

令和 2 年 9 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04052

研究課題名(和文) 腸上皮死細胞の発信する腸炎促進シグナル

研究課題名(英文) Immune regulation by dead intestinal epithelial cells

研究代表者

浅野 謙一 (ASANO, Kenichi)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10513400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、腸上皮死細胞培養液が、それ単独ではCCL8産生を誘導しないが、LPS刺激に伴うマクロファージのCCL8産生を促進することを見出した。死細胞培養液をサイズ排除クロマトグラフィーで分画化し、活性成分が分子量約1,000の画分に含まれるペプチドの可能性が高いことを突き止めた。この画分をさらに逆相カラム(C18)でHPLC/MSし、VimentinやhnRNP2b1など、これまで腸炎との関連があまり知られていなかった内因性アジュバントを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年わが国で炎症性腸疾患の罹患患者数が急増しており、新たな治療標的の発見が望まれている。以前に我々は、腸管のCD169マクロファージがCCL8を産生し、腸炎進展に関与することを見出した。抗CCL8抗体はマウスの大腸炎を抑制したことから、マクロファージによるCCL8産生の制御が、炎症性腸疾患の治療戦略策定に寄与すると考え、CCL8産生を促進するシグナル分子同定を目指した。本研究では、腸上皮死細胞から産生される内因性アジュバントが、マクロファージによるCCL8産生を促進することを証明した。今後、これらの分子を同定することで、炎症性腸疾患の急性増悪機序の理解や、治療法開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)： We found that tBHP-treated adult mouse small intestinal epithelial cell (aMos7)-derived conditioned medium (CM) enhances CCL8 production by macrophages that were stimulated in vitro with LPS. The CM alone did not induce CCL8 production by macrophages. These findings suggest that a dead cell-derived factor and bacterial components coordinately promote intestinal inflammation. To identify this dead cell-derived molecule, we fractionated CM from tBHP-treated aMos7 cells by HPLC on sizing column monitored with an ultraviolet spectrum detector. A fraction (approximately 1,000 kDa) that showed CCL8 enhancing activity were further separated by HPLC with a reverse phase (C18) column. Mass spectrometry identified Vimentin and hnRNP2b1-derived peptides that are known as potential endogenous adjuvants. Role of these molecules in the induction of CCL8 by macrophages will be examined by generating Vimentin- or hnRNP2b1-knock-down aMos7 cells by CRISPR/Cas9 method.

研究分野：免疫学

キーワード：CCL8 炎症性腸疾患 死細胞 DAMPs マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究の背景

以前に我々は、消化管の CD169 マクロファージが、上皮傷害とそれに伴う腸内細菌の侵入に応答して CCL8 を産生し腸炎を増悪することを報告した (Asano et al., 2015 Nature Commn.)。さらに抗 CCL8 抗体が DSS 誘導大腸炎の臨床症状を改善することを示し、CD169 マクロファージとそれの産生する CCL8 が腸炎の治療標的として有望なことを証明した。この結果から、炎症状態の大腸には CD169 陽性マクロファージを炎症促進的形質に誘導する、何らかの環境シグナルが存在する、と想定し CCL8 産生誘導機構の解明を目指した。小腸上皮細胞株に死を誘導してその培養液を回収し、これをマクロファージに添加すると、それ単独では CCL8 産生を誘導しなかったが、LPS 刺激によるマクロファージからの CCL8 産生を著明に亢進した。この結果は、腸上皮死細胞培養液中に CCL8 産生を誘導する何らかの炎症促進分子が存在することを意味する。

2. 研究目的

このような背景のもと本研究は、腸上皮細胞死と腸炎進展の関連を分子レベルで解明することを目指した。研究期間内の目標として、

- ① 腸上皮死細胞由来分子を認識するマクロファージ受容体の探索
- ② 腸上皮死細胞に由来するマクロファージ活性化因子の同定
- ③ 腸上皮死細胞由来分子による粘膜免疫制御機能の解析、および腸上皮細胞由来マクロファージ活性化分子の阻害による治療応用

