

博士論文

食食能評価系の確立と
マクロファージ活性化メカニズムの包括的解析

2019 年 3 月

甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科
生命化学専攻 分子細胞発生学研究室

石川 真実

目次

第 1 章 要旨	1
第 2 章 背景	3
2-1 自然免疫と獲得免疫	3
2-2 免疫反応におけるマクロファージの働き	4
2-3 マクロファージの多様性	5
2-4 初期攻撃としてのマクロファージ	7
2-5 ヒトとマウスのマクロファージ	8
2-6 研究目的	8
第 3 章 実験操作	10
3-1 THP-1 細胞の培養	10
3-2 THP-1 細胞のマクロファージへの分化誘導	10
3-3 THP-1 マクロファージの polarization	10
3-4 pH 感受性ビーズの作製	10
3-5 貪食アッセイ	11
3-6 統計処理	11
第 4 章 マクロファージ活性化評価法の確立とスクリーニング	12
4-1 序論	12
4-2 実験操作	13
4-2-1 DNA マイクロアレイ解析	13
4-2-2 リアルタイム PCR	13
4-3 結果	13
4-3-1 貪食能評価系の確立（貪食させる標的の選定）	13
4-3-2 貪食能評価系の確立（貪食能の算出方法）	16
4-3-3 貪食能評価系の確立（一般的なマクロファージ活性化因子添加時の貪食能測定）	20
4-3-4 貪食能評価系を用いたスクリーニング	20
4-3-5 マクロファージの polarization の条件検討	21

4-4 考察	23
第5章 評価系を用いた ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF の評価	27
5-1 序論	27
5-2 実験操作	28
5-2-1 試薬	28
5-2-2 THP-1 由来マクロファージへの ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF 添加	28
5-2-3 DNA マイクロアレイ解析	28
5-2-4 リアルタイム PCR	28
5-2-5 貪食アッセイ (ALA+SFC)	29
5-2-6 貪食アッセイ (PAPLAL、serum-MAF)	29
5-2-7 ヒト末梢血単核球の分離およびマクロファージへの分化誘導	29
5-3 結果	30
5-3-1 ALA+SFC がマクロファージに与える影響	30
5-3-1-1 ALA+SFC 添加マクロファージの遺伝子発現の変化	30
5-3-1-2 ALA+SFC の添加による M1 および M2 マクロファージの 免疫関連遺伝子の発現解析	31
5-3-1-3 ALA+SFC がマクロファージの貪食能へ及ぼす効果	33
5-3-2 PAPLAL がマクロファージに与える影響	33
5-3-2-1 PAPLAL によるマクロファージの polarization の変化	33
5-3-2-2 PAPLAL がマクロファージの貪食能へ及ぼす効果	34
5-3-3 serum-MAF がマクロファージに与える影響	35
5-3-3-1 serum-MAF 添加時のマクロファージの遺伝子発現の変化	35
5-3-3-2 serum-MAF がマクロファージの貪食能へ及ぼす効果	35
5-4 考察	36
5-5 小括	39
第6章 serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムの解析	40
6-1 序論	40
6-2 実験操作	40

6-2-1 遊走性の測定	40
6-2-2 タイムラプス観察を用いたビーズ取り込み効率の測定方法	40
6-2-3 ローテーターを用いたビーズ取り込み効率の測定方法	41
6-2-4 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察	41
6-2-5 Lifeact-GFP THP-1 細胞の作製	41
6-2-6 DNA マイクロアレイ解析	42
6-2-7 リン酸化免疫受容体アレイ解析	42
6-2-8 リン酸化タンパク質の定量	42
6-2-9 阻害剤実験	43
6-2-10 siRNA によるトランスフェクション	43
6-3 結果	43
6-3-1 serum-MAF によるマクロファージの貪食能を向上させる要因の解析	44
6-3-1-1 遊走性の解析	44
6-3-1-2 serum-MAF 処理マクロファージのビーズ取り込み効率の測定	45
6-3-2 マクロファージの形態観察	46
6-3-3 serum-MAF 暴露時間の変化によるマクロファージの貪食能の測定	49
6-3-4 serum-MAF による貪食関連遺伝子の発現プロファイル	50
6-3-5 serum-MAF 添加マクロファージのシグナル伝達経路の解析	51
6-4 考察	55
第 7 章 serum-MAF 中に含まれる有効成分の解析	58
7-1 序論	58
7-2 実験操作	58
7-2-1 試薬	58
7-2-2 serum-MAF の処理	58
7-2-3 免疫沈降	58
7-3 結果	59
7-3-1 serum-MAF 中の有効成分の解析	59
7-3-2 γ -globulin によるマクロファージの貪食能上昇メカニズム	63
7-3-2-1 γ -globulin への暴露時間の変化によるマクロファージの貪食能の測定	63

7-3-2-2 γ -globulin によるマクロファージ活性化におけるシグナル伝達経路の解析	64
7-3-2-3 γ -globulin によるマクロファージのビーズ取り込み効率	66
7-3-2-4 γ -globulin によるマクロファージの形態変化	67
7-3-2-5 γ -globulin 添加によるマクロファージ貪食能の経時的測定	68
7-4 考察	68
7-4-1 serum-MAF 中の有効成分の一つは γ -globulin である	68
7-4-2 γ -globulin のマクロファージ貪食能上昇メカニズム	69
7-4-3 serum-MAF 中の有効成分は γ -globulin 以外に存在する	69
第8章 serum-MAF によるマクロファージ活性化メカニズムにおけるマイクロドメインの役割	72
8-1 序論	72
8-2 実験操作	74
8-2-1 試薬	74
8-2-2 siRNA によるトランスフェクション	74
8-2-3 マイクロドメイン分画	74
8-2-4 免疫染色	75
8-3 結果	75
8-3-1 脂質ラフトの解析	75
8-3-2 Galectin lattice の解析	79
8-3-3 Galectin lattice 上の候補タンパク質	82
8-4 考察	83
第9章 結論	87
9-1 結果のまとめ	87
9-2 新規マクロファージ貪食活性化メカニズム	90
9-3 本研究の意義	90
謝辞	93
参考文献	95
業績リスト	103

第1章 要旨

抗原が体内に侵入した際に、自然免疫で働く細胞による初期攻撃が抗原の排除に重要である。その中でもマクロファージは抗原を迅速に貪食し排除する細胞で、貪食した抗原の情報を CD4⁺T 細胞へ抗原提示することで、獲得免疫系を誘導する。つまり自然免疫の初期段階としての抗原の貪食は、自然免疫だけでなく獲得免疫を誘導するためにも非常に重要である。本研究は、自然免疫の初期で働くヒトのマクロファージに着目し、マクロファージを迅速に活性化させるメカニズムをマクロファージの状態（炎症性や抗炎症性）の変化（polarization）だけではなく、貪食能も含めて多角的に解析し、明らかにすることを目的としている。そのため、マクロファージの迅速な貪食能を測定できる評価系の確立を行い、その評価系を用いて発見したマクロファージ活性化因子をモデル系として研究を行った。

貪食能評価系の確立

確立した評価系はヒト由来の単球様細胞株である THP-1 から分化させたマクロファージに因子を一定時間暴露し、因子の洗浄を行った後に pH 感受性ビーズを貪食させる方法である。また貪食能の算出方法として新規算出方法である IBRf（ビーズ取り込まれ率：%）= {(貪食されたビーズの蛍光輝度) / (全ビーズの蛍光輝度)} × 100 で貪食能を求めることで、既存法と比較して、ビーズ量に依存しない安定した実験結果が得られるようになった。様々な因子を添加した際のマクロファージの貪食能を測定した結果、β-ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼで処理したヒト血清である serum-MAF がマクロファージの貪食能を著しく上昇させることを明らかにした。

PAPLAL、ALA+SFC、serum-MAF によるマクロファージの polarization および貪食能の解析

貪食能の評価系が有用であるかを ALA+SFC（5-アミノレブリン酸とクエン酸第一鉄との同時投与）、PAPLAL（白金ナノコロイドとバラジウムナノコロイドとの混合物）、serum-MAF を用いて調べた。ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF ではそれぞれの因子でマクロファージの polarization や貪食能の挙動は大きく異なった。この結果は、本研究で確立した実験系が様々な因子によって多様な状態に変化したマクロファージを解析することが可能であることを示している。また貪食能を著しく上昇させる serum-MAF は polarization に変化を与えなかった。

serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムの解析

血清由来の serum-MAF は、複数のタンパク質から構成されている混合物であるため、serum-MAF 中の有効成分の探索を行なったところ、 γ -globulin が有効成分の一つであることが明らかとなった。マクロファージを serum-MAF または γ -globulin に 5 分間暴露させることで貪食能が上昇したことから、これらの因子はマクロファージの貪食能を迅速に活性化できることが明らかとなった。一方でこの迅速な活性化は、serum-MAF ではビーズ添加後 10 分で検出できるような強い活性化であったのに対し、 γ -globulin では 60 分後に検出できるような serum-MAF に比して弱い活性化であった。これらの結果から、serum-MAF には γ -globulin 以外の迅速な貪食能を強く活性化させることができる因子が含まれていることが明らかとなった。また serum-MAF 暴露マクロファージでは Galectin lattice を含む脂質ラフトの形成促進や、細胞輪郭部のアクチン集積がみられたものの、 γ -globulin 暴露マクロファージでは見られなかった。これらの結果から γ -globulin ではない serum-MAF 中の有効成分は Galectin lattice を含む脂質ラフト形成やアクチンの集積を引き起こすことで、マクロファージの貪食能を強く活性化させていることが示唆された。

本研究ではマクロファージの迅速な活性化を測定する評価系の確立を行い、そこから迅速に貪食能の強い活性化を引き起こす serum-MAF を発見し、さらにその活性化メカニズムの解析も行なった。serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムは Galectin lattice を含む脂質ラフトの形成促進などの膜タンパク質のダイナミックな変化が関わっており、細胞生物学的見地からも非常に興味深い。また serum-MAF は polarization を変化させることなくマクロファージの貪食能を上昇させることができるため、そこには副作用の少ないアジュバントとして有用な成分が含まれていると期待している。

第2章 背景

2-1 自然免疫と獲得免疫

ヒトの体内に病原体等の抗原が侵入してきた際、免疫細胞が抗原を認識し、排除することによって生体内の恒常性が維持されている。この免疫機構は、自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫は、体内に侵入してきた抗原をマクロファージや好中球等の貪食細胞が貪食し、排除する免疫機構である。一方で獲得免疫は、侵入してきた抗原を記憶し(免疫記憶)、再び同じ抗原が侵入してきた際に、すばやく抗原に特異的な抗体を産生し、抗原を排除する免疫機構である。獲得免疫は脊椎動物のみが持つ高度な免疫機構で、自然免疫はほとんどすべての動物が持っている原始的な免疫機構である。

しかし免疫研究の発展に関しては、多くの動物が共通に持つ自然免疫ではなく、獲得免疫の研究が先行しており、1796年に Jenner が、初めてワクチン療法を行なって以来、盛んに行われてきた。一方で自然免疫は、1973年に自然免疫と獲得免疫をつなげる抗原提示能をもつ樹状細胞が発見されたことや (Steinman *et al.*, 1973)、2001年に自然免疫の異物認識において重要な役割を果たしているパターン認識受容体の一種類である Toll-like receptor (TLR)の活性化が獲得免疫系を誘導すること (Akira *et al.*, 2001)、等が徐々に報告され始めた。このような研究から、自然免疫と獲得免疫は独立に働いているのではなく、感染のごく初期にまず自然免疫系で働くマクロファージや好中球が異物を貪食する(本論文ではこれを、初期攻撃と呼ぶことにする)。そこから樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示能を持つ細胞が異物の情報を獲得免疫細胞に伝え、自然免疫と獲得免疫の両構成細胞がサイトカインやインターロイキン等の分泌因子や細胞表面のシグナル分子を介して様々な情報交換を行う“自然免疫と獲得免疫のネットワーク”が、異物を正しく認識して適切に攻撃するという免疫機構において重要であることが分かってきた (Figure 2-1)。

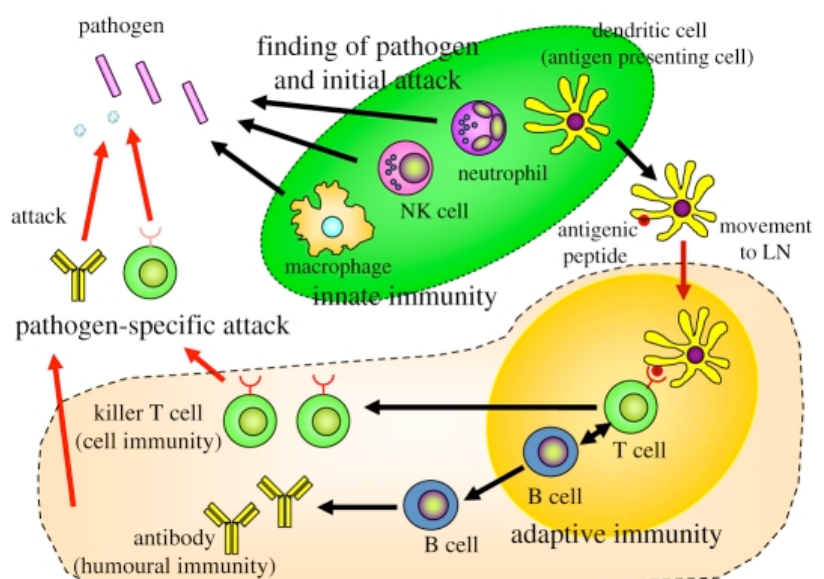


Figure 2-1. 自然免疫と獲得免疫の相互作用 (Akira *et al.*, 2011)

2-2 免疫反応におけるマクロファージの働き

自然免疫で働くマクロファージは体内に侵入した病原体等の異物を貪食し排除する細胞で、生体防御機構の前線で働く重要な細胞である。抗原が侵入し、免疫反応が開始するとマクロファージは周囲の環境に応じてその働きを変化させていく (Figure 2-2)。抗原が侵入すると、マクロファージは抗原がもつ共通の分子構造である Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を TLR 等のパターン認識受容体 (Pattern-recognition receptors; PRRs) で認識する。TLR が抗原を認識しシグナル伝達系が活性化されると、炎症性サイトカイン、ケモカイン遺伝子の転写が開始され獲得免疫系で働く Th1 細胞や B 細胞の活性化を誘導する。また TLR による抗原認識と同時期に血中タンパク質の一群である補体が抗原に結合することにより、マクロファージは補体受容体 (Complement receptors; CRs) を介して抗原を貪食することで抗原に対する初期攻撃を行う (詳細なメカニズムは 2-4 参照)。獲得免疫系細胞の活性化の誘導は TLR を介したものだけではなく、抗原提示による活性化もある。マクロファージや樹状細胞がナイーブ CD4⁺T 細胞に抗原提示を行うと、T 細胞は Th1 細胞、Th2 細胞へと分化する。Th1 細胞は炎症性サイトカイン (IFN- γ 等)、Th2 細胞は抗炎症性サイトカイン (IL-4 等) を産生し、その他の免疫細胞と協調しながら、それぞれの抗原や組織の状態に応じた免疫反応を惹起する。マクロファージは Th1 細胞が産生した IFN- γ によって誘導される炎症性の M1 マクロファージや Th2 細胞が産生した IL-4 によって誘導される抗炎症性の M2 マクロファージの状態になり、IL-1 や IL-10 等様々な因子を分泌することで、炎症反応を促進あるいは抑制し組織修復を行う。このマクロファージの可逆的な状態変化は polarization とよばれる。以上のようにマクロファージは抗原の侵入から炎症反応の収束までに、周囲の環境に応じて貪食や polarization、サイトカインの産生等を行うことで免疫反応のバランスの維持に重要な役割を果たしている。

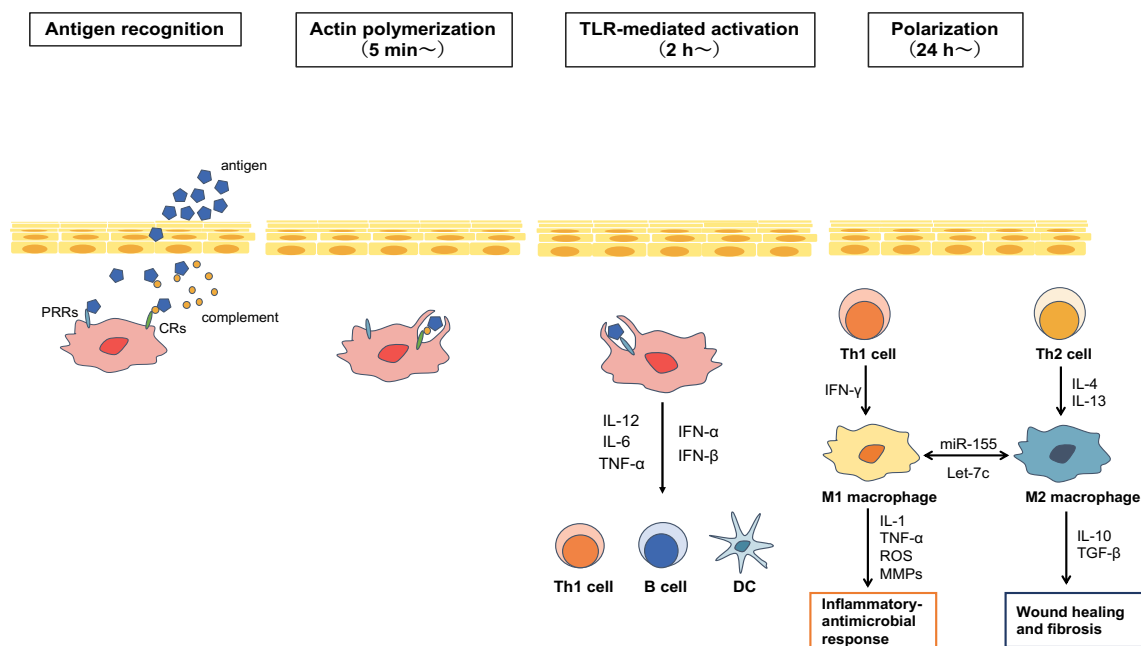


Figure 2-2. 免疫反応におけるマクロファージの働き

抗原侵入から獲得免疫活性化後までのマクロファージの機能を表している。PRRs; pattern-recognition receptors、CR; complement receptors、DC; dendritic cell、

2-3 マクロファージの多様性

1883 年に Mechnikov によって発見されたマクロファージは 100 年近く異物の排除のみを行う細胞と考えられ、スポットライトのあたらない細胞であった。しかし近年マクロファージは、その由来や性質・機能等の観点から、多様な細胞集団であることが明らかにされつつある (Sieweke *et al.*, 2013, Murray *et al.*, 2014)。マクロファージは急性の炎症反応に対応する「末梢マクロファージ」と、組織に常在して恒常性を維持する「組織常在性マクロファージ」に大別されている。これらのマクロファージの発生はともに骨髄由来であり、末梢血中では単球として循環し、組織内にリクルートされたのちにマクロファージへと分化すると考えられてきた。しかし 2010 年頃から組織常在性マクロファージは、発生初期の卵黄嚢に由来し、それぞれの組織内でマクロファージ様の細胞として自己複製されることで維持されていることが次々と報告され、末梢マクロファージとはその性質が異なることが明らかにされた。

また 2-2 で述べた Th1 および Th2 細胞が産生したサイトカインによって、マクロファージは炎症性の M1 あるいは抗炎症性の M2 と呼ばれる 2 つの状態に polarize するという考え方が 2000 年に Mill や Gordon らによって提唱された (Mills *et al.*, 2000, Gordon *et al.*, 2003)。

しかし M1 と M2 の 2 種類だけでは説明が難しいマクロファージの状態が次々と報告され、M2 マクロファージをさらに 3 つに分けた M2a、M2b、M2c の 3 つ

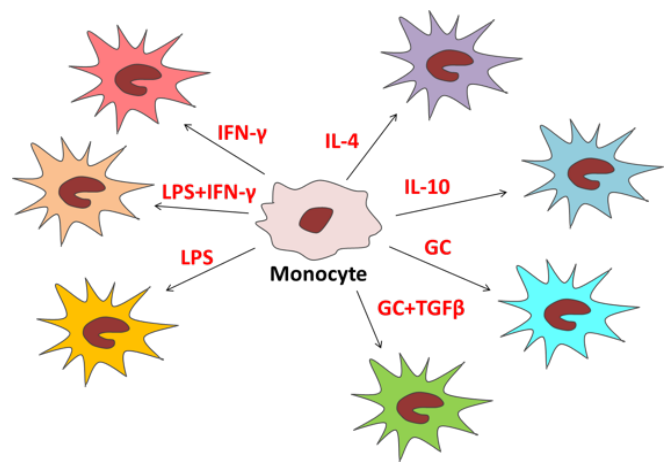


Figure 2-3. 提唱されているマクロファージの polarization

に区別する分類も提唱されてきた (Mantovani *et al.*, 2004)。そして 2014 年には、マクロファージの polarization は添加する因子によって 7 種類に分けられると報告された (Figure 2-3) (Murray *et al.*, 2014)。Polarization の多様性については未だに議論が続けられており、添加する因子の種類によって今後さらに増えるのではないかと考えられる。

この polarization は、一般的な細胞分化とは異なり M1 と M2 の 2 つの状態を容易に行き来できる状態である。例えば microRNA である miR-155 や Let-7c は、それらの発現量によって M1 と M2 の 2 つの状態の行き来を調節できることが報告されている (Cai *et al.*, 2012, Banerjee *et al.*, 2013, Essandoh *et al.*, 2016, Self-Fordham *et al.*, 2017)。以上のようにマクロファージは、サイトカイン、microRNA によって細胞の性質をすばやく変化させることのできる非常に高い可塑性を持った細胞である。このマクロファージの多様性と可塑性が、抗原の侵入や組織の損傷等の様々な環境に対応して免疫系全体に影響を与えることで、免疫系ネットワークの中で重要な役割を果たしていると考えられている。

このような理解の下、現在盛んに行われているマクロファージ活性化の研究は、「polarization」を解析することが多い。しかしこの polarization は、上述のように獲得免疫で働く T 細胞等との相互作用によるネットワーク形成後に現れる表現系である。自然免疫系の細胞として抗原が侵入してきた際に即座に対応するための活性化とは別物である。生体防御機構において最初に重要となるのは、自然免疫で働く細胞による初期攻撃である。

2-4 初期攻撃としてのマクロファージの貪食

初期攻撃に関する分子メカニズムに関しては、TLR や補体を介した働きが知られている。抗原が侵入してきた際、マクロファージは抗原がもつ共通の分子構造である PAMPs を TLR 等の PRRs で認識する。TLR が抗原を認識し、シグナル伝達系が活性化されると、炎症性サイトカイン、ケモカイン遺伝子の転写が開始され、抗原に対する獲得免疫系を誘導する。さらに TLR は貪食能の活性化を誘導することも報告されている (Akira *et al.*, 2006)。TLR4 のリガンドである LPS によってマクロファージを刺激すると、二つの経路で貪食能が誘導される。一つ目は TLR の下流で働くアダプタータンパク質である Myeloid differentiation primary response 88 (Myd88) を介してシグナル伝達分子である Janus activating kinase 2 (JAK2)、p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) のリン酸化を誘導し、スカベンジャーレセプターの発現を誘導することで貪食能を誘導する (Doyle *et al.*, 2004)。二つ目は低分子量 G タンパク質の Cell division control protein 42 (Cdc42) および RAS-related C3 botulinus toxin substrate (Rac) が活性化することによってアクチンの重合が促進されることで貪食能の上昇が生じる (Kong *et al.*, 2008)。さらにこの報告では、アクチン重合は LPS で刺激後 60 分以内に見られるものの、貪食能が上昇するのは 12 時間後であることから、TLR4 を介した貪食能の上昇は転写・翻訳を介した活性化であることを示唆している (Kong *et al.*, 2008)。一方、LPS で 20 分刺激すると貪食能の上昇が見られたとの報告もあることから、TLR を介した貪食能の促進には転写を介した活性化メカニズムと転写を介さない素早い活性化メカニズムがあると考えられる。

また初期の免疫反応の一つとして補体による活性化がある。補体とは血中タンパク質の一群である。補体による活性化は抗体依存的な古典的経路、抗体非依存的のレクチン経路と副経路の 3 つの経路があり、自然免疫で働く補体経路としてはレクチン経路と副経路が挙げられる。これらの経路は最終的に共通の経路を辿り、補体の成分の一つである C3 が分解されて、C3b が生成される。C3b は抗原に結合し、抗原がマクロファージに貪食されやすい状態にする (オプソニン化)。C3b がマクロファージの CR3 と結合すると下流のシグナル分子のリン酸化を介してアクチン重合が促進され、迅速な貪食の上昇が誘導される (Knodler *et al.*, 2001, Flannagan *et al.*, 2012)。

マクロファージは貪食した抗原の排除だけではなく、抗原の情報を CD4⁺T 細胞へ抗原提示することで、獲得免疫系を誘導する。つまり自然免疫の初期段階としての抗原の貪食は、自然免疫だけでなく獲得免疫を誘導するためにも非常に重要かつ必須であり、初期攻撃としてのマクロファージの「迅速な貪食能」の活性化は、自然免疫で働くマクロファージの活性化の指標として考慮すべきであると考えられる。また貪食能を迅速に上昇させる因子は、自然免疫を活性化させるアジュ

バント剤としての応用が期待できる。アジュバント剤は非特異的免疫賦活剤（抗原性補強剤）とも呼ばれ、抗原と一緒に投与することにより生体の免疫反応を高める効果を持つ薬剤である。抗原を吸着し、抗原提示細胞への取り込み作用を高めるもの（水酸化アルミニウム（アラム; Alum）等）や、抗原を局所に長時間留める効果を持ち、抗原刺激を長時間持続させる効果をもつもの（流動性パラフィン、フロイント等）、T 細胞や B 細胞といった免疫担当細胞を直接活性化させるもの（IL-12 等）等がすでに用いられているものの、マクロファージの貪食能の活性化といった観点で開発された薬剤は無い（Awate *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2015）。

2-5 ヒトとマウスのマクロファージ

マクロファージを含めた免疫系の研究の多くはマウスを用いて研究が行われている。しかし 2013 年に Martinez 等が、マウスマクロファージで発現している 459 個の mRNA と、ヒトマクロファージで発現している 489 個の mRNA のうち、共通に発現している mRNA は 231 個であったと報告した（Martinez *et al.*, 2013）。例えばマウスの M2 マクロファージのマーカーとして Arginase-1 が用いられているが、ヒトのマクロファージでは Arginase-1 の発現は誘導されず、マーカーとして適当ではない（Raes *et al.*, 2005）。このように、T 細胞や B 細胞等の他の免疫細胞と異なり、マクロファージはマウスとヒトで共通のマーカーとなる遺伝子が少ないため、医薬品の開発等でヒトに応用する際に大きな障害となっており、ヒトのマクロファージを用いた研究が重要である。

2-6 研究目的

本研究は、自然免疫の初期で働くヒトのマクロファージに着目し、マクロファージを迅速に活性化させるメカニズムを polarization だけではなく、貪食能も含めて多角的に解析し、明らかにすることを目的としている。マクロファージを迅速に活性化させる新規マクロファージ活性化因子を発見し、それをモデル系として研究を行っていくことで、自然免疫の初期反応の新しいメカニズムの解明に繋がるとともに、アジュバントとして使用可能な因子の 1 つになり得ると考える。また実験に使用する材料はヒト由来の細胞株を用いる。理由として、2-5 で上述したようにマウスとヒトのマクロファージでは発現しているマーカー分子が異なるため、マウスでメカニズムを明らかにしたところで、実際のヒトの身体への情報のフィードバックを行うのに時間がかかる。したがって、ヒト由来の細胞を用いて *in vitro* の実験を行うことで、生体内への情報のフィードバックがマウスを使用した実験よりも容易に行えると考ええる。第 4 章ではヒト由来 THP-1 細胞を用いて polarization および貪食能の評価系の確立を行なった。第 5 章では確立した評価系を用いて

ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF の 3 種類の因子の免疫系に対する効果の評価を行なった。第 5 章の結果より serum-MAF によってマクロファージの貪食能が著しく上昇したため、第 6 章では serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムを解析し、第 7 章で serum-MAF の有効成分の探索、第 8 章で serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇において、素早いシグナル伝達がおこるマイクロドメインが関与しているか解析を行なった。

第 3 章 実験操作

3-1 THP-1 細胞の培養

THP-1細胞は理研BRC (RCB1189; Tsukuba, Japan)より購入した。それぞれの細胞は37°C、5%CO₂インキュベーター内で培養した。THP-1細胞の培養培地は、RPMI-1640メディウムに10%ウシ胎児血清 (Gibco, E.U.-approved, South American Origin)、3% L-グルタミン、10%炭酸水素ナトリウムを添加したものを使用した。細胞の培養には10 cmプラスチックシャーレを用い、希釈継代培養を行った。

3-2 THP-1 細胞のマクロファージへの分化誘導

THP-1 細胞を、96-well plate に 2.0×10^4 cells/well となるように播種した (35 mm プラスチックシャーレで実験を行う場合は細胞数を 5.0×10^5 cells/dish となるように播種した)。そこに 200 ng/mL の 12-*o*-tetradecanoyl-13-phorbolacetate (TPA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を添加し、24 時間培養することでマクロファージ様細胞へ分化させた。

3-3 THP-1 マクロファージの polarization

THP-1 細胞を、35 mm プラスチックシャーレに 2.5×10^5 cells/dish となるように播種した。そこに 200 ng/mL の TPA を添加し、6 時間後に M1 または M2 マクロファージへの分化誘導因子 (M1; 100 pg/ml LPS + 20 ng/mL IFN- γ 、M2; 20 ng/mL IL-4 + 20 ng/mL IL-13) をそれぞれのシャーレに添加し (M0 マクロファージは因子の添加は行わない)、42 時間培養することで M0、M1 または M2 様マクロファージへ polarization を行なった。

3-4 pH 感受性ビーズの作製

磁気ビーズ (Dynabeads® protein G; Invitrogen, Oslo, Norway) 600 μ g を 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.3) で 3 回洗浄後、0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液を 100 μ L 加え、ビーズ溶液とした。ビーズ溶液 100 μ L に 10 mM の pH 感受性色素 (AcidiFluor™ ORANGE-NHS; 五稜化薬株式会社, Goryo Chemical, Hokkaido, Japan)を 1.2 μ L 添加し、よくピペッティングした後、60 分間室温 (遮光) で静置した。60 分後、0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.3)で 6 回洗浄を行った。洗浄後、0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液を 20 μ L 加え、これを pH 感受性ビーズ溶液とした。反応の確認として、pH 2.2、4、6、8 の緩衝溶液にビーズを添加し、ビーズの蛍光の有無を蛍光顕微鏡 (BioRevo;

