

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591041

研究課題名（和文） 新たなサイトカイン IL-34 を応用したマクロファージ分化・機能発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the regulatory mechanism for differentiation and function of macrophages using a novel cytokine IL-34

研究代表者

鈴 伸也（SUZU SHINYA）

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授

研究者番号：80363513

研究成果の概要（和文）：マクロファージは自然免疫を司る、重要な血液・免疫担当細胞である。そしてその分化や機能はサイトカインと呼ばれる機能蛋白質によって制御される。これまでで特定された主なサイトカインは M-CSF であるが、近年、新たに IL-34 と呼ばれるサイトカインもマクロファージの分化や機能を制御する事が明らかとなった。本研究では、M-CSF と IL-34 が必ずしも同じ作用を示す訳でない事を明らかにし、これらサイトカインの生体内での役割が異なる可能性を示唆する事ができた。

研究成果の概要（英文）：Macrophages are important hematopoietic immune cells that regulate innate immunity, and their differentiation and function are regulated by functional proteins called cytokines. A major cytokine identified so far is M-CSF, but it has been recently found that another cytokine IL-34 also regulates macrophage differentiation and function. In this study, we revealed that these two cytokines differentially regulated macrophages, suggesting that M-CSF and IL-34 have different in vivo role.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：造血学

科研費の分科・細目：血液学

キーワード：マクロファージ・分化・サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージは自然免疫を司る重要な血液・免疫担当細胞である。そして、他の細胞と同じ様に、マクロファージ分化・機能制御もサイトカインによって制御される。中でも、マクロファージコロニー刺激因子（Macrophage colony-stimulating factor; M-CSF）は単球の増殖とマクロファージへの

分化に必須のサイトカインである。実際、機能的な M-CSF を欠損する *op/op* マウスでは末梢単球や多くの組織マクロファージが著しく減少する（Yoshida et al, Nature 1990）。M-CSF は高度に糖鎖修飾されたタンパク質であり、その受容体は Fms と呼ばれる、チロシンキナーゼ型受容体である。M-CSF と Fms についてはこれまでに実に多くの多面的な研

究がなされ、申請者自身も 1987 年から M-CSF 研究を続けてきた。これまでに、M-CSF タンパク質には複数のアイソフォームがある事 (Suzu et al, JBC 1992, Blood 1994, JCI 1994, JI 1997)、M-CSF はマクロファージの抗腫瘍活性を増強する一方で (Suzu et al, Cancer Res 1989) 骨髄ストローマ細胞の増殖も支持する事 (Yamada et al, JCP 1997)、Fms を介したシグナル伝達機構における Dok-2 の役割 (Suzu et al, EMBO 2000)、そして最近ではヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の病原性タンパク質 Nef による Fms シグナルの抑制などを報告してきた (Suzu et al, Blood 2005; Hiyoshi et al, Blood 2008)。M-CSF とその受容体 Fms については基本的な事が分かったかに思えたが、2008 年に米国企業から画期的な報告がなされた。それは Fms には M-CSF と一次構造上全く相同性のない別のリガンド、インターロイキン 34 (IL-34) が存在するというものである (Lin et al, Science 320: 807-811, 2008)。この事実は、単球/マクロファージ系の恒常性維持に Fms シグナルがいかに重要であることを示すと同時に、思ったよりも複雑に Fms シグナルが制御されている事を示している。

申請者もこの報告をもとにヒト IL-34 をクローニングし、その機能について解析を行ってきた。その結果、確かに IL-34 は M-CSF-Fms 結合に拮抗し、ヒト末梢単球のマクロファージ分化を誘導する事を確認した。さらに培養細胞株を用いた検討で、IL-34 による増殖刺激能は Fms を発現させた場合のみに起こる、つまり IL-34 が Fms を機能的な受容体として使う事も確認した。ただ非常に興味深い事に、M-CSF との培養で得られたマクロファージの形態と IL-34 との培養で得られたマクロファージの形態は明らかに違っていた。IL-34 で培養したマクロファージは全般的に小型であった。Science の論文でもマクロファージコロニーの写真を supplemental data として示しており、言及はしていないが M-CSF と IL-34 とでは形成されるコロニーサイズが随分と違うように見える。以上の結果は、同じ Fms を受容体として共有するにもかかわらず、M-CSF と IL-34 の生物活性は同じではない事を示唆する。しかし、その理由と意義は分かっていない。そして、Fms に 2 つのリガンドが存在する根本的な意義も全く分かっていない。それに向けてはまず、この 2 つのサイトカインの生物学的作用が同一なのかを明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