の3点を掲げた。

3. 研究方法

① Wistar ラットに、骨髄由来マクロファージを免疫し、マクロファージに対する抗体ライブラリーを作製した。マクロファージの CCL8 産生を指標に、死細胞由来成分のマクロファージ受容体への結合を阻害する抗体を選別した。その抗体の認識するマクロファージ受容体を質量分析で同定した。

② 死細胞培養液をサイズ排除クロマトグラフィーで分画化し、活性成分を含む画分を、マクロファージの CCL8 産生を指標に絞り込んだ。その画分をさらに逆相(C18)カラムで HPLC し、検出されたピークを質量分析することでペプチド配列を決定した。当該タンパク質を欠損した腸上皮細胞株を作製し、マクロファージの CCL8 産生を促進するか検討した。

4. 研究結果

① 死細胞培養液の CCL8 産生促進効果を阻害する抗体の作製とマクロファージ受容体の探索

選別した抗体の認識するマクロファージ表面分子を質量分析し、CD9 と CD14 を同定した。CCL8 産生におけるこれらの分子の重要性を検討する過程で、CCL8 産生には、LPS と結合した TLR4 が CD14 とともにエンドサイトーシスされ、TRIF を介したシグナル経路を活性化することが重要なことを明らかにした。また LPS と Poly(I:C)がマクロファージの CCL8 産生を強力に誘導するのに対し、Pam3CSK4 刺激では、ほとんど CCL8 産生が亢進しないことが判明した。以上の結果は、CCL8 産生における TRIF 経路の重要性を

示唆する新知見と言えるが、このアッセイ系では、LPS 刺激そのものを阻害する抗体が優先的に選別され、死細胞由来分子の受容体を同定することが困難と考え、②の方法で、死細胞培養液中の活性分子同定を試みた。

② 死細胞培養液に含まれる CCL8 産生促進分子の探索

死細胞培養液の活性は、核酸分解酵素の影響を受けず、加熱処理で減弱したことから、活性成分がタンパク質あるいは脂質である可能性を考えた。死細胞培養液をサイズ排除クロマトグラフィーで分画化し、活性成分が分子量約 1,000 Da の画分に含まれるペプチドの可能性が高いことを突き止めた(図1)。この画分を逆相カラム(C18)で再び HPLC し、検出されたピークを質量分析することでペプチド配列を決定した。このうち最も protein score の高かった、Vimentin と heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPa2b1)に着目し、これらのタンパク質・ペプチドが、マクロファージによる CCL8 産生を促進する可能性を次の 2 つの方法で検討した。

