

## 疾患特異的M2マクロファージの機能解析

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 自然免疫学  
佐藤 荘

### 1. 目的

自然免疫の中で大きな役割を果たしている細胞であるマクロファージは、細菌やウイルス感染制御に重要な役割を果たすだけでなく、寄生虫感染、アレルギー応答、脂肪代謝、癌転移等にも寄与している<sup>1,2</sup>。これらの現象にはそれぞれ異なった性質のマクロファージにより担われていると考えられているが、それらは大きくはM1型とM2型マクロファージとに分類できる。以前に申請者は、ヒストンH3リジン27トリメチル(H3K27me3)の脱メチル化を行うエピジェネティックな遺伝子制御因子であるJmJc domain containing protein 3 (Jmjd3)が、M2マクロファージ分化に寄与していることが報告されている<sup>3,4</sup>。また、Chromatin immunoprecipitation on Sequencing (ChIP-Seq)解析によって、Jmjd3がIRF4の発現を調節し、M2マクロファージの分化を制御し、アレルギー応答や寄生虫に対する生体防御応答に必要な不可欠であることが分かっている。しかしながら、このアレルギーに関わるM2マクロファージの活性化経路の全貌が明らかになったわけではなく、このM2マクロファージ活性化の更なる分化・活性化経路の解明が、アレルギー疾患に対する創薬につながる鍵となる。

そこで申請者は、M2マクロファージの活性化機構を更に解明するために、Jmjd3と相互作用する分子の探索を行った。その結果、酵母ツーハイブリッド法により、Jmjd3の天然変性部位と相互作用する新規遺伝子、Jmjd3 Interacting Gene 8 (以下JIG8)を同定した。本研究ではこのJIG8の自然免疫系における機能を明らかにすることにより、アレルギー誘導物質及び寄生虫感染等に対する生体応答をM2マクロファージの分化及び機能解析の観点から解明することを目的としている。

### 2. 方法

#### ①JIG8遺伝子欠損マウスの作製

C57BL/6J由来ES細胞から調節したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、JIG8遺伝子付近のゲノムDNAをクローニングした。JIG8のexon2及び3を含むDNA断片をネオマイシン耐性遺伝子カセットに置換するように、ターゲティングベクターを作製した。エレクトロポレーション法を用いてES細胞にターゲティングベクターを導入し、G418を用いて相同組み換え体の選別を行った。得られたES細胞クローンを胚盤胞に移植し、キメラマウスを得た。オスのキメラマウスとC56BL/6Jのメスマウスを交配し、ヘテロマウスを作製した。このヘテロマウス同士を交配することでJIG8<sup>-/-</sup>マウスを得た。

②組織学的解析 生後直後の胎児から肺を回収し、4%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク)中で4℃・72時間静置し、サンプルを固定した。固定したサンプルをパラフィン包埋後に切り出し、H&E染色を行った。

③FACS解析 マウスの胸腺、脾臓、リンパ節、骨髄の細胞を回収後、赤血球を除去した。MACSバッファーを用いて洗浄後、5×10<sup>5</sup>/サンプルに調製し、FACS用抗体で15分間氷上にて染色した。再度MACSバッファーを用いて洗浄し、FACSCantII (BECTON DICKINSON)を用いて測定し、FlowJo (Biolegend)で解析した。

#### ④M1マクロファージ、M2マクロファージの解析

マウスに4%チオグリコレートメディウムを2 ml腹腔内投与し、3日後に滲出した腹腔マクロファージを回収した。腹腔マクロファージ $5 \times 10^4$ 個/wellで96well flat plateに撒き、LPS (100 ng/ml; sigma) , CpG DNA (10 nM; invivogen) , Malp2 (30 ng/ml; invivogen)による細胞の刺激、またこれらのリガンドとIFN- $\gamma$  (500 unit/ml; R&D systems)との共刺激を行って、24時間後に上清を回収した。上清中のIL-6、IL-12 p40、TNF- $\alpha$ の産生をELISA kit (R&D systems)を使用して測定した。また、LPS (1 mg/head)を腹腔内に投与した。投与後0時間、1時間、3時間、6時間にマウスの尾から血液を採取した。採取した血液を4°Cに保存し3時間後に血清を採取した。血清中のサイトカイン産生をELISA法で検討した。同様の方法でマウスにLPSを投与し、生存率を測定した。

Chitin(sigma)の投与、及びその解析方法に関しては参考論文3の通りに行った。

### 3. 結果

①Jmjd3遺伝子欠損マウスは生後間もなく肺組織の損傷による、呼吸障害により死亡すること明らかとなっている<sup>3</sup>。したがって、この分子と結合するJIG8についても同様に検討を行った(Fig. 1)。その結果、Fig. 1に示す様に、JIG8<sup>-/-</sup>マウスは耐性致死の表現型を示した。

	JIG8 <sup>+/+</sup>	JIG8 <sup>+/-</sup>	JIG8 <sup>-/-</sup>	
個体数 (%)	49 (42)	68 (58)	0 (0)	117 (100)

Fig.1 JIG8<sup>-/-</sup>は耐性致死となり個体は得られない

そこで、その原因がJmjd3と同様の物であるかどうかを検討するために、胎児の肺の組織学的解析を行った(Fig.2)。Fig. 2に示す様に、JIG8<sup>-/-</sup>マウスの胎児の肺には、肺の組織異常があることが確認され、Jmjd3と同様の表現型で致死となっていることが明らかとなった。