米国 Stanley 博士らの報告にあるように、Fms の欠損はそれだけで末梢単球と多くの組織マクロファージの著しい減少を引き起こす (Dai et al, Blood 2002)。つまり Fms シグナルは他のサイトカイン受容体シグナルでは完全には補完することのできない、単球/マクロファージにとっては不可欠な経路である。従って、単球/マクロファージ系の成り立ちを理解する上では、Fms シグナルがどう制御されるかを完全に解明する必要がある。ではなぜ Fms に 2 つのリガンドが存在するのであろうか。2 番目のリガンド IL-34 の存在は、Fms 欠損マウスの表現型が M-CSF 欠損マウスよりもなぜ重篤なのか (Dai et al, Blood 2002)、という説明には十分かも知れない。恐らく、近い内に、IL-34 欠損マウスおよび IL-34/M-CSF ダブル欠損マウスの作製が報告され、Fms を介したシグナルが単球/マクロファージにとっていかに重要であるかを再確認させてくれるだろう。それでもなお、「なぜ Fms に 2 つのリガンドが必要なのか」という根本的な解決には十分ではない。全体像を理解するには、一方で基本的な知見を積み重ねていくことも重要である。例えば、申請者らは M-CSF の生理的な血清中濃度が約 1ng/mL である事を報告してきたが (Suzu et al, Blood 1991)、IL-34 はどうなのだろうか。M-CSF は多くの細胞/組織で発現するが IL-34 はどうなのだろうか、そしてその発現量は病態などでどう変動するのだろうか。また、そもそも IL-34 と M-CSF は全く同じシグナル経路を動かし、そして本当にも Fms が唯一の受容体なのだろうか。本研究は、単球/マクロファージの成り立ちに Fms シグナルそしてそのリガンド M-CSF と IL-34 がどう関わっているか、その全体像を明らかにするのに必要不可欠である。

以上を踏まえて以下の点を明らかにする事を目的とする。研究全体の構想は、Fms に 2 つのリガンド (M-CSF と IL-34) が存在する事が、単球/マクロファージにとってどのような生理的意義があるのかを明らかにする事である。そのために以下の基本的な点について明らかにする。

- ①IL-34 のタンパク質としての特徴は (2 量体、糖鎖修飾の程度は) ?
- ②機能領域はどこなのか?
- ③in vitro で誘導されるマクロファージの形態がなぜ M-CSF と IL-34 で違う?接着分子などの発現の違いそれとも細胞骨格構造の違い

い?シグナル伝達のパターンあるいは時間的な制御の違いで説明できるのか? Fms に結合後のエンドサイトーシスおよび分解の速度の違いで説明できるのか?

④形態だけでなくマクロファージの機能も違うのか?抗腫瘍活性、貪食能、サイトカイン産生能など

⑤発現する細胞および発現調節機構は同じなのか?

⑥体内での分布やタンパク量は違うのか?

⑦病態での変動パターンは同じなのか?

⑧IL-34 と M-CSF は Fms の同じ部位に結合するのか?

⑨そもそも IL-34、M-CSF とともに Fms が唯一の受容体なのか?

IL-34 と M-CSF の生物活性、特に *in vitro* で培養して得られるマクロファージの形態には明らかな違いが見られ、IL-34 で誘導されるマクロファージは全般的に小型である。本研究でより詳細に表現型(接着分子の発現パターン、細胞骨格、抗腫瘍活性、貪食能、サイトカイン産生能など)がどう違うのかが明らかになる。そして、それら違いがどのような分子機構によるのか(シグナル伝達のパターンあるいは時間的な制御の違い、Fms に結合後のエンドサイトーシスあるいは分解の速度の違いなど)が明らかになる。また、IL-34 に関する基本的な情報(タンパク質としての性質、機能領域、IL-34 の Fms 結合部位、発現する細胞および発現調節機構、体内での分布や存在するタンパク量など)が明らかになる。そして、そもそも M-CSF、IL-34 とともに Fms が唯一の受容体なのか明らかになる。そして、体内(血清中など)での IL-34 存在量や分布を明らかにするために、ヒトおよびマウス IL-34 に対するモノクローナル抗体を作製し、他の研究グループにも積極的に提供する。全ての結果をあわせて、M-CSF と受容体 Fms を共有する新規サイトカイン IL-34 の存在意義を明確にする事を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ①IL-34 の基本性状の生化学的解析

これまでにヒト IL-34 の C 末端に Flag 配列を付加してもその生物活性は保持される事を確認している。そこでこの組換えタンパク質が、単量体あるいは M-CSF と同様に(Suzu et al, Blood 1991) 2 量体で存在するのか、また M-CSF と同じく高度に糖鎖修飾されてい

るかを Western blotting、糖消化酵素などを用いた生化学的解析で明らかにする。また、2 量体化している場合はそれが生物活性に必須かどうか変異体を作製して解析する。

