by Autoantibodies in Microscopic Polyangiitis. Arthritis Rheumatol. 査読有, 2017, 69(10):2069-2080. DOI: 10.1002/art.40170.
- ⑥ Kohyama M, Matsuoka S, Shida K, Sugihara F, Aoshi T, Kishida K, Ishii KJ, Arase H. Monocyte infiltration into obese and fibrilized tissues is regulated by PILR α . Eur. J. Immunol. 査読有, 2016, 46(5):1214-1223. DOI: 10.1002/eji.201545897.
- ⑦ Bednarski JJ, Pandey R, Schulte E, White LS, Chen BR, Sandoval GJ, Kohyama M, Haldar M, Nickless A, Trott A, Cheng G, Murphy KM, Bassing CH, Payton JE, Sleckman BP. RAG-mediated DNA double-strand breaks activate a cell type-specific checkpoint to inhibit pre-B cell receptor signals. J Exp Med. 査読有, 2016, 213(2):209-223. DOI: 10.1084/jem.20151048.

- ⑧ Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H. Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2015, 290(32):19833-19843.
DOI: 10.1074/jbc.M114.635508.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Yuriko Muramatsu, Tadahiro Suenaga, Masako Kohyama, Hisashi Arase, Host Molecules Associating with Human Herpesvirus 6(HHV-6, 第 17 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫), 2018/9/5
- ② 岸田 一輝, 香山雅子, 末永忠広, 荒瀬 尚, T 細胞レセプターと同様な抗原特異性を示す抗体による新たな免疫制御機構, 第 28 回 Kyoto T cell Conference, 京都大学(京都), 2018/6/15
- ③ Masako Kohyama, Sumiko Matsuoka, Tatsuya Shishido, Hisashi Arase, Intestinal Epithelial Homeostasis Regulated by CD74, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(宮城), 2017/12/14
- ④ Yuki Sasagawa, Kenji Tanimura, Hui Jin, Noriko Arase, Tadahiro Suenaga, Masako Kohyama, Kouyuki Hirayasu, Satoko Morikami, Yasuhiko Ebina, Tatsuya Atsumi, Hideto Yamada, Hisashi Arase, Antiphospholipid antibody recognizes β 2GPI complexed with HLA class II molecules via its domain V, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(宮城), 2017/12/14
- ⑤ Satoko Morikami, Kenji Tanimura, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Tadahiro Suenaga, Masako Kohyama, Tatsuya Atsumi, Hideto Yamada, Hisashi Arase, Prothrombin complexed with HLA class II molecules is an autoantibody target in antiphospholipid syndrome, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(宮城), 2017/12/14
- ⑥ Kazuki Kishida, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Antigen-specific immune regulation mediated by TCR-like antibodies, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(宮城), 2017/12/14
- ⑦ Yuta Shimizu, Kyoko Shida, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Chemical compounds that specifically inhibit aberrant MHC class II expression, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(宮城), 2017/12/13
- ⑧ Tatsuya Shishido, Masako Kohyama, Kouyuki Hirayasu, Tadahiro Suenaga, Hisashi Arase, Crucial role of CD74 in hematopoietic cell differentiation, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(宮城), 2017/12/12
- ⑨ 香山雅子, 糖鎖認識機構を介した PILRa の単球における役割解析, 糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2017, 東京医科歯科大学(東京), 2017/1/25
- ⑩ Hui Jin, Noriko Arase, Sumiko Matsuoka, Kouyuki Hirayasu, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki and Hisashi Arase, Induction of autoantibody by neo-self TSH receptor / MHC class II complexes, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄), 2016/12/6
- ⑪ Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Sasazuki Takehiko, Arase Hisashi, MHC class II molecules expose autoantibody epitopes on autoantigens, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2015/11/20
- ⑫ Kohyama Masako, Matsuoka Sumiko, Arase Noriko, Arase Hisashi, PILR α negatively regulates monocyte infiltration into the skin, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2015/11/19
- ⑬ Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Saito Fumiji, Iwatani Hirosugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi, Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in ANCA-associated vasculitis, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2015/11/18
- ⑭ 日和良介, 大村浩一郎, 荒瀬規子, 金暉, 平安恒幸, 香山雅子, 末永忠広, 齋藤史路, 岩谷博次, 渥美達也, 寺尾知可史, 三森経世, 荒瀬尚, MPO/HLA class II 複合体は顕微鏡的多発血管炎における自己抗体の標的である, 第 43 回日本臨床免疫学会総会, 神戸国際会議場(兵庫) 2015/10/22

- ⑮ 香山尚子, 香山雅子, 竹田潔, 食餌鉄依存的な腸管 CX3CR1^{high} 制御性ミエロイド細胞維持機構, 第43回日本臨床免疫学会総会, 神戸国際会議場(兵庫) 2015/10/22

[その他]

ホームページ等

大阪大学微生物病研究所免疫化学分野ホームページ <http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp>