

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461407

研究課題名(和文)新たに同定したマクロファージ分化誘導因子IL-32の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the newly identified macrophage differentiation-inducing factor IL-32

研究代表者

鈴 伸也 (Suzu, Shinya)

熊本大学・エイズ学研究センター・教授

研究者番号：80363513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：M-CSFはマクロファージ(MF)の分化・生存、抗炎症性2型MFを誘導する。一方最近、別のサイトカインIL-32もMF分化を誘導する事が示唆された。本研究ではM-CSFがIL-32の作用に正・負の両面を有する事を発見した。両者共MF生存を支持、組合せで相加が見られたが、HIV-1複製では反対の作用(M-CSFで増強・IL-32で阻害)が見られ、IL-32のHIV-1阻害はM-CSFで中和された。この拮抗はIL-32誘導M1表現型ではないが興味深い事にIL-32誘導M2表現型はM-CSFでむしろ増強された。これら発見はMFでのHIV-1制御、MF生存やM1/M2比の制御機構解明の上で重要である。

研究成果の概要(英文)：M-CSF stimulates differentiation/survival of macrophages (MF) and induces anti-inflammatory M2 but not pro-inflammatory M1 MF. Recently, another cytokine IL-32 was reported to promote MF differentiation. Here, we found that M-CSF has additive/inhibitory effects on IL-32 activities. When added to M-CSF-MF, these cytokines supported MF survival, which was enhanced by their combination. However, they had opposed effects on HIV-1 replication; stimulated by M-CSF and inhibited by IL-32. Anti-HIV-1 activity of IL-32 was cancelled by M-CSF. Such effect of M-CSF was not seen with IL-32-induced M1-like features including high cytokine/chemokine production and CD80 expression. Of interest, IL-32-treated MF showed also M2-like features including high phagocytosis and expression of CD14 and CD163, the latter of which was up-regulated by combination with M-CSF. Our findings help to further understand the mechanisms regulating HIV-1 replication in MF, and the survival and M1/M2 ratio of MF.

研究分野：実験血液学・ウイルス学

キーワード：細胞分化 マクロファージ サイトカイン IL-32

1. 研究開始当初の背景

全ての組織に、多様な形で存在する血液細胞マクロファージは、末梢の単球と呼ばれる前駆細胞が分化して維持されると考えられている。そして、機能的には炎症性の1型(M1)と抗炎症性の2型(M2)に大別される。そして、そのM1/M2のバランスは炎症や感染等への宿主防御とその修復過程に重要な事が明らかとなってきている。

一方、サイトカインと呼ばれる生理活性蛋白質群は、これらマクロファージの分化を誘導する事で、上記の病態過程を間接的に制御する事も分かってきた。例えば、GM-CSFは1型、M-CSFは2型を誘導する事が知られており、この中でM-CSF誘導2型マクロファージは血管新生や免疫抑制作用等により、むしろ腫瘍の増殖と悪性を促進する。つまり、マクロファージ分化は様々な病態と密接に関連し、GM-CSFやM-CSF等のサイトカインは間接的に、その過程を制御する。

大部分の組織マクロファージ分化に必須である事から、我々は特にM-CSFに着目した研究を続けてきた(Suzu et al, EMBO 2000, Blood 2005, Blood 2008, Cell Death Differ 2010, J Immunol 2012 他)。しかしながら、組織毎に形態や機能が異なるマクロファージが果たして、上記2つのサイトカインだけで制御されるとは考えられず、更なる研究が必要とされてきた。

2. 研究の目的

近年、M-CSFやGM-CSFに加え、IL-32と呼ばれるサイトカインが単球をマクロファージに分化させる能力を有する可能性が報告され(文献1)。IL-32は活性化したT細胞やNK細胞が高産生する分泌型の蛋白質として最初に発見された。一方、IL-32を添加した場合、単球・マクロファージ系の細胞株がTNF等の炎症性サイトカインを高発現する事、更には同じ細胞株を用いた実験で、マクロファージへの分化を促進する可能性も示唆された。又、エイズウイルスHIV-1の増殖を抑制する可能性も示唆された。しかしながら、これらは全て腫瘍化した細胞株を用いた実験系で得られた結果であり、ヒト末梢単球や初代培養マクロファージで検証はされていない。そして実際に、IL-32がどの様なマクロファージを分化誘導するのか、詳細な表現型解析もなされていないのが現状であった。又、IL-32の抗HIV-1活性のメカニズムも不明のままである。

他方、IL-32には幾つかユニークな特徴が知られている。先ず、ヒトにはあるものの、マウスにはホモログが存在しない。そして、既存の蛋白質(サイトカインも含めて)とアミノ酸配列上に相同性が全くない。これらの事実から、IL-32はM-CSFやGM-CSFと言ったサイトカインとは異なるマクロファージ分化制御能を有すると予想される。そして、そ

れらはヒトあるいは霊長類に特有のものである可能性も示唆される。以上を踏まえて、本研究ではIL-32がどの様なマクロファージを、どの様なメカニズムで誘導し、そして、どの様にしてHIV-1複製を阻害するかの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) M-CSFは森永乳業より供与された。IL-32はR&D社より購入した。これらサイトカイン材料中のエンドトキシン含量が測定以下である事を確認した後に実験に用いた(文献2)。(2) 初代培養ヒトマクロファージは、既報に従い、同意の得られた健常人の末梢単球をM-CSF存在下に約5日間培養して調製した。その後、M-CSF、IL-32及び両者の存在下(濃度は100 ng/ml)に培養して、以下の解析に用いた。

(3) 細胞内シグナル活性は既報に従い、ウェスタンブロット法で解析した。特にMAPキナーゼ及びNF-κB経路に着目して行った。

(4) マクロファージの生存はMTT試薬を用いた発色法で定量した。

(5) マクロファージにおけるHIV-1複製はHIV-1のGag蛋白質を標的としたELISA及びフローサイトメトリー法で経時的に測定した。細胞核内に組み込まれたHIV-1ゲノムもPCR法で定量した。

(6) マクロファージの表現型はフローサイトメトリー法を中心に解析した(細胞表面分子の発現及び貪食能)。培養上清中へのサイトカインやケモカインの産生はR&D社より購入した抗体アレイを用いて測定した。

(7) 統計学的有意差はpaired student t test解析で判定した。

4. 研究成果

研究結果全体のまとめ図

	M-CSF	IL-32	M-CSF + IL-32
HIV-1 replication	↑	↓	↑
Survival	↑	↑	↑↑
Anti-inflammatory M2 phenotypes	↑	↑	↑↑

結果-1: 細胞内シグナル活性化誘導能、及び生存支持能

先ず、IL-32とM-CSFがマクロファージに対してどの様なシグナル活性化を誘導するかをウェスタンブロット法で比較解析した。M-CSFはMAPキナーゼの活性化は誘導するが、NF-κB経路の活性化は誘導しない事が知られているが、IL-32は両経路とも活性化する事を見出した。興味深い事に、IL-32によるMAPキナーゼ活性化はM-CSFによるものに比べて

非常に緩やかに進行し、その為、M-CSF と組み合わせる事で、MAP キナーゼ活性化が遷延する事を新たに見出した。

一方、両サイトカイン共、マクロファージの生存支持能を有していた。そして組み合わせる事で更に生存が増強される事を新たに見出した。マクロファージの生存に MAP キナーゼが重要な事が知られており、この相加効果と言う結果は、前述のウエスタンブロットでの結果（組み合わせによる MAP キナーゼ活性化の遷延化）と良く一致した。

結果-2 : HIV-1 複製に対する作用

一方、マクロファージにおける HIV-1 複製に対する作用ではマクロファージ生存支持能と対照的な結果が得られた。M-CSF は HIV-1 複製を増強する事が良く知られているが、IL-32 は強く阻害した。そして、この抗 HIV-1 効果が M-CSF 存在下で認められなくなる、つまり M-CSF で拮抗される事を新たに見出した。

この拮抗作用のメカニズムを明らかにする為に、HIV-1 受容体 CD4 の発現を定量した所、IL-32 で有意な発現低下を認めた。しかしながら、この発現低下は M-CSF で回復はしなかった。これらの結果から、IL-32 は CD4 の発現低下とそれ以外の、少なくとも 2 つの過程を障害して HIV-1 複製を阻害する可能性が示唆された。

結果-3 : M1/M2 表現型に対する作用

M-CSF は抗炎症性の M2 マクロファージを分化誘導する事が良く知られているが、IL-32 がどのようなマクロファージを誘導するか明らかにする為に、炎症性 M1 マクロファージに特徴的なマーカー・機能も含めて解析を行った。先ず、IL-32 マクロファージは複数の炎症性サイトカイン・ケモカインを高産生し、共刺激分子 CD80 の高発現が認められる等、M-CSF マクロファージとは異なり、M1 マクロファージ様の性質を示した。一方で非常に興味深い事に、これら M1 表現型に加え、CD14 や CD163 発現、高い貪食能等、M2 表現型も同時に示す事を新たに見出した。そしてこれらが M-CSF 存在下で更に増強される事も見出した。つまり、IL-32 で誘導されるマクロファージは M1 と M2 の両方の性質を併せ持っており、M-CSF で M2 の性質が強くなる事が明らかとなった。

結論及び考察 :

IL-32 抗 HIV-1 活性を有し、それが M-CSF で拮抗される事、マクロファージ生存・及び M2 マクロファージ表現型発現では両者が相加効果を示す事、一方で IL-32 マクロファージは M1・M2 両方のマクロファージの性質を同時に示す事など、本研究により、新たな発見が幾つかなされた（文献 3）。これらの結果は、未だ十分に明らかとなっていない、マクロファージの生存機構、HIV-1 複製制御、M1/M2 表現型制御メカニズムの理解に、今後

貢献すると期待される。

一方、これら M-CSF と IL-32 の相加・拮抗の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。M-CSF の受容体は既に明らかとなっているが、IL-32 については特異的な受容体は同定されておらず、その解明が今後、重要である。

又、今後、HIV-1 感染症も含めて、本研究の結果を病態との関連研究に発展させる事が重要である。その為には例えば、HIV-1 感染者の血清中あるいは組織で IL-32 や M-CSF の量や発現を解析する必要がある。そして、IL-32 がヒトには存在するがマウスに見られないと言う事実との関連研究も重要である。今後、マウスマクロファージとヒトマクロファージが自然免疫の中で果たす役割の違いと、その中での IL-32 の関与と言う観点での研究の進展も考えられる。

<引用文献>

1. Netea MG, Lewis EC, Azam T, Joosten LA, Jaekal J, Bae SY, Dinarello CA, Kim SH. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proc Nat. Acad Sci USA* 105: 3515-352, 2018.
2. 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 Differ* 17: 1917-1927, 2010.
3. Osman A, Bhuyan F, Hashimoto M, Nasser H, Maekawa T, Suzu S. M-CSF inhibits anti-HIV-1 activity of IL-32 but they enhance M2-like phenotypes of macrophages. *J Immunol* 192: 5083-5089, 2014.
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 9 件)

1. Maekawa T, Osawa Y, Izumi T, Nagao S, Takano K, Okada Y, Tachi N, Teramoto M, Kawamura T, Horiuchi T, Saga R, Kato S, Yamamura T, Watanabe J, Kobayashi A, Kobayashi S, Sato K, Hashimoto M, Suzu S, Kimura F. MPL activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia*, in press. doi: 10.1038/leu.2017.112. (査読有)
2. Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M, Noyori O, Nasser H, Miyazaki M, Saito T, Kondoh Y, Osada H, Kimura S, Hase K, Ohno H, Suzu S. Potential role of the formation of tunneling nanotubes in HIV-1 spread in