#### ②IL-34 と M-CSF の生物活性の比較

これまでに IL-34 誘導マクロファージの形態が M-CSF 誘導マクロファージの形態とは明らかに違う事を見出している。その理由を明らかにするために、インテグリンなどの接着分子の発現パターンに細胞内骨格などに差があるかを FACS や免疫染色で解析する。またサイトカイン産生能に違いがあるかを ELISA 法あるいは FACS による細胞内染色で解析する。

#### ③IL-34 と M-CSF によって起こるシグナル伝達経路の相違解析

前述したように、少なくとも IL-34 誘導マクロファージの形態は M-CSF 誘導マクロファージの形態とは明らかに違う。そして初年度の研究で、IL-34 と M-CSF がその他の生物活性の点でどう違うかも明らかになる。その結果をふまえてそれらの違いがどのようなシグナル伝達の違いによるかを明らかにする。Fms はチロシンキナーゼなのでチロシンリン酸化タンパク質のパターンそして経時的なパターン変化にも着目して解析する。方法は代表者による既報(Suzu et al, EMBO 2000)に準じて行う。

#### ④IL-34 と M-CSF の Fms への結合部位と結合後の動態解析

なぜ IL-34 誘導マクロファージの形態が M-CSF 誘導マクロファージの形態と違うのかを上記のシグナル解析とは別の 2 つの観点からも解析する。まず、IL-34 と M-CSF は同じ Fms 部位に結合するのかを Fms に対する 4 種類の抗体を用いて明らかにする。M-CSF と Fms の結合は C 末端に Flag 配列を付加した M-CSF を用いて FACS で簡便にモニターできるので(Suzu et al, Blood 2005)、この方法を応用し 4 種の抗体が同じように M-CSF - Fms 結合と IL-34 - Fms 結合を阻害するかを解析する。また、もう 1 つの観点として M-CSF-Flag および IL-34-Flag 結合ののち Fms が同じ速度でエンドサイトーシスされ分解されて行くのかも Western blotting などで(Suzu et al, JCP 2007) 解析する。

#### ⑤ヒト IL-34 の機能領域の同定

さまざまな C 末端欠失変異体を作製しその生物活性を測定し、ヒト IL-34 の機能領域を同定する。生物活性の測定はサイトカイン依存性ヒト白血病細胞株 TF-1 を用いる。ヒト

IL-34はFmsを発現しないTF-1細胞の増殖は刺激しないが、Fmsを発現するTF-1細胞(Suzu et al, JI 1997)の増殖を刺激する事が分かっている。

#### 4. 研究成果

本研究により、マクロファージ分化・表現型に対して、M-CSFとIL-34という、2つのサイトカインが、同一の受容体を介して作用するにもかかわらず、複数の点において異なる生物活性を示す事を初めて明らかにできた。そしてその分子機構の一端を明らかにする事もできた。これらの結果から、生体内においても、M-CSFとIL-34の役割が異なる可能性が示唆された。

主な結果を以下に要約する。M-CSF培養マクロファージとIL-34マクロファージの表現型・機能を、各種アレイ、ELISA、FACSおよび各種バイオアッセイを用い、同時にM-CSFとIL-34で活性化されるシグナル分子・転写因子をWestern blotや各種アレイを用いて比較解析した。まず、マクロファージ生存支持能、表面抗原(CD14、CD16、CD11b、CD18、CD29、CD86、CD163、CD204)の発現、貪食能、HIV-1増殖能に大きな差は見られなかった。しかし、形態に加え、CD54とHLA-DRの発現が異なる事を見出した。さらに炎症性サイトカインやケモカインの産生パターンに違いがある事を見出した。特に、MCP-1及びeotaxin-2の差が顕著であった。一方、シグナル活性化では、その速度と時間経過においてIL-34とM-CSFには明らかな違いがある事を初めて見出した。つまり、IL-34は一過性に強いシグナルを誘導し、M-CSFはそれよりも弱い持続するシグナルを誘導した。M-CSFとIL-34の共通の受容体Fmsだけでなく、その他のシグナル分子(FAK及びShc)でも確認できた。最終年度は更に、マクロファージがM-CSFよりもIL-34に対して強い遊走能を示す事も初めて見出した。そしてこの現象はIL-34とM-CSFとでは刺激後の受容体のエンドサイトーシスとリサイクリングの速度が異なるという結果と良く一致していた。つまり、シグナル活性化と完全に一致して、IL-34は早期に強く受容体エンドサイトーシスを誘導するがすぐに回復し、一方、M-CSFではゆるやか・長期に受容体エンドサイトーシスが進行した。そして、IL-34とM-CSFは共通の受容体Fms上の異なる領域に結合する事も、Fmsの変異体(FMS146E)解析、及び複数の抗Fms単クローン抗体を用いた解

