

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18873

研究課題名(和文) CD206陽性マクロファージの腸管の恒常性維持及び炎症性腸疾患における役割の解明

研究課題名(英文) Role of CD206 Positive Macrophages in the Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

林 周作 (Hayashi, Shusaku)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：10548217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管粘膜の恒常性維持および炎症性腸疾患におけるCD206陽性マクロファージの役割について、CD206陽性マクロファージを除去可能な遺伝子改変マウス(CD206DTRマウス)を用い研究を行い、以下の成果を得た。

腸管粘膜に存在する腸管マクロファージのうち、CD206陽性マクロファージが抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生細胞として働き、腸管粘膜の恒常性維持に寄与する可能性が示唆された。CD206陽性マクロファージは炎症によって傷害された腸管粘膜の損傷修復を促進することを示した。これらの知見から、CD206陽性マクロファージは炎症性腸疾患における積極的な粘膜修復への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of CD206 positive intestinal macrophages in the mucosal repair after inflammation. We used transgenic mice expressing human diphtheria toxin (DT) receptor under the control of CD206 gene promoter. A part of the resident intestinal macrophages expressed CD206, and about 90% of this population was depleted after DT injection. In the experimental colitis model, the recovery of body weight loss and improvement of disease activity index was significantly delayed in CD206-depleted mice compared with WT mice. The resident intestinal macrophages promoted the wound repair of colonic epithelial cells after the injury. We found that the intestinal macrophages from CD206-depleted mice did not affect the wound repair of colonic epithelial cells after the injury.

The present findings suggest that CD206 positive intestinal macrophages play an important role in the intestinal mucosal repair following inflammatory damage such as inflammatory bowel disease.

研究分野：薬理学、粘膜免疫学

キーワード：炎症性腸疾患 腸管マクロファージ IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は病因不明の慢性炎症疾患である。絶えず外界と接している腸管粘膜においては“寛容と排除”という両極端の反応を支配する腸管粘膜免疫システムが高度に発達している。炎症性腸疾患の病態形成には腸管粘膜免疫システムの異常が関与していると考えられているが、その全貌は明らかにされていない。また、既存の治療法では十分な病態改善が得られないことも多く、炎症性腸疾患の発症・病態形成機構の解明ならびに新規で有用な治療法・治療薬の創出が求められている。

腸管粘膜免疫システムでは腸管の恒常性を維持するために、免疫系細胞をはじめ上皮細胞や間質細胞など多様な細胞が連携している。特に腸管マクロファージは中心的な役割を担うことが知られている。腸管マクロファージにはいくつかのサブセットが存在するが、報告者らは CD206 陽性マクロファージが腸管粘膜免疫システムの制御に関与する可能性を見出した。CD206 はマンノース受容体であり、組織に常在するマクロファージのマーカーとして用いられているが、腸管粘膜における CD206 陽性マクロファージの役割はほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、CD206 陽性マクロファージを特異的に任意の時期で除去可能な遺伝子改変マウス (CD206DTR マウス) を用い、腸管粘膜の恒常性維持における CD206 陽性マクロファージの生理学的な役割を解明する。さらに、炎症性腸疾患病態における CD206 陽性マクロファージの病態生理学的役割の解明を行う。

## 3. 研究の方法

8-12 週齢の CD206DTR マウス (C57BL/6 バックグラウンド) を使用した。

CD206 陽性マクロファージの除去は、CD206DTR マウスにジフテリア毒素 (1-5 µg/kg) を投与し行った。

炎症性腸疾患モデルは、マウスに炎症惹起物質であるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS; 36-50 kDa) の 2% 水溶液を 5-7 日間飲水投与し、その後普通水を 7-14 日間飲水させて作製した。

*In vitro* 損傷修復モデルは、腸管上皮細胞株に人工的に損傷を作製し、経時的に損傷面積を測定し評価した。

## 4. 研究成果

(1) CD206 陽性マクロファージの腸管粘膜における生理学的役割

腸管粘膜における CD206 陽性マクロファージの分布について解析を行ったところ、腸管マクロファージ (F4/80 陽性細胞) は腸管粘膜固有層に一様に局在しており、CD206 陽性マクロファージは、上皮層から遠い深部に

局在していることが明らかとなった。

CD206DTR マウスを用いた解析において、ジフテリア毒素投与 2 日後には、CD206 陽性マクロファージは約 90% 除去されており、7 日後には、CD206 陽性マクロファージは WT マウスと同様に再分布していた。また、ジフテリア毒素投与 2 日後の腸管組織では、マクロファージの遊走に関与する *ccl2* および *cxcl2* の mRNA 発現が WT マウスと比較して有意に上昇していた。これらケモカインの発現上昇は、除去された CD206 陽性マクロファージの前駆細胞を血中から腸管粘膜に動員するために、観察されたと考えられる。また、組織に常在するマクロファージのマーカーである *fizz1* の mRNA 発現は、CD206 マクロファージの除去に伴い低下していたが、*arginase1* および *ym1* の mRNA 発現は変化していなかった。これらの結果から、腸管粘膜に存在する CD206 陽性マクロファージは、他の臓器において定義されている常在型マクロファージとは異なる性質を有することが示唆された。

腸管マクロファージは、抗炎症性サイトカインである IL-10 を高産生することにより腸管粘膜の恒常性維持に寄与することが知られている。CD206 陽性マクロファージを除去した腸管マクロファージは、リポ多糖の刺激による IL-10 の mRNA 発現上昇を示さなかった。このことから、CD206 陽性マクロファージは腸管粘膜において IL-10 の産生細胞として働く可能性が示唆された。