Keyence, Osaka, Japan) で確認した。

3-5 貪食アッセイ

分化誘導を行ったマクロファージの培地をアスピレーターで除去し、任意の因子を加えて、1 または 4 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。1 または 4 時間後、培地をアスピレーターで除去し、無血清 RPMI を 100 µL/well 加えた (wash 操作)。Wash 操作を合計 2 回行った後、培地をアスピレーターで除去し、3 µg/mL 蛍光ビーズ含有無血清 RPMI を 100 µL/well 加え、1 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。1 時間後、蛍光プレートリーダー (Infinite 200 PRO; Tecan, Zurich, Switzerland) で測定した (532/568 nm)。測定終了後、各ウェルにクエン酸-第 2 リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) を 50 µL/well 加え、再度蛍光プレートリーダーで測定した。マクロファージに貪食されたビーズの蛍光輝度と全ビーズの蛍光輝度 (pH 3.5 緩衝液添加後の蛍光輝度) を求め、その比をマクロファージの貪食活性 (Internalized beads ratio measured with fluorescence; IBRf) として以下の式で算出した。

$$\text{IBRf (\%)} = \frac{\text{貪食された全ビーズの蛍光輝度}}{\text{pH 3.5 緩衝液添加後の全ビーズの蛍光輝度}} \times 100$$

3-6 統計処理

実験結果は全て平均値±標準偏差で示した。有意差検定は F-test を行い、等分散を確かめた後、Student's t-test を行なった。

第4章 マクロファージ活性化評価法の確立とスクリーニング

4-1 序論

第2章でも述べたように、マクロファージの初期攻撃は、自然免疫だけでなく獲得免疫を誘導するためにも重要である。初期攻撃としてのマクロファージの最大の働きは迅速に抗原を貪食することであるため、マクロファージの迅速な貪食能の活性化をマクロファージの活性化の指標として測定することが最適であると考えた。

現在の貪食能の測定は細胞種、ターゲットとなる異物、測定方法や評価方法は研究者によって様々で、標準化された評価法がない状況である (Table 4-1) (Uto *et al.*, 2011, Cannon *et al.*, 1992)。またこれらの評価法では、赤血球や LATEX beads を添加してから約2時間で固定し、サンプルとしている。既存法では、①使用されている異物は比重が軽く、シャーレ底に沈殿するまでの時間にバラツキがあり完全に全ての異物が沈殿するまでに時間がかかるため、マクロファージの素早い貪食を安定して測定できない、②貪食実験を行ってから貪食能を算出するまでに半日以上かかるため、新たなマクロファージ活性化因子をスクリーニングするためには膨大な時間が必要となる、③顕微鏡下での観察・評価が必要であり多大な労力を必要とする、などの問題点が挙げられる。また貪食能の測定の際によく使用される抗原として、抗体でオプソニン化を行なった抗原を貪食させることが多い (Uto *et al.*, 2011, Itoh *et al.*, 2015)。抗体によるオプソニン化が行われるのは、polarization と同様に、獲得免疫が活性化し、抗原特異的な抗体が産生された後であり、免疫反応の後期におこる貪食能活性化であるため、我々が注目している初期攻撃とは異なるメカニズムである。

Table 4-1. 現在行われているマクロファージの貪食能評価法

細胞	腹腔マクロファージ (マウス)、RAW264 (マウス)、Peripheral blood mononuclear cells-derived macrophage (PBMC) (ヒト)、Bone marrow-derived macrophage (BMDM) (マウス、ヒト、ラット)、THP-1 (ヒト)
抗原	オプソニン化羊赤血球、オプソニン化 LATEX beads、 <i>E.coli</i> 、Zymosan、蛍光 LATEX beads
測定方法	固定・染色後カウント、FACS、蛍光輝度測定
評価方法	取り込み数 (個/1細胞)、蛍光輝度

一方で初期攻撃におけるマクロファージの貪食能の評価は標準化された方法がないことから、活性化の指標として評価されることは少なく、貪食能評価法の確立は本研究の基盤として必須である。免疫反応の初期の迅速なマクロファージの貪食を測定でき、短時間かつハイスループットで評価可能な系を確立することは、新たなマクロファージ活性化因子を発見するためにも重要で

ある。本章ではマクロファージの機能を包括的に理解しやすくするため、polarization 後のマクロファージの貪食能を測定するための polarization の条件検討およびマクロファージの貪食能評価できるモデル系の確立を行なった。

4-2 実験操作

4-2-1 DNA マイクロアレイ解析

Polarization を行った THP-1 マクロファージ (M0; TPA 処理、M1; TPA+LPS+IFN- γ 処理、M2; TPA+IL-4+IL-13 処理) について Sure Print G3 Human GE Microarray Kit 8x60k ver. 3.0 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて遺伝子発現解析を行った。解析は北海道システムサイエンス (Hokkaido, Japan) に委託した。

4-2-2 リアルタイム PCR

Polarization を行った THP-1 マクロファージ (M0; TPA 処理、M1; TPA+LPS+IFN- γ 処理、M2; TPA+IL-4+IL-13 処理) の RNA 抽出・cDNA 合成を行い、以下のプライマーを使用してリアルタイム PCR を行なった。

	Forward	Reverse
GAPDH	TCAAGGCTGAGAACGGGAAG	CATCGCCCCACTTGATTTTG
CXCL10	TTCCTGCAAGCCAATTTTGT	TGATGGCCTTCGATTCTGG
SOCS3	ACACTTCGGGAATGCTGAAC	GAGCAAACAAGGCAGAAAGTG
IRF5	TTATATTGTCCCCCGAGGTG	ATGGCTGAAGGCAGAAAGTG
CCL22	AAACTAATGTCCCTCCCTCTC	TTTGGGGCTTCACATTGACC
CD209	GTCCCATCTGTCTTCTTGTC	CCACACCAGCTCACTCATAAA
FGL2	TCTGCCCACTGAGACTAGAA	TTGCTTCGGGAGCTGAATAG

4-3 結果

4-3-1 貪食能評価系の確立 (貪食させる標的の選定)

モデル系の確立にあたって、本研究ではヒト由来の株化細胞であり培養が容易な単球様細胞である THP-1 から分化させたマクロファージを用いた。最初に THP-1 マクロファージの貪食能を測定するために必要である貪食させる標的の選定を行った。体内に侵入した抗原に対してマクロファージは Phagocytosis で抗原を細胞内へ取り込む。Phagocytosis は一般的に、直径およそ 500 nm ~ 5 μ m の粒子を取り込むとされており、その範囲内で顕微鏡等での観察がしやすい大きさが好ましい。しかし標的をあまり大きくし過ぎると、マクロファージが貪食できる個数が少なくなり、因子添加時の貪食能の差が検出しにくくなる (Figure 4-1)。そこで本研究では、マクロファージ

が標的を取り込む様子が目視で確認でき、さらにマクロファージが最大で 100 個程度取り込める大きさである $3\text{ }\mu\text{m}$ の程度の標的を用いることにした。また標的として特定の抗原性をもつ標的を使用すると、その抗原に対する貪食メカニズムしか解析できない。本研究では汎用性のある系の確立を行うことが目的のため、スカベンジャーレセプター等に認識される一般的な異物の貪食として評価できる特定の抗原性をもたないと考えられるビーズを使用した。

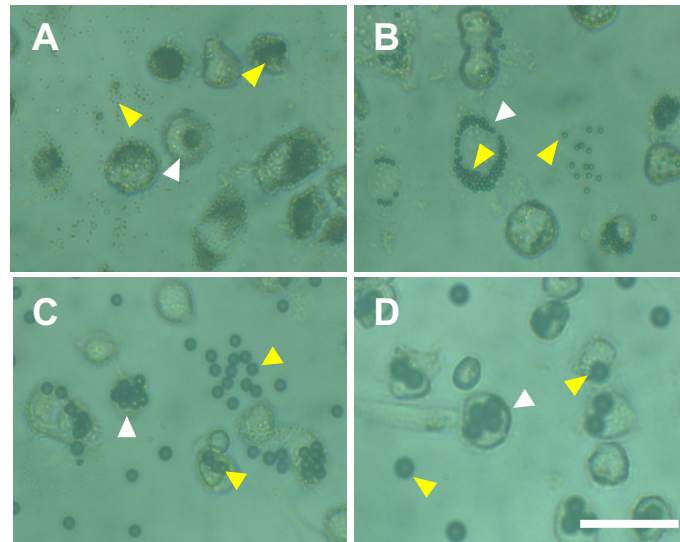


Figure 4-1. 貪食させるビーズの大きさの検討
THP-1 マクロファージに $1\text{ }\mu\text{m}$ (A)、 $3\text{ }\mu\text{m}$ (B)、 $6\text{ }\mu\text{m}$ (C)、 $10\text{ }\mu\text{m}$ (D) LATEX ビーズを貪食させて 24 時間後の様子。白矢尻がマクロファージ、黄矢尻がビーズを示している。スケールバー; $20\text{ }\mu\text{m}$

我々が着目しているマクロファージの貪食は迅速な反応であり、その貪食能を測定するためにはビーズが速くシャーレ底に沈む必要がある。既存のビーズを用いた貪食能評価法の問題点として貪食させるビーズの比重が軽いことが挙げらる。そこで抗原として貪食させるビーズの条件検討として、 $3\text{ }\mu\text{m}$ の LATEX (ポリスチレン) ビーズと LATEX ビーズよりも比重の大きい磁気ビーズ (LATEX; $\sim 1.05\text{ g/cm}^3$ 、磁気ビーズ; $\sim 2.0\text{ g/cm}^3$) を貪食させ、ビーズがシャーレ底に沈む時間を測定した (Figure 4-2)。LATEX ビーズは全てのビーズがシャーレ底に沈むまでに 3 時間必要とした。一方で、磁気ビーズは添加後 10 分で $91.1\pm 3.0\%$ のビーズがシャーレ底に沈んでおり、30 分で全ビーズが沈んだ。そのため、シャーレ底に沈むのが速い磁気ビーズを、マクロファージに貪食させることにした。

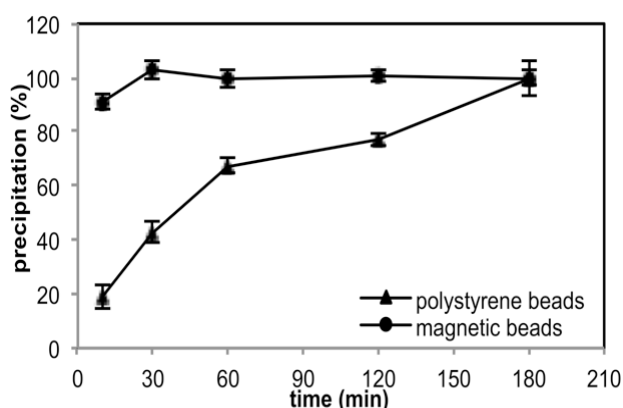


Figure 4-2. LATEX ビーズと磁気ビーズ添加後の沈殿率の測定

2 mL の培地が入っている 35 mm シャーレに 45 μ g の各ビーズを添加し、タイムラプス撮影を行った。ビーズ添加 3 時間後にシャーレ底に存在するビーズを全ビーズ数とし、各時間に沈下していたビーズ数と全ビーズ数の割合を沈殿率 (precipitation) として算出した。

次に磁気ビーズの表面修飾を選択した。アミノ基修飾または protein G 修飾の磁気ビーズを用いてマクロファージの貪食を測定した結果、アミノ基修飾ビーズに対するマクロファージの貪食能は $48.9 \pm 8.8\%$ 、protein G 修飾ビーズに対する貪食能は $17.4 \pm 2.5\%$ となった (Figure 4-3)。本研究では様々な因子を添加し、貪食能の増減を測定したいため、因子を加えていない状態のマクロファージの貪食能は低い方が好ましい。そのため使用するビーズは Protein G 修飾ビーズを選択した。

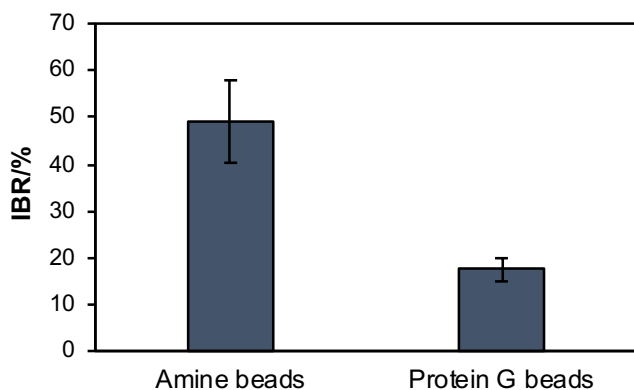


Figure 4-3. 磁気ビーズの表面修飾の違いによるマクロファージの貪食能の測定

THP-1 マクロファージに Dynabeads Amine と Dynabeads protein G を貪食させて 1 時間後に位相差顕微鏡で撮影を行った。撮影した写真の全ビーズと貪食されたビーズをそれぞれカウントし、(貪食されたビーズ/全ビーズ) $\times 100$ の値を貪食能 (IBR; Internalized beads ratio) として算出した。エラーバーは SD (n=3)。

マクロファージが貪食した抗原は、Phagosome の形で細胞内に取り込まれる。Phagosome が形成されると、その内部が徐々に酸性環境下になることを利用して、マクロファージに貪食されたビーズが酸性環境下になった際に蛍光を発するように、低 pH になると蛍光を発する pH 感受性色素 (AcidiFluor™ ORANGE) を磁気ビーズに修飾し、pH 感受性ビーズを作製した。作製した pH 感受性ビーズの pH 応答性を調べるため、pH 2.2 から pH 7 の緩衝溶液に磁気ビーズを添加し、その蛍光輝度を測定した結果、pH を低下させるとビーズの蛍光輝度が直線的に増加した (Figure 4-4A, B)。この pH 感受性ビーズをマクロファージに貪食させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、貪

食されたビーズは赤く蛍光を発することが確認できた (Figure 4-4C)。

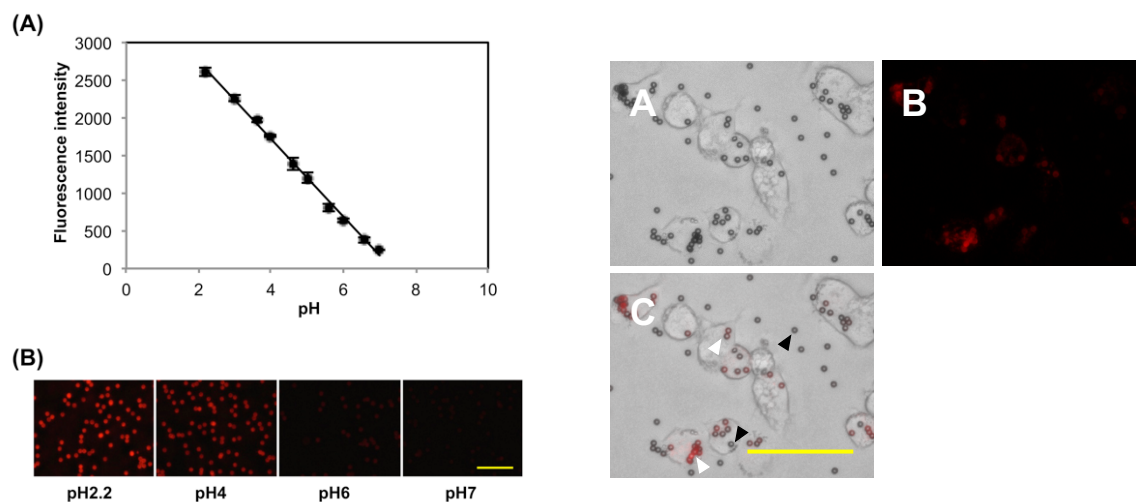


Figure 4-4. pH 感受性ビーズの機能解析

pH 感受性ビーズに pH2.2、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 のクエン酸リン酸バッファーを添加し、蛍光輝度を蛍光プレートリーダーで測定し (A)、さらにビーズの蛍光を蛍光顕微鏡で観察した (B)。pH 感受性ビーズ 3 μ g をマクロファージに貪食させ 1 時間後の様子を蛍光顕微鏡で観察した (C)。白矢尻は貪食されたビーズ、黒矢尻は貪食されていないビーズを示している。スケールバー; 25 μ m (B)、50 μ m (C)

4-3-2 貪食能評価系の確立 (貪食能の算出方法)

当研究室ではヒト由来単球様細胞である U937 から分化させたマクロファージを用いて、貪食能を定量的に評価する算出方法を確立している (Ishikawa *et al.*, 2014)。この算出方法 (Internalized beads ratio; IBR) は、全体のビーズ量のうち何個のビーズが取り込まれているかを算出する方法である。この算出方法と、先行研究でよく使用されている 1 細胞あたりに何個ビーズ貪食しているかを算出する方法を用いて、ビーズ量を変化させた際の貪食能を測定した (Figure 4-5)。既存の算出方法ではビーズ量を変化させた時に結果が変化するのに対し (Figure 4-5A)、IBR で算出するとビーズ量に左右されず安定的に貪食能を算出できた (Figure 4-5B)。しかしこの実験では、pH 感受性色素未修飾の磁気ビーズを使用しており、全ビーズ数を手でカウンターを用いてカウントしていたため、多大な労力を要した。pH 感受性ビーズを用いて蛍光輝度で IBR を測定するには、貪食されたビーズの蛍光輝度および全ビーズの蛍光輝度を測定する必要がある。貪食されたビーズの蛍光輝度は、写真やプレートリーダーを用いて計測できるが、それに対応する全ビーズの蛍光輝度をどう捉えるかは難しい。pH 感受性ビーズは培地中では蛍光を発しておらず、pH を強制的に変化させて測定するにしても、pH の値により蛍光輝度は変化することから、何らかの基準を設ける必要がある。そこで、全ビーズが phagolysosome に移行した状態を全ビーズの蛍光輝度と

することとした。

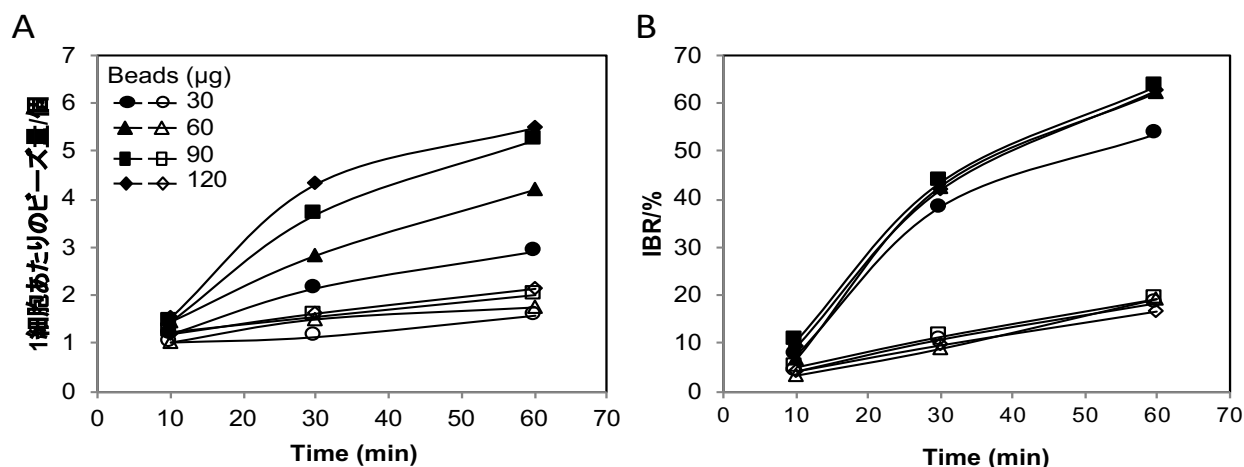


Figure 4-5. 貪食能の算出方法（1細胞あたりのビーズ量またはIBR）の違いによるマクロファージの貪食能
 35 mm dish を用い、ヒト由来単球様細胞 U937 細胞から分化させたマクロファージに培地または serum-MAF (6 µg/mL) 含有培地と 30、60、90、120 µg のビーズを添加した。ビーズ添加 10、30、60 分後に位相差顕微鏡で写真撮影を行なった。撮影した写真からマクロファージ中に取り込まれたビーズの数を数え、その平均値を視野内のマクロファージの数で割ることで、既存の方法である 1細胞あたりのビーズ量を算出した (A)。同じ写真を用いて視野内の全ビーズ量および貪食されたビーズ量を数え、貪食されたビーズ/視野内の全ビーズ×100 で算出することで Internalized beads ratio (IBR) として貪食能を算出した (B) ●、▲、■、◆は serum-MAF 含有培地で培養した結果、○、△、□、◇は培地のみで培養した結果を表している。

そのため、THP-1 マクロファージにおける Phagolysosome の最も低い pH を明らかにすることとした。使用している蛍光色素は、pH 2.0 から pH6.0 の間で pH の値とその蛍光輝度との関係は直線性を示すことが知られており (Asanuma *et al.*, 2014)、貪食されたビーズのうち最も明るく光るビーズが、最も低い pH の Phagolysosome にまで移行したビーズと考えることができる。そこで、ビーズを 1 時間貪食させて蛍光顕微鏡で貪食の様子を撮影し、さらに視野を固定したまま pH 2.2 の緩衝溶液を添加し、再び撮影した。撮影後、取り込まれたビーズの中で一番明るく光っているビーズを image J で抽出し、同じビーズの pH 2.2 環境下での蛍光輝度も測定し、(Phagolysosome 内のビーズの蛍光輝度) / (pH2.2 時の同じビーズの蛍光輝度) の値を Fluorescence ratio として算出した (Table 4-2)。また、Phagolysosome 中の pH はマクロファージ活性化因子の種類や添加の有無によ

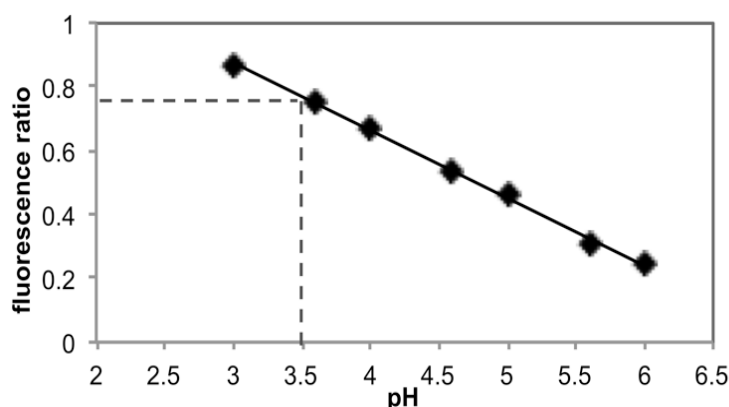


Figure 4-6. Fluorescence ratio の検量線
 Figure 3 (A)で測定した pH 3.0-6.0 および pH 2.0 の緩衝液における pH 感受性ビーズの蛍光輝度から Fluorescence ratio を算出した。点線は Table 2 から算出した Phagolysosome 内の pH 感受性ビーズの Fluorescence ratio (0.78) 時の pH を示している。

らず一定であろうと考え、control（マクロファージ活性化因子無添加）、serum-MAF（IBR で算出した際に貪食能が上昇することが知られている因子）、IFN- γ （一般的なマクロファージ活性化因子）処理後のそれぞれの Fluorescence ratio を算出したところ、予想通り大きな差を示さず、ここから算出される pH が THP-1 マクロファージの Phagolysosome の最低 pH と考えてよいと考えられた。そこで、これら 3 条件での平均である 0.78 を Phagolysosome の Fluorescence ratio とした。この Fluorescence ratio から pH の値を算出するために、pH 3-6 の緩衝溶液中の pH 感受性ビーズも Fluorescence ratio を算出し、検量線を作成した（Figure 4-6）。検量線に実際に Phagolysosome 内の Fluorescent ratio である 0.78 をあてはめると、マクロファージの Phagolysosome 内の pH が 3.5 であることが明らかとなった（Figure 4-6）。この結果より、貪食アッセイを行なって、その蛍光輝度を測定後、培地の pH を 3.5 に調整して再度その蛍光輝度を測定することで、貪食されたビーズと全ビーズの蛍光輝度をそれぞれ正確に求めることができるようになり、この 2 つの値を用いることで、IBR が求められることになる（Figure 4-7）。pH 感受性ビーズを用いたこの方法は、IBR を蛍光輝度での測定に変換した算出方法のため、我々はこの方法を IBRf（Internalized beads ratio measured with fluorescent）と名付けた。

Table 4-2. Phagolysosome の fluorescence ratio

	取り込まれたビーズの 最大蛍光輝度	pH 2.2 の蛍光輝度	Fluorescence ratio§
control	57.5±0.5	71.2±1.4	0.81±0.02
serum-MAF*	57.5±0.4	74.3±0.9	0.77±0.01
IFN- γ **	56.1±0.6	73.8±2.2	0.76±0.01

Data are means \pm s.d. (n=3).

§ Fluorescence ratio = (Maximum fluorescence intensity of internalized beads)/(Fluorescence intensity at pH 2.2). *Serum MAF: 6 μ g/mL. **IFN- γ : 20 ng/mL.

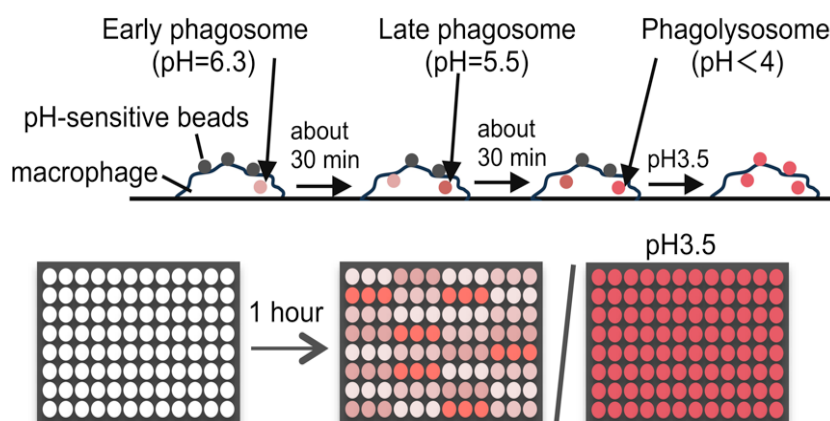


Figure 4-7. 評価系の概要

上段は確立した評価系の取り込まれたビーズの検出原理を表している。pH 感受性ビーズがマクロファージに取り込まれ、Phagosome から Phagolysosome に移行すると酸性環境下になり、ビーズが蛍光を発する。下段は 96 ウェルフォーマットにおける評価系のイメージを表している。マクロファージを様々な因子で処理し、無血清培地で洗浄後の状態（左）にビーズを添加し 1 時間培養を行う。1 時間後、処理した因子の違いによって貪食能の違いを反映し、それぞれのウェルでの蛍光輝度が異なる（中央）。蛍光輝度測定後、全てのウェルに緩衝溶液（pH 3.5）を加え、再び蛍光輝度を測定し、その割り算によって IBRf を算出する。

IBRf を用いて 96 ウェルプレートでアッセイを行う際の細胞数の検討を行なった (Table 4-3)。細胞数を 5×10^3 – 8×10^4 cells/well まで変化させた時の serum-MAF の有無によるマクロファージの貪食能を測定した。細胞数が増加するにしたがって IBRf も上昇した。serum-MAF の添加による貪食能の増加の割合を Activation ratio (AR) として算出した結果、 2×10^4 cells/well の細胞密度で AR が最大を示したため、細胞数は 2×10^4 cells/well に定めた。また IBRf を用いて添加するビーズ量を変化させた際の貪食能を測定した。貪食アッセイを行ない、蛍光輝度を測定してその値を貪食能として算出した値と (Figure 4-8A)、IBRf で算出した値 (Figure 4-8B) を比較すると、IBRf で算出した時に、IBR と同様にビーズ量のバラツキに左右されない安定な結果が得られた。

Table 4-3. 細胞数の変化によるマクロファージの貪食能

細胞数 (cells/well)	control (IBRf, %)*	serum-MAF (IBRf, %)*	AR**
5×10^3	3.0 ± 0.5	5.4 ± 2.1	1.8 ± 0.6
1×10^4	3.7 ± 0.9	11.1 ± 5.5	3.0 ± 1.2
2×10^4	6.0 ± 2.1	20.3 ± 7.2	3.4 ± 0.4
4×10^4	12.9 ± 8.1	28.7 ± 7.5	2.7 ± 0.8
8×10^4	25.8 ± 9.6	41.1 ± 2.3	1.8 ± 0.5

Data are means \pm s.d. (n=3).

*IBRf (%): internalized bead ratio measured with fluorescence. **AR: activation ratio.