析で明らかにした。最後に、IL-34のC末端を人工的に欠失した変異体を作製して、特にC末端の60アミノ酸はIL-34の生物活性に必須でない事も明らかにした。以上の成果は1報の論文として発表し(Chihara T, Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Motoyoshi K, Kimura F, Okada S. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death and Differentiation* 17, 1917-1927, 2010)、更にもう1報を投稿中である(Hiyoshi M, Chihara T, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Hashimoto M, Bhuyan F, Suzu S. M-CSF and IL-34 regulate their common receptor in different manners but fail to activate mutant receptors discovered in leukoencephalopathy, submitted)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

1. Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Hashimoto M, Tokunaga K, Suzu S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes and Infection* 15, 280-290, 2013 (査読有)
2. Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Bai B, Nakagawa T, Suzu S, Nakamura H, Kuratsu J, Takeya M. Importance of direct macrophage-tumor interaction on progression of human glioma. *Cancer Science* 103, 2165-2172, 2012 (査読有)
3. Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Okada S, Suzu S. HIV-1 Proteins Preferentially Activate Anti-Inflammatory M2-Type Macrophages. *Journal of Immunology* 188, 3620-3627, 2012 (査読有)
4. Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Yoshidomi Y, Chutiwitoonchai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S, Suzu S. HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the Golgi through the Src kinase Hck. *Journal of Cellular Physiology* 227, 1090-1097, 2012 (査読有)
5. Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi

- P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S. The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS One* 6, e27696, 2011 (査読有)
6. Mwimanzi P, Hasan Z, Hassan R, Suzu S, Takiguchi M, Ueno T. Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocytes recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8, 50, 2011 (査読有)
7. 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 Science* 102, 1424-1431, 2011 (査読有)
8. Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H, Suzu S, Okada S. Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into BALB/c and C57BL/6 strain of rag-2/jak3 double-deficient mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 539748, 2011 (査読有)
9. Dikeakos JD, Atkins KM, Thomas L, Emert-Sedlak L, Byeon IL, Jung J, Ahn J, Wortmann MD, Kukull B, Saito M, Koizumi H, Williamson DM, Hiyoshi M, Barklis E, Takiguchi M, Suzu S, Gronenborn AM, Smithgall TE, Thomas G. Small molecule inhibition of HIV-1-induced MHC-I downregulation identifies a temporally regulated switch in Nef action. *Molecular Biology of the Cell* 21, 3279-3292, 2010 (査読有)
10. Chihara T, Suzu S (correspondence), Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Motoyoshi K, Kimura F, Okada S. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death and Differentiation* 17, 1917-1927, 2010 (査読有)
11. Seubwai W, Vaeteewoottacham K, Hiyoshi M, Suzu S, Puapairoj A, Wongkham C, Okada S, Wongkham S. Cepharanthine exerts antitumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF- $\kappa$ B. *Cancer Science* 101, 1590-1595, 2010 (査読有)
12. Towata T, Komizu Y, Kariya R, Suzu S, Matsumoto Y, Kobayashi N, Wongkham C, Wongkham S, Ueoka R, Okada S. Hybrid liposomes inhibit the growth of cholangiocarcinoma by induction of cell cycle arrest in G1 phase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 3680-3682, 2010 (査読有)
13. Shiraishi Y, Gotoh K, Towata T, Shimasaki T, Suzu S, Kojima A, Okada S. Therapeutic effects of  $\gamma$ -irradiation in a primary effusion lymphoma mouse model. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1, 79-84, 2010 (査読有)
14. Towata T, Komizu Y, Suzu S, Ueoka R, Okada S. Highly selective fusion and accumulation of hybrid liposomes into primary effusion lymphoma cells along with induction of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 445-448, 2010 (査読有)
15. Towata T, Komizu Y, Suzu S, Matsumoto Y, Ueoka R, Okada S. Hybrid liposomes inhibit the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo. *Leukemia Research* 34, 906-911, 2010 (査読有)
16. Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H, Tanaka M, Suzu S, Sasaki Y, Okada S. Chronic hepatitis C virus infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 445-448, 2010 (査読有)
- [その他]  
ホームページ  
<http://www.caids.kumamoto-u.ac.jp/data/suzu/index.html>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
鈴 伸也 (SUZU SHINYA)  
熊本大学・エイズ学研究センター・准教授  
研究者番号：80363513
- (2) 研究協力者

千原 隆 (CHIHARA TAKASHI)  
熊本大学・エイズ学研究センター・大学院  
生  
研究者番号：なし