(2) CD206 陽性マクロファージの腸管粘膜における病態生理学的役割

炎症性腸疾患モデルにおいて、2% DSS から普通水に切り換える前日よりジフテリア毒素を CD206DTR マウスに投与し、CD206 陽性マクロファージの除去を行った場合、CD206DTR マウスでは WT マウスに比べて、炎症により傷害された腸管粘膜の修復遅延が認められた。

腸管上皮の *in vitro* 損傷修復モデルにおいて腸管マクロファージを腸管上皮細胞と共に培養すると腸管上皮細胞の損傷修復が促進された。一方、CD206 陽性マクロファージを除去した腸管マクロファージでは、腸管上皮細胞に対する損傷修復の促進作用が消失していた。

## (3) 考察・結論

CD206 陽性マクロファージは、IL-10 産生を介して腸管粘膜の恒常性維持に寄与することが示唆された。また、CD206 陽性マクロファージは、腸管上皮の損傷修復を促進することによって、炎症で傷害された腸管粘膜の修復に関与することが示唆された。

本研究結果から、炎症によって傷害された腸管粘膜の積極的な修復に対して CD206 陽性マクロファージを応用することは、新規で有用な治療法が望まれている炎症性腸疾患

の新たな治療戦略の開拓に繋がる可能性が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 5件)

Hayashi S, Hamada T, Zinsou DGA, Oshiro M, Itoi K, Yamamoto T, Kadowaki M. PI3K p85 $\alpha$  Subunit-deficient Macrophages Protect Mice from Acute Colitis due to the Enhancement of IL-10 Production. *Sci Rep*. 2017; 7: 6187. 査読有.

DOI: 10.1038/s41598-017-06464-w.

Nagata Y, Yamamoto T, Hayashi M, Hayashi S, Kadowaki M. Improvement of Therapeutic Efficacy of Oral Immuno therapy in Combination with Regulatory T Cell-inducer Kakkonto in a Murine Food Allergy Model. *PLoS One*. 2017; 12: e0170577. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0170577.

Yamada-Nomoto K, Yoshino O, Akiyama I, Ushijima A, Ono Y, Shima T, Nakashima A, Hayashi S, Kadowaki M, Osuga Y, Saito S. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonist inhibits the development of endometriosis by regulating inflammation. *Am J Reprod Immunol*. 2016; 76: 491-498. 査読有. DOI: 10.1111/aji.12592.

Yamamoto T, Fujiwara K, Tsubota Y, Kageyama-Yahara N, Hayashi S, Kadowaki M. Induction of Regulatory T Cells as a Novel Mechanism Underlying the Therapeutic Action of Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, in a Murine Food Allergy Model. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016; 169: 146-156. 査読有. DOI: 10.1159/000445433.

Kato S, Hayashi S, Kitahara Y, Nagasawa K, Aono H, Shibata J, Utsumi D, Amagase K, Kadowaki M. Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluoro uracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells. *PLoS One*. 2015; 10: e0116213. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0116213.

#### [学会発表](計 8件)

Hayashi S, Sendo M, Hertati A, Tobe K, Kadowaki M. Role of CD206 Positive Macrophages in the Mucosal Repair after Intestinal Inflammation. KEYSTONE SYMPOSIA -The Resolution of Inflammation in Health and Disease-, 2018, 03, 24-28, Dublin, Ireland.

Hayashi S, Sendo M, Hertati A, Tobe K, Kadowaki M. CD206 Positive Intestinal

Macrophages Contribute to the Colonic Epithelial Wound Healing. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines 2017), 2017, 10, 29-11, 02, Kanazawa.

Hayashi S, Zinsou D, Tobe K, Kadowaki M. CD206 Positive Intestinal Macrophages Accelerate the Colonic Epithelial Wound Healing. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI2017), 2017, 07, 19-22, Washington D.C., USA.

林 周作, ジンス ドナルド, 糸井佳奈, 若林ののか, 門脇 真. IL-10を高産生する腸管マクロファージは急性大腸炎の発症を抑制する. 第 90 回日本薬理学会年会, 2017, 03. 15-17, 長崎.

Hayashi S, Zinsou D, Tobe K, Kadowaki M. CD206 Positive Macrophages is Involved in the Resolution of Intestinal Injury. The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (Chronic Inflammation -Initiation, Progression and Resolution), 2017, 01, 20-21, Suita.

林 周作, 濱田貴之, ジンス ドナルド, 門脇 真. 腸管マクロファージの IL-10 産生亢進を標的とした炎症性腸疾患に対する新規治療戦略. 生体機能と創薬シンポジウム 2016, 2016, 08, 25-26, 仙台.

Hayashi S, Hamada T, Itoi K, Kadowaki M. PI3 Kinase p85 $\alpha$  Subunit-deficient Macrophages Suppress the Development of DSS-induced Acute Colitis due to the Enhancement of IL-10 Production. Digestive Disease Week 2016, 2016, 05, 21-24, San Diego, USA.

林 周作, Yuda, 濱田貴之, 戸邊一之, 門脇 真. 腸管粘膜の修復における CD206 陽性マクロファージの役割. 第 89 回日本薬理学会年会, 2017, 03. 09-11, 横浜.

#### [図書](計 0件)

#### [産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.inm.u-toyama.ac.jp/jp/departments/06\\_gp.html](http://www.inm.u-toyama.ac.jp/jp/departments/06_gp.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

林 周作 (HAYASHI, Shusaku)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：10548217