- macrophages. *The Journal of Immunology* 196: 1832-1841, 2016 (査読有)
3. Hashimoto M, Nasser H, Bhuyan F, Kuse N, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Sakuragi J, Monde K, Maeda Y, Welbourn S, Strebel K, Abd El-Wahab EW, Miyazaki M, Hattori S, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Oka S, Takiguchi M, Suzu S. Fibrocytes differ from macrophages but can be infected with HIV-1. *The Journal of Immunology* 195: 4341-4350, 2015 (査読有)
 4. Ogawa M, Takemoto Y, Sumi S, Inoue D, Kishimoto N, Takamune N, Shoji S, Suzu S, Misumi S. ATP generation in a host cell in early-phase infection is increased by upregulation of cytochrome c oxidase activity via the p2 peptide from human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Retrovirology* 12: 97, 2015 (査読有)
 5. Hashimoto M, Nasser H, Chihara T, Suzu S. Macropinocytosis and TAK1 mediate anti-inflammatory to pro-inflammatory macrophage differentiation by HIV-1 Nef. *Cell Death and Disease* 5: e1267, 2014 (査読有)
 6. Komohara Y, Morita T, Annan DA, Horlad H, Ohnishi K, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Suzu S, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Akashi K, Takeya M, Jinushi M. The coordinated actions of TIM-3 on cancer and myeloid cells in the regulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Res* 9: 999-1007, 2015 (査読有)
 7. Kariya R, Taura M, Suzu S, Kai H, Katano H, Okada *. HIV protease inhibitor Lopinavir induces apoptosis of primary effusion lymphoma cells via suppression of NF-kB pathway. *Cancer Letters* 342: 52-59, 2014 (査読有)
 8. Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosaka-Akita H, Jinushi M. Cancer stem-like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells. *Cancer Res* 74: 2689-2709, 2014 (査読有)
 9. Osman A, Bhuyan F, Hashimoto M, Nasser H, Maekawa T, Suzu S. M-CSF inhibits anti-HIV-1 activity of IL-32 but they enhance M2-like phenotypes of macrophages. *The Journal of Immunology* 192: 5083-5089, 2014 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 鈴 伸也, Hesham Nasser, Farzana Bhuyan, 橋本倫拓. 新たな宿主細胞

- fibrocytes と HIV-1 の相互作用. 第 62 回 ウイルス学会学術集会. 2014/11/11 横浜
2. 鈴 伸也, Bhuyan Farzana, 橋本倫拓, Nasser Hesham, 日吉真照. HIV-1 感染マクロファージからのナノチューブ形成促進機構. 第 28 回日本エイズ学会学術集会. 2014/12/4 大阪
 3. Shinya Suzu. Susceptibility of circulating fibrocytes to HIV-1 in vitro and in vivo. Keystone Symposia (HIV persistence: Pathogenesis and Eradication). 2016/3/23 California (USA)
 4. 鈴 伸也. Tunneling nanotubes を介した HIV-1 伝播. 第 30 回日本エイズ学会学術集会. 2016/11/26 鹿児島

[図書] (計 3 件)

1. 鈴 伸也. 細胞膜ナノチューブを介した新たな HIV 感染拡大メカニズム. 感染・炎症・免疫 (羊土社) 印刷中
2. 鈴 伸也. HIV 感染と tunneling nanotubes. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 66 (4): 413-418, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴 伸也 (Shinya Suzu)

熊本大学・エイズ学研究センター/国際先端医学研究拠点施設・教授

研究者番号: 80363513

(3) 連携研究者

野依 修 (Osamu Noyori)

熊本大学・エイズ学研究センター/国際先端医学研究拠点施設・特定事業研究員

研究者番号: 30737151