

機関番号： 17401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390113
 研究課題名（和文） マクロファージの活性化制御におけるスカベンジャー受容体の役割と診断・治療への応用
 研究課題名（英文） ROLE OF SCAVENGER RECEPTORS IN MACROPHAGE ACTIVATION AND THEIR APPLICATION FOR DIAGNOSIS AND THERAPY
 研究代表者
 竹屋 元裕（TAKEYA MOTOHIRO）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
 研究者番号：90155052

研究成果の概要（和文）：

クラス A スカベンジャー受容体 (SR-A, CD204) 欠損マクロファージ (M ϕ) を用いた検討で、SR-A は TLR4 の LPS との結合を競合的に阻害し、M2 M ϕ の抗炎症性機能の一翼を担うことを明らかにした。急性冠症候群では、血中単球に SR-A が誘導され診断マーカーとなり得ることがわかった。ヒト腫瘍組織の検討では、CD163 陽性 M2 M ϕ の浸潤度と膠細胞腫や卵巣癌の悪性度に相関がみられ、M2 M ϕ と腫瘍細胞が STAT3 を介して相互作用を示すことを明らかにした。天然化合物の corosolic acid は M ϕ の M2 分化を抑制し、M ϕ の M2 機能を抑制することで治療効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Using class A scavenger receptor (SR-A, CD204)-deficient macrophages, we disclosed that SR-A suppresses the macrophage activation by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in a competitive manner. The result indicates SR-A plays a pivotal role in the regulation of the LPS-induced inflammatory response. Density of CD163-positive macrophages in tumors positively correlated with the malignant grade of glioma and epithelial ovarian cancer. It was found that M2 macrophages and tumor cells interact via STAT3. By screening natural compounds, corosolic acid was found to suppress M2 polarization of macrophages. This compound could be a potentially new tool for tumor prevention and therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：(1)マクロファージ (2)オルタナティブ活性化 (3)クラス A スカベンジャー受容体 (SR-A, CD204) (4)ヘモグロビンスカベンジャー受容体 (CD163) (5)腫瘍内浸潤マクロファージ (6)STAT3 (7)天然化合物

1. 研究開始当初の背景

スカベンジャー受容体は修飾 LDL をリガンドとするという共通の性質を有し、粥状硬化におけるマクロファージの泡沫細胞化に

関わる受容体として解析が始まった。これまでに 10 種類に及ぶ異なる構造の分子が発見され、それぞれ異なるリガンド特異性を示し、粥状硬化のみならず、マクロファ-

ジの活性化制御にも広く関与することがわかってきた。スカベンジャー受容体ファミリーのなかでも、クラス A スカベンジャー受容体 (SR-A, CD204), MARCO 受容体, CD36, CD68, ヘモグロビンスカベンジャー受容体 (CD163) はマクロファージに強い発現がみられ、マクロファージの活性化を介して、感染防御、生体内代謝制御、腫瘍免疫等におけるマクロファージ機能に深く関与することが明らかになってきている。マクロファージの活性化に関しては、古典的活性化 (M1) 以外にオルタナティブ活性化経路 (M2) が存在することが明らかとなり、オルタナティブ活性化を受けた M2 マクロファージは炎症制御や組織修復に関与し、古典的活性化マクロファージとは異なる形質を示し、スカベンジャー受容体の発現パターンも異なることが報告されている。しかし、スカベンジャー受容体を介したマクロファージの活性化機構については未解明の部分が多く、マクロファージの活性化の違いによるスカベンジャー受容体の発現パターンについても十分な解析がなされていない。

2. 研究の目的

スカベンジャー受容体ファミリーには、分子構造もリガンド特異性も異なる様々な分子が包含され、発現細胞や炎症制御における役割も異なっている。本研究の最初のテーマでは、クラス A スカベンジャー受容体 (SR-A, CD204) を介したマクロファージの活性化制御機構の解析を行い、SR-A (CD204) によるマクロファージ機能制御のメカニズムを明らかにする。次に様々な病態に出現するマクロファージについてスカベンジャー受容体ファミリーの発現パターンを解析し、病態形成への関連を明らかにするとともに、発現パターンの解析による病態診断への応用を目指す。さらに、マクロファージの活性化を制御する天然化合物のスクリーニングを行い、マクロファージの活性化制御に基づく新しい治療法開発の可能性について基礎的検討を加える。

3. 研究の方法

これまでの高濃度酸素暴露肺傷害モデルや心筋梗塞モデルを用いた検討では、SR-A (CD204) 欠損マクロファージでは TNF- α の分泌亢進がみられたが、野生型では、TNF- α の分泌亢進が抑制された。そこで、本研究では SR-A (CD204) のリガンド刺激によるシグナル伝達分子の活性化を SR-A (CD204) 欠損マクロファージと野生型と比較する。さらに、SR-A (CD204) と TLR4 などの TNF- α 誘導性受容体がリガンドを共有して、リガンドとの結合

段階での競合阻害が起こっている可能性について検討する。

次に、マクロファージに特異的に発現されるスカベンジャー受容体である SR-A (204) と CD163 を主体に、M1 および M2 活性化マクロファージにおける発現パターンを解析する。さらにヒト病理検体を用いて種々の病態におけるスカベンジャー受容体ファミリーの発現パターンを解析し、マクロファージの活性化と病態との関連を明らかにする。最後に、共同研究者が保有する天然化合物ライブラリーを用いて、ヒトマクロファージにおける CD163 の発現や IL-10 の産生を制御する物質をスクリーニングし、マクロファージの活性化制御に基づいた病態治療への応用を探る。

4. 研究成果

(1) SR-A (CD204) を介するマクロファージの活性化制御機構の解明

SR-A (CD204) は、M2 マクロファージにおいて発現が増強することが知られている。SR-A 欠損マウスを用いたこれまでの検討から、高濃度酸素暴露肺傷害モデルや急性心筋梗塞モデルでは、TNF- α の産生が亢進し炎症が増強することを見いだした。そこで「SR-A は TNF- α の産生抑制を介して炎症抑制性の M2 マクロファージの機能に関与する」という仮説を立て、LPS による敗血症モデルを用いて検討を加えた。その結果、野生型に比べ SR-A 欠損マウスでは、TNF- α , IL-6, IFN- β の産生が亢進することが明らかになった。さらに、欠損マウスでは、NF- κ B の活性化亢進を初めとする TLR4 を介したシグナル伝達系が野生型に比して、より活性化されていることが分かった。そこで、*in vitro* において TLR4 と SR-A の共通のリガンドである LPS と SR-A 単独のリガンドである酸化 LDL を用いて競合阻害実験を行うと、SR-A は LPS の TLR4 との結合を競合的に阻害することが明らかとなった。この結果から、SR-A による抗炎症作用の一部は、TLR4 のリガンド結合を競合的に阻害することに起因すると考えられた (図 1) (論文投稿中)。

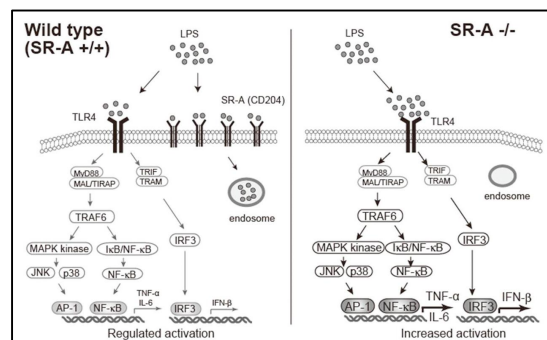


図 1 SR-A による LPS 結合の競合的阻害

(2) マクロファージ活性化の違いによるスカベンジャー受容体の発現パターンの解析と病態の関わり

様々な病態において出現するマクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現パターンを解析するとともに、病態との関連を検討した。まず、急性心筋梗塞をはじめとする急性冠症候群では血中単球においてSR-Aの発現が誘導されることが明らかになった。このことから単球におけるSR-Aの発現は、急性冠症候群の診断と経過を評価するための有用なマーカーとなる可能性が示された(論文番号15)。自己免疫性慢性炎症疾患である強皮症の検討では、炎症の強度に比例してM2マクロファージの浸潤がみられ、その後の線維化に関与する可能性が示唆された(13)。

腫瘍内には多くのマクロファージが浸潤し、腫瘍の増殖や進展に影響を与えていることが知られている。そこで、膠細胞腫におけるマクロファージの活性化を検討すると、悪性度の増加に伴ってオルタナティブ活性化M2マクロファージの腫瘍内浸潤が増強し、腫瘍の増殖を促進していることが示唆された(16)。また、卵巣癌の検討では、膠細胞腫と同様に悪性度に比例してM2マクロファージの浸潤密度が増強し、M2マクロファージが腫瘍増殖に対し促進的に作用する可能性が考えられた(12)。マウスリンパ腫を用いた移植モデルの解析では、SR-A欠損マウスの移植腫瘍内への浸潤マクロファージ数は野生型と同程度であったが、腫瘍増殖が有意に抑制されていた。続いてサイトカン分泌との関連を検討した結果、SR-AはTLR4を介したNOやIFN- γ の産生を抑制することが明らかとなり、このことによって腫瘍増殖に促進的に作用している可能性が考えられた(11)。M2マクロファージと腫瘍細胞の相互作用について、ヒト膠芽腫細胞株やヒト卵巣癌細胞株を用いたin vitroの検討から、signal transducer and activator of transcription-3(STAT3)の活性化が重要であることが明らかとなった(5)。すなわち、腫瘍細胞ではSTAT3の活性化により増殖が誘導され、一方、マクロファージにおいてはSTAT3の活性化によりオルタナティブ活性化が増強されるものと考えられる(図2)。

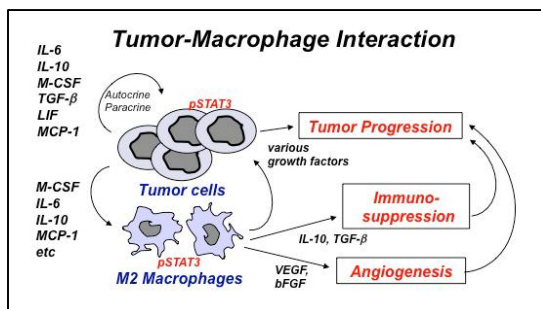


図2 腫瘍細胞とマクロファージの相互作用

(3) マクロファージの活性化を制御する天然化合物の検索

上述の解析結果に基づき、マクロファージの活性化を制御することによって腫瘍増殖を抑制することが可能であると考え、マクロファージのオルタナティブ活性化を抑制する天然化合物のスクリーニングを行った。その結果、バナバやピワに含まれるcorosolic acidが膠芽腫細胞やマクロファージのSTAT3の活性化を阻害し、腫瘍細胞増殖を抑制する事を明らかにした(2,4)。さらにタマネギの成分であるonionin Aにもマクロファージのオルタナティブ活性化を抑制する作用があることを見いだした(2)。今後、これらの化合物を用いて移植腫瘍を用いたin vivoの解析を加えて、マクロファージの活性化制御による治療法開発に発展させたい。

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27件)

(1) Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, Takeya M. Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*, 査読有, in press, 2011

(2) 藤原章雄, 菰原義弘, 池田 剛、竹屋元裕 マクロファージの活性化制御による生活習慣病治療戦略 日本体質医学会雑誌 査読無 73(1) 67-71, 2011

(3) Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, Sakashita N, Takeya M, Tsukamoto S, Ikeda T. Triterpenoids isolated from zizyphus jujuba inhibit foam cell formation in macrophages. *J Agric Food Chem*, 査読有, 59:4544-4552, 2011

(4) Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M. Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3 and NF- κ B in tumor cells and tumor-associated macrophages. *Cancer Sci*, 査読有, 102:206-211, 2011

(5) Takaishi K, Komohara Y, Tashiro H, Ohtake H, Nakagawa T, Katabuchi H, Takeya M. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci*, 査読有, 101:2128-2136, 2010

(6) Higashi-Kuwata N, Masatoshi J, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC,

Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 査読有, 12:R128, 2010

(7) Hasita H, Komohara Y, Okabe H, Masuda T, Ohnishi K, Lei XF, Beppu T, Baba H, Takeya M. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci*, 査読有, 101, 1913-1919, 2010

(8) Niino D, Komohara Y, Murayama T, Aoki R, Kimura Y, Hashikawa K, Kiyasu J, Takeuchi M, Suefuji N, Sugita Y, Takeya M, Ohshima K. Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Pathol Int* 査読有, 60:278-283, 2010

(9) Ohnishi K, Komohara Y, Sakashita N, Iyama K, Murayama T, Takeya M. Macrophages in Langerhans cell histiocytosis are differentiated toward M2 phenotype: their possible involvement in pathological processes. *Pathol Int*, 査読有, 60:27-34, 2010

(10) Takemura K, Sakashita N, Fujiwara Y, Komohara Y, Lei X, Ohnishi K, Suzuki H, Kodama T, Mizuta H, Takeya M. Class A scavenger receptor promotes osteoclast differentiation via the enhanced expression of receptor activator of NF- κ B (RANK). *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 391:1675-1680, 2010