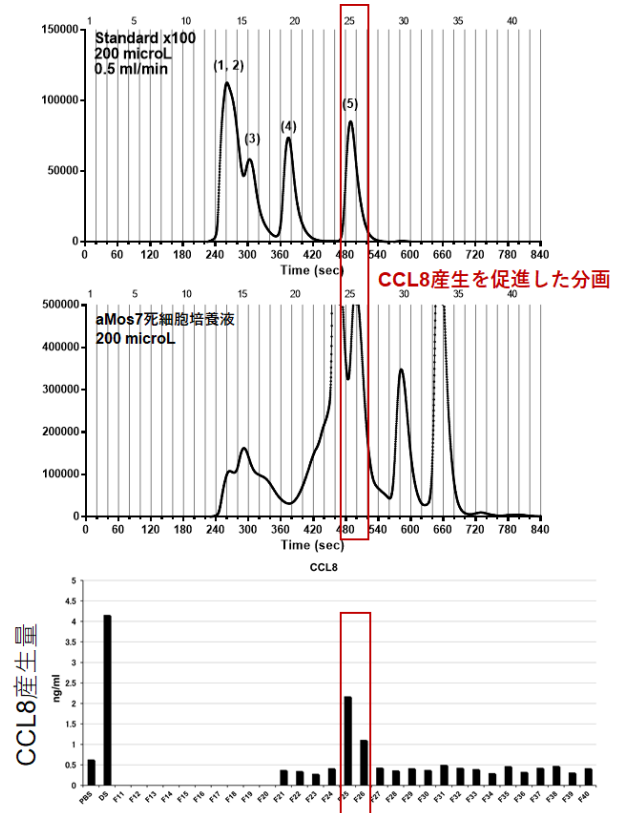


図1 CCL8 産生促進の活性成分は、分子量約 1,000 Da の画分(赤枠)に含まれる。標準液(上段)と aMos7 死細胞培養液(中段)のクロマトグラム。サイズ排除クロマトグラフィーで分画化した死細胞培養液をマクロファージに添加した。それらのマクロファージをさらに LPS 刺激し、培養液中の CCL8 濃度を ELISA で定量した(下段)。

1) 質量分析で検出されたペプチド(10 から 20 アミノ酸)を化学合成して BMDM に添加し、LPS 刺激に伴う CCL8 産生促進効果を検討した。しかし、合成ペプチド(Vimentin 由来 4 種類、hnRNP 由来 4 種類)は、いずれも LPS 刺激に伴う CCL8 産生を促進しなかった。

2) マウス小腸上皮由来細胞株(aMos7)の Vimentin 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムで破壊し、Vimentin 欠損 aMos7 細胞を作製した。aMos7 細胞に、tBHP で細胞死を誘導し、その死細胞培養液の CCL8 産生促進効果を BMDM で検討した。もし、Vimentin あるいはそれに由来するペプチドが、CCL8 産生誘導の責任分子であるならば、Vimentin 欠損株の死細胞培養液を添加した BMDM による CCL8 産生は、親株の死細胞培養液添加した BMDM よりも減少すると考えられる。しかし、Vimentin 欠損株の CCL8 促進活性は、親株と同程度であったことから、Vimentin はマクロファージによる CCL8 産生に必須ではないと結論づけた。