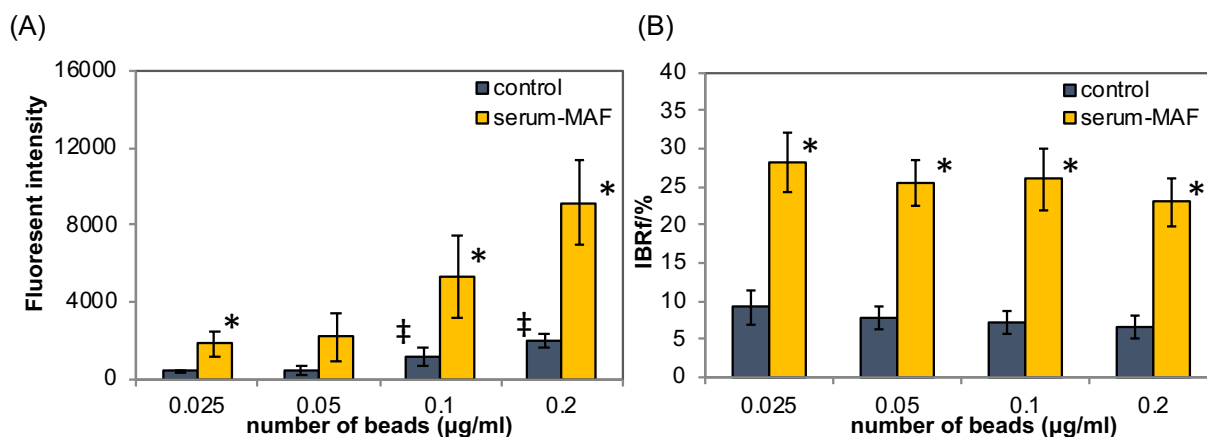


Figure 4-8. 貪食能の算出方法 (蛍光輝度または IBRf) の違いによるマクロファージの貪食能

マクロファージを培地または serum-MAF 含有培地で 1 時間培養し、無血清培地で洗浄後、0.025、0.05、0.1、0.2 µg/ml 添加し、1 時間後に蛍光輝度を測定した。貪食能は、蛍光輝度 (A) または新規算出方法である Internalized beads ratio measured with fluorescent (IBRf) で算出した (B)。エラーバーは SD (n=3) * $p < 0.05$ (各ビーズ量の control との t -test) ‡ $p < 0.05$ (0.025 µg/ml の control との t -test)

4-3-3 食食能評価系の確立（一般的なマクロファージ活性化因子添加時の食食能測定）

確立した評価系で一般的なマクロファージ活性化因子添加時の食食能を測定した（Figure 4-9）。因子を5分間暴露した結果、controlでは $8.7 \pm 1.3\%$ 、LPSでは 10.6 ± 1.0 ($p=0.18$)、IFN- γ では $10.5 \pm 0.3\%$ ($p=0.13$)、LPS+IFN- γ では $9.4 \pm 0.9\%$ ($p=0.57$)、IL-4では $10.0 \pm 0.8\%$ ($p=0.32$)、IL-10では $9.6 \pm 1.1\%$ ($p=0.51$)、DEXでは $9.8 \pm 1.6\%$ ($p=0.50$)、TGF- β では $9.6 \pm 1.1\%$ ($p=0.49$)、DEX+TGF- β では $9.6 \pm 1.1\%$ ($p=0.51$)、serum-MAFでは $23.5 \pm 3.0\%$ ($p=0.003$)となった。

一方で因子を4時間暴露した結果、controlでは $6.3 \pm 0.2\%$ 、LPSでは $6.9 \pm 1.0\%$ ($p=0.51$)、IFN- γ では $9.4 \pm 0.8\%$ ($p=0.03$)、LPS+IFN- γ では $8.4 \pm 0.1\%$ ($p=0.00013$)、IL-4では $6.6 \pm 1.0\%$ ($p=0.73$)、IL-10では $6.3 \pm 1.0\%$ ($p=0.92$)、DEXでは $6.5 \pm 0.4\%$ ($p=0.60$)、TGF- β では $5.7 \pm 0.7\%$ ($p=0.34$)、DEX+TGF- β では $6.1 \pm 0.3\%$ ($p=0.46$)、serum-MAFでは $27.5 \pm 3.2\%$ ($p=0.0007$)となった（ p 値は全てcontrolに対する差の t 検定を行った結果を表している。 $n=3$ ）。

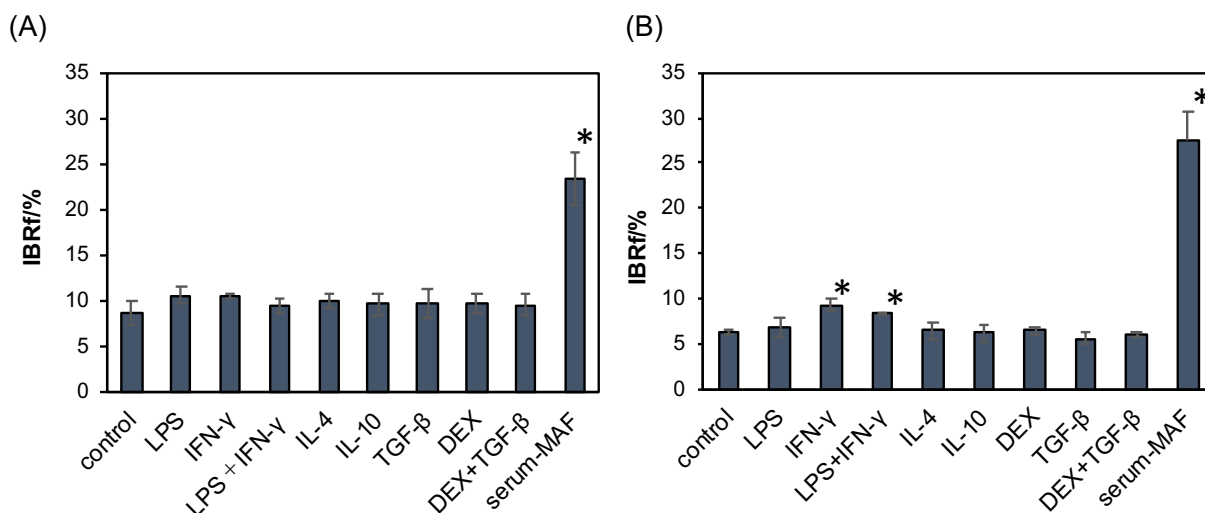


Figure 4-9. マクロファージ活性化因子添加時の食食能

マクロファージに各因子を5分（A）または4時間（B）暴露し、食食アッセイを行なった。LPS; 100 pg/mL、IFN- γ ; 20 ng/mL、IL-4; 20 ng/mL、IL-10; 20 ng/mL、Dexamethasone (DEX); 20 ng/mL、TGF- β ; 20 ng/mL、serum-MAF; 6 μ g/mL。エラーバーはSD ($n=3$) * $p < 0.05$ (t -test)

4-3-4 食食能評価系を用いたスクリーニング

一般的な活性化因子だけでなく、様々な因子を添加した際のマクロファージの食食能を測定した（Table 4-4）。その中で食食能の有意な変化が見られたのはハチミツ B、C、Dであった。

Table 4-4. 様々な因子添加によるマクロファージの貪食能測定

添加因子	AR*	添加因子	AR*	添加因子	AR*
キチン		ペプチド		ナタマメ	
βキチン（酸）0.5%	1.1	EDAYKWK	0.6	3-アセトン	1.0
βキチン（酸）1%	1.1	NMAIKWK	0.8	s3-アセトン	0.9
βキチン（酸）2%	1.1	SMITHKWK	1.0	4-アセトン	1.2
βキチン（アルカリ）0.5%	1.1	LINEKWK	0.7	5-アセトン	0.8
βキチン（アルカリ）1%	1.1	WIMKIPKWK	0.6	6-アセトン	1.5
αキチン 0.5%	1.1	NGELKWK	0.8	3-エタノール	0.8
αキチン 1%	1.0	SNIKEKWK	0.4	s3-エタノール	1.0
セルロース 0.5%	0.9	IWTHEKWK	0.6	4-エタノール	1.0
セルロース 1%	0.8	FTYEKWK	0.6	5-エタノール	1.0
βキチン（酸）0.5%（上清）	1.2	KYMLNKWK	0.4	6-エタノール	0.8
βキチン（酸）1%（上清）	1.2	TKHSKWK	0.4	未加熱	0.9
βキチン（酸）2%（上清）	1.2	EGYPTKWK	0.5	加熱	0.8
βキチン（アルカリ）0.5%（上清）	1.2	IKEAKWK	1.0	培養上清	
βキチン（アルカリ）1%（上清）	1.1	RAIHKWK	0.5	CM-1	1.2
αキチン 0.5%（上清）	1.1	SAMIKWK	1.5	CM-2	1.1
αキチン 1%（上清）	1.0	MIYAKWK	0.4	CM-3	1.0
セルロース 0.5%（上清）	0.9	DIEAKWK	1.6	CM-4	1.0
セルロース 1%（上清）	0.7	TAKAKWK	0.9	CM-5	1.1
ハチミツ		KNEWKWK	1.9	CM-6	1.0
ハチミツ A	1.2	INAIKWK	0.6	CM-7	1.0
ハチミツ B	1.3 [‡]	FIRSTKWK	0.4	CM-8	0.9
ハチミツ C	1.2 [‡]	IITMKWK	0.5	CM-9	0.9
ハチミツ D	1.3 [‡]	FISHKWK	1.1		
ハチミツ E	1.1	IHENNKWK	0.6		
		EGHPKWK	1.0		
		IMITKWK	0.4		

*AR; activation ratio, [‡]p<0.05

4-3-5 マクロファージの polarization の条件検討

THP-1 細胞を用いた polarization の先行研究として、分化誘導剤である 12-*o*-tetradecanoyl-13-phorbolacetate (TPA) を添加し 6 時間後に M1 または M2 マクロファージへの誘導因子を添加し、18-66 時間培養して polarization を行う方法がよく用いられている (Sugihara *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2016)。先行研究をもとに THP-1 マクロファージに TPA を添加し、6 時間後に M1 および M2 polarization 誘導因子である LPS+IFN-γ、IL-4+IL-13 をそれぞれ添加し、42 時間培養を行うことで、M1 および M2 マクロファージへの polarization を行った。polarization を評価するうえでマーカー遺伝子の選択は重要であるものの、先行研究ではマーカー遺伝子は生物種や細胞種によって異なっている。したがって我々が確立する実験系で M1 または M2 マクロファージへ誘導を行なった際に発現するマーカー遺伝子の選定が必要である。そこで THP-1 マクロファージにおける M1、M2 マクロファージの指標となる遺伝子を選別するため、M1、M2 マクロファージへ分化さ

せたマクロファージの DNA マイクロアレイ解析を行い、それぞれに特徴的な遺伝子を選別した (Table 4-5)。

Table 4-5. M1 および M2 マクロファージにおける代表的な遺伝子の発現

Gene name	Description	Normalized expression			Ratio	
		M0	M1	M2	M1/M0	M2/M0
M1 marker						
<u>Transcriptional factors</u>						
<i>IRF5</i>	interferon regulatory factor 5	7.89	67.14	14.15	8.5	1.8
<i>SOCS3</i>	suppressor of cytokine signaling 3	1.62	20.11	2.34	12.4	1.4
<u>Signaling factors</u>						
<i>CCL8</i>	chemokine (C-C motif) ligand 8	0.01	1.83	0.01	158.0	0.9
<i>CCL15</i>	chemokine (C-C motif) ligand 15	0.20	0.28	0.22	1.4	1.1
<i>CCL19</i>	chemokine (C-C motif) ligand 19	0.05	0.07	0.05	1.4	1.0
<i>CCL20</i>	chemokine (C-C motif) ligand 20	3.97	20.56	1.48	5.2	0.4
<i>CXCL9</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	0.01	12.82	0.01	1336.9	0.9
<i>CXCL10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0.02	3.99	0.02	183.7	0.9
<i>CXCL11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	0.01	0.07	0.02	6.5	2.4
<i>CXCL13</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	0.02	0.01	0.03	0.6	1.6
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta	114.66	321.12	38.74	2.8	0.3
<i>IL6</i>	interleukin 6	0.01	0.01	0.01	1.0	1.3
<i>IL12A</i>	interleukin 12A	0.01	0.01	0.01	0.9	0.9
<i>IL15</i>	interleukin 15	0.02	0.55	0.02	22.2	0.8
<i>IL23A</i>	interleukin 23A	6.16	12.62	5.60	2.0	0.9
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor	13.72	56.70	4.50	4.1	0.3
M2 marker						
<u>Receptors</u>						
<i>MRC1</i>	mannose receptor, C type 1	0.02	0.01	0.01	0.6	0.4
<i>CD209</i>	dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin	0.14	0.23	4.24	1.6	30.1
<i>CD302</i>	dec205-associated c-type lectin 1	0.93	0.66	1.37	0.7	1.5
<i>MSR1</i>	macrophage scavenger receptor 1	0.14	0.25	0.48	1.8	3.4
<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain family 7, member A	0.08	0.27	0.29	3.4	3.7
<u>Transcriptional factor</u>						
<i>IRF4</i>	interferon regulatory factor 4	0.12	0.14	0.11	1.2	0.9
<i>SOCS1</i>	suppressor of cytokine signaling 1	0.87	2.12	2.97	2.4	3.4
<u>Signaling factors</u>						
<i>CCL13</i>	chemokine (C-C motif) ligand 13	0.01	0.01	0.01	0.9	0.9
<i>CCL14</i>	chemokine (C-C motif) ligand 14	0.03	0.01	0.02	0.3	0.5
<i>CCL17</i>	chemokine (C-C motif) ligand 17	0.12	0.07	0.11	0.6	0.9
<i>CCL18</i>	chemokine (C-C motif) ligand 18	0.54	1.61	0.65	3.0	1.2
<i>CCL22</i>	chemokine (C-C motif) ligand 22	0.68	0.05	5.92	0.1	8.7
<i>CCL23</i>	chemokine (C-C motif) ligand 23	0.55	1.00	0.40	1.8	0.7
<i>CCL26</i>	chemokine (C-C motif) ligand 26	0.02	0.03	0.12	2.0	6.7
<i>FGL2</i>	fibrinogen-like 2	2.12	2.81	7.41	1.3	3.5
<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1	0.06	0.02	0.02	0.3	0.4
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta 1	35.36	26.56	37.58	0.8	1.1

これらの中から、先行研究でもマーカー遺伝子として良く用いられている *CXCL10* (*C-X-C motif chemokine 10*)、*SOCS3* (*Suppressor of cytokine signaling 3*)、*IRF5* (*Interferon regulatory factor 5*) を M1 マーカーとして、*CCL22* (*C-C motif chemokine 22*)、*CD209* (*Cluster of Differentiation 209*)、*FGL2* (*Fibrinogen-like protein 2*) を M2 マーカーとして選び出し、それらのマーカーとしての適正を確かめるために、実際に各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で調べた (Figure 4-10) (Martinez *et al.*, 2006)。M0 マクロファージ (TPA48 時間処理マクロファージ) と比べ M1 マクロファージでは、*CXCL10* は 36.8 倍、*SOCS3* は 5.8 倍、*IRF5* は 2.7 倍、*CCL22* は 0.6 倍、*CD209* は 1.3 倍、*FGL2* は 1.4 倍、M2 マクロファージでは *CXCL10* は 0.6 倍、*SOCS3* は 1.9 倍、*IRF5* は 1.7 倍、*CCL22* は 7.1 倍、*CD209* は 26.0 倍、*FGL2* は 2.9 倍となった。この結果で各マーカー遺伝子は、それぞれ M1、M2 への polarization により 2 倍以上の発現上昇が認められ、さらに M1/M2 あるいは M2/M1 の発現上昇率の比でも 2 倍以上の違いを示していたため、これら従来のマーカー遺伝子をそれぞれ M1、M2 マクロファージのマーカー遺伝子として適していると考えられた。

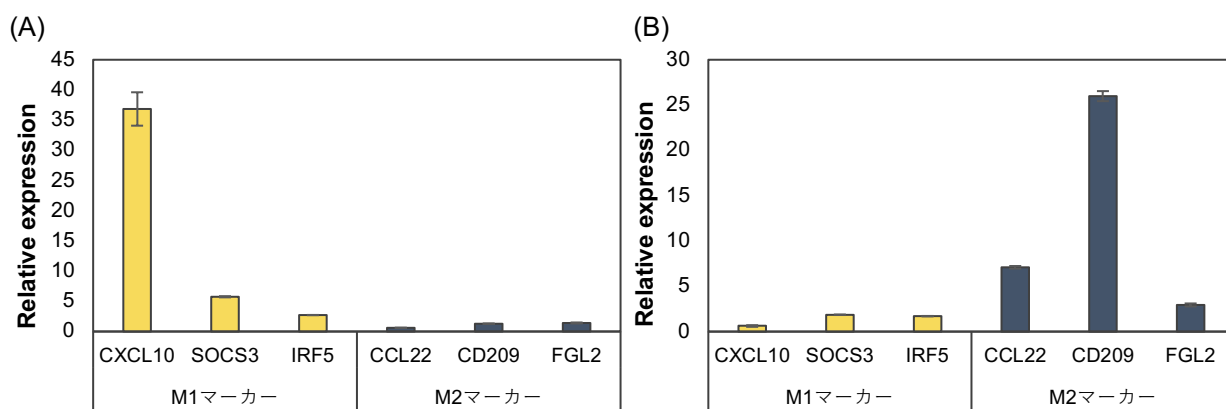


Figure 4-10. M1 および M2 マクロファージにおける候補遺伝子の発現量

TPA 添加 6 時間後に 100 pg/ml LPS + 20ng/ml IFN- γ または 20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13 を添加し、42 時間培養したマクロファージの遺伝子 (*CXCL10*、*SOCS3*、*IRF5*、*CCL22*、*CD209*、*FGL2*) の発現量を測定した。M1 マクロファージ (A) および M2 マクロファージ (B) における各遺伝子の発現量は、TPA48 時間処理のマクロファージにおける各遺伝子の発現量を 1 とした時の相対値で算出した。

4-4 考察

本章で確立した貪食能評価系の大きな特徴として、貪食させる抗原、貪食能の算出方法、因子処理時間の短さ、High-throughput 化が挙げられる。マクロファージに貪食させる標的として重要な点は、①大きさにバラツキがなく入手が容易であり、②添加後迅速にシャーレ底に沈殿し、マクロファージの貪食が安定して測定できることが挙げられる。我々はこれらの条件を満たす標的として、比重が大きく 10 分で 91%がシャーレの底に沈む磁気ビーズを選択した。先行研究では抗体でオプソニン化されている抗原を使用することが多いが (Kang *et al.*, 2012)、オプソニン化を介

した貪食は獲得免疫が働き抗体産生が行われた後の現象であり、本研究では獲得免疫が誘導される前のマクロファージの貪食能を測定したいため、磁気ビーズへのオプソニン化は行わなかった。さらに、因子自体がオプソニン化の効果を示す可能性を排除するため、因子による活性化を行った後、因子を洗い流してから貪食能の評価を行うことで、オプソニン化の効果や培地に含まれるウシ血清の影響を排除することができるため、因子がマクロファージに対して直接作用して活性化する能力をより正確に評価することが可能となったと考える。

貪食能の算出方法は、1 細胞あたりどの程度の量の抗原を貪食したかを細胞の固定を行なった後に算出する方法が多い (Uto *et al.*, 2011, Itoh *et al.*, 2015)。マクロファージは遊走能が一定の時、周囲に抗原が多いほど貪食する量は増え、少ないとその分貪食する量が減る。そのため 1 細胞あたりの抗原の貪食量はマクロファージの周囲に存在する抗原の量に左右され、それにバラツキがあると安定した結果が得られない。我々の評価系で用いている磁気ビーズは、比重が大きく添加後 10 分で 90%以上がシャーレ底に沈むというメリットがある一方で、ビーズ添加時のビーズ溶液と培養液との混合が完全に均一になる前に沈降しやすく、マクロファージの周囲のビーズ濃度のバラツキが生じやすい。また同様に、貪食が進むとマクロファージ周囲のビーズはどんどん減少することから、マクロファージの周囲のビーズ濃度を一定に保つことは原理的に不可能だと考えている。我々が確立した貪食能の新規算出方法である IBR は全ビーズ数と貪食されたビーズ数の割合で算出しているため、個々のマクロファージが貪食したビーズ数のバラツキをキャンセルできるため、こういった基本的な問題点を克服でき、より安定に貪食能を算出できる方法である。

さらにこの方法を改良して磁気ビーズに pH 感受性色素を修飾して、蛍光輝度で貪食能を算出可能とし、High-throughput system となるように試みた。IBR を蛍光輝度で算出するためには、全ビーズの蛍光輝度と貪食されたビーズの蛍光輝度を測定する必要があるため、我々は全ビーズが Phagolysosome に移行した状態を全ビーズの蛍光輝度とすることとし、THP-1 マクロファージの Phagolysosome の pH を測定し、pH 3.5 という結果を得た。この値は先行研究で報告されている値とも同等の値であるため、pH 感受性ビーズは正確にマクロファージの Phagolysosome 内の pH を反映していると考え (Pelczar *et al.* 2009, Flannagan *et al.*, 2012)。pH3.5 中のビーズの蛍光輝度を全ビーズ数の蛍光輝度とし、IBRf として算出した結果では、IBR で測定した結果と同様に安定した結果が得られたため、蛍光輝度の測定のみで High-throughput system として使用した場合でも信頼できる結果が得られることを確認できた。

また確立した評価系で得られる結果が、先行研究で報告されている結果と対応しているかを確かめた。一般的なマクロファージ活性化因子を 4 時間暴露し、貪食能を測定した結果、LPS+IFN-

γ 、IFN- γ でマクロファージの貪食能が上昇した。これらの因子は先行研究において貪食能の上昇が知られている因子であるため、既存の評価法とも対応がとれていると考える (Mohamad *et al.*, 2014)。しかし本評価系においては、先行研究で貪食能の上昇が知られている LPS を添加しても貪食能が上昇する傾向は示すものの有意な上昇は見られなかった。これは、標的ビーズの特性なども含め確立した評価系が、初期攻撃としてのマクロファージの迅速な貪食能を測定することに比較的特化した評価系となっていることを示しているのかもしれない。さらに素早い貪食能を確認するため、因子の暴露時間を 5 分にした際の貪食能を測定した。その結果 4 時間暴露では貪食能の有意な上昇がみられた IFN- γ 、LPS+IFN- γ 刺激でも貪食能の上昇は観察されなかった一方で、serum-MAF では 4 時間暴露とほぼ同等の上昇が確認された。

結果に載せていない因子も含めて 100 種類以上の様々な因子を用いてスクリーニングを行なった結果、貪食能上昇を誘導する因子がほとんど存在しなかった中でいくつかのハチミツの添加でマクロファージの貪食能が上昇した。これらの因子によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムを明らかにすることは新規活性化メカニズムの発見に繋がる可能性もあるため非常に興味深い。

既存の評価系と今回確立した評価系のタイムスケールを Figure 4-11 に示した。既存法が因子を添加してから 4-24 時間培養し、貪食能を測定しているのに対し、本評価系は因子を 5 分-4 時間という短い暴露時間に収めており、免疫反応の初期に働くマクロファージの貪食能の測定が可能と考える。さらに蛍光輝度の測定のみで貪食能を算出できるため、合計で必要となる時間は実験から解析まで合わせて最短で 85 分（因子暴露時間 5 分+ビーズ添加時間 60 分+測定時間 15 分+解析時間 5 分）であり、既存法よりも結果を迅速に出すことが可能である。

Published assay system



Novel assay system

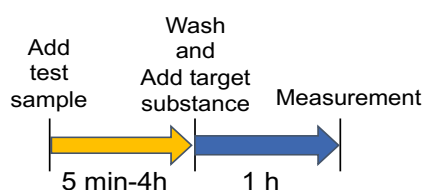


Figure 4-11. 既存の貪食能評価系と確立した貪食能評価系の比較

既存法では活性化因子に 4-24 時間暴露し、その後 1-4 時間標的を添加するのに対し、本評価法では活性化因子添加後 5 分-4 時間暴露後、細胞を洗浄し標的を 1 時間貪食させている。

さらに本研究では初期攻撃を含めたマクロファージの機能の包括的な理解を目指しているため、THP-1 マクロファージの polarization 後に貪食能を測定するための条件検討を行なった。その基本となる THP-1 マクロファージの polarization の状態を評価する方法を確立するために、M1 または M2 に分化させたマクロファージの遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析を行うことで網羅的に解析し、M1 および M2 への polarization のマーカーとして、特徴的な遺伝子を選択した。選択したそれぞれのマーカーは先行研究でも報告されており、それらのマーカーを用いて評価された M1 および M2 への polarization は適切なものであると考える。

以上のように、本章で確立した評価系は、先行研究で行われている貪食アッセイよりも迅速かつ定量的に測定できる方法である。本章で確立した評価系を polarization 後のマクロファージに応用する際のタイムスケジュールを Figure 4-12 に示す。確立した評価系は、初期攻撃としての貪食能（Figure 4-12 の Early phase に相当）の測定だけでなく、polarization 後のマクロファージが抗原と接触した際の迅速なマクロファージの貪食能（Figure 4-12 の Late phase に相当）が測定できることから、免疫反応の多段階で多様な機能をもつマクロファージを一つの評価系で解析することで、マクロファージ活性化メカニズムの包括的な理解につながると考える。

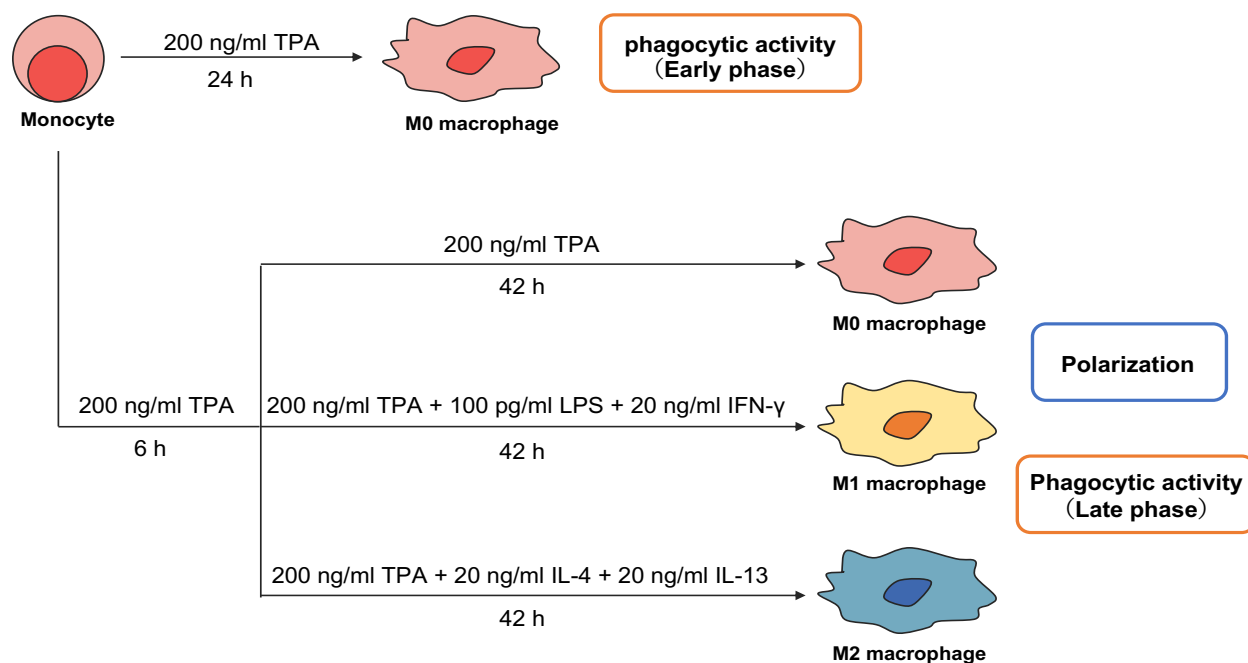


Figure 4-12. 本研究で確立したマクロファージ活性化評価法

THP-1 を TPA (200ng/ml) を添加することでマクロファージ様細胞へと分化誘導を行う。貪食能を測定する時は TPA 添加 24 時間後に Figure 4-9 のスキームで実験を行う。Polarization の測定を行う時は TPA 添加 6 時間後に M1 または M2 への分化誘導因子 (LPS+IFN- γ または IL-4+IL-13) を加え 42 時間培養後に特徴的な遺伝子の発現解析を行う。

第5章 評価系を用いた ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF の評価

5-1 序論

本章では3つの因子（ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF）を用いて、第4章で確立した食能の評価系が有用であるかを調べるとともに、それぞれの因子が示すヒト生体におよぼす様々な疾患に対する治療効果に対する基礎科学的根拠を提示することを試みた。

5-Aminolevulinic acid (ALA)は、内在性のアミノ酸でポルフィリンの前駆体となり、細胞内ではミトコンドリアの呼吸活性を上昇させる (Ishizuka *et al.*, 2011)。さらに、クエン酸第一鉄 (sodium ferrous citrate; SFC) との同時投与 (ALA+SFC) では、耐糖性の向上や脂質過多の減弱などの効果が見られ (Ohta *et al.*, 2017, Saitoh *et al.*, 2018)、ひいては糖尿病や肥満関連症に対する治療効果が期待されている (De *et al.*, 2009, Patti *et al.*, 2010)。その中で、マウスの実験系において ALA+SFC によるマクロファージの polarization の変化が報告されている一方で、ヒト免疫系に対する ALA+SFC の効果は不明な点が多い (Sugiyama Y *et al.*, 2018)。本研究で確立した評価系を用いてヒト免疫系に対する ALA+SFC の効果を定量的に評価し、ALA+SFC が免疫系に及ぼす効果の作用機序の一端を明らかにすることを試みた。

PAPLAL は白金とパラジウムの混合物であり、強いカタラーゼ活性を示すことが知られており (Okamoto *et al.*, 2012)、皮膚における白斑の治療に効果があるとの報告もある (Shibata *et al.*, 2015)。白斑は自己免疫疾患の一つで、皮膚の基底層に存在するメラノサイトが減少し、メラニン色素が作れなくなる病気である。CD8⁺T 細胞によるメラノサイト特異的な攻撃や Treg 細胞の機能障害が原因と考えられており (Lili *et al.*, 2012)、PAPLAL は皮膚角化細胞における Aryl hydrocarbon receptor (AhR)、Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2)経路を活性化させることで抗酸化を促進し、さらに CXCL10 の発現を亢進させることで患部における免疫系のバランスを回復させ、T 細胞による色素細胞の破壊を止めると考えられている (Tsuji *et al.*, 2017)。一方、患部に多数の CD68⁺OKM5⁺マクロファージが存在していることが報告されているものの、白斑におけるマクロファージの役割は不明な点が多い (Poole *et al.*, 1996)。我々は PAPLAL がマクロファージの polarization に影響を与えることで、皮膚の炎症反応を抑制していると仮定し、PAPLAL がマクロファージに与える影響を我々が確立した実験系を用いて調べた。

serum-MAF は β -ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼで処理したヒト血清で、2008 年に Yamamoto 等によって抗腫瘍効果を有すると報告されたマクロファージ活性化因子である (Yamamoto *et al.*, 2008)。その後も乳がんや肺がん、多発性硬化症に効果があるとの臨床報告も

なされ、その基礎科学的な裏付けが求められてきた (Inui *et al.*, 2014, Inui *et al.*, 2016)。本研究で確立したマクロファージ貪食能を定量的に評価する実験系を用いたところ、第4章で示したように serum-MAF によってマクロファージの貪食能が著しく上昇した。この serum-MAF によるヒトマクロファージの貪食能活性化と serum MAF の示す治療効果にどのような関連があるかを明らかにするため、異なる状態に polarize したマクロファージの貪食能に serum MAF がどのような影響を与えるか調べた。

5-2 実験操作

5-2-1 試薬

PAPLAL はムサシノ製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より、5-Aminolevulinic acid (ALA) および sodium ferrous citrate (SFC) は SBI Pharmaceuticals Co. LTD (Tokyo, Japan) より提供していただいた。LPS, *E. coli* serotype 055:B5 は Sigma-Aldrich より購入した。IFN- γ は Wako より購入した。IL-4 および IL-13 は Peprotech (NJ, USA) より購入した。

5-2-2 THP-1 由来マクロファージへの ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF 添加

THP-1 細胞を、35 mm プラスチックシャーレに 2.5×10^5 cells/well となるように播種した。そこに 200 ng/mL の TPA を添加し、6 時間後に M1 または M2 マクロファージへの分化誘導因子 (M1; 100 pg/mL LPS + 20 ng/mL IFN- γ , M2; 20 ng/mL IL-4 + 20 ng/mL IL-13) を添加し、18 時間培養した。TPA 添加から 24 時間後、1 mM ALA + 0.5 mM SFC、10% PAPLAL または 6 μ g/mL serum-MAF を添加しさらに 24 時間培養した。

5-2-3 DNA マイクロアレイ解析

THP-1 マクロファージ (M0; TPA 処理、M1; TPA+LPS+IFN- γ 処理、M2; TPA+IL-4+IL-13 処理)、および ALA + SFC を添加した M0、M1、M2 マクロファージについて Sure Print G3 Human GE Microarray Kit 8x60k ver. 3.0 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて遺伝子発現解析を行った。

5-2-4 リアルタイム PCR

THP-1 マクロファージ (M0; TPA 処理、M1; TPA+LPS+IFN- γ 処理、M2; TPA+IL-4+IL-13 処理)、および ALA+SFC を添加した M0、M1、M2 マクロファージの RNA 抽出・cDNA 合成を行い、以下のプライマーを使用してリアルタイム PCR を行なった。

	Forward	Reverse
GAPDH	TCAAGGCTGAGAACGGGAAG	CATCGCCCCACTTGATTTTG
CXCL10	TTCTTGCAAGCCAATTTTGT	TGATGGCCTTCGATTCTGG
SOCS3	ACACTTCGGGAATGCTGAAC	GAGCAAACAAGGCAGAAAGTG
IRF5	TTATATTGTCCCCCGAGGTG	ATGGCTGAAGGCAGAAAGTG
CCL22	AAACTAATGTCCCTCCCTCTC	TTTGGGGCTTCACATTGACC
CD209	GTCCCATTCTGTCCTTCTTGTC	CCACACCAGCTCACTCATAAA
FGL2	TCTGCCCAGTGAGACTAGAA	TTGCTTCGGGAGCTGAATAG

5-2-5 貪食アッセイ (ALA+SFC)

THP-1 マクロファージ (M0、M1、M2、M0+ALA+SFC、M1+ALA+SFC、M2+ALA+SFC) の培地をアスピレーターで除去し、無血清 RPMI を 1 mL/dish 加えた (wash 操作)。Wash 操作を合計 2 回行った後、培地をアスピレーターで除去し、30 µg/mL 蛍光ビーズ含有無血清 RPMI を 1.5 µL/dish 加え、1 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。1 時間後、蛍光顕微鏡 Biorevo BZ-9000 (Keyence) で写真撮影を行った。蛍光を発しているビーズと発していないビーズの面積を抽出し、貪食活性を IBA (internalized beads area) として以下の式で算出した。

$$\text{IBA (\%)} = \frac{\text{蛍光を発しているビーズの面積}}{\text{全ビーズの面積}} \times 100$$

5-2-6 貪食アッセイ (PAPLAL, serum-MAF)

THP-1 マクロファージ (M0、M1、M2、M0+PAPLAL or serum-MAF、M1+PAPLAL or serum-MAF、M2+PAPLAL or serum-MAF) に対して貪食アッセイを行なった (第 3 章 3-5 参照)。

5-2-7 ヒト末梢血単核球の分離およびマクロファージへの分化誘導

採血した血液を Leucosep リンパ球分離チューブ (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) に入れ、800 g で 15 分間遠心を行い、上清を除去した。細胞層を PBS 10 ml が入っている 50 ml チューブに移し、300 g で 10 分間遠心を行なった。上清を除去後、PBS 5 ml を加え懸濁後、300 g で 10 分間遠心を行い、この操作を合計で 2 回行なった。上清除去後、有血清 RPMI で細胞を懸濁し、細胞数を血球計算盤にてカウントし、 $2.0\text{--}3.0 \times 10^7$ cells/10 cm プラスチックシャーレとなるように細胞を播種し、CO₂ インキュベーター内で 4 時間培養した。4 時間後培地を除去し、有血清 RPMI とマクロファージへの分化誘導因子である GM-CSF または M-CSF を 50 ng/mL となるように添加し、3 日間培養を行なった。3 日後培地交換を行う際にも新しく GM-CSF または M-CSF を加え、さらに 3 日間培養を行なった。細胞を PBS で洗浄し、アクターゼで細胞を剥離後、 2.0×10^4 cells/well

(96 well plate) となるように細胞を播種し、24 時間培養を行い実験に用いた。この時も新しく GM-CSF または M-CSF を加えた。貪食アッセイは 5-2-6 と同じ操作を行なった。

5-3 結果

5-3-1 ALA+SFC がマクロファージに与える影響

5-3-1-1 ALA+SFC 添加マクロファージの遺伝子発現の変化

M1 および M2 マクロファージの遺伝子発現に対して ALA+SFC の添加が及ぼす影響を、DNA マイクロアレイにより解析した。M1 または M2 マクロファージと各マクロファージに ALA+SFC を添加したサンプル間によるシグナルの比率をスキャッタープロットで確認した (Figure 5-1)。スキャッタープロットにおける対角線両側の平行なラインは、発現の変化が 2 倍に増加あるいは 1/2 に減少したラインとした。スキャッタープロットで示すように、M1 マクロファージ、M2 マクロファージともに、ALA+SFC 処理の有無で遺伝子発現パターンにあまり大きな変化は見られないものの、M1 マクロファージでは M2 マクロファージに比べて、ALA+SFC 処理の有無による発現の変化が比較的大きかった。

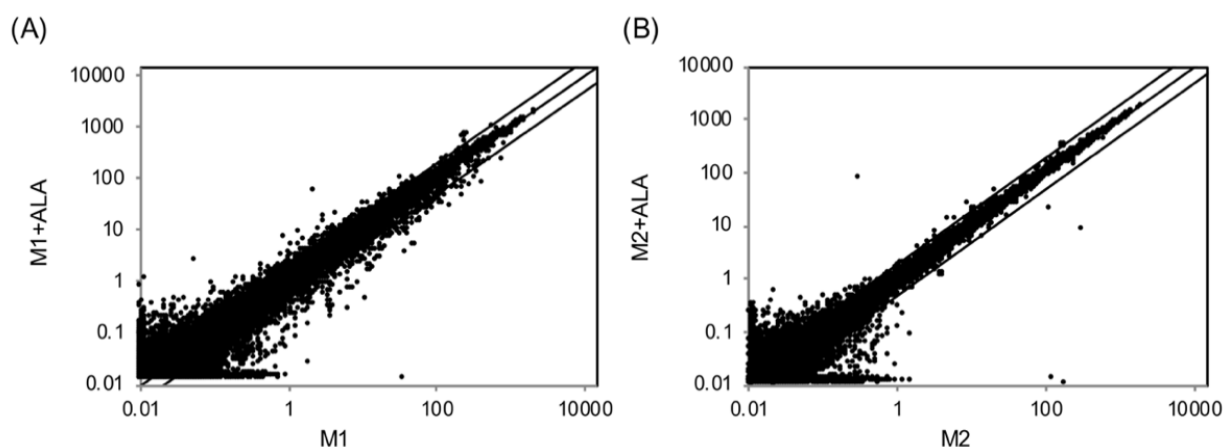


Figure 5-1. ALA+SFC の添加による M1 および M2 マクロファージの遺伝子発現変化

M1 マクロファージ (A) および M2 マクロファージ (B) に ALA+SFC 処理を行った際のマクロファージの遺伝子発現の変化をスキャッタープロットで表した。未処理を横軸 (M1 あるいは M2) に、処理後のマクロファージを縦軸 (M1+ALA あるいは M2+ALA) に示した。

先行研究において ALA+SFC の添加で *Heme oxygenase (HMOX)*をはじめとする Heme 関連遺伝子の発現が上昇することが報告されている (Ishizuka *et al.*, 2011, Hooda *et al.*, 2013)。そこで本実験系でも ALA+SFC によって Heme 関連遺伝子の発現が変化しているか確認した (Table 5-1)。M1 マクロファージでは、ALA+SFC の添加で各遺伝子の発現が、*HEBP1* (*heme binding protein 1*) では 1.70 倍、*HMOX1* (*heme oxygenase 1*) では 2.80 倍、*HMOX2* (*heme oxygenase 2*) では 1.30 倍、

SLC48A1 (solute carrier family 48 member 1, also called *HRG1*; heme-responsive gene 1)では 6.46 倍上昇していた。M2 マクロファージに ALA+SFC を添加した場合では、これらの遺伝子の発現はそれぞれ 1.34 倍、1.95 倍、1.11 倍、3.13 倍変化した。

Table 5-1. Changes in the expression of heme-related genes

Gene name	Description	Normalized expression*				Ratio	
		M1	M2	M1+ALA	M2+ALA	(M1+ALA)/M1	(M2+ALA)/M2
<i>HEBP1</i>	heme binding protein 1	41.6	53.7	70.6	72.1	1.70	1.34
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase (decycling) 1	243	164	679	320	2.80	1.95
<i>HMOX2</i>	heme oxygenase (decycling) 2	14.7	20.9	19.1	23.3	1.30	1.11
<i>SLC48A1</i>	solute carrier family 48 member 1	2.1	6.4	13.7	19.9	6.46	3.13

*: Averages of normalized intensity values are indicated.

5-3-1-2 ALA+SFC の添加による M1 および M2 マクロファージの免疫関連遺伝子の発現解析

ALA+SFC の添加によって Heme 関連遺伝子の発現が上昇していることが確認できたため、次に ALA+SFC を添加した際の各マクロファージの免疫関連遺伝子（分泌因子、受容体、転写因子、MHC 分子）の発現に変化があるかを調べた。最初に M1 マクロファージに ALA+SFC を添加することで発現量が 1/2 以下に減少した免疫関連遺伝子をリストアップした (Table 5-2)。M1 マクロファージに ALA+SFC を添加すると、*CCL2* (chemokine (C-C motif) ligand 2)、*CCL4L2* (chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2)、*CXCL9* (chemokine (C-X-C motif) ligand 9)、*CXCL10* (chemokine (C-X-C motif) ligand 10)、*IDO1* (indoleamine 2,3-dioxygenase 1) の遺伝子発現が強く抑制されていることが明らかとなった。CCL2 を除くこれらの遺伝子発現は、M1 マクロファージに分化する時に M0 マクロファージと比較して 7-1000 倍以上発現量が上昇する遺伝子であり、M1 マクロファージのマーカーとしてもよく知られている遺伝子であるため、ALA+SFC は M1 マクロファージへの polarization を抑制すると考えられる。

一方で M2 マクロファージに関しても Table 5-2 と同じ条件で遺伝子発現をリストアップした結果、CCL2、CCL4L2 のみ条件を満たした (Table 5-3)。M1 マクロファージに添加した時と比較して M2 マクロファージに対する ALA+SFC の免疫関連遺伝子への効果は少ないようであった。

Table 5-2. Immune-related genes decreased in M1 macrophages treated with ALA+SFC

Gene name	Description	Normalized expression*		Ratio
		M1	M1+ALA	(M1+ALA)/M1
<u>Signaling factor</u>				
<i>CCL2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.74	0.33	0.09
<i>CCL3</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3	535	236	0.44
<i>CCL3L3</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	63.8	22.5	0.35
<i>CCL4L2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	45.0	4.44	0.10
<i>CXCL9</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	12.8	1.61	0.13
<i>CXCL10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3.99	0.28	0.07
<i>IDO1</i>	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	10.8	0.48	0.04
<i>MIF</i>	macrophage migration inhibitory factor	363	178	0.49
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor	56.7	21.6	0.38
<u>Receptor and receptor related protein</u>				
<i>CD14</i>	CD14 molecule	32.3	8.20	0.25
<i>ICAM1</i>	intercellular adhesion molecule 1	70.1	26.6	0.38
<u>Transcriptional factor</u>				
<i>IRF1</i>	interferon regulatory factor 1	36.3	14.2	0.39
<i>IRF5</i>	interferon regulatory factor 5	67.1	29.8	0.44
<i>IRF8</i>	interferon regulatory factor 8	3.86	0.86	0.22
<i>SOCS3</i>	suppressor of cytokine signaling 3	20.1	4.81	0.24
<u>MHC molecules</u>				
<i>HLA-DMA</i>	MHC class II, DM alpha	15.2	4.08	0.27
<i>HLA-DMB</i>	MHC class II, DM beta	8.97	2.40	0.27
<i>HLA-DPA1</i>	MHC class II, DP alpha 1	52.1	21.0	0.40
<i>HLA-DPB1</i>	MHC class II, DP beta 1	36.8	13.0	0.34
<i>HLA-DQA1</i>	MHC class II, DQ alpha 1	12.6	2.78	0.22
<i>HLA-DQA2</i>	MHC class II, DQ alpha 2	11.4	2.60	0.23
<i>HLA-DQB1</i>	MHC class II, DQ beta 1	73.0	22.4	0.27
<i>HLA-DQB2</i>	MHC class II, DQ beta 2	10.5	2.61	0.25
<i>HLA-DRA</i>	MHC class II, DR alpha	96.1	38.0	0.40
<i>HLA-DRB1</i>	MHC class II, DR beta 1	443	201	0.45
<i>HLA-DRB3</i>	MHC class II, DR beta 3	114	48.2	0.42
<i>HLA-DRB4</i>	MHC class II, DR beta 4	59.1	23.6	0.40
<i>HLA-DRB5</i>	MHC class II, DR beta 5	365	174	0.48

*: Averages of normalized intensity values are indicated.

Table 5-3. Immune-related genes decreased in M2 macrophages treated with ALA and SFC

Gene name	Description	Normalized expression*		Ratio
		M2	M2+ALA	(M2+ALA)/M2
<i>CCL2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.71	1.24	0.34
<i>CCL4L2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2	15.4	7.39	0.48

*: Averages of normalized intensity values are indicated.

5-3-1-3 ALA+SFC がマクロファージの貪食能へ及ぼす効果

ALA+SFC がマクロファージの貪食能に変化を与えるかを検討するため、M0、M1、M2 マクロファージに ALA+SFC を添加した時の貪食能を測定した (Figure 5-2)。IBA は M0 マクロファージ (control; $8.8 \pm 2.5\%$ 、ALA+SFC; 8.1 ± 2.2 ($p=0.73$))、M1 マクロファージ (control; $6.4 \pm 2.2\%$ 、ALA+SFC; $1.9 \pm 1.2\%$ ($p=0.02$))、M2 マクロファージ (control; $7.4 \pm 2.2\%$ 、ALA+SFC; $6.7 \pm 3.4\%$ ($p=0.79$)) となった (p 値は各マクロファージの control と t 検定を行なった結果を示している。n=3)。この結果より M0 および M2 マクロファージにおいて、ALA+SFC の有無で貪食能は変化しない一方で、M1 マクロファージに ALA+SFC を添加すると貪食能が有意に減少することが明らかとなった。

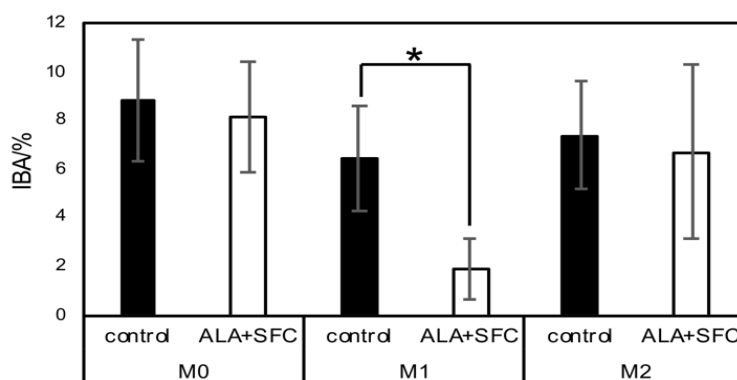


Figure 5-2. ALA+SFC 添加マクロファージの貪食能

1 mM ALA+0.5 mM SFC 処理した M1 および M2 マクロファージの貪食能 (IBA) を測定した。ALA+SFC の添加条件は実験操作 (5-2-2) 参照。Control は ALA+SFC を添加せずに polarization を 48 時間行なっている。エラーバーは SD (n=3)。* $p<0.05$ (t -test)

5-3-2 PAPLAL がマクロファージに与える影響

5-3-2-1 PAPLAL によるマクロファージの polarization の変化

M0、M1、M2 マクロファージの遺伝子発現に対して PAPLAL の添加が及ぼす影響を、リアルタイム PCR を用いて調べた。M0 時の各遺伝子の発現量を 1 とした時の処理後の遺伝子発現量を相対値で算出した (Figure 5-3)。M0 から M1 へ分化させたマクロファージは、M1 マーカーである CXCL10 が 36.9 倍、SOCS3 が 5.7 倍、IRF5 が 2.7 倍上昇していたが、そこに PAPLAL を添加した結果、それら M1 マーカーの発現は有意に低下し、M0 と同等あるいはそれ以下に低下した。一方で M0 から M2 へ分化させたマクロファージは、M2 マーカーである CCL22 が 7.1 倍、CD209 が 25.9 倍、FGL2 が 2.9 倍上昇しており、そこに PAPLAL を添加すると、CD209、FGL2 の発現量は有意に減少した一方で、CCL22 の発現量だけは有意に上昇した。

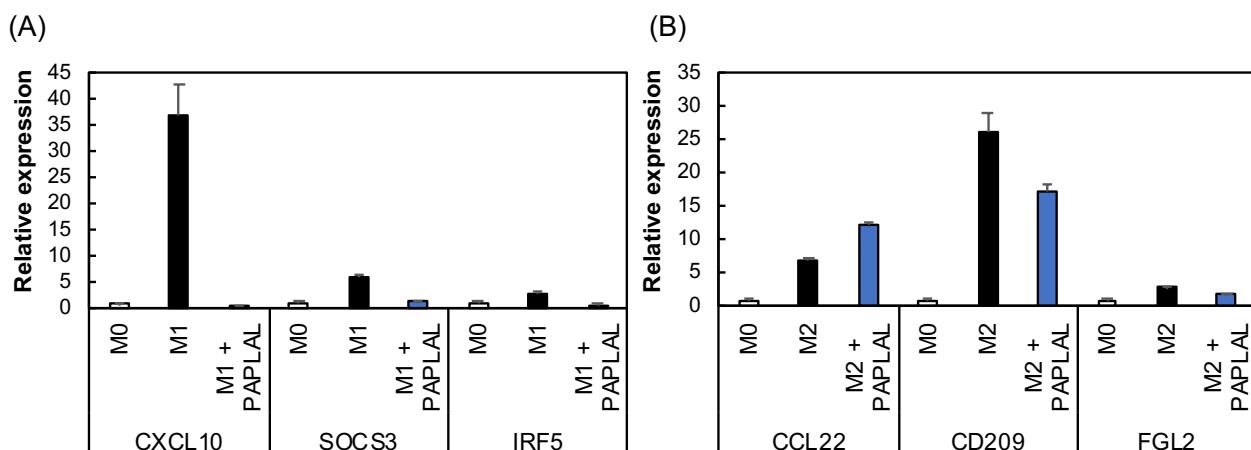


Figure 5-3. PAPLAL 処理 M1 および M2 マクロファージにおけるマーカー遺伝子の発現量

10%PAPLA 処理した M1 および M2 マクロファージの各マーカー遺伝子 (M1 マーカー; *CXCL10*, *SOCS3*, *IRF5*, M2 マーカー; *CCL22*, *CD209*, *FGL2*) の発現量を測定した。M1 マクロファージおよび M2 マクロファージに polarize したマクロファージ (左; M1、右; M2) およびそれぞれに PAPLAL を添加したマクロファージ (左; M1+PAPLAL、右; M2+PAPLAL) における各遺伝子の発現量は、TPA48 時間処理のマクロファージにおける各遺伝子の発現量 (M0) を 1 とした時の相対値で算出した。エラーバーは SD (n=3)。

5-3-2-2 PAPLAL がマクロファージの食食能へ及ぼす効果

PAPLAL がマクロファージの食食能に変化を与えるかを検討するため、M0、M1、M2 マクロファージに PAPLAL を添加した時の食食能を測定した (Figure 5-4)。IBRf は M0 マクロファージ (control; $8.5 \pm 1.3\%$ 、PAPLAL; 8.4 ± 0.8 ($p=0.95$))、M1 マクロファージ (control; $5.4 \pm 0.7\%$ 、PAPLAL; $6.1 \pm 3.3\%$ ($p=0.80$))、M2 マクロファージ (control; $7.8 \pm 1.5\%$ 、PAPLAL; $6.3 \pm 0.8\%$ ($p=0.29$)) となり、PAPLAL の有無に関わらずマクロファージの食食能は変化しなかった (p 値は各マクロファージの control と t 検定を行なった結果を示している。n=3)。

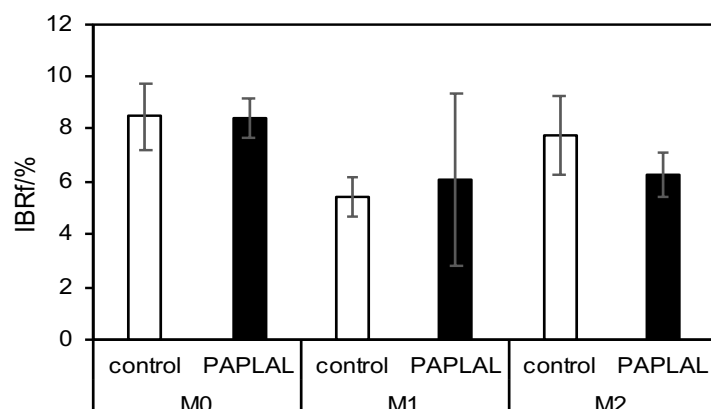


Figure 5-4. PAPLAL 処理マクロファージの食食能

10 %PAPLA 処理した M1 および M2 マクロファージの食食能 (IBRf) を測定した。PAPLAL の添加条件は実験操作 (5-2-2) 参照。Control は ALA+SFC を添加せずに polarization を 48 時間行なっている。エラーバーは SD (n=3)。

5-3-3 serum-MAF がマクロファージに与える影響

5-3-3-1 serum-MAF 添加時のマクロファージの遺伝子発現の変化

M0、M1、M2 マクロファージの遺伝子発現に対して serum-MAF 添加が及ぼす影響を、DNA マイクロアレイ解析を用いて調べた。M0、M1、M2 マクロファージと各マクロファージに serum-MAF を添加したサンプル間によるシグナルの比率をスキャッタープロットで確認した (Figure 5-5)。スキャッタープロットにおける対角線両側の平行なラインは、発現の変化が2倍に増加あるいは1/2に減少したラインとした。スキャッタープロットに示すように M0、M1 または M2 マクロファージに serum-MAF を添加しても大きく変動している遺伝子はほとんど見られなかった。

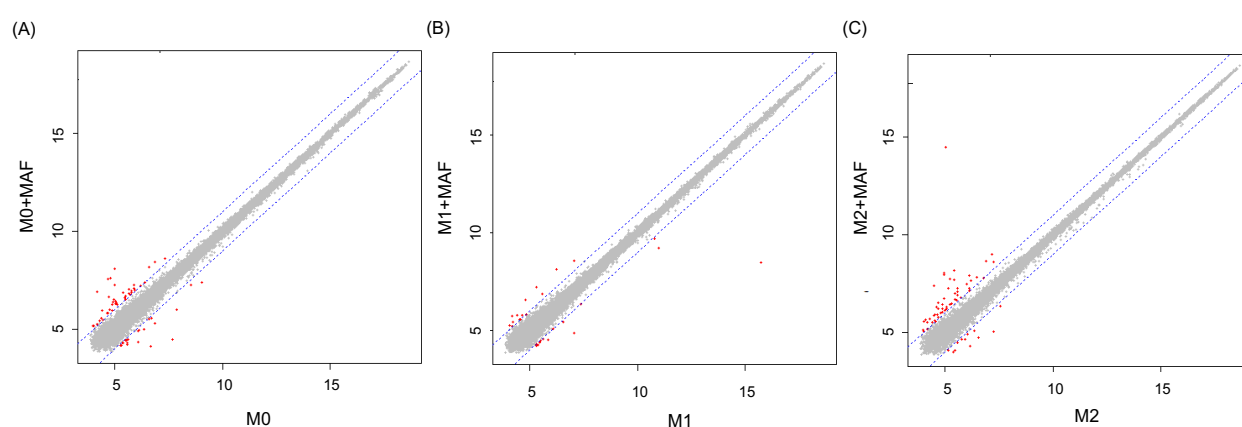


Figure 5-5. serum-MAF の添加による M0、M1、M2 マクロファージの遺伝子発現変化

M0 マクロファージ (A)、M1 マクロファージ (B)、M2 マクロファージ (C) に serum-MAF 処理を行った際のマクロファージの遺伝子発現の変化をスキャッタープロットで表した。未処理を横軸 (M0、M1 あるいは M2) に、処理後のマクロファージを縦軸 (M0+MAF、M1+MAF あるいは M2+MAF) に示した。

5-3-3-2 serum-MAF がマクロファージの貪食能へ及ぼす効果

serum-MAF がマクロファージの貪食能に変化を与えるかを検討するため、M0、M1、M2 マクロファージに serum-MAF を添加した時の貪食能を測定した (Figure 5-6)。IBRf は M0 マクロファージ (control; $8.0 \pm 1.4\%$ 、serum-MAF; 20.7 ± 3.5 ($p=0.004$)), M1 マクロファージ (control; $5.1 \pm 0.5\%$ 、serum-MAF; $17.0 \pm 4.9\%$ ($p=0.023$)), M2 マクロファージ (control; $6.8 \pm 2.0\%$ 、serum-MAF; $14.6 \pm 3.2\%$ ($p=0.012$)) となり、serum-MAF を添加すると各マクロファージで貪食能は有意に上昇した。(p 値は各マクロファージの control と t 検定を行なった結果を示している。n=3)。

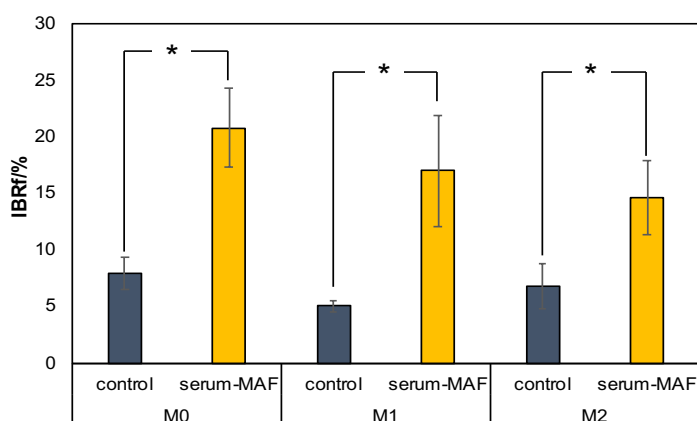


Figure 5-6. serum-MAF 処理 M1 および M2 マクロファージの食食能

6 μ g/ml serum-MAF 処理した M1 および M2 マクロファージの食食能 (IBRf) を測定した。Serum-MAF の添加条件は実験操作 (5-2-2) 参照。Control は serum-MAF を添加せずに polarization を 48 時間行なっている。エラーバーは SD (n=3)。* p <0.05 (t -test)

また確立した評価法で行なった実験結果が THP-1 マクロファージのみにみられる現象であるのかを確かめるため、ヒトの末梢血から採取した単球を、7 日間の処理で PBMC を M1 に polarize できることが知られている GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating Factor) または 7 日間の処理で PBMC を M2 に polarize できることが知られている M-CSF (macrophage colony-stimulating Factor) (Hamilton *et al.*, 2008) で polarize させたマクロファージを用いて同様の実験を行なった (Figure 5-7)。その結果、GM-CSF で M1 に polarize させたマクロファージは control が 6.7 ± 0.8 、serum-MAF が 20.2 ± 2.3 ($p=0.001$)、M-CSF で M2 に polarize させたマクロファージは control が 15.1 ± 3.7 、serum-MAF が 22.2 ± 2.7 ($p=0.03$) となった (p 値は各マクロファージの control と t 検定を行なった結果を示している。n=3)。

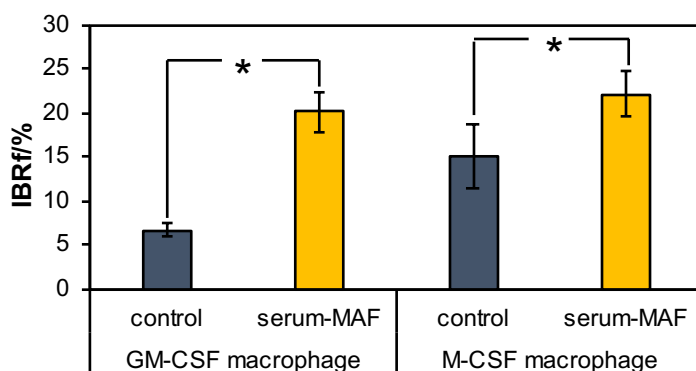


Figure 5-7. serum-MAF 処理 M1 および M2 マクロファージの食食能

ヒト末梢血から M1 および M2 に polarize させたマクロファージに 6 μ g/mL serum-MAF で 1 時間処理後の食食能 (IBRf) を測定した。エラーバーは SD (n=3)。* p <0.05 (t -test)

5-4 考察

ALA+SFC は M1 マクロファージの polarization および食食能を抑制する

先行研究においていくつかの細胞種で *HMOX1* と *SLC48A1* などの Heme 関連遺伝子の発現が ALA+SFC によって上昇することが報告されている (Ishizuka *et al.*, 2011, Hooda *et al.*, 2013)。遺伝子発現解析の結果から、本実験系において ALA+SFC の添加で *HMOX1* と *SLC48A* の 2 倍以上の発現上昇がみられたため、本実験系は先行研究の結果を再現していると考ええる。

本研究における遺伝子発現解析の結果では、ALA+SFC の添加によって *HMOX1* の発現が上昇

するとともに M1 マクロファージへの polarization を強く抑制する一方で、M2 マクロファージへの影響は少なかった。この結果は、Harusato 等による、*HMOX1* の発現が上昇することで *IFN- γ* や *iNOS* などの炎症に関わる遺伝子発現が減少し、*YMI (chitinase-like 3)* や *FIZZ (RETNLA: resistin like alpha)* などの抗炎症に関わる遺伝子発現が上昇するという報告 (Harusato *et al.*, 2013) と M1 では一致しているものの M2 に対する反応は異なっているとも言える。しかし、Harusato 等の結果はマウスを用いた結果であり、彼らが用いている M2 マーカーのヒトでの相同遺伝子は M2 マーカーではなく、今回のチップ解析においても大きな変動は見せていなかった (data not shown)。また、LPS を処理した RAW264 (マウスマクロファージ細胞株) に ALA を添加すると貪食能が上昇することが報告されている (Ogura *et al.*, 2018)。本評価系では M1 マクロファージに ALA+SFC を添加すると貪食能が有意に低下しており、やはりマウスとヒトとの違いや細胞種の違い、polarization 条件の違い、貪食能評価系の違い等から、先行研究と異なる結果となったと考えている。しかし、M1 マクロファージの polarization を抑制することは共通した結果であり、今回の結果ではその抑制効果は大きく、またその抑制メカニズムが *HMOX1* の発現上昇という既知の遺伝子パスウェイで説明できるものであった。今回の結果は、ALA+SFC のヒト免疫系に対する効果が、マクロファージの M1 への polarization を抑制することで抗炎症の作用を示すことであることを示していると考えている。

一方で、今回 *IDO1* および *MHC II* 遺伝子の発現が M1 マクロファージへの ALA+SFC 処理によって減少したことは新たな知見をもたらしている。これらの遺伝子が *HMOX1* の下流で発現調節を受けているという報告は無く、今後その関係を解析していくことは Heme 代謝が細胞に及ぼす作用を理解する新規メカニズムの発見にも繋がる可能性があり非常に興味深い。また *IDO1* は免疫調節因子として知られており、炎症時に樹状細胞や貪食細胞で発現上昇がおこることが報告されている (Romani *et al.*, 2008)。MHC II 分子は CD4⁺T 細胞への抗原提示で使用されるタンパク質である。この結果は ALA+SFC が M1 への polarization や貪食能を抑制するだけでなく免疫系全体の負の制御を行なっている可能性を示しており、自己免疫疾患などの過剰な免疫反応の抑制に効果があるのではないかと考える。例えば全身性エリテマトーデス (SLE: Systemic Lupus Erythematosus) は単球およびマクロファージの機能不全が関与している自己免疫疾患で、重症な SLE では M1 マクロファージが増加していることが報告されているため、M1 マクロファージの機能を抑制する ALA+SFC は SLE への効果的な治療になり得ることも考えられる (Byrne *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2015)。

PAPLAL はマクロファージの polarization を制御する

今回、PAPLAL はヒト M1 マクロファージに特徴的な遺伝子の発現量を強く抑制していた。この結果はラットを用いた実験でも確認されていることから (Minamiyama *et al.*, 2018; ただし共同研究者の担当したデータ)、PAPLAL が M1 マクロファージへの polarization を抑制する効果を持つことは十分に期待できる。その一方で、M2 マクロファージに対する PAPLAL の効果は、ヒトの細胞においては M1 マクロファージと比較して変動は少なかったもののマーカー遺伝子の発現を有意に変化させ、ラットでは大きな変化をもたらさなかった (Minamiyama *et al.*, 2018; ただし共同研究者の担当したデータ)。ヒトで M1、M2 ともに遺伝子発現を抑制したことから細胞全体の活性を弱らせていたとも考えられるが、貪食能に変化が無かったことから、今回の結果は免疫応答全体を沈静化させるような効果であったと理解しており、遺伝子発現の変化の有無はヒトとラットの免疫系の違いが影響していると考えている。この理解は、ヒト M2 マクロファージにおいて CCL22 の発現が PAPLAL の添加で増加していた点からもサポートされる。CCL22 は Treg の炎症部への誘導に関与しており (Montane *et al.*, 2011)、炎症を収束させ、免疫系のバランスを保つのに重要な遺伝子として近年注目されている遺伝子である。この遺伝子の発現上昇は非常に興味深い。以上の結果より PAPLAL は M1 マクロファージによる炎症反応を強く抑制し、M2 マクロファージにおける CCL22 を増加させて Treg の誘導を行うことで、CD8⁺T 細胞の働きを抑制している可能性が考えられる。

serum-MAF は遺伝子発現プロファイルを変えずマクロファージの貪食能を上昇させる

第 4 章では、serum-MAF 処理によって M0 マクロファージの貪食能を著しく上昇させることを明らかにした。ここではさらに M0 や M1、M2 に polarization を行なったマクロファージに対する serum-MAF の効果を検証したところ、遺伝子発現の大きな変動は見られなかったものの、serum-MAF の添加により M0、M1 および M2 マクロファージにおいても貪食能が大きく上昇した。これらの結果から、serum-MAF はマクロファージの polarization に影響は与えず、マクロファージの状態に関係なく貪食能を上昇させることが明らかとなった。さらにヒト末梢血由来マクロファージでも貪食能を測定した。ヒト末梢血から単球を分離し、そこに GM-CSF または M-CSF を加えて 7 日間培養を行うと、それぞれ M1 または M2 様マクロファージへ polarize する (Hamilton *et al.*, 2008)。THP-1 マクロファージから polarization させたマクロファージで行なった実験結果と同様の実験を行なった結果、serum-MAF の添加で GM-CSF または M-CSF で分化させたマクロファージの貪食能上昇が見られたことから、serum-MAF による貪食能の上昇は THP-1 マクロファージ

のみに見られる現象ではなく、ヒトマクロファージで共通に見られる現象であると考えられ、本評価系の汎用性の高さを示していると考ええる。

免疫反応は様々な細胞が分泌因子などによって情報交換を行っており、適切なタイミングで適切な因子を分泌することで炎症と抗炎症のバランスが保たれている。アジュバントを含むワクチン接種においては、副作用である炎症の惹起が問題点として挙げられている。ワクチン接種では多かれ少なかれ、接種部位に発赤を生じる。つまり現在のアジュバントは副作用として、炎症反応が生じていると考えられるため、炎症反応時に働く M1 マクロファージが間接的に活性化されていると考えられる。マクロファージの polarization に変化を与えない因子は、炎症・抗炎症のバランスを保ったまま免疫系の活性化を誘導できるため、副作用の少ないアジュバントの開発に繋がると考えており、serum-MAF の有効成分の探索やマクロファージ活性化メカニズムを明らかにすることにより、これまでは無い新しいメカニズムで高いアジュバント作用を示す薬剤の開発に貢献できるものと期待される。

5-5 小括

第 4 章で確立した polarization および貪食評価系を用いて、第 5 章では因子添加時のマクロファージの挙動を調べた。ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF ではそれぞれの因子でマクロファージの polarization や貪食能の挙動は大きく異なった。この結果は本研究で確立した実験系が様々な因子によって多様な状態に変化したマクロファージを解析することが可能であることを示している。また PAPLAL の実験では、ラットの骨髄由来マクロファージを用いた実験とほぼ同様の結果が得られていること、serum-MAF の実験ではヒト末梢血由来マクロファージでほぼ同様の結果が得られていることから、確立した実験系は汎用性の高い実験系となっていると考えていると考えている。

本研究は初期攻撃として働くマクロファージに着目している。そして、初期攻撃としての働きは貪食を行うことであり、貪食能を上昇させる因子に注目している。第 4 章および本章で解析した因子の中で顕著な貪食能の亢進を示した因子は serum-MAF であり、その活性化メカニズムは興味深い。そこで第 6 章では serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムを解析した。

第 6 章 serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムの解析

6-1 序論

serum-MAF (serum derived macrophage activating factor) は β -ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼで処理したヒト血清で、腫瘍退縮の効果も報告されている (Yamamoto *et al.*, 2008)。またマウスにおいて serum-MAF によってマクロファージの貪食能が上昇することが報告されているものの、そのメカニズムは不明である (Kuchiike *et al.*, 2013)。本章では serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムを明らかにするため、活性化メカニズムが既知である一般的なマクロファージ活性化因子であり、本実験系で貪食能の上昇がみられた LPS+IFN- γ と比較しながら形態やシグナル伝達経路などを多角的に解析した。

6-2 実験操作

6-2-1 遊走性の測定

THP-1 マクロファージ (5.0×10^5 cells/35mm dish) に serum-MAF (6 μ g/mL) または LPS+IFN- γ (LPS; 100 pg/mL、IFN- γ ; 20 ng/mL) を 4 時間暴露後、無血清 RPMI で 2 度の洗浄を行った後、無血清 RPMI に培地交換をした。そこに 60 μ g/dish の pH 感受性ビーズを添加した。ビーズ添加時から 1 時間、4 分間隔でタイムラプス観察を行った。タイムラプス観察開始の 30 分前に Hoechst33342 を添加して核を染色した。タイムラプス観察終了後に Image J を用いて、1 時間に細胞 (Hoechst で染色された核の中心を細胞の場所とした) が移動した軌跡について、5 点の場所を記録し、点と点の間の距離の合計を総移動距離として算出した。

6-2-2 タイムラプス観察を用いたビーズ取り込み効率の測定方法

遊走性の測定に用いたタイムラプス観察のデータを用いて解析を行った。Image J を用いて、1 つ 1 つの細胞が 1 時間のうちに何個のビーズに接触し、何個のビーズを取り込んだのかをカウントした。細胞とビーズとの接触に関してはビーズ濃度が大きく影響することから、撮影領域ごとのビーズ数の偏りを無くするため、以下の式を用いて補正を行った。Control、serum-MAF、LPS+IFN- γ それぞれ $n=3$ でデータを取っており、control のひとつの撮影データ (基準) の撮影領域に存在したビーズ数を基本としてビーズの濃度に応じた補正を行っている。ただし、取り込み効率の算出時には、これらの補正値は約分されて無くなることから影響しない。

$$\text{接触したビーズ数} = \text{各データの接触したビーズ数} \times \frac{\text{基準の全ビーズ数}}{\text{各データの全ビーズ数}}$$

$$\text{取り込まれたビーズ数} = \text{各データの取り込まれたビーズ数} \times \frac{\text{基準の全ビーズ数}}{\text{各データの全ビーズ数}}$$

$$\text{ビーズ取り込み効率} = \frac{\text{取り込まれたビーズ数}}{\text{接触したビーズ数}} \times 100$$

6-2-3 ローテーターを用いたビーズ取り込み効率の測定方法

THP-1 マクロファージ (5.0×10^5 cells/35mm dish) に serum-MAF ($6 \mu\text{g/mL}$) または LPS+IFN- γ (LPS; $100 \mu\text{g/mL}$ 、IFN- γ ; 20 ng/mL) を 4 時間暴露後、無血清 RPMI で 2 度の洗浄を行った後、Accutase (Innovative Cell Technologies) を 10 分間作用させた後、無血清培地を添加してピペッティングを行うことで細胞を剥離し 1.5 mL チューブ内に回収した。遠心後、 3.5×10^5 cells に対して $6 \mu\text{g/mL}$ の pH 感受性蛍光ビーズを加え、1 mL の無血清 RPMI 中に懸濁した状態でローテーターを用いて 38 rpm で 1 時間攪拌した。攪拌後、ローテーター内の細胞懸濁液 100 μL を 96 穴プレートに移してビーズの蛍光輝度を測定後、pH3.5 の緩衝溶液を加えて再度蛍光輝度を測定し、ビーズ取り込まれ率 (IBRf) を算出した。

6-2-4 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

THP-1 細胞を 5.0×10^5 cells/dish となるように 35 mm プラスチックシャーレに播種し、200 ng/ml TPA 含有培地で分化誘導を行った。分化誘導後のマクロファージに $6 \mu\text{g/mL}$ serum-MAF または $100 \mu\text{g/mL}$ LPS+20 ng/mL IFN- γ 処理を 4 時間行い、2%グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液で 1 度洗浄を行った後、2%グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液で細胞の固定を行った。SEM 観察は、花市電子顕微鏡株式会社 (Aichi, Japan) で行った。

6-2-5 Lifeact-GFP THP-1 細胞の作製

2×10^6 cells の HEK293T 細胞を 10 cm プラスチックシャーレに播種し、over night で培養を行った。 $4 \mu\text{g}$ の plasmid (pBabe Lifeact puro $2 \mu\text{g}$ + Amphotropic $2 \mu\text{g}$) と PEI 40 μL 、OPTI-MEM 240 μL を 1.5 ml チューブで混合し、HEK293T 細胞に滴下し、CO₂ インキュベータ内で 24 時間培養した。培地交換を行い、さらに 24 時間後に回収したウイルスを含む培養上清を 0.45 μm のフィルターに通したものに、終濃度 8 mg/mL となるように polybrene を加え、THP-1 細胞 (4×10^6 cells/well) を

播種した 6 well プレートに添加し、30°C、2000 rpm で 1 時間遠心した。その後、CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養し、2 µg/mL の puromycin で 3 日間セレクションを行なった。セレクション後、限界希釈法で 96 well プレートに THP-1 細胞を 1 cell/well になるように播種し、蛍光を発している細胞のクローニングを行なった。

6-2-6 DNA マイクロアレイ解析

分化誘導を行った THP-1 マクロファージおよび分化後に 1 時間の 6 µg/mL Serum MAF 処理を行った THP-1 マクロファージについて Sure Print G3 Human GE Microarray Kit 8x60k ver. 2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて遺伝子発現解析を行った。解析は、北海道システムサイエンス (Hokkaido, Japan) に委託した。

6-2-7 リン酸化免疫受容体アレイ解析

リン酸化免疫受容体アレイ解析は Human Phospho-Immunoreceptor Array Kit (R&D systems, Minnesota, USA) を用いて以下のプロトコルで行った。THP-1 マクロファージを 3×10⁶ cells/10 mm dish となるように播種した。任意の因子を添加し（各サンプルにつき dish を 3 枚使用する）、1 時間反応させた。反応後 1×PBS で 2 回洗浄し、1×10⁷ cells あたり 1 ml の Lysis Buffer を加え細胞を破碎した。細胞破碎液を 1.5 mL チューブに回収後、4°C で 30 分攪拌を行い、14,000 rpm×5 分遠心を行い、上清のタンパク量を測定し、各サンプルのタンパク量を揃えた。メンブレンに各サンプル溶液を加え、4°C で震盪を行った (overnight)。メンブレンを wash buffer で 3 回洗浄し、Anti-Phospho Tyrosine-HRP detection antibody を加え 2 時間震盪を行った。wash buffer で 3 回洗浄後、X 線フィルムへ 10 分間露光し、検出した。

6-2-8 リン酸化タンパク質の定量

5.0×10⁵ cells の THP-1 マクロファージに Serum-MAF (6 µg/mL)、LPS+IFN-γ (100 ng/mL LPS、20 ng/mL IFN-γ) を添加し、1 時間反応させた。反応後、無血清 RPMI で 2 回洗浄を行った後 1.5 ml の Buffer A (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM 2-mercaptoethanol、150 mM NaCl、1 % Triton X-100、20 µM APMSF、10 µg/mL Leupeptin、1 mM Na₃VO₄) で細胞を破碎し、回収した。10,000 g×10 分×4°C で遠心を行い、上清を回収した。回収した上清のタンパク量を Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定し、各サンプルのタンパク量を揃えた。SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティングによってリン酸化タンパク質のバンドを検出した。

使用した抗体を以下に示す。pY-STAT1、pY-STAT3、pY-STAT5、p44/42 MAPK (Erk) rabbit antibody (Cell signaling technology Japan, Tokyo, JAPAN)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit antibody (Cell signaling technology Japan)、JNK1/3 rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)、p-JNK rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology)、anti-p38 rabbit antibody (Upstate Biotechnology, Billerica, MA, USA)、Phospho-p38 MAP kinase (Thr180/tyr182) rabbit antibody (Cell signaling technology Japan)

6-2-9 阻害剤実験

貪食能アッセイを行う各活性化因子添加時に、Table 6-1 の阻害剤を同時に添加し 4 時間反応を行った。反応後、wash 操作を行い、貪食アッセイを行った。

Table 6-1. 阻害剤リスト

阻害剤	会社	阻害標的分子	最終濃度
H89	Cayman chemical	Protein kinase A (PKA)	4 μ M
LY294002	東京化成工業株式会社	PI3-kinase	100 μ M
PP2	Calbiochem	Src and RIP2 kinase	10 μ M
Piceatannol	東京化成工業株式会社	Syk tyrosine kinase	10 μ M
SB203580	Cayman chemical	p38 MAPK	100 μ M
U0126	Sigma aldrich	MKK1, MKK2	10 μ M

6-2-10 siRNA によるトランスフェクション

THP-1 細胞 2×10^4 cells/well を 30 μ l の有血清 RPMI で希釈し、96 well plate に播種した。500 μ L チューブに、30 μ L の無血清 RPMI、Hiperfect (Qiagen, Venlo, Netherlands) 0.5 μ L、siRNA (Bioneer, Daejeon, Korea) を終濃度が 100 nM となるように加え、vortex で混合後、15 分間室温で静置した (siRNA 溶液)。15 分後、THP-1 細胞に siRNA 溶液を加えてピペッティングを行い、6 時間 CO₂ インキュベータ内で培養した。6 時間後、別の 96 well plate に 140 μ L の TPA 含有有血清 RPMI (TPA; 終濃度 200 ng/mL) を加えておき、そこにトランスフェクションを行なった THP-1 を加えて CO₂ インキュベータ内で 18 時間培養を行なった。ターゲット遺伝子がノックダウンされているかを確認するため、トランスフェクションを行なった細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR で遺伝子発現を確認した。その際に使用したプライマー配列を Table 6-2 に示す。

Table 6-2. 使用したプライマー配列

	Forward primer	Reverse primer
CDC42	GATTACGACCGCTGAGTTATCC	GTTATCTCAGGCACCCACTTT
FCER1	AAGGATGGTGAAGCTCTCAAG	CACTTTGCCCGTACAGTAGTAG
FCER2	GGAGGAGGTGACAAAGCTAAG	GTAGCACTTCCGTTGGAAATTG
FCGR1A	CTGCCACAGAGGATGGAAAT	GAAACCAGACAGGAGTTGGTAA
FCGR2A	GGCACCTACTGACGATGATAAA	CAAGCTGAGAGTATGACCACAT
FCGR2B	GCTGTAGTGGCCTTGATCTAC	TAGTGGGATTGGCTGGTTTC
GAPDH	CTCCTCACAGTTGCCATGTA	GTTGAGCACAGGGTACTTTATTG
IFNGR1	ACGAGCAGGAAGTCGATTATG	TCTTCCTTCTGCGTGAGTATTT
IFNGR2	CTGGGACTCTGTGTCCATTATC	CTCCGATGGCTTGATCTCTTC
ITGAX	GTTAGCAGCCACGAACAATTC	TCCCTCTGTCCCAGGTTATT
ITGB2	CAAGTCCCAGTGGAACAATGA	GTCTTCACCAAGTGCTCCTAAC
JAK1	GGATTACAAGGATGACGAAGGA	CGAAGAAGGCCAGGGAAATA
JAK2	GCAGCAACAGAGCCTATCGG	TGCACAAAATCATGCCGCCA
MAPK14	TCTTTGCTGTGGATGGGTAAA	CTGTCATTTTCGGCCACTCTTA
PIK3CG	TGTGGGCTTCCTTCCTTTAC	GTTCCCAGTAGCAGGATGATT
PIK3R5	ATTGCCTTCGTCAGGGTAAG	TTGTACACGCAGAGTGAGATG
PTPN11	CACGAGGTCAGCAAACCTATCA	GAGAACCTGCGATCACCTTT
PTPN6	GAGTACGGGAACATCACCTATC	CTTTCTCCTCCCTCTTGTTCTT
Rac1	GGATACAGCTGGACAAGAAGAT	CAAATGATGCAGGACTCACAAG
RAP1A	CCTTACACTTCCTTCTACTTATCC	CCTGACAACTGGCCCTAATAC
RAP1GAP	GACGCTCTATGAGGAACTACAC	CCACTGCCATTCTCCATCTT
RAP1GDS	GGACGTAGGTGGAAAGATGAAG	AATGAACTGGACTGGCTACTATG
RASSF5	AGGCCTATGCTGAGGTCTAA	CTGAGCAACACAACCAAAGAAG
RhoA	CCATCATCCTGGTTGGGAATAA	ATCTCTGCCTTCTTCAGGTTTC
RhoG	GCTTGGGAACACTGGGTATT	CAGCAACAACTGTGTGGAAAG
STAT3	AGGGTACATCATGGGCTTTATC	CTCCTTCTTTGCTGCTTTCAC
SYK	ATGTGGGAAGCATTCTCCTATG	CATCCGCTCTCCTTTCTCTAAC
WAS	GACATCCAGAACCCTGACATC	TCTTCCCTGAGCGTTTCTTATC
WASL	TGCATGTTTCAGTCCTCTACC	GGCTACCAGACGACCATTTAG

6-3 結果

6-3-1 serum-MAF によるマクロファージの貪食能を向上させる要因の解析

Serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇が、①遊走性が向上したことにより、マクロファージとビーズが接触する回数が増えたため貪食できる機会が向上したのか、②serum-MAF を添加したマクロファージは、接触するビーズを効率よく取り込むことができるため貪食能が上昇したのかを調べた。

6-3-1-1 遊走性の解析

マクロファージに serum-MAF と一般的なマクロファージ活性化因子である LPS+IFN- γ を添加した際の遊走性を測定した。Control（培地のみ）、Serum MAF（6 μ g/mL）、そして LPS+IFN- γ （100

pg/mL LPS、20 ng/mL IFN- γ) を添加し 4 時間培養後、無血清培地に培地交換を行い、ビーズを添加してから 1 時間タイムラプス撮影を行い、その映像から image J を用いてマクロファージの様子を解析し、移動した距離を比較した (Figure 6-1)。ビーズ添加から 1 時間に移動した距離は、control が $11.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 、serum-MAF が $12.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($p=0.02$)、LPS+IFN- γ が $11.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($p=0.4$) となり、control と比較して serum-MAF 処理マクロファージは 1.16 倍遊走性が上昇した (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=3)。

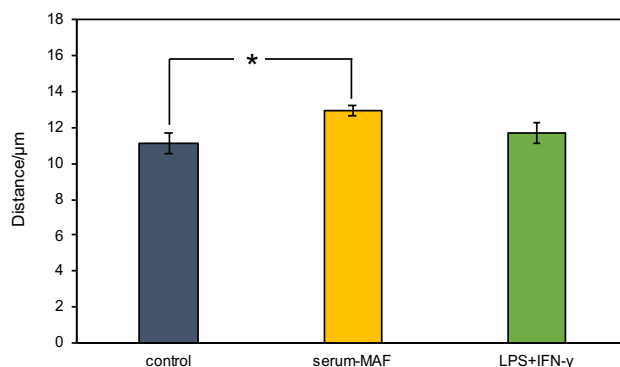


Figure 6-1. マクロファージの遊走性の測定
マクロファージに serum-MAF (6 $\mu\text{g/ml}$)、LPS+IFN- γ (LPS; 100 pg/ml、IFN- γ ; 20 ng/ml) を 4 時間暴露後、ビーズを添加し、1 時間タイムラプス撮影を行い、その映像を Image J を用いて遊走性を測定した。* $p<0.05$ (t -test) エラーバーは SD (n=3)

6-3-1-2 serum-MAF 処理マクロファージのビーズ取り込み効率の測定

遊走性を測定した同じタイムラプスデータを用いて、取り込み効率を解析した。マクロファージに serum MAF、LPS+IFN- γ を 1 時間暴露させた後ビーズを添加した。ビーズを添加してから 60 分の間に個々のマクロファージに接触したビーズ数と取り込まれたビーズ数をカウントし、取り込み効率を算出した (Table 6-3)。ビーズ添加から 1 時間に接触したビーズ数は control が 1.7 ± 0.4 個、serum-MAF が 3.3 ± 0.5 個 ($p=0.025$)、LPS+IFN- γ が 1.9 ± 0.3 個 ($p=0.568$) となった。同様に取り込まれたビーズ数は control が 0.7 ± 0.2 個、serum-MAF が 2.9 ± 0.5 個 ($p=0.006$)、LPS+IFN- γ が 1.1 ± 0.3 個 ($p=0.186$)、ビーズ取り込み効率は control が $37.3 \pm 5.8\%$ 、serum-MAF が $87.2 \pm 5.7\%$ ($p=0.001$)、LPS+IFN- γ が $55.9 \pm 9.9\%$ ($p=0.083$) となった。Serum-MAF は接触したビーズ数が 1.9 倍、取り込まれたビーズ数 4.3 倍、ビーズ取り込み効率が 2.3 倍と全ての値が有意に向上した (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=3)。

Table 6-3. serum-MAF および LPS+IFN- γ によるマクロファージのビーズ取り込み効率 (タイムラプス解析)

	control	serum-MAF	LPS+IFN- γ
接触したビーズ数 (個)	1.7 ± 0.4	3.3 ± 0.5	1.9 ± 0.3
取り込まれた数 (個)	0.7 ± 0.2	2.9 ± 0.5	1.1 ± 0.3
取り込み効率 (%)	37.3 ± 5.8	87.2 ± 5.7	55.9 ± 9.9

serum-MAF 刺激において、マクロファージとビーズの接触する数が control と比較して 1.9 倍増加していたことが原因でビーズ取り込み効率が上昇していた可能性があるため、ビーズが接触する回数が同じでもビーズ取り込み効率が上昇するのかを検証した。control、serum-MAF (6 $\mu\text{g/mL}$)、

LPS+IFN- γ (100 pg/mL LPS、20 ng/mL IFN- γ) を 4 時間暴露後、ローテーターを用いてチューブ内で細胞とビーズを 1 時間攪拌した。攪拌後、ビーズの蛍光強度を測定し、ビーズ取り込み効率を算出した。ビーズ添加後 1 時間のビーズ取り込まれ率は control が $27.0 \pm 5.1 \%$ 、serum-MAF が $142.3 \pm 23.8 \%$ ($p=0.0002$)、LPS+IFN- γ が $33.5 \pm 9.2 \%$ ($p=0.322$) となった (Figure 6-2: p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=4)。

LPS+IFN- γ 刺激では、ビーズ取り込まれ率の上昇傾向は見られたものの有意な差ではなかった。一方 Serum MAF 刺激によってビーズ取り込まれ率は有意に 5.3 倍上昇した。

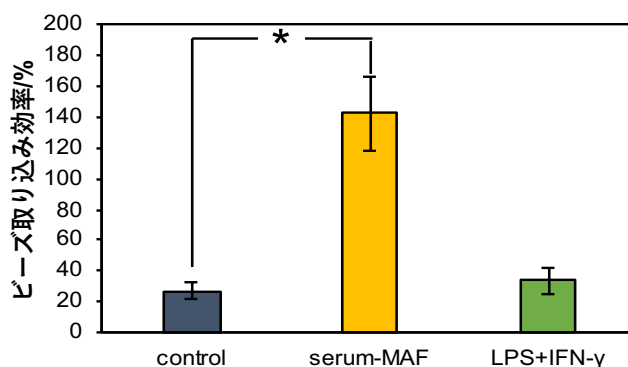


Figure 6-2. マクロファージのビーズ取り込み効率 (ローテーター使用)
マクロファージに serum-MAF (6 μ g/ml)、LPS+IFN- γ (LPS; 100 pg/ml、IFN- γ ; 20 ng/ml) を 4 時間暴露後、細胞を剥離し、チューブに細胞とビーズを加えローテーターで 1 時間攪拌後、蛍光強度を測定した。* $p < 0.05$ (t -test) エラーバーは SD (n=3)

6-3-2 マクロファージの形態観察

serum-MAF によってビーズ取り込み効率が上昇していることが明らかとなった。マクロファージがビーズを取り込む様子をタイムラプス撮影によって観察した際、serum-MAF 処理マクロファージの膜構造が大きく変化している様子が観察された (Figure 6-3)。

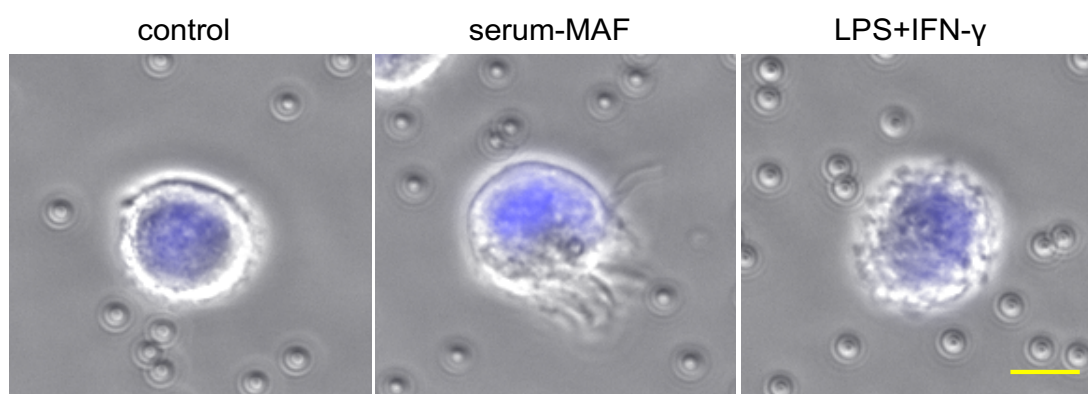


Figure 6-3. 位相差顕微鏡による各因子 (serum-MAF、LPS+IFN- γ) 添加時のマクロファージの形態観察

THP-1 マクロファージに serum-MAF (6 μ g/ml)、LPS +IFN- γ (LPS; 100 pg/ml、IFN- γ ; 20 ng/ml) を 4 時間暴露した後、ビーズを添加約 10-20 分後に撮影を行なった。スケールバー; 10 μ m

そこで serum-MAF の添加による形態的变化の詳細を調べるため、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行なった (Figure 6-4)。その結果、control および LPS+IFN- γ と比較して、serum-MAF を添加したマクロファージは細胞膜先端に発達した膜構造が観察できた。

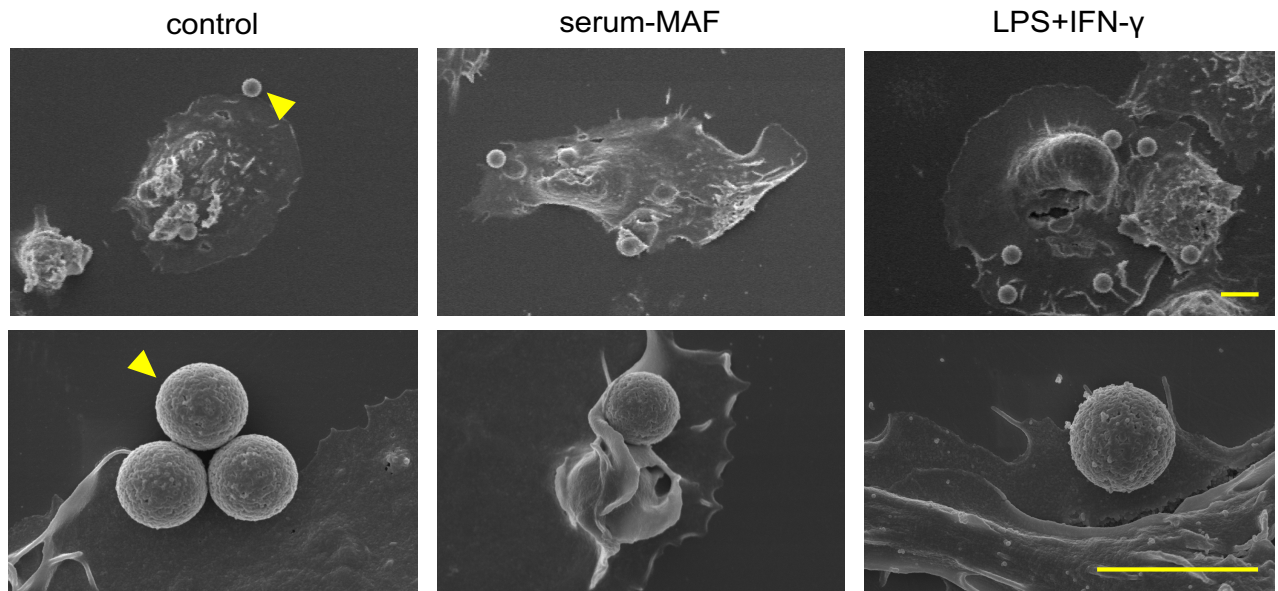
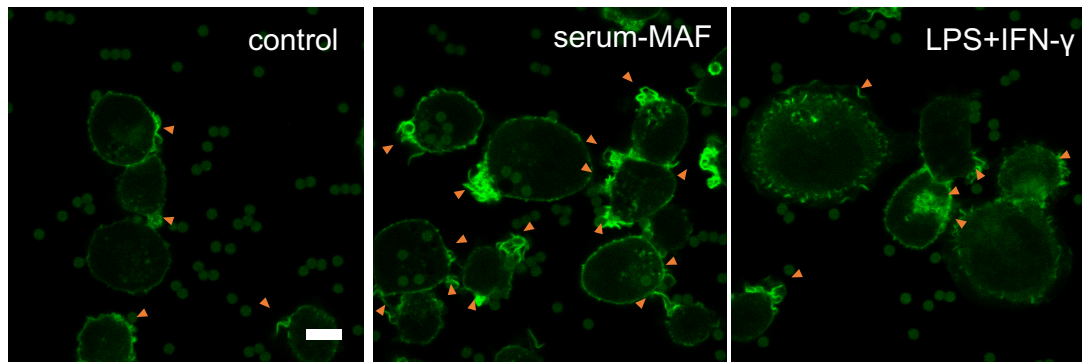


Figure 6-4. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による各因子 (serum-MAF、LPS+IFN- γ) 添加時のマクロファージの形態観察

THP-1 マクロファージに serum-MAF (6 $\mu\text{g/ml}$)、LPS +IFN- γ (LPS; 100 pg/ml 、IFN- γ ; 20 ng/ml) を 4 時間暴露した後、ビーズを添加し 1 時間後に固定を行い SEM で観察を行なった。上段はマクロファージ全体、下段は細胞輪郭部の一部である。黄色矢尻はビーズを示している。スケールバー; 5 μm

細胞膜先端の発達した構造はアクチンの波打ち構造である membrane ruffling ではないかと考え、アクチンが関係しているかどうかを調べるため、細胞内でアクチン特異的に結合するペプチド (17 アミノ酸) に蛍光色素がラベルされた Lifeact-GFP THP-1 マクロファージを用いて、アクチンの挙動を観察した (Figure 6-5A)。Serum-MAF を添加したマクロファージは control、LPS+IFN- γ と比較して、membrane ruffling が生じていた。より定量的に解析を行うために、画像解析ソフトウェアである Image J を用いて細胞底面から約 3 μm の 20 枚の光学切片上で、membrane ruffling の長さを計測した (Figure 6-5B)。その結果 control が $450.2 \pm 47.2 \mu\text{m}$ 、serum-MAF が $755.4 \pm 70.1 \mu\text{m}$ ($p=0.007$)、LPS+IFN- γ が $540.6 \pm 62.3 \mu\text{m}$ ($p=0.18$) となり、serum-MAF で membrane ruffling が亢進しており、細胞輪郭部のアクチン再構成が活発になっていることが明らかとなった。

(A)



(B)

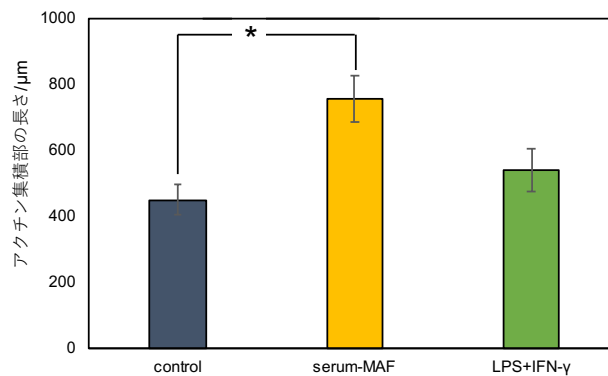


Figure 6-5. Lifeact-THP-1 を用いたマクロファージのアクチン動態の観察

(A) 共焦点レーザー顕微鏡で、serum-MAF (6 μg/ml)、LPS + IFN-γ (LPS; 100 pg/ml、IFN-γ; 20 ng/ml) を添加し、4 時間後にビーズを 1 時間貪食させた Lifeact-THP-1 マクロファージを撮影した。画像は細胞底面から 1.4 μm 上の工学切片である。緑は Lifeact-GFP を示し、橙色の矢尻は membrane ruffling 部を示す。スケールバー : 10 μm
(B) membrane ruffling の長さを image J を用いて算出した。* $p < 0.05$ (t -test) エラーバーは SD (n=3)

Serum-MAF で見られた membrane ruffling がどの程度の時間の serum-MAF 暴露で観察できるのかを serum-MAF の暴露時間を変化させ、各暴露時間経過後、無血清培地で洗浄後の様子を共焦点顕微鏡にて撮影し、F アクチンの集積の様子を定量化した (Figure 6-6)。その結果、control が $495.7 \pm 101.3 \mu\text{m}$ 、serum-MAF 5 分暴露が $936.5 \pm 251.7 \mu\text{m}$ ($p=0.03$)、serum-MAF 10 分暴露が $875.4 \pm 61.8 \mu\text{m}$ ($p=0.001$)、serum-MAF 30 分暴露が $750.6 \pm 99.2 \mu\text{m}$ ($p=0.02$)、serum-MAF 60 分暴露が $807.3 \pm 117.0 \mu\text{m}$ ($p=0.01$) となり、serum-MAF を 5 分間暴露することで、既に membrane ruffling の亢進が見られており、細胞の洗浄時間が 5 分ほどかかっていることも加味し、serum-MAF 刺激後長くとも 10 分以内という早い時点で細胞膜裏打ちのアクチン細胞骨格の再構成が起こっていることを示している (Figure 6-6B) (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=3)。

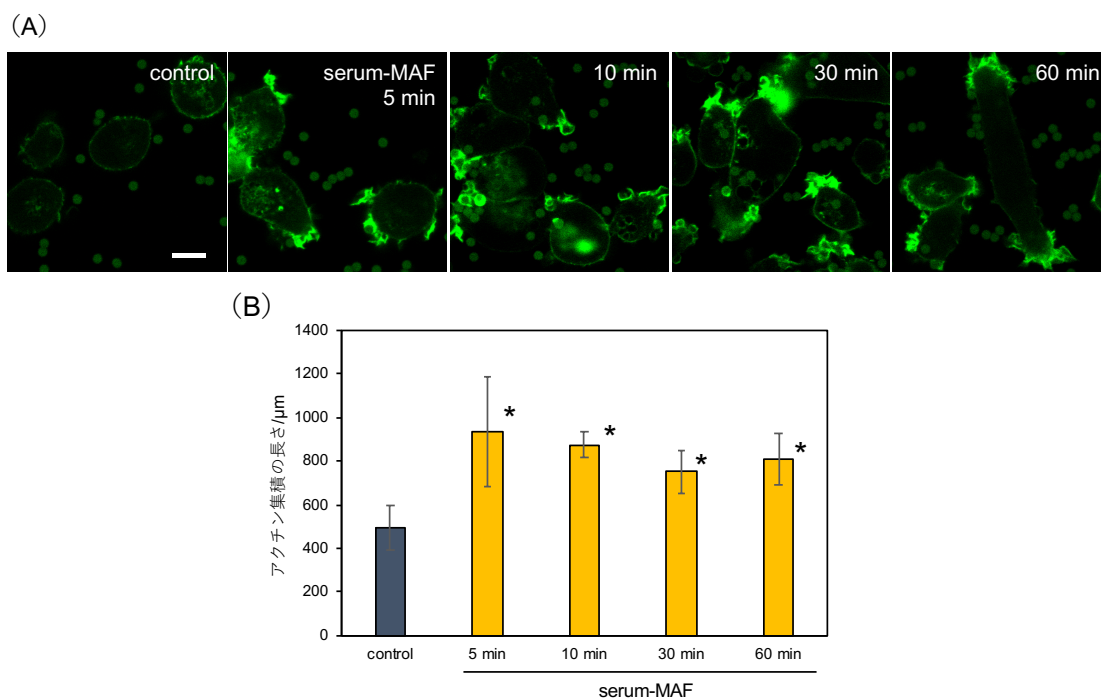


Figure 6-6. Lifeact-THP-1 を用いたマクロファージのアクチン動態の観察

(A) serum-MAF (6 $\mu\text{g/ml}$) を添加した 5-60 分後にビーズを添加して 1 時間貪食させた Lifeact-THP-1 マクロファージを共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。画像は細胞底面から 1.4 μm 上の光学切片である。緑は Lifeact-GFP を示している。左から control、各時間 serum-MAF を暴露した細胞。スケールバー : 10 μm (B) membrane ruffling の長さを image J を用いて算出した。* $p < 0.05$ (t -test) エラーバーは SD ($n=3$)

6-3-3 serum-MAF 暴露時間の変化によるマクロファージの貪食能の測定

serum-MAF を 5 分間暴露することで見られるマクロファージの membrane ruffling の上昇が、貪食能の上昇と関係しているかを調べるため、serum-MAF の暴露時間を変化させた際の貪食能を測定した。マクロファージに serum-MAF を 5、15、30、45、60 分間暴露し、その後これまでと同様に 1 時間ビーズを貪食させることで貪食能を測定した (Figure 6-7)。貪食能は control が $6.08 \pm 0.7\%$ 、5 分暴露が $16.95 \pm 2.0\%$ ($p=0.002$)、15 分暴露が $17.10 \pm 1.4\%$ ($p=0.0005$)、30 分暴露が $16.56 \pm 1.6\%$ ($p=0.001$)、45 分暴露が $16.44 \pm 2.2\%$ ($p=0.003$)、60 分暴露が $15.62 \pm 2.9\%$ ($p=0.01$) となり、serum-MAF を 5 分間暴露することでマクロファージの貪食能が上昇することが明らかとなった (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。 $n=3$)。この結果は、貪食能の上昇が membrane ruffling の亢進と同じタイミングで起こっていることを示しており、serum-MAF 処理後 10 分以内に見られる membrane ruffling の亢進がマクロファージの貪食能に関与している可能性が示唆された。

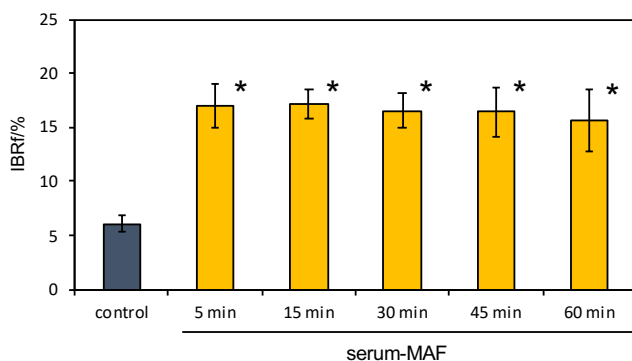


Figure 6-7. serum-MAF の暴露時間の違いによるマクロファージの食食能の測定

THP-1 マクロファージに serum-MAF (6 µg/ml) を 5-60 分間暴露し、食食能を測定した。* $p < 0.05$ (t -test) エラーバーは SD (n=3)

6-3-4 serum-MAF による食食関連遺伝子の発現プロファイル

serum-MAF 添加 5 分以内に生じる membrane ruffling と serum-MAF の 5 分間暴露でみられる迅速な食食能の上昇が関連していることが示唆されたことから、serum-MAF によるマクロファージの活性化は転写非依存的であることが示唆されたため、serum-MAF によって遺伝子発現に変化がないのではないかと考えた。そこで分化後の THP-1 マクロファージ(control)と serum-MAF(6 µg/mL)に 1 時間暴露させたマクロファージ (serum-MAF) の RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行った。6-3-2 で serum-MAF によってアクチン再構成が活発になることが明らかとなっており、ビーズの食食はアクチン依存的であるため、仮に遺伝子発現が変化しているならばアクチンを介した食食関連遺伝子の発現が上昇していると考え、アクチンを介した食食関連の遺伝子発現を抜粋して記載した (Table 6-4)。遺伝子のリストアップは Swanson, 2008 を参考にした。Normalized 値から Fold change (MAF/cont) を算出して比較したところ、2 倍以上に増加あるいは 1/2 以下に減少するような変化を示した遺伝子は無く、serum-MAF の添加で発現が大きく変化しているアクチンの再構成に関わる遺伝子はないと結論づけた。

Table 6-4. アクチンを介した食食に関連する遺伝子発現

Gene name	Description	Nomalized expression		Ratio
		control	serum-MAF	MAF/cont
<u>Receptors</u>				
<i>FcR</i>	Fc-IgG, IIa, receptor	3.59	3.58	1.00
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	0.04	0.04	0.91
<u>Adaptors</u>				
<i>CRK</i>	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog	1.33	1.38	1.04
<i>ELMO1</i>	engulfment and cell motility 1	0.47	0.53	1.13
<u>GEFs</u>				
<i>TRIO</i>	trio Rho guanine nucleotide exchange factor	2.66	2.41	0.91
<i>DOCK1</i>	dedicator of cytokinesis 1	0.25	0.05	0.18
<i>VAV1</i>	vav 1 guanine nucleotide exchange factor	38.31	40.78	1.06
<u>GTPases</u>				
<i>RHOG</i>	ras homolog family member G	7.36	7.33	1.00
<i>RAC1</i>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	9.60	9.57	1.00
<i>CDC42</i>	cell division cycle 42	13.48	14.17	1.05
<i>ARF6</i>	ADP-ribosylation factor 6	1.93	1.97	1.02
<i>RHOA</i>	ras homolog family member A	44.44	49.47	1.11
<u>Effectors</u>				
<i>ELMO1</i>	engulfment and cell motility 1	0.47	0.53	1.13
<i>WASF1</i>	WAS protein family, member 1	1.88	1.77	0.94
<i>PAK1</i>	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	6.05	6.60	1.09
<i>WASP</i>	Wiskott-Aldrich syndrome	0.64	0.65	1.01
<i>ROCK1</i>	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	1.19	1.21	1.02

6-3-5 serum-MAF 添加マクロファージのシグナル伝達経路の解析

serum-MAF によるマクロファージの食食能向上は、遺伝子発現による変化ではなく、転写非依存的な活性化であることが示唆されたため、タンパク質のリン酸化に着目した。Serum-MAF (6 $\mu\text{g/mL}$)、LPS+IFN- γ (100 pg/mL LPS、20 ng/mL IFN- γ) を添加し 1 時間後の免疫関連受容体のリン酸化を Human Phospho-Immunoreceptor Array Kit を用いて比較した。その結果、多くの受容体で control ならびに両活性化因子の添加後もバックグラウンドレベルの低いシグナルしか検出しなかった。その中で、LPS+IFN- γ で SHP-2 のリン酸化が亢進していたが、serum-MAF でリン酸化の大きな変化を示した受容体は見られなかった (Figure 6-8)。

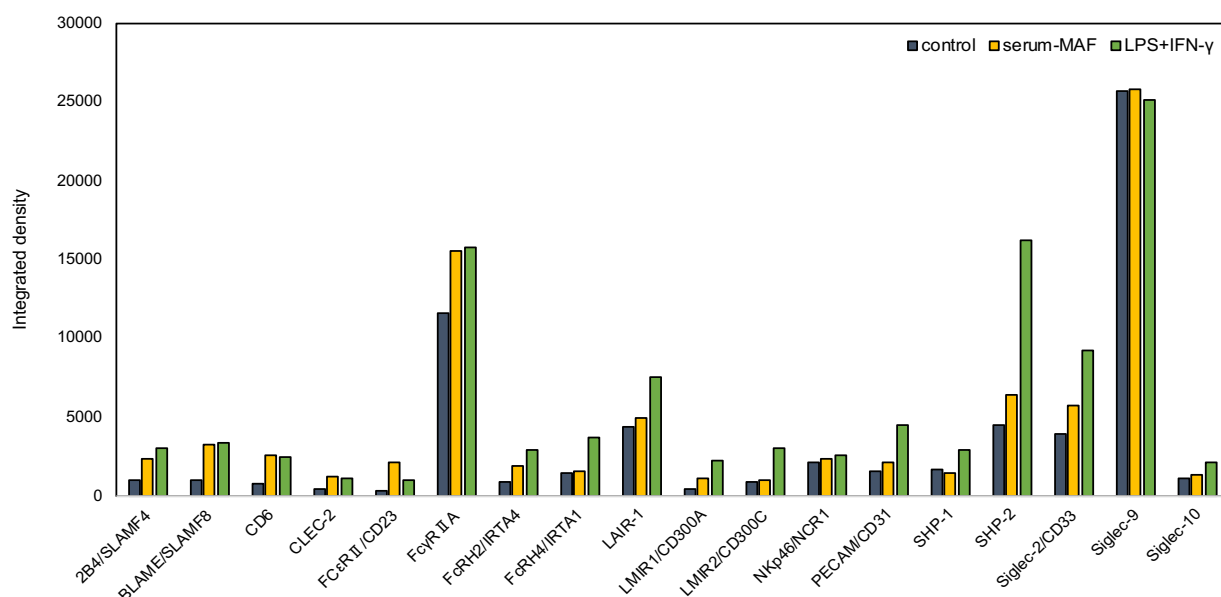


Figure 6-8 serum-MAF および LPS+IFN- γ 処理マクロファージの免疫関連受容体のリン酸化解析

THP-1 マクロファージに serum-MAF (6 μ g/ml) および LPS+IFN- γ (LPS; 100 pg/ml, IFN- γ ; 20 ng/ml) を 1 時間暴露し、細胞を回収後、ライセート中の免疫関連受容体のリン酸化タンパク質を Human phospho-immunoreceptor array で検出し、image J で解析した。

次に受容体の下流で働くシグナル伝達分子のリン酸化をウエスタンブロッティングにより、解析した。その結果、serum-MAF では明確なリン酸化は認められなかったが、p38、Erk に弱いリン酸化が認められた。一方で、LPS+IFN- γ では STAT1、STAT3、JNK、Erk の明瞭なリン酸化が起きていることが明らかとなった (Figure 6-9)。

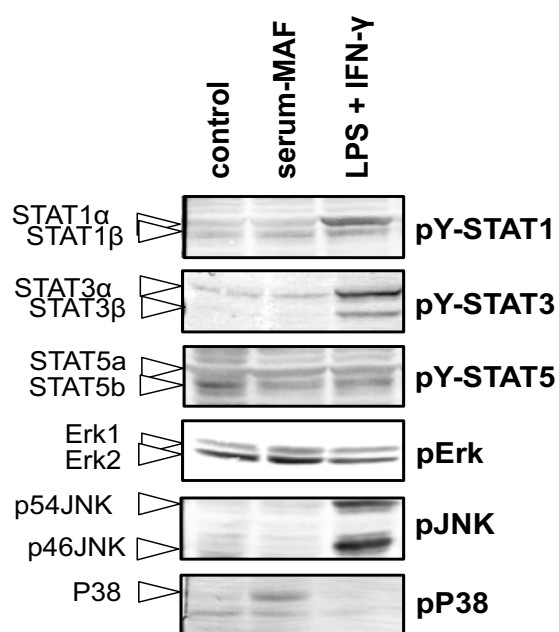


Figure 6-9. シグナル伝達分子のリン酸化

THP-1 マクロファージに serum-MAF (6 μ g/ml) および LPS+IFN- γ (LPS; 100 pg/ml, IFN- γ ; 20 ng/ml) を 1 時間添加後、無血清培地にメディアウムチェンジを行い、細胞を回収した。細胞からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにより各リン酸化タンパク質量を定量した。各タンパク質のバンドを矢尻で示している。

さらに種々のシグナル伝達分子の阻害剤を用いて、貪食能の阻害実験を行なった。阻害剤と serum-MAF (6 $\mu\text{g/mL}$) または LPS+IFN- γ (100 pg/mL LPS、20 ng/mL IFN- γ) を同時添加し、4 時間培養後、阻害剤を含まない状態で貪食アッセイを行なった (Figure6-10)。IBRf は Untreated (control; 16.1 \pm 2.0%、serum-MAF; 39.0 \pm 4.3% ($p=0.002$)、LPS+IFN- γ ; 26.7 \pm 1.4% ($p=0.003$))、PP2 (control; 15.6 \pm 1.3%、serum-MAF; 43.5 \pm 1.4% ($p=3.1\times 10^{-5}$)、LPS+IFN- γ ; 23.8 \pm 2.9% ($p=0.02$))、Piceatannol (control; 14.8 \pm 0.9%、serum-MAF; 35.0 \pm 6.1% ($p=0.01$)、LPS+IFN- γ ; 17.9 \pm 0.9% ($p=0.03$))、SB203580 (control; 18.3 \pm 2.5%、serum-MAF; 34.8 \pm 3.0% ($p=0.004$)、LPS+IFN- γ ; 19.4 \pm 4.1% ($p=0.76$))、U0126 (control; 17.0 \pm 0.9%、serum-MAF; 32.6 \pm 3.0% ($p=0.002$)、LPS+IFN- γ ; 22.2 \pm 2.8% ($p=0.06$))、LY294002 (control; 20.9 \pm 2.9%、serum-MAF; 37.3 \pm 0.8% ($p=0.002$)、LPS+IFN- γ ; 20.6 \pm 4.2% ($p=0.94$))、H89 (control; 19.7 \pm 3.1%、serum-MAF; 38.0 \pm 2.1% ($p=0.002$)、LPS+IFN- γ ; 23.3 \pm 3.7% ($p=0.35$)) となり、LPS+IFN- γ 処理マクロファージは SB203580、U0126、LY294002、H89 の添加で貪食能が阻害された一方で、serum-MAF 処理はどの阻害剤を添加しても貪食能は阻害されなかった (p 値は各試薬処理時の control との t 検定の結果を表している。n=3)。タンパク質のリン酸化および阻害実験の結果より、serum-MAF のマクロファージ貪食能上昇メカニズムは LPS+IFN- γ によるものとは異なるメカニズムであると考えられる。

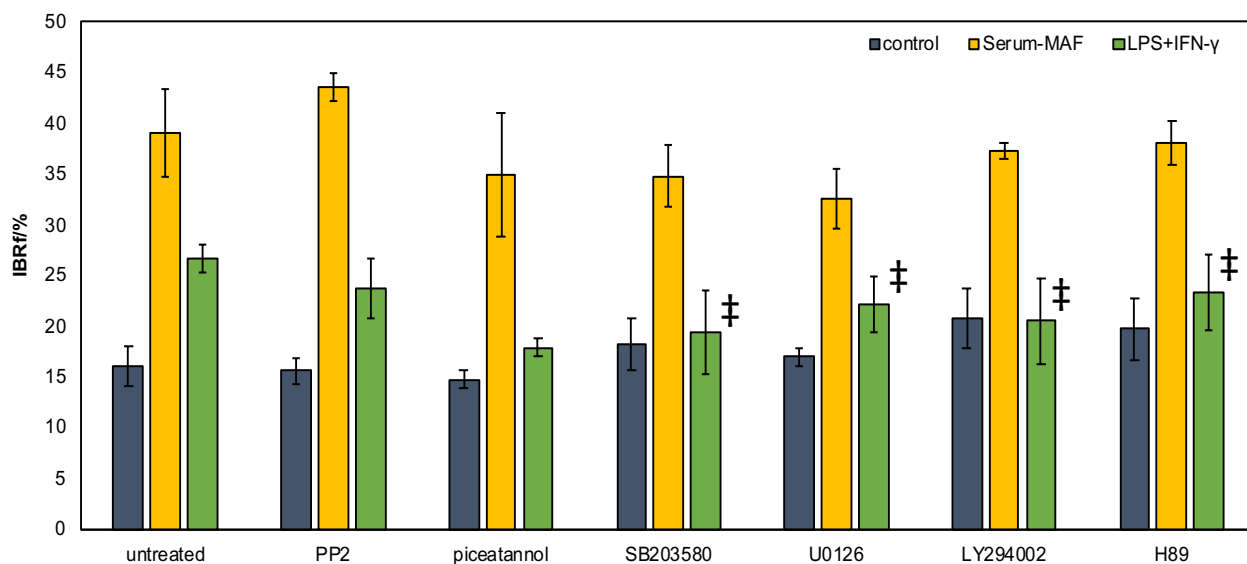


Figure 6-10. serum-MAF および LPS+IFN- γ 処理マクロファージのシグナル伝達分子の阻害実験

THP-1 マクロファージに src 阻害剤 PP2 (10 μM)、syk 阻害剤 piceatannol (10 μM)、p38 阻害剤; SB203580 (100 μM)、MKK 阻害剤 U0126 (10 μM)、PI3K 阻害剤 LY292004 (100 μM)、PKA 阻害剤; H89 (4 μM) を 15 分間 pre-incubation した。その後 serum-MAF (6 $\mu\text{g/mL}$)、LPS+IFN- γ (LPS; 100 pg/mL 、IFN- γ ; 20 ng/mL) と各阻害剤を 4 時間処理し、貪食能を測定した。‡ $p > 0.05$ (t -test)

さらにマクロファージの貪食に関わる受容体やシグナル分子などの候補遺伝子を siRNA でノックダウンした細胞を作製した。まず、既知の遺伝子をターゲットとしていない siRNA (non-targeting siRNA) および各候補遺伝子 1 つにつき 3 箇所の siRNA を用いてノックダウンを行い、real time PCR にて mRNA 量を定量して non-targeting siRNA に対して各 siRNA によりどの程度 mRNA 量が減少したかを Knockdown efficiency (% : 0%がノックダウン効果の無いことを示す)として評価した。また 3 つの siRNA のうち最も Knockdown efficiency の高かった配列を用いて、貪食能の変化を評価した。non-targeting siRNA および各遺伝子の siRNA をトランスフェクションした細胞に対して、無処理 (control)、serum-MAF 処理、LPS+IFN- γ 処理の各処理を行い、それぞれの貪食能 (IBRf) を算出した。その結果、non-targeting siRNA では control が 9.2 ± 2.2 %、serum-MAF 処理が 33.2 ± 5.6 % ($p=3.7 \times 10^{-9}$)、LPS+IFN- γ 処理が 11.8 ± 2.4 % ($p=0.02$) となり、因子添加で貪食能が有意に上昇した (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=12)。non-targeting siRNA をトランスフェクションしても、serum-MAF や LPS+IFN- γ によるマクロファージの貪食能はこれまでの結果と同様に活性化されているため、non-targeting siRNA を含めたトランスフェクションの操作は貪食の活性化等に影響を与えていないと考えられる。そこで、non-targeting siRNA をトランスフェクションした細胞における (serum-MAF あるいは LPS+IFN- γ 添加時の IBRf) / (control の IBRf) を Activation ratio (AR) として求め、それぞれの因子による活性化の基準値とした。次に、各候補遺伝子の siRNA トランスフェクション細胞における control に対する serum-MAF または LPS+IFN- γ 添加時の AR を求め、non-targeting siRNA トランスフェクション細胞での AR (serum-MAF 処理で 3.7 ± 0.5 倍、LPS+IFN- γ 処理で 1.3 ± 0.3 倍) との間で有意差検定を行なった。その結果、どの候補分子のノックダウンを行なっても、貪食能の変化は見られなかった (Table 6-5)。

Table 6-5. 候補遺伝子のノックダウンによるマクロファージの貪食能

Gene name		Description	AR		Knockdown efficiency (%)
			serum-MAF	LPS+IFN- γ	
non-targeting			3.7 \pm 0.5	1.3 \pm 0.3	0.0
<i>Receptors</i>					
FCER1A	Fc fragment of IgE receptor I		3.7 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3	0.0
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II		4.0 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3	59.0
FCGR1A	Fc fragment of IgG receptor Ia		3.2 \pm 0.4	1.4 \pm 0.3	13.0
FCGR2A	Fc fragment of IgG receptor IIa		3.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	39.0
FCGR2B	Fc fragment of IgG receptor IIb		3.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.3	56.0
IFNGR1	interferon gamma receptor 1		4.0 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5	32.0
IFNGR2	interferon gamma receptor 2		3.7 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2	59.0
ITGAX	integrin, alpha X		3.9 \pm 0.7	1.3 \pm 0.3	31.0
ITGB2	integrin, beta 2		4.1 \pm 0.6	1.4 \pm 0.3	53.0
<i>Signaling molecules</i>					
JAK1	Janus kinase 1		3.7 \pm 0.4	1.2 \pm 0.2	68.0
JAK2	Janus kinase 2		4.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	39.0
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14		3.7 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	60.0
PIK3CG	phosphoinositide-3-kinase, catalytic subunit gamma		3.8 \pm 0.5	1.2 \pm 0.3	52.0
PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5		5.7 \pm 1.6	1.7 \pm 0.6	50.0
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3		4.3 \pm 0.7	1.2 \pm 0.4	56.0
SYK	spleen tyrosine kinase		3.8 \pm 0.8	1.4 \pm 0.6	63.0
<i>protein tyrosine phosphatase</i>					
PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6		3.7 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	68.0
PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11		3.1 \pm 0.6	1.4 \pm 0.2	69.0
<i>GTPase and related proteins</i>					
CDC42	cell division cycle 42		3.9 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2	58.0
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1		3.7 \pm 0.5	1.2 \pm 0.2	57.0
RHOA	ras homolog family member A		4.0 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	46.0
RHOG	ras homolog family member G		3.5 \pm 0.01	1.3 \pm 0.3	66.0
RAP1A	RAP1 member of RAS oncogene family		3.4 \pm 0.6	1.1 \pm 0.2	45.0
RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein		4.2 \pm 0.7	1.4 \pm 0.2	43.0
RAP1GDS	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1		3.9 \pm 0.6	1.3 \pm 0.2	57.0
RASSF5	Ras association domain family member 5		4.5 \pm 0.8	1.7 \pm 0.2	50.0
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome		3.7 \pm 0.4	1.3 \pm 0.02	58.0
WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like		4.3 \pm 1.1	1.7 \pm 0.5	29.0

AR; activation ratio (IBRf of serum-MAF or LPS+IFN- γ /IBRf of control)

6-4 考察

遊走性・ビーズ取り込み効率の測定より、serum-MAF によってマクロファージの遊走性とビーズ取り込み効率のどちらも有意に上昇することが明らかとなった。しかし遊走性の結果では、誤差が非常に小さかったことから有意差がでたものの、その向上は 1.16 倍程度であり、serum-MAF による貪食能の向上が約 3 倍であることを考えると、接触したビーズを効率よく取り込むことが貪食能向上の主要な要因であると考えられる。ビーズを取り込む様子をタイムラプス撮影により観察すると、serum-MAF 処理マクロファージは細胞膜の膜構造が大きく変化している様子が確認でき、さらに SEM 観察でも細胞膜の発達した構造が確認できた。ビーズの取り込み時に細胞骨格の一

つであるアクチンの再編成がおこることが知られているため (Swanson *et al.*, 2008)、Lifeact-THP-1 を用いてアクチンの動態を確認した結果、serum-MAF の添加でマクロファージの membrane ruffling の増大が観察された。またこの membrane ruffling はビーズを添加しなくても serum-MAF に暴露するだけで確認できたため (data not shown)、ビーズと接触した刺激によってではなく serum-MAF によってマクロファージのアクチンが集積することで、ビーズと接触した際にビーズを取り込みやすい状態になっており、ビーズ取り込み効率の上昇につながったのではないかと考える (Figure 6-11)。また serum-MAF の暴露時間を変化させた際に serum-MAF の 5 分間暴露で membrane ruffling が亢進したことから、serum-MAF による貪食能上昇は 5 分以内でおこる迅速な membrane ruffling の形成が関係している可能性が示唆された。また serum-MAF 刺激マクロファージで遺伝子発現に大きな変化が見られなかったことも、迅速な活性化メカニズムであることを裏付けていると考える。先行研究ではマウスの腹腔マクロファージに serum-MAF を 3 時間暴露し、オプソニン化させた SRBC (sheep-red blood cells) を 1.5 時間貪食させると、貪食能が上昇することが報告されており、この serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇は少なくとも 3 時間の serum-MAF 処理が必要であることが報告されている (Kuchiike *et al.*, 2013)。本研究で確立した実験系においては、serum-MAF を 5 分間暴露で貪食能が上昇する迅速な活性化であるため、先行研究でのマクロファージ貪食能上昇メカニズムとは異なると思う。

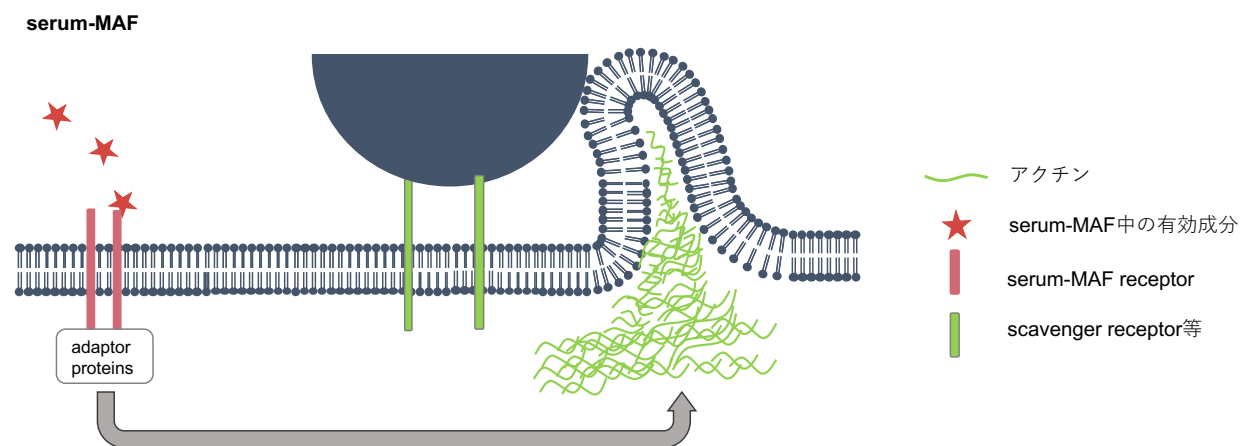


Figure 6-11 本章から予想される serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇メカニズム

本実験系での serum-MAF によるマクロファージのシグナル伝達経路を明らかにするために、翻訳後修飾の一つでタンパク質機能の調節や細胞全体のシグナル伝達に重要なリン酸化を調べた。LPS+IFN- γ では、下流のシグナル伝達経路である STAT1、3 や JNK のリン酸化が起こっていた。

STAT1 は IFN- γ の下流で働き、マクロファージの活性化に関連する多くの遺伝子を発現させることが知られており、貪食の活性化にも関わっているとされている (Dominici *et al.*, 2012, Schiavano *et al.*, 2016)。STAT3 は phagosome の成熟に必要であると報告されている (Zhu *et al.*, 2015)。JNK は、細胞を貪食する際に重要な役割を担っている (Ohsawa *et al.*, 2011)。さらに LPS+IFN- γ 処理マクロファージに様々なシグナル伝達分子の阻害実験を行なった結果、p38、MEK、PI3K、PKA を阻害することで LPS+IFN- γ 処理で上昇がみられたマクロファージの貪食能が有意に抑制された。これらの阻害実験で阻害効果が確認されたシグナル分子やタンパク質のリン酸化が上昇していた STAT1、JNK は先行研究において LPS+IFN- γ の下流で働くことが報告されており、この実験系の妥当性を表している (Chan *et al.*, 2001, Doyle *et al.*, 2004)。

一方で serum-MAF では p38 のリン酸化レベルが上昇する傾向がみられた。p38 は、様々なシグナル伝達経路の下流で働くことが知られており、貪食に関わる詳しい関与は明らかになっていないが、p38 の阻害によってマクロファージの貪食能が低下することが報告されている (McGilvray *et al.*, 2000)。しかし p38 の阻害剤による実験を行なった結果、serum-MAF によるマクロファージの貪食能は阻害されなかった。この結果は p38 が serum-MAF による貪食上昇には関与していない、もしくは serum-MAF による貪食能上昇メカニズムは複数の経路が動いているため、一つの経路を阻害したところで効果が見られないなどの原因が考えられる。同様に免疫関連受容体やシグナル分子、アクチン再構成に重要である低分子量 GTP タンパク質など候補遺伝子のノックダウンを行なった結果、serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇に効果が見られず、阻害実験において明確な阻害効果が一切検出されなかったことから、serum-MAF による貪食能上昇メカニズムは複数の経路が動いていると現時点では考えている。また受容体やシグナル伝達分子のリン酸化の検出、シグナル伝達の阻害剤による実験などから LPS+IFN- γ と serum-MAF では下流のシグナル伝達経路が異なることが明らかとなった。

本章の実験によって、単一のターゲットの阻害および siRNA によるターゲット遺伝子のノックダウンを行なっても serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇に効果が見られなかったことから、serum-MAF は複数の成分により複数の経路が活性化することによってマクロファージの貪食能上昇を引き起こしていると考えられたため、第 7 章では serum-MAF 中の有効成分の探索を行なった。

第 7 章 serum-MAF 中に含まれる有効成分の解析

7-1 序論

serum-MAF は多様な因子を含む血清タンパク質であるが、マクロファージを活性化させる有効成分として Gc-globulin が報告されている。Gc-globulin はアルブミンスーパーファミリーに属する血清糖タンパク質で、ヒトでは 458 アミノ酸からなる 52~55 kDa のタンパク質で、血液中でビタミン D 結合タンパク質として働いている。また 1991 年に Yamamoto らによって酵素処理を行った Gc-globulin にマクロファージ活性化能があることが発見された (Yamamoto N *et al.*, 1991)。serum-MAF 中の Gc-globulin の糖鎖は、 β -ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼによって切断され、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が露出した状態だと考えられ、GalNAc を酵素により排除するか、または GalNAc 単体を添加して拮抗阻害を起こさせると貪食能が低下することから、GalNAc が活性化に重要であると考えられている (Yamamoto N *et al.*, 1996, Aramaki Y *et al.*, 1993, Kuchiike D *et al.*, 2013)。これらの実験は Gc-globulin に 3 時間暴露した後に測定している系であり、本実験系における serum-MAF の 5 分間暴露後の貪食能上昇に関与する有効成分との関連を示唆するデータは何もない。そこで、本研究の迅速な貪食の活性化に関わる serum-MAF 中の因子の探索を新たにイチから行なった。

7-2 実験操作

7-2-1 試薬

albumin、Gc-globulin、 γ -globulin は Sigma Aldrich から購入した。阻害剤の購入については第 6 章 6-2-1 に記載している。

7-2-2 serum-MAF の処理

serum-MAF に対して以下の 3 種類の処理を施した。56°C で 30 分インキュベートする非働化処理を行ったもの、50 kDa 以下のサイズの分子を排除する透析処理を行なったもの、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の proteinase K で 1 時間 65°C の条件下で分解処理を行ったものを調製した。

7-2-3 免疫沈降

Protein G dynabeads を 40 μL 取り、上清を除去した。200 μL の滅菌 PBS で洗浄後、新たに 200 μL の PBS を加え、ビーズを攪拌して 50 μL ずつ 4 本に分注した。その内の 1 本に 1 μL の serum MAF

を加え、2時間緩やかに攪拌した。2本目のビーズ溶液に、反応後の溶液を加え2時間緩やかに攪拌した。同様の作業を合計3回繰り返し、4本目のビーズ溶液では over night で攪拌し、4本目を γ -globulin 吸着 serum-MAF とした。

7-3 結果

7-3-1 serum-MAF 中の有効成分の解析

先行研究において serum-MAF 中の有効成分として Gc-globulin が報告されている (Yamamoto *et al.*, 1991)。しかし本評価系で定量化している迅速な活性化に関して、GalNAc 単体による貪食能の拮抗阻害が生じないことから、Gc-globulin 以外の因子が serum-MAF による貪食能上昇に関与していると考えている (data not shown)。

そこで古典的手法で Serum-MAF の有効成分の解析を行なった。最初に serum-MAF 中の有効成分がタンパク質かどうかを調べるため、タンパク質分解酵素である proteinase K で処理し、マクロファージの貪食能を測定した (Figure 7-1A)。その結果マクロファージの貪食能は、control; $9.2 \pm 1.9\%$ 、serum-MAF; $16.9 \pm 1.9\%$ ($p=0.02$)、serum-MAF+proteinase K; 8.1 ± 2.6 ($p=0.53$) となり、serum-MAF 中のタンパク質がマクロファージの貪食能上昇に必須であることが明らかとなった。また、血中タンパク質で迅速な貪食に関与しているタンパク質として補体が知られている (Knodler *et al.*, 2001, Flannagan *et al.*, 2012)。血中タンパク質の一群である補体は 56°C で 30 分熱処理を行うことで非働化が可能である。serum-MAF を非働化させて補体成分が貪食能に与える影響を調べたところ (Figure 7-1B)、control; $15.0 \pm 3.1\%$ 、非働化 serum-MAF; 34.1 ± 6.7 ($p=0.02$) となった。さらに serum-MAF を透析し、50 kDa 以下のタンパク質を排除して貪食能を測定した結果、control; $7.9 \pm 2.5\%$ 、serum-MAF; $25.6 \pm 3.1\%$ ($p=0.003$)、透析 serum-MAF; 21.6 ± 2.8 ($p=0.006$) となった (Figure 7-1C; p 値は全て control に対する差の t 検定を行った結果を表している。n=3)。この結果から、serum-MAF 中の 50 kDa 以上の補体ではないタンパク質が貪食能上昇に重要であることが示された。

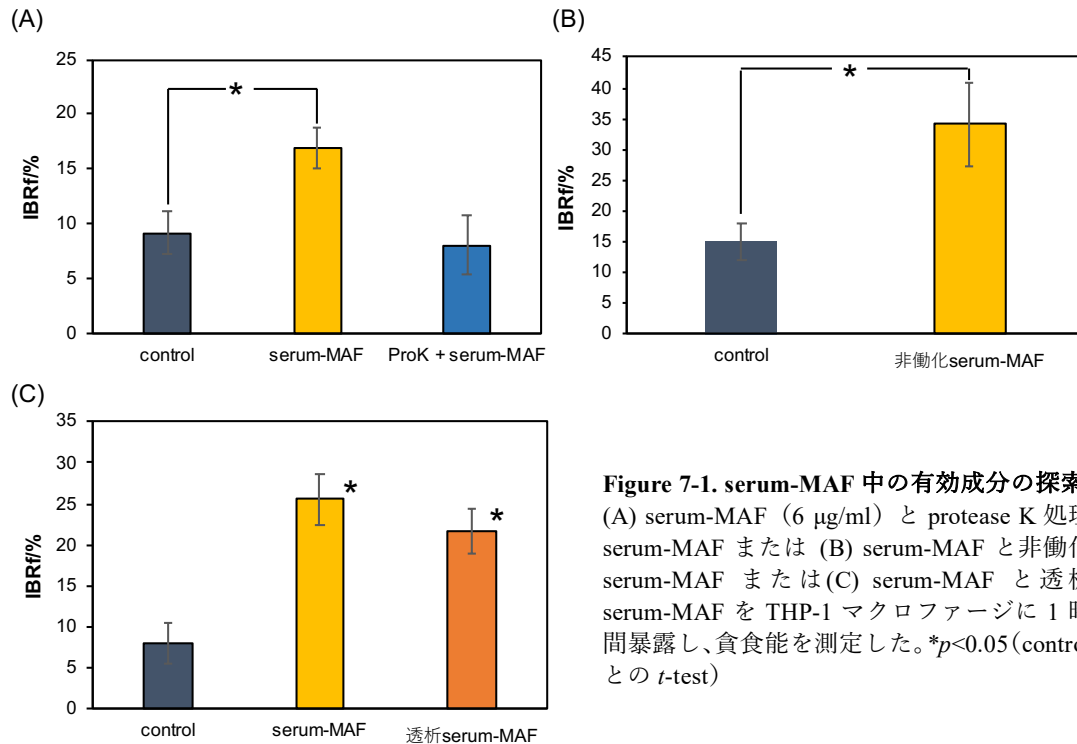


Figure 7-1. serum-MAF 中の有効成分の探索

(A) serum-MAF (6 μ g/ml) と protease K 処理 serum-MAF または (B) serum-MAF と非働化 serum-MAF または (C) serum-MAF と透析 serum-MAF を THP-1 マクロファージに 1 時間暴露し、食食能を測定した。* $p < 0.05$ (control との t -test)

serum-MAF は血清を酵素処理した血清タンパク質であるため、Cohn の低温エタノール法で 5 つに分画された血漿タンパク質 (Fibrinogen、 γ -globulin、Haptoglobin、Antithrombin、Albumin の各分画) 中に食食能上昇に関与している成分がないかを調べた (Figure 7-2)。その結果、control; $12.0 \pm 2.7\%$ 、Fibrinogen; 28.8 ± 4.3 ($p = 0.009$)、 γ -globulin; 30.0 ± 4.9 ($p = 0.01$)、Haptoglobin; 14.9 ± 3.7 ($p = 0.42$)、Antithrombin; 13.7 ± 2.5 ($p = 0.55$) Albumin; 30.0 ± 4.9 ($p = 0.01$)、serum-MAF; 31.5 ± 6.3 ($p = 0.20$) (p 値は全て control に対する差の t 検定を行った結果を表している。 $n = 3$) となり、Fibrinogen 分画、 γ -globulin 分画、serum-MAF でマクロファージの食食能が有意に上昇した。Fibrinogen は血清には含まれておらず、さらに serum-MAF 中にも Fibrinogen は含まれていなかったため (data not shown)、serum-MAF 中の有効成分の 1 つが γ -globulin である可能性が示された。

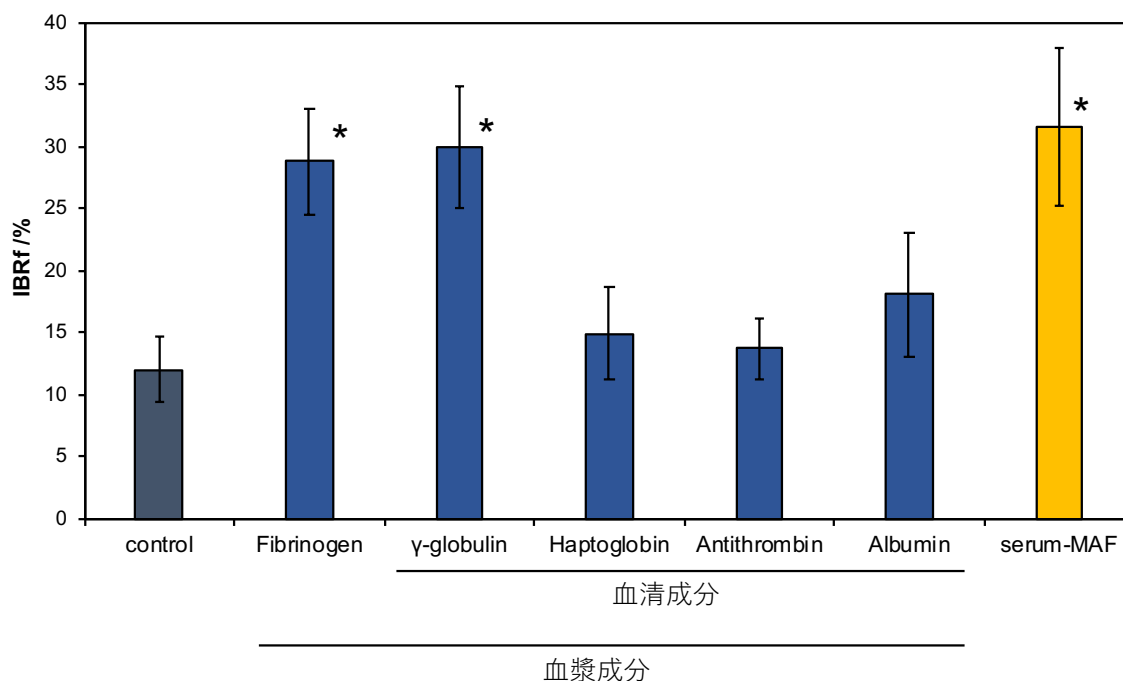


Figure 7-2. Cohn 血漿分画添加時のマクロファージの貪食能の測定

THP-1 マクロファージに Fibrinogen (6 µg/mL)、γ-globulin (6 µg/mL)、Haptoglobin (6 µg/mL)、Antithrombin (6 µg/mL)、Albumin (6 µg/mL)、serum-MAF (6 µg/mL) を 1 時間暴露し、貪食能を測定した。エラーバーは SD (n=3) * $p < 0.05$ (control との t -test)

そこで serum-MAF から γ-globulin を除去して貪食能を測定し、γ-globulin が serum-MAF 中の有効成分として働いているかを確認した (Figure 7-3)。4 回免疫沈降を行なうことで、γ-globulin が除去できた serum-MAF を添加し、マクロファージの貪食能を測定した結果、control; $4.3 \pm 0.6\%$ 、serum-MAF; $18.9 \pm 1.7\%$ ($p = 0.0004$)、免疫沈降 serum-MAF; $4.4 \pm 0.9\%$ ($p = 0.90$) となり、γ-globulin が除去された serum-MAF では貪食能の上昇が見られなかった (p 値は全て control に対する差の t 検定を行った結果を表している。n=3)。また serum-MAF 中に含まれる γ-globulin の濃度を、ウェスタンブロッティングを行うことで調べた。既製品の精製 γ-globulin で検量線を作成し、serum-MAF 中の γ-globulin の濃度を算出した。その結果 serum-MAF 中の γ-globulin 含量は全タンパク質量の約 36.3%であることが明らかとなった (data not shown)。そこで serum-MAF 中の γ-globulin の濃度 (2 µg/ml) と同じ濃度の精製 γ-globulin を添加し貪食能を測定した結果、control; $9.2 \pm 1.7\%$ 、serum-MAF; $21.7 \pm 1.2\%$ ($p = 0.0009$)、γ-globulin; $22.4 \pm 1.3\%$ ($p = 0.001$) となった (p 値は全て control に対する差の t 検定を行った結果を表している。n=3)。これらの結果は、γ-globulin が serum-MAF の有効成分の一つであることを示している。

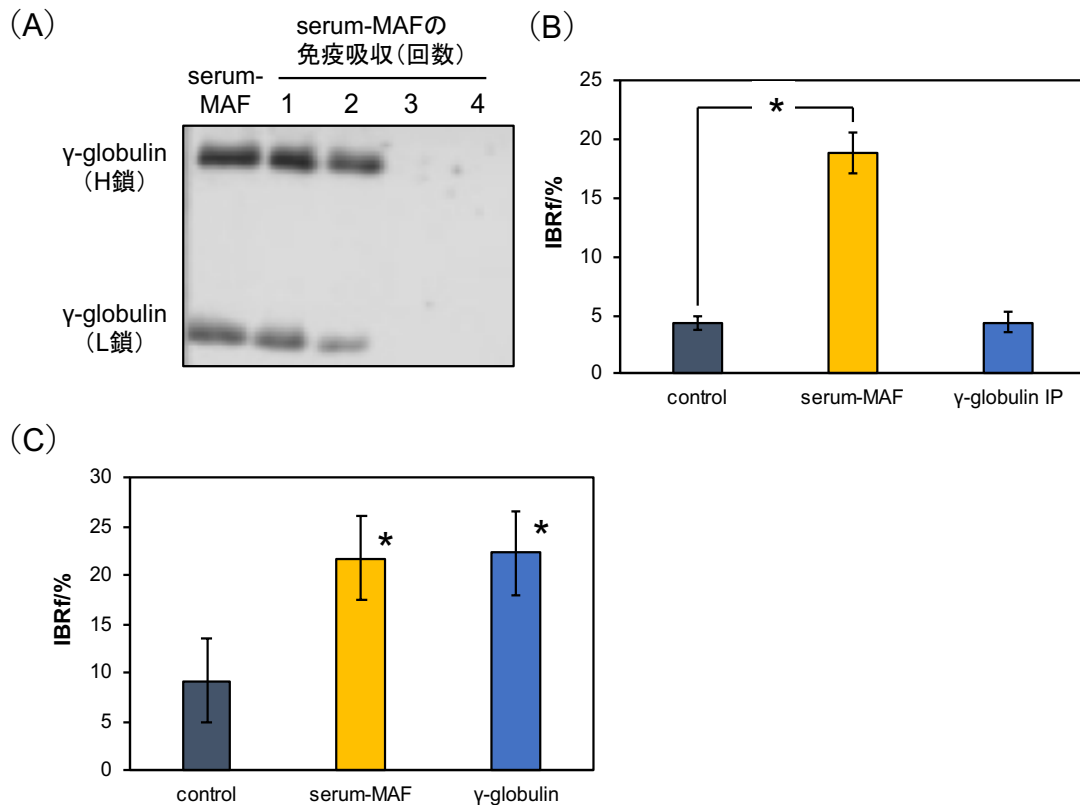


Figure 7-3. serum-MAF 中の γ -globulin の免疫沈降および精製 γ -globulin によるマクロファージの貪食能

(A) serum-MAF 中の γ -globulin を Dynabeads proteinG ビーズで免疫沈降を 4 回行い、serum-MAF 中の γ -globulin をウエスタンブロットで調べた。(B) THP-1 マクロファージに serum-MAF または免疫沈降を 4 回行った serum-MAF (γ -globulin IP) を 1 時間暴露し、貪食能を測定した。(C) THP-1 マクロファージに serum-MAF と精製 γ -globulin (2 μ g/mL) を 1 時間暴露し、貪食能を測定した。エラーバーは SD (n=3) * p <0.05 (control との t -test)

最後に、先行研究で serum-MAF の有効成分であると報告されている Gc-globulin が本研究で見られる貪食能の上昇に関与しているかを確かめた。serum-MAF 中の Gc-globulin の濃度を、 γ -globulin の時と同様の手法で測定した結果、serum-MAF 中の Gc-globulin 含量は全タンパク質量の約 1%であることが明らかとなった (data not shown)。これまでの実験条件では、serum MAF を 6 μ g/mL で用いていたことから、精製 Gc-globulin を serum-MAF 中の濃度 (60 ng/mL) と同じになるように添加し、貪食能を測定した (Figure 7-4)。その結果、control; 9.2 \pm 1.7%、serum-MAF; 21.7 \pm 1.2% (p =0.0009)、Gc-globulin; 6.8 \pm 1.4 (p =0.19) となり、GalNAc 単体による貪食能の拮抗阻害が生じない結果を含めて、本実験系における迅速なマクロファージの活性化に対して Gc-globulin は serum-MAF 中の有効成分ではないことが明らかとなった (p 値は全て control に対する差の t 検定を行った結果を表している。n=3)。

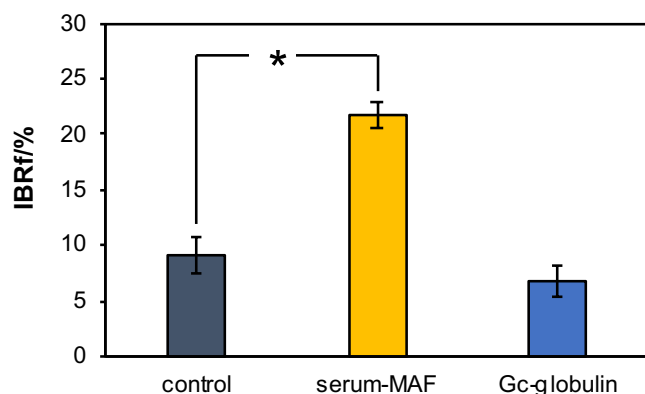


Figure 7-4. Gc-globulin 添加によるマクロファージの貪食能
 Serum-MAF (6 $\mu\text{g/mL}$) または Gc-globulin (60 ng/mL) を 1 時間暴露後、貪食能を測定した。
 * $p < 0.05$ (t -test)

7-3-2 γ -globulin によるマクロファージの貪食能上昇メカニズム

7-3-2-1 γ -globulin への暴露時間の変化によるマクロファージの貪食能の測定

serum-MAF 中の有効成分の 1 つが γ -globulin であることが明らかとなったため、 γ -globulin のみが serum-MAF の有効成分であるかどうかを、 γ -globulin 単体添加と serum-MAF の結果を比較することで調べた。最初に γ -globulin への暴露時間を変化させることでマクロファージの貪食能が変化するのかを測定した。マクロファージに 5、15、30、45、60 分間 γ -globulin を暴露後、貪食能を測定した (Figure 7-5)。貪食能は control が $15.7 \pm 3.6\%$ 、5 分間暴露が $28.6 \pm 2.4\%$ ($p = 0.01$)、15 分間暴露が $28.6 \pm 2.9\%$ ($p = 0.02$)、30 分間暴露が $28.5 \pm 1.6\%$ ($p = 0.01$)、45 分間暴露が $24.7 \pm 1.7\%$ ($p = 0.03$)、60 分間暴露が $25.0 \pm 2.8\%$ ($p = 0.03$) となった (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=3)。結果より γ -globulin は serum-MAF と同様に 5 分間暴露でマクロファージを活性化した。

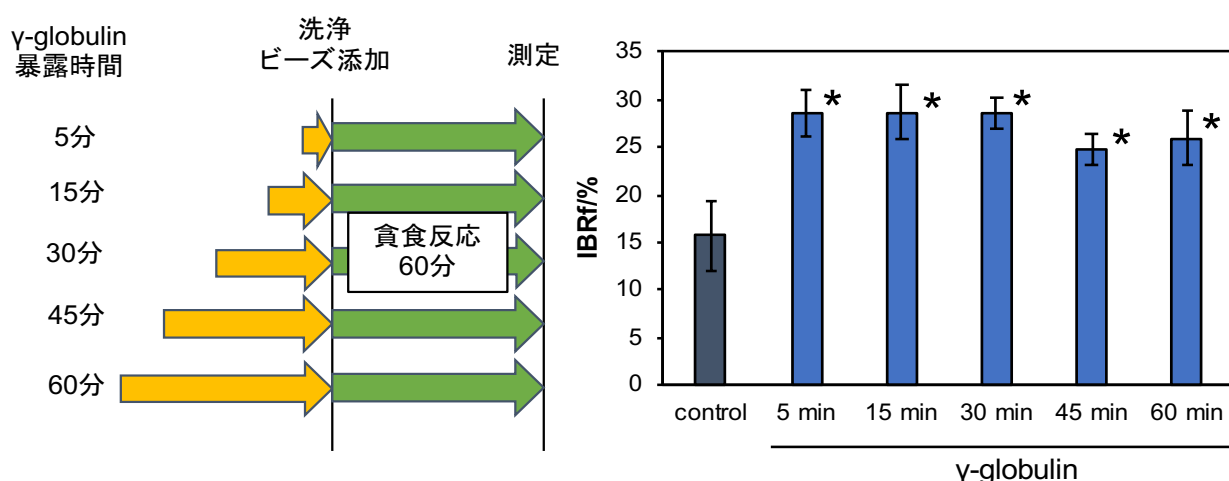


Figure 7-5. γ -globulin の暴露加時間の違いによるマクロファージの貪食能の測定

THP-1 マクロファージに γ -globulin (2 $\mu\text{g/mL}$) を 5-60 分間暴露し、貪食能を測定した。左図は実験のスキームを示しており、右図は算出した貪食能を示している。エラーバーは SD (n=3) * $p < 0.05$ (t -test)

7-3-2-2 γ -globulin によるマクロファージ活性化におけるシグナル伝達経路の解析

次に Serum-MAF と同様、 γ -globulin のシグナル伝達経路を解析するため、シグナル伝達分子の阻害剤を用いて、貪食能を測定した。serum-MAF (6 μ g/mL) または γ -globulin (2 μ g/mL) を各種の阻害剤と同時に添加し 4 時間暴露後、貪食アッセイを行なった (Figure 7-6)。IBRf は Untreated (control; 6.4 \pm 0.5%、serum-MAF; 18.7 \pm 3.5%、 γ -globulin; 17.3 \pm 3.3%)、PP2 (control; 7.2 \pm 1.2% ($p=0.44$)、serum-MAF; 23.1 \pm 1.4% ($p=0.60$)、 γ -globulin; 21.5 \pm 2.7% ($p=0.23$))、Piceatannol (control; 7.2 \pm 0.9% ($p=0.33$)、serum-MAF; 20.3 \pm 1.7% ($p=0.17$)、 γ -globulin; 19.3 \pm 2.9% ($p=0.56$))、SB203580 (control; 5.9 \pm 0.8% ($p=0.48$)、serum-MAF; 16.3 \pm 1.0% ($p=0.40$)、 γ -globulin; 12.6 \pm 3.8% ($p=0.26$))、U0126 (control; 6.7 \pm 0.1% ($p=0.47$)、serum-MAF; 13.5 \pm 2.7% ($p=0.17$)、 γ -globulin; 13.9 \pm 0.9% ($p=0.24$))、LY294002 (control; 10.6 \pm 3.9% ($p=0.20$)、serum-MAF; 19.1 \pm 2.7% ($p=0.92$)、 γ -globulin; 19.6 \pm 1.3% ($p=0.42$))、H89 (control; 7.3 \pm 1.2% ($p=0.41$)、serum-MAF; 19.9 \pm 1.4% ($p=0.70$)、 γ -globulin; 18.8 \pm 2.9% ($p=0.66$)) となった (p 値は untreated の serum-MAF または γ -globulin との t 検定の結果を表している。n=3)。阻害実験の結果より、serum-MAF と同じように使用したどの阻害剤でも阻害効果が見られなかった。

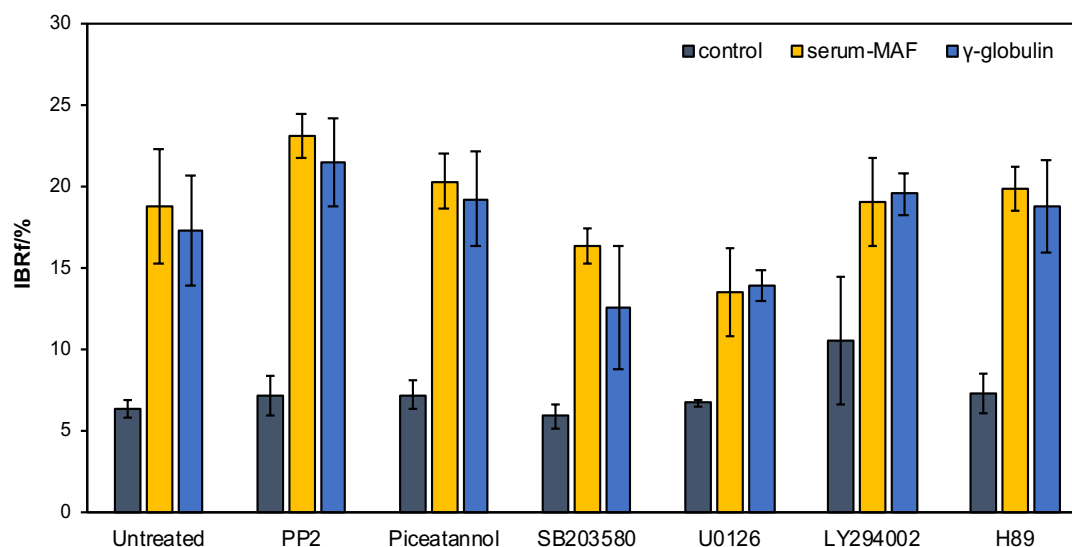


Figure 7-6. serum-MAF および γ -globulin 処理マクロファージのシグナル伝達分子の阻害による貪食能の変化

THP-1 マクロファージに src 阻害剤 PP2 (10 μ M)、syk 阻害剤 piceatannol (10 μ M)、p38 阻害剤; SB203580 (100 μ M)、MKK 阻害剤 U0126 (10 μ M)、PI3K 阻害剤 LY292004 (100 μ M)、PKA 阻害剤; H89 (4 μ M) を 15 分間 pre-incubation した。その後 serum-MAF (6 μ g/ml)、 γ -globulin (2 μ g/ml) と各阻害剤を 4 時間暴露後、貪食能を測定した。エラーバーは SD (n=3)

さらに受容体やシグナル分子などの候補遺伝子に関して、siRNA を用いたノックダウン細胞を作製した。既知の遺伝子をターゲットとしていない配列 (non-targeting siRNA) をトランスフェク

シヨンした細胞で、無処理 (control)、serum-MAF 処理、 γ -globulin 処理した際のそれぞれの IBRf を算出したところ、control が 9.2 ± 2.2 %、serum-MAF 処理が 33.2 ± 5.6 % ($p=3.7 \times 10^{-9}$)、 γ -globulin 処理が 34.2 ± 6.9 % ($p=5.3 \times 10^{-8}$) となり、serum-MAF および γ -globulin 処理で貪食能が有意に上昇した (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=12)。さらにこの値を利用して serum-MAF あるいは γ -globulin 添加時の IBRf/control の IBRf を求めた。その結果マクロファージの貪食能は、control を基準として、serum-MAF 処理で 3.7 ± 0.5 倍、 γ -globulin 処理で 3.8 ± 0.5 倍上昇した (Table 7-1)。さらに各 siRNA トランスフェクション細胞での無処理と因子添加時の IBRf の比率を求め、non-targeting siRNA トランスフェクション細胞での各因子添加時の比率 (上述) との間で有意差検定を行なった。その結果、PTPN6 および PTPN11 のノックダウンを行なった細胞で、 γ -globulin の貪食能が有意に抑制された。

Table 7-1. 候補遺伝子のノックダウンによるマクロファージの食食能

Gene name	Description	AR		Knockdown efficiency (%)
		serum-MAF	γ -globulin	
non-targeting		3.7 \pm 0.5	3.8 \pm 0.5	0.0
<i>Receptors</i>				
FCER1A	Fc fragment of IgE receptor I	3.7 \pm 0.3	3.5 \pm 0.7	0.0
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II	4.0 \pm 0.4	3.9 \pm 0.5	59.0
FCGR1A	Fc fragment of IgG receptor Ia	3.2 \pm 0.4	3.2 \pm 0.3	13.0
FCGR2A	Fc fragment of IgG receptor IIa	3.2 \pm 0.1	3.2 \pm 0.3	39.0
FCGR2B	Fc fragment of IgG receptor IIb	3.8 \pm 0.1	3.4 \pm 0.4	56.0
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	4.0 \pm 0.5	4.0 \pm 1.0	32.0
IFNGR2	interferon gamma receptor 2	3.7 \pm 0.4	3.4 \pm 0.6	59.0
ITGAX	integrin, alpha X	3.9 \pm 0.7	3.8 \pm 0.4	31.0
ITGB2	integrin, beta 2	4.1 \pm 0.6	4.0 \pm 0.5	53.0
<i>Signaling molecules</i>				
JAK1	Janus kinase 1	3.7 \pm 0.4	3.3 \pm 0.3	68.0
JAK2	Janus kinase 2	4.2 \pm 0.3	4.2 \pm 0.4	39.0
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	3.7 \pm 0.3	3.8 \pm 0.8	60.0
PIK3CG	phosphoinositide-3-kinase, catalytic subunit gamma	3.8 \pm 0.5	3.6 \pm 0.5	52.0
PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	5.7 \pm 1.6	5.0 \pm 1.8	50.0
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	4.3 \pm 0.7	4.2 \pm 1.2	56.0
SYK	spleen tyrosine kinase	3.8 \pm 0.8	3.3 \pm 0.7	63.0
<i>protein tyrosine phosphatase</i>				
PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	3.7 \pm 0.2	2.7 \pm 0.3*	68.0
PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	3.1 \pm 0.6	3.0 \pm 0.4*	69.0
<i>GTPase and related proteins</i>				
CDC42	cell division cycle 42	3.9 \pm 0.4	3.7 \pm 0.6	58.0
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	3.7 \pm 0.5	3.3 \pm 0.3	57.0
RHOA	ras homolog family member A	4.0 \pm 0.4	3.6 \pm 0.5	46.0
RHOG	ras homolog family member G	3.5 \pm 0.01	3.5 \pm 0.3	66.0
RAP1A	RAP1 member of RAS oncogene family	3.4 \pm 0.6	3.5 \pm 0.4	45.0
RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein	4.2 \pm 0.7	4.0 \pm 0.5	43.0
RAP1GDS	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1	3.9 \pm 0.6	3.9 \pm 0.5	57.0
RASSF5	Ras association domain family member 5	4.5 \pm 0.8	4.4 \pm 0.7	50.0
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome	3.7 \pm 0.4	3.8 \pm 0.3	58.0
WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	4.3 \pm 1.1	4.5 \pm 1.4	29.0

AR; activation ratio (IBRf of serum-MAF or γ -globulin/IBRf of control)、* $p < 0.05$ (non-targeting siRNA 細胞における γ -globulin の AR との t -test)7-3-2-3 γ -globulin によるマクロファージのビーズ取り込み効率

次に serum-MAF で上昇が確認されているビーズ取り込み効率が、 γ -globulin の添加で上昇するかをタイムラプス観察により調べた (Table 7-2)。serum-MAF は接触したビーズ数が 4.8 倍、取り込まれたビーズ数 1.6 倍、ビーズ取り込み効率が 3.0 倍、 γ -globulin は接触したビーズ数が 4.0 倍、取り込まれたビーズ数 1.6 倍、ビーズ取り込み効率が 2.6 倍となった。serum-MAF、 γ -globulin の

添加でビーズ取り込み効率が有意に向上したものの、 γ -globulin では serum-MAF ほど大きな貪食効率の向上は見られず、その差は有意なものであった。この結果は、serum-MAF の有効成分として γ -globulin が重要であることに加え、まだ他の因子が関与している可能性を示している。

Table 7-2. serum-MAF および γ -globulin によるマクロファージのビーズ取り込み効率

	control	serum-MAF	γ -globulin
接触したビーズ数 (個)	3.5 \pm 1.8	5.7 \pm 1.7	5.4 \pm 1.5
取り込まれた数 (個)	0.7 \pm 0.4	3.6 \pm 1.2 *	2.9 \pm 0.7 *
ビーズ取り込み効率 (%)	21.2 \pm 3.5	62.7 \pm 3.0 *	54.7 \pm 1.5 * \ddagger

* p <0.05 (control との t -test)、 $\ddagger p$ <0.05 (serum-MAF との t -test)、 n =3

7-3-2-4 γ -globulin によるマクロファージの形態変化

serum-MAF と γ -globulin ではビーズ取り込み効率に違いが見られた。ビーズ取り込み効率は細胞膜の membrane ruffling が関与していると考えられるため、 γ -globulin の添加で serum-MAF 添加マクロファージでみられた membrane ruffling が見られるかを調べた (Figure 7-7)。細胞底面から約 3 μ m の 20 枚の光学切片上で、membrane ruffling の長さを計測したところ、control が 339.1 \pm 70.8 μ m、serum-MAF が 723.1 \pm 152.7 μ m (p =0.03)、 γ -globulin が 419.7 \pm 139.9 μ m (p =0.51)となり、serum-

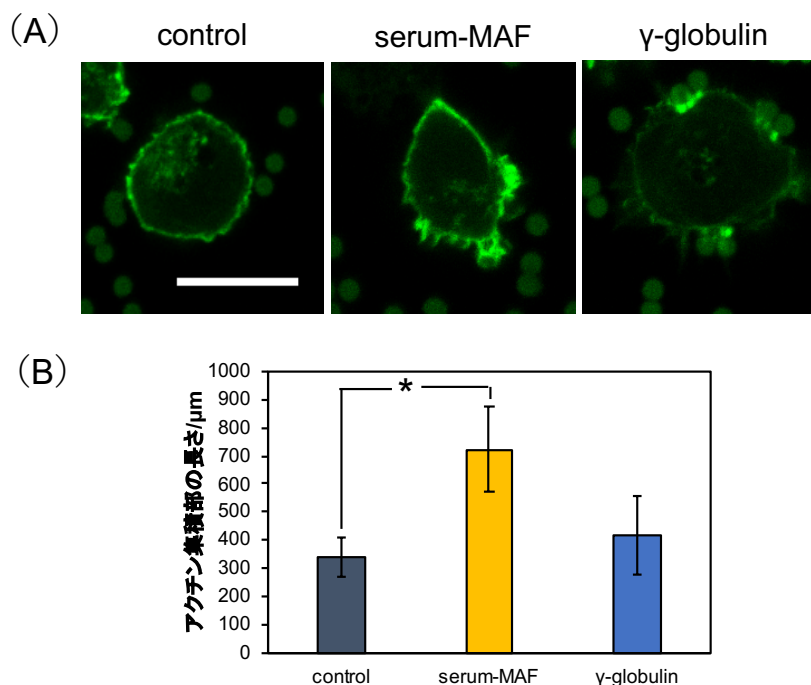


Figure 7-7. Lifeact-THP-1 を用いたマクロファージのアクチン動態の観察

(A)共焦点レーザー顕微鏡で、serum-MAF (6 μ g/ml)、 γ -globulin (2 μ g/ml) を添加し、1 時間後にビーズを 1 時間貪食させた Lifeact-THP-1 マクロファージを撮影した。画像は細胞底面から 1.4 μ m 上の工学切片である。緑は GFP-アクチンを示す。スケールバー : 20 μ m (B) membrane ruffling の長さを imageJ を用いて算出した。エラーバーは SD (n =3) * p <0.05 (t -test)

MAF でみられた細胞輪郭部のアクチン再構成が γ -globulin ではみられないことが明らかとなった (p 値は全て control との t 検定の結果を表している。n=3)。

7-3-2-5 γ -globulin 添加によるマクロファージ貪食能の経時的測定

serum-MAF と γ -globulin とのマクロファージ貪食能活性化において、ビーズ取り込み効率および細胞膜の membrane ruffling に違いが見られたことから、serum-MAF と γ -globulin ではビーズと接触してから貪食するまでの時間に違いがあるのではないかと考え、serum-MAF または γ -globulin を 60 分間暴露後、ビーズ添加後の貪食能を経時的に測定した (Figure 7-8)。その結果ビーズ添加後 10 分で control が $3.8 \pm 0.6\%$ 、serum-MAF が $6.3 \pm 0.8\%$ ($p=0.02$)、 γ -globulin が $3.6 \pm 0.6\%$ ($p=0.74$)、ビーズ添加後 30 分で control が $5.4 \pm 0.9\%$ 、serum-MAF が $11.7 \pm 2.5\%$ ($p=0.03$)、 γ -globulin が $8.1 \pm 2.3\%$ ($p=0.21$)、ビーズ添加後 60 分で control が $9.8 \pm 0.4\%$ 、serum-MAF が $21.5 \pm 0.2\%$ ($p=2.8 \times 10^{-6}$)、 γ -globulin が $21.4 \pm 0.5\%$ ($p=1.1 \times 10^{-5}$) となり、serum-MAF はビーズ添加 10 分で貪食能の上昇が有意にみられたものの、 γ -globulin はビーズ添加後 60 分まで有意な差が見られなかった (p 値は各時間の control との t 検定の結果を表している。n=3)。この結果から、serum-MAF にはビーズ添加 10 分後に貪食能の上昇を引き起こす γ -globulin 以外の因子が存在することが示唆された。

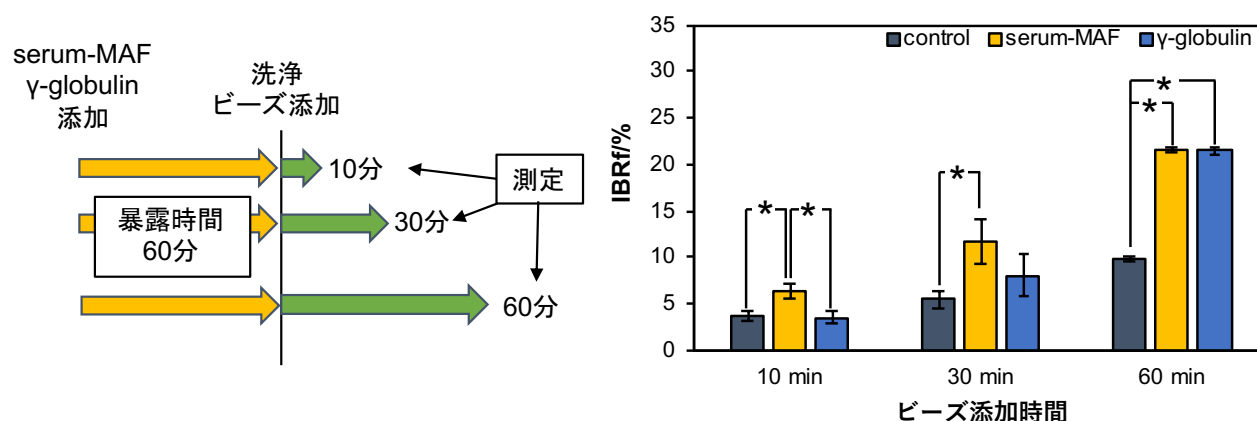


Figure 7-8. γ -globulin 添加によるマクロファージ貪食能の経時的測定

THP-1 マクロファージに γ -globulin (2 $\mu\text{g/mL}$) および serum-MAF (6 $\mu\text{g/mL}$) を 60 分間暴露し、ビーズを添加後 10、30、60 分の貪食能を測定した。左図は実験のスキームを示しており、右図は算出した貪食能を示している。エラーバーは SD (n=3) * $p < 0.05$ (t -test)

7-4 考察

7-4-1 serum-MAF 中の有効成分の一つは γ -globulin である

先行研究より、serum-MAF 中の有効成分として Gc-globulin が報告されている (Yamamoto *et al.*,

1991)。しかし本実験系では serum-MAF 中の Gc-globulin と同じ濃度の Gc-globulin で処理してもマクロファージの貪食能の上昇はみられなかったため、本実験系における serum-MAF 中の有効成分は Gc-globulin ではないことが明らかとなった。先行研究では Gc-globulin によるマクロファージの活性化は 3 時間の暴露が必要であることも報告されているため、5 分間の暴露でマクロファージの貪食能が上昇する迅速な貪食能の活性化を誘導する本実験系と先行研究では、serum-MAF によるマクロファージ活性化メカニズムが異なることが示唆された (Yamamoto *et al.*, 1997, Kuchiike *et al.*, 2013)。また Serum-MAF 中のタンパク質の分解や免疫沈降の結果から、本実験系における serum-MAF 中の有効成分の一つが γ -globulin であることが分かった。

7-4-2 γ -globulin のマクロファージ貪食能上昇メカニズム

γ -globulin はビーズや赤血球などをオプソニン化する因子として汎用されており、その活性化メカニズムは、Fc γ 受容体から下流のシグナル伝達分子である syk (Spleen tyrosine kinase) を介することが知られている。しかし本研究では Fc γ 受容体や syk をノックダウンしても、 γ -globulin によるマクロファージの貪食能上昇は阻害されなかった。一方で脱リン酸化酵素である PTPN6、PTPN11 のノックダウンで、 γ -globulin による貪食能上昇の割合が低下した。この結果は γ -globulin によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムが PTPN6、PTPN11 を介している可能性を示している。

PTPN6、PTPN11 は protein tyrosine phosphatase として知られており、細胞のシグナル伝達をリン酸化酵素と拮抗しながら調整している。PTPN6 は Fc γ レセプターを介する貪食を負に制御することが知られている (Kant *et al.*, 2002)。しかし本研究では、PTPN6 が貪食を正に制御する結果となっている。これらの phosphatase と γ -globulin の貪食能の上昇にどのような関係があるのかを今後解析していくことで、既知の Fc γ 受容体を介した活性化とは異なる経路が明らかになる可能性があると考えられる。

7-4-3 serum-MAF 中の有効成分は γ -globulin 以外に存在する

serum-MAF と γ -globulin 添加時のマクロファージの活性化メカニズムを多角的に解析した結果ではいくつかの違いがみられた (Table 7-4)。このことにより、serum-MAF と γ -globulin ではマクロファージの貪食能上昇メカニズムが異なることが示されたため、serum-MAF 中の有効成分は γ -globulin だけではなく他の因子 (Factor X) も関与していることが強く支持される。serum-MAF では γ -globulin だけでなく、複数の因子が働いているため、単一の候補分子の阻害や、遺伝子のノ

ックダウンでは効果が見られなかったと考えている。

Table 7-4. serum-MAF と γ -globulin のマクロファージ活性化メカニズムの違い

	Serum-MAF	γ -globulin
取り込み効率	上昇する	上昇するものの serum-MAF より低い
形態 (membrane ruffling)	上昇する	変化しない
ビーズ添加時間	10 分で貪食能が上昇する	60 分で貪食能が上昇する
因子暴露時間	5 分暴露で貪食能が上昇する	5 分暴露で貪食能が上昇する
シグナル伝達阻害剤	貪食能が阻害されない	貪食能が阻害されない

γ -globulin では serum-MAF で見られた membrane ruffling が観察されず、ビーズ取り込み効率も serum-MAF より低い値であった。serum-MAF を 60 分間暴露後、マクロファージにビーズを貪食させた際、10 分後にはすでに control と比較して貪食能が有意に上昇した。一方で γ -globulin では 60 分後によく control と比較して貪食能が有意に上昇した。この結果から、 γ -globulin はマクロファージの迅速な貪食能の上昇に関与しているものの、ビーズ添加後 10 分で貪食能の有意な上昇を引き起こすような強い活性化は誘導しないと考えている。さらに membrane ruffling の程度を測定した結果から、 γ -globulin ではない serum-MAF 中の因子 (Factor X) がマクロファージの membrane ruffling を促進することが、ビーズ添加後 10 分でみられる貪食の強い活性化を誘導し、高い貪食効率をもたらしている要因となっているのではないかと考えている (Figure 7-9)。この素早いアクチンの集積と貪食能の関係を考える上で、私は素早いシグナル伝達を引き起こす脂質ラフトなどのマイクロドメインが serum-MAF による貪食能の強い活性化に関係しているのではないかと考え、第 8 章ではマイクロドメインに着目し、研究をおこなった。

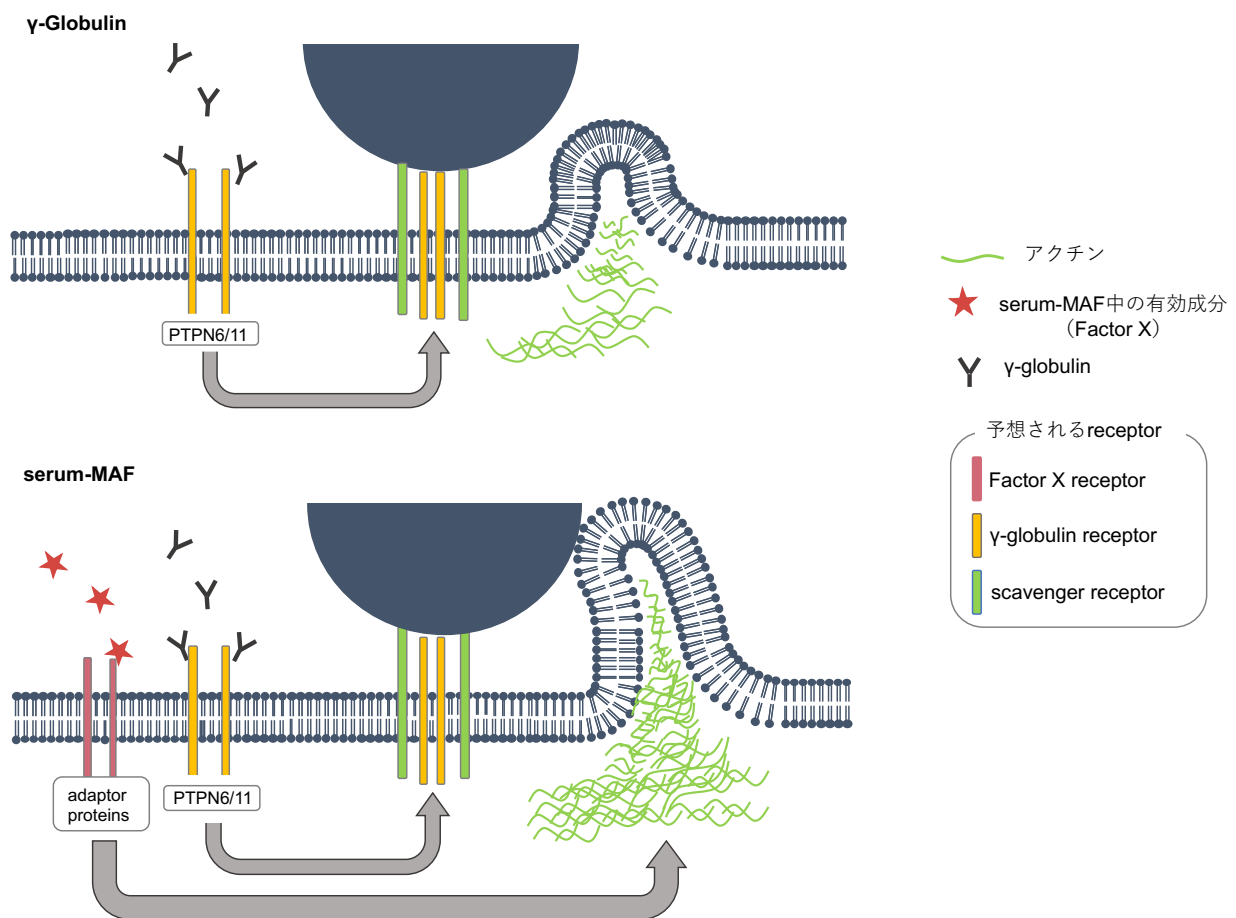


Figure 7-9. 本章から予想される γ -globulin と serum-MAF によるマクロファージの食食能上昇メカニズム

第 8 章 serum-MAF によるマクロファージ活性化メカニズムにおけるマイクロドメインの役割

8-1 序論

細胞膜はグリセリン脂質や糖脂質、ステロールなどの脂質からなる脂質二重層に様々な膜タンパク質が埋まった構造をとっており、1972 年に Singer と Nicolson によって提唱された流動モザイクモデルによって、細胞膜上の膜タンパク質や脂質が脂質二重層を自由に拡散していると考えられている (Singer *et al.*, 1972)。しかし近年、細胞膜はランダムで均一な構造体ではなく、脂質が個々の性質に基づいて分子の集合体をつくることが明らかになってきた (Simons *et al.*, 1997)。このような分子が集合した微小領域を膜マイクロドメインという。膜マイクロドメインにはスフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリン、コレステロールが豊富に存在しており、シグナル伝達、細胞骨格系の編成など様々な細胞機能に重要な役割を果たしている。免疫系では多種の受容体やリン酸化酵素が集合したマイクロクラスターと呼ばれる構造を作り、さらにそれが機能的に集合して免疫シナプスと呼ばれる大きなクラスターを形成することで複雑なシグナル伝達を行っていることも報告されており、免疫系の素早く効率的なシグナル伝達に膜マイクロドメインは重要である (Yokosuka *et al.*, 2010)。膜マイクロドメインは集合する分子の違いで名称も異なっており、代表的なドメインとして脂質ラフトが挙げられる。

脂質ラフトは細胞膜上のスフィンゴ脂質とコレステロールに富むドメインで、この領域に glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカータンパク質やアシル化修飾されたタンパク質が集積すると考えられている (Anderson *et al.*, 2002、Simons *et al.*, 2000)。飽和アシル基は脂質ラフトとの親和性が高く、例えばアルカリフォスファターゼは GPI アンカー修飾を、Src family kinase (SFK) はパルミトイル化修飾を受けることによって脂質ラフトに局在することが報告されている (Paulick *et al.*, 2008、Mukherjee *et al.*, 2003)。他にも脂質ラフトには G タンパク質共役型受容体 (Foster *et al.*, 2003)、G タンパク質 (Oh *et al.*, 2001) など、多くのシグナル伝達に関与するタンパク質が集積することが報告されていることから、細胞外からの刺激を速やかに細胞内に伝える「情報伝達の間」として機能していると考えられている。またこの集積の寿命は約 0.2 秒ほどであり、生成と崩壊を繰り返すダイナミックなマイクロドメインである (Suzuki *et al.*, 2012)。

脂質ラフト構造のサブタイプの一つとしてカベオラ構造がある。カベオラ構造は脂質ラフトと同様にコレステロールやスフィンゴ脂質に富んでおり、カベオリンと呼ばれる細胞膜裏打ちタンパク質によって比較的安定した構造となる。つまり脂質ラフト内面にカベオリンが存在している

マイクロドメインがカベオラ構造と呼ばれている。典型的なカベオラ構造は直径 50~80 nm の窪みを持ち、エンドサイトーシスの経路の一つとしても機能している (Severs *et al.*, 1988, Nabi *et al.*, 2003)。

また Galectin lattice も脂質ラフトの安定化に関わっていると考えられている。Galectin lattice は Galectin が多量体を形成し、膜タンパク質の糖鎖と結合することで膜タンパク質同士が架橋されて細胞膜上での膜タンパク質を集積させていると考えられている (Nabi *et al.*, 2015)。膜タンパク質の集積は結果的にその部分の脂質組成を変化させることから、Galectin lattice が形成されているマイクロドメインも脂質ラフトのサブタイプの一種と考えられており、本研究ではマイクロドメインを脂質ラフト、脂質ラフト+カベオラ構造 (以後カベオラ構造)、脂質ラフト+Galectin lattice (以後 Galectin lattice) の 3 種類に分類して議論を進めていく。

Galectin lattice を形成する Galectin は可溶性で糖鎖の非還元末端にガラクトースを含む糖鎖構造 (β -ガラクトシド) に特異的に結合するレクチンファミリーである。Galectin は約 135 アミノ酸からなる高い相同性を持つ S 型糖認識ドメイン (S-CRD: S-carbohydrate recognition domain) を持っている。Galectin-3 は細胞質 (Gritzmacher *et al.*, 1988)、核周囲やミトコンドリア膜 (Yu *et al.*, 2002) に多く存在する。細胞質中に存在する Galectin-3 は抗アポトーシス活性を持ち (Yang *et al.*, 1996)、核に存在する Galectin-3 は mRNA 前駆体のスプライシングを促進する (Dagher *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 2002)。細胞外への放出機構については明らかにされていないが、Galectin-3 は細胞表面にも検出される。細胞表面の Galectin-3 は細胞間の相互作用や接着、lattice 構造の形成などに機能していることが知られており (Roff *et al.*, 1983, Nieminen *et al.*, 2007)、二量体あるいは五量体などの多量体を形成することで、多くの細胞表面の糖タンパク質を架橋し、より強いシグナル伝達の引き金となると考えられる。また Galectin-3 がマクロファージの貪食を制御することが報告されている (Sano *et al.*, 2003)。Galectin-3 ノックダウン細胞では抗原添加後のマクロファージの貪食速度が低下することが報告されている。また上皮細胞において Galectin とアクチンの再構成の関わりも報告されており、Galectin-3 は細胞膜上のインテグリン $\alpha 3$ 上の N-glycan に結合し、インテグリン $\alpha 3$ 同士を架橋することで、ラメリポディアの形成を促進することが報告されている (Saravanan *et al.*, 2009)。serum-MAF 処理したマクロファージは membrane ruffling が促進され、さらに転写非依存的な迅速な活性化が行われている。マイクロドメインは迅速なシグナル伝達をおこすため、serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇に、迅速なシグナル伝達がおこるマイクロドメインが関与していると考え、本章では serum-MAF 処理でマイクロドメインの形成が促進されるかの解析を行なった。

8-2 実験操作

8-2-1 試薬

精製 Galectin-3、ラクトースー水和物は Wako から購入した。2-Bromohexadecanoic acid は Sigma Aldrich から購入した。β-シクロデキストリンは甲南大学フロンティアサイエンス学部甲元一也教授から供与していただいた。

8-2-2 siRNA によるトランスフェクション

操作の詳細は 6-2-2 に記述している。使用したプライマー配列を Table 8-1 に示す。

Table 8-1. 使用したプライマー配列

	Forward	Reverse
ZDHHC11	CTGCTCATCTTCCACATCTACC	CCATTTGCACGTATGGATCTTTC
ZDHHC6	CCTGCTGCCCTCTGAATAAA	TCGTAAACCTCTTGTGGCTAAA

8-2-3 マイクロドメイン分画

THP-1 マクロファージを 3×10^6 cells/10 mm dish となるように播種した。各活性化因子を添加し（各サンプルにつき dish を 3 枚使用する）、1 時間反応させた。反応後、無血清 RPMI で 2 回洗浄を行い、Buffer A（リン酸化タンパク質の定量と同じ組成）を 700 μ l 添加し、氷上で 10 分間静置した。スクレイパーで細胞を回収後、2 枚目の dish に細胞破碎液を添加し、10 分間静置した。処理条件ごとに合計 3 枚の dish で同様の操作を行い、細胞破碎液を 1.5 ml チューブに回収し、10,000 g \times 10 分 \times 4 $^{\circ}$ C で遠心を行った。遠心後上清を回収し、Bradford protein assay（Bio-rad）でタンパク量を定量し、各サンプルのタンパク量を揃えた。各サンプルの細胞破碎液 500 μ l を 1.5 mL チューブに分取し、85 %スクロース/Buffer A (Triton X-100 free)を 500 μ L 加えてピペッティングで懸濁を行い、5 mL 超遠心チューブに加えた。同じ 5 mL チューブに 30 %スクロース 2.5 mL、5 %スクロース 1.5 mL をゆっくりと重層し、100,000 g \times 20 時間、4 $^{\circ}$ C で超遠心を行った。遠心終了後、5 mL チューブの上から 1 mL ずつ取り出して、1.5 mL チューブに入れ、合計 5 個の Fraction を調製した。Fraction 2 のサンプルを 900 μ L 分取し、15 mL チューブに移し、ice water で 5 倍希釈を行い、ボルテックスで攪拌後、遠心用チューブに移し、150,000 g \times 30 分 \times 、4 $^{\circ}$ C で超遠心を行い、マイクロドメインを濃縮した。遠心終了後、ペレットを 1 \times sample buffer に溶解し、SDS-PAGE を行った。

8-2-4 免疫染色

Lifeact-THP-1 マクロファージまたは THP-1 マクロファージを 1.6 %パラホルムアルデヒド (polysciences, PA, USA) で 5 分間固定後、PBS で洗浄した。5% BSA で 1 時間ブロッキング後、一次抗体として抗 Galectin-3 抗体 (CST,87985s; 1:100 希釈)、抗 CD18 抗体 (Sigma, SAB4700404; 1:100 希釈) を使用した。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, A11001; 1:1000 希釈)、Alexa Fluor 532-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, A11009; 1:1000 希釈) を使用した。DNA は 10 $\mu\text{g/mL}$ の DAPI で染色した。染色したサンプルは LSM700 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。

8-3 結果

8-3-1 脂質ラフトの解析

脂質ラフトを含むマイクロドメインは、シグナル分子を局所的に集積させることによって、効率的なシグナル伝達を行う場として機能していると考えられている (Simons *et al.*, 2011)。serum-MAF はマクロファージの貪食能を迅速に活性化している点から、免疫シナプスのようにマイクロドメインを形成し、迅速なシグナル伝達を促進しているのではないかと考えた。

マイクロドメインの主要な構成成分としてコレステロールがある。 β -シクロデキストリン (β -CD) はコレステロールと強く結合する性質があるため、培養液中に比較的高濃度で加えることで、脂質ラフトを構成するコレステロールを引き抜き、脂質ラフトを破壊することが知られている (Keller *et al.*, 1998)。最初に serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇が、マイクロドメインを介しているかを調べるため、 β -CD で細胞を処理することで、serum-MAF によるマクロファージの貪食能が抑制されるか検討した (Figure 8-1)。その結果 control では、Untreated; $5.5 \pm 0.9\%$ 、 β -CD 処理; $3.2 \pm 1.2\%$ ($p=0.01$)、serum-MAF では Untreated; $19.4 \pm 5.0\%$ 、 β -CD 処理; $10.9 \pm 3.3\%$ ($p=0.02$)、 γ -globulin では Untreated; $15.9 \pm 4.8\%$ 、 β -CD 処理; $14.4 \pm 5.3\%$ ($p=0.69$) となった (p 値は各試薬処理時の control との t 検定の結果を表している。n=3)。 β -CD を添加することで、serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇が有意に低下したのに対し、 γ -globulin によるマクロファージの貪食能に変化はみられなかった。