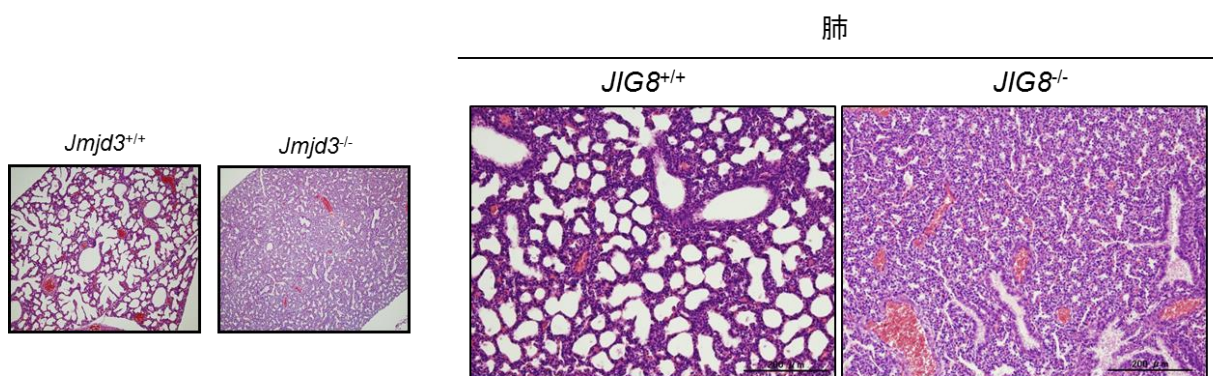


Fig.2 JIG8<sup>-/-</sup>は肺組織の障害により生後間もなく致死となる

② JIG8<sup>-/-</sup>マウスは①で示したように耐性致死となるために、生体での免疫系の解析が不可能である。したがって、次に免疫系でのJIG8の役割を解明するために、受精後15.5日目の胎児が得られるかを検討した。その結果、15.5日目ではJIG8<sup>-/-</sup>マウス由来の肝細胞が得られたので、それらと野生型由来の細胞とを回収し、 $\gamma$ 線を照射した成体マウスに移植することによりキメラマウスの作製を行った。

③ 最初に②で作製したマウスの免疫細胞の解析を行った。胎児由来肝細胞の $\gamma$ 線照射済生体マウスへの移植後8週における、T細胞、B細胞、NK細胞、炎症性単球、好中球等の細胞の割合をFACS解析にて行ったところ、JIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスは、これらの免疫細胞が野生型と同等の割合、及び同等の細胞数であることが明らかとなった。また、チオグリコレートによって誘導されるJIG8<sup>-/-</sup>キメラマウス由来マクロファージは、様々なTLRリガンドに対して正常な応答を示した。さらに、LPSを腹腔内投与することにより起こされるエンドトキシンショックもJIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスでは野生型と同程度起こることが明らかになった。これらの事から、JIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスは正常なM1マクロファージを持っていることが明らかとなった。

④ Chitinの腹腔内投与はM2マクロファージを誘導し、さらにそれらの細胞が好酸球の遊走の誘導を行う<sup>5)</sup>。Jmjd3<sup>-/-</sup>マウスにchitinを投与してもM2マクロファージマーカー遺伝子の活性化、及び好酸球遊走の誘導といった一連のアレルギー応答は起こらないことが分かっている。そこで、次にJIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスにchitinを投与したところ、Arg1やYm1といったM2マクロファージマーカーの発現が野生型と比較して減少していることが明らかとなった。またFACS解析により、マウスへのchitin投与後の腹腔内への好酸球の遊走を確認した所、JIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスでは野生型よりも腹腔内に遊走してくる好酸球の割合も減少していた。これらの事から、JIG8はM2マクロファージの活性化に部分的に関与していることが明らかとなった。

#### 4. 考察

本研究では、Jmjd3に結合する分子として同定されたJIG8の機能解析を行った。上記の結果からJmjd3欠損時と同様に、JIG8<sup>-/-</sup>マウスは肺組織の異常により生後間もなく呼吸不全となって致死となることが分かった。したがって、肺組織の形成への寄与度に関して、JIG8は単独でJmjd3と同等の働きをしていると考えられる。

一方で、M2マクロファージマーカーの発現低下の程度、好酸球遊走の程度を検討した所、野生型と比較するとJIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスでは低減がみられるものの、Jmjd3<sup>-/-</sup>キメラマウスで観察されるほどの低下の程度は観察されなかった。これらの結果から、M2マクロファージの活性化能に関しては、JIG8単独の作用とは考えられず、JIG8と協調的に働く別の新しい分子が存在している可能性が考えられる。

そこでホモロジー検索の結果から、JIG8とアミノ酸配列の相当性が非常に高い分子であるJIG7に着目した。JIG7とJIG8とをHEK293細胞に強制発現させたところ、これらの2つの分子は細胞内で結合することが明らかとなっている。現在、Crispr/Cas9のシステムによりJIG7<sup>-/-</sup>/JIG8<sup>-/-</sup>キメラマウスの作製を計画中である。今後はそのマウスのアレルギー応答の検討、及びマクロファージの活性化能と標的遺伝子の影響を検討する予定である。

#### 5. 参考文献

1. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:23
2. Martinez F. O., Helming L. & Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27, 451-483, (2009).
3. Satoh T. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11, 936-944, (2010)
4. De Santa, F. et al. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 2007; 130: 1083
5. Reese, T.A. et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 2007; 447: 92-96