(11) Komohara Y, Takemura K, Lei XF, Sakashita N, Harada M, Suzuki H, Kodama T, Takeya M. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to upregulation of nitric oxide and interferon- γ production by tumor-associated macrophages. *Cancer Sci*, 査読有, 100:2160-2166, 2009

(12) Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int*, 査読有, 59:300-305, 2009

(13) Higashi-Kuwata N, Makino T, Inoue Y, Takeya M, Ihn H. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Exp Dermatol*, 査読有, 18:727-729, 2009

(14) Satoh H, Kiyota E, Terasaki Y, Sawamura T, Takagi K, Mizuta H, Takeya M.

Expression and localization of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in murine and human placentas. *J Histochem Cytochem*, 査読有, 56:773-784, 2008

(15) Nakayama M, Kudoh T, Kaikita K, Yoshimura M, Oshima S, Miyamoto Y, Takeya M, Ogawa H. Class A macrophage scavenger receptor gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells specifically increased in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 査読有, 198:426-433, 2008

(16) Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol*, 査読有, 216:15-24, 2008

[学会発表] (計 29 件)

(1) Takeya M. M2 type of macrophages and tumor microenvironment. Zhejiang University-Kumamoto University Life Science Symposium, December 13, 2010 Zhejiang University (Hangzhou, China)

(2) 竹屋元裕 マクロファージの活性化制御による生活習慣病治療戦略 シンポジウム 2 「体質改善を主眼においた最新の生活習慣病治療法開発」第 60 回日本体質医学会総会 平成 22 年 10 月 16-17 日 熊本パレアホール (熊本)

(3) Takeya M. CD163 as a marker for M2 macrophages in human tissues. CD163 AND INFLAMMATION, WORKSHOP2010, September 8-10, 2010 The Sandbjerg Estate (Denmark)

(4) 菰原義弘、大西紘二、竹屋元裕 脳原発悪性リンパ腫におけるマクロファージ浸潤と臨床予後に関する解析 第 50 回日本リンパ網内系学会総会 平成 22 年 6 月 18-19 日 朱鷺メッセ(新潟)

(5) Komohara Y, Takeya M. Significance of M2 macrophage infiltration in human malignant tumors. Symposium 6: Tumor Microenvironments. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of macrophages 2010, May 20-21, 2010 Kumamoto Parea Hall (Kumamoto)

(6) 藤原章雄 菰原義弘、池田 剛、坂下直実、竹屋元裕 Corosolic acid のマクロファージ活性化制御作用について 第 99 回日本病理学会総会 平成 22 年 4 月 27-29 日 京王プラザホテル (東京)

(7) 大西紘二、菰原義弘、藤原章雄、坂下直実、清田恵美、竹村健一、竹屋元裕 CD204(class A scavenger receptor) は Toll-like receptor 4 の MyD88 依存性及び非依存性シグナル伝達経路を抑制する 第 49

回日本リンパ網内系学会総会 平成21
年7月9-11日 淡路夢舞台国際会議場（淡
路島）

(8) 菰原義弘、竹村健一、坂下直実、竹屋元
裕 腫瘍内浸潤マクロファージにおける
CD204(class A scavenger receptor)発現の
意義 第98回日本病理学会総会 平成21年
5月1-3日 国立京都国際会館（京都）

(9) 大西紘二、菰原義弘、藤原章雄、竹屋元
裕 CD204（クラスAスカベンジャー受容体）
はMyD88依存性と非依存性のTLR4シグナル
伝達経路を抑制する 第98回日本病理学会
総会 平成21年5月1-3日 国立京都国際
会館（京都）

(10) 竹屋元裕 炎症制御におけるマクロフ
ァージのオルタナティブ活性化とクラスAス
カベンジャー受容体 [ワークショップ1：炎
症研究の新しい展開] 第97回日本病理学会
平成20年5月15日 石川県立音楽堂(金沢)

[その他]

ホームページ等

熊本大学・大学院生命科学研究部・細胞病理
学分野

[http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/
patho2/patho2.html](http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/patho2/patho2.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹屋 元裕 (TAKEYA MOTOHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90155052

(2) 研究分担者

坂下 直実 (SAKASHITA NAOMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90284752

菰原 義弘 (KOMOHARA YOSHIHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40449921

藤原 章雄 (FUJIWARA YUKIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70452886