【考察】

本研究により、マクロファージによる CCL8 産生機構の一端が明らかになった。今回 HPLC/MS で同定した死細胞培養液中のペプチドが、菌体由来成分と相乗的に作用し、マクロファージの CCL8 産生を促進する可能性を引き続き検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Friedrich Sarah-Kim, Schmitz Rosa, Bergerhausen Michael, Lang Judith, Cham Lamin B., Duhan Vikas, Haussinger Dieter, Hardt Cornelia, Addo Marylyn, Prinz Marco, Asano Kenichi, Lang Philipp Alexander, Lang Karl Sebastian	4. 巻 8
2. 論文標題 Usp18 Expression in CD169+ Macrophages is Important for Strong Immune Response after Vaccination with VSV-EBOV	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 142 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines8010142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyagawa Takuya, Hasegawa Kana, Aoki Yoko, Watanabe Takuya, Otagiri Yuka, Arasaki Kohei, Wakana Yuichi, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Yamaguchi Hideki, Tagaya Mitsuo, Inoue Hiroki	4. 巻 218
2. 論文標題 MT1-MMP recruits the ER-Golgi SNARE Bet1 for efficient MT1-MMP transport to the plasma membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3355 ~ 3371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201808149	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 Takeya Hiroto, Ohnishi Koji, Shiota Takuya, Saito Yoichi, Fujiwara Yukio, Yagi Taisuke, Kiyozumi Yuki, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Baba Hideo, Komohara Yoshihiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Maf expression in human macrophages and lymph node sinus macrophages in patients with esophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 112 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.19002	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 Camara Abdouramane, Cordeiro Olga G., Alloush Farouk, Sponcel Janina, Chypre M?lanie, Onder Lucas, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Yagita Hideo, Ludewig Burkhard, Flacher Vincent, Mueller Christopher G.	4. 巻 50
2. 論文標題 Lymph Node Mesenchymal and Endothelial Stromal Cells Cooperate via the RANK-RANKL Cytokine Axis to Shape the Sinusoidal Macrophage Niche	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1481.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2019.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikeda Naoki, Asano Kenichi, Kikuchi Kenta, Uchida Yoshimi, Ikegami Hiroki, Takagi Ryo, Yotsumoto Satoshi, Shibuya Takumi, Makino-Okamura Chieko, Fukuyama Hidehiro, Watanabe Takashi, Ohmuraya Masaki, Araki Kimi, Nishitai Gen, Tanaka Masato	4. 巻 3
2. 論文標題 Emergence of immunoregulatory Ym1+Ly6Chi monocytes during recovery phase of tissue injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eaat0207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.aat0207	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 Deguchi Yutaka, Nishina Takashi, Asano Kenichi, Ohmuraya Masaki, Nakagawa Yoshiko, Nakagata Naomi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Araki Kimi, Mikami Tetuo, Tanaka Masato, Nakano Hiroyasu	4. 巻 505
2. 論文標題 Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established Il11-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 453 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Kenta, Iida Mayumi, Ikeda Naoki, Moriyama Shigetaka, Hamada Michito, Takahashi Satoru, Kitamura Hiroshi, Watanabe Takashi, Hasegawa Yoshinori, Hase Koji, Fukuhara Takeshi, Sato Hideyo, Kobayashi Eri H., Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Tanaka Masato, Asano Kenichi	4. 巻 201
2. 論文標題 Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Michiko, Suganami Takayoshi, Kato Hideaki, Kanai Sayaka, Shirakawa Ibuki, Sakai Takeru, Goto Toshihiro, Asakawa Masahiro, Hidaka Isao, Sakugawa Hiroshi, Ohnishi Koji, Komohara Yoshihiro, Asano Kenichi, Sakaida Isao, Tanaka Masato, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 2
2. 論文標題 CD11c+ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.92902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai Yohei, Takahashi Daiei, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Oda Mayumi, Ko Shigeru B. H., Ko Minoru S. H., Mandai Shintaro, Nomura Naohiro, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 7
2. 論文標題 Salt suppresses IFN inducible chemokines through the IFN -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 4件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 浅野 謙一
2. 発表標題 炎症制御性単球・マクロファージの分化制御機構解明
3. 学会等名 マルチオミックスによる遺伝子発現制御の先端的医学共同研究拠点シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei Ogawa, Kenichi Asano, Masato Tanaka
2. 発表標題 Conversion of neutrophils into Ly6G+SiglecF+ cells with neurosupportive phenotype in murine olfactory neuroepithelium
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Asano, Naoki Ikeda, Kenta Kikuchi, Masato Tanaka
2. 発表標題 Immunoregulatory Ym1+Ly6Chi monocytes expand in the bone marrow during the late phase of inflammation and accelerate tissue repair.
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Kikuchi, Masato Tanaka, Kenichi Asano
2. 発表標題 Phenotypic conversion of intestinal CD169+ macrophages by Maf
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Asano, Kenta Kikuchi, Masato Tanaka
2. 発表標題 Phenotypic conversion of tissue macrophages by Maf
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Asano
2. 発表標題 Phenotypic conversion of the colon macrophage phenotype by Maf
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野謙一
2. 発表標題 Mafによる組織マクロファージの形質変化
3. 学会等名 第27回 日本Cell death学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kikuchi, M. Tanaka, and K. Asano
2. 発表標題 A transcription factor c-Maf acts as the molecular switch that converts CD169+ macrophage phenotype
3. 学会等名 5th Annual Meeting of the Intenational Cytokine & Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊池 健太、田中 正人、浅野 謙一
2. 発表標題 転写因子c-MafによるCD169陽性マクロファージの形質制御
3. 学会等名 日本生化学会 関東支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野 謙一、菊池 健太、田中 正人
2. 発表標題 大腸炎を誘導する腸管マクロファージのサブセット
3. 学会等名 日本薬学会 関東支部会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫調節作用を有する単球細胞及びその使用方法	発明者 浅野謙一、西躰元、 田中正人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-097457	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	濱田 理人 (Hamada Michito) (20567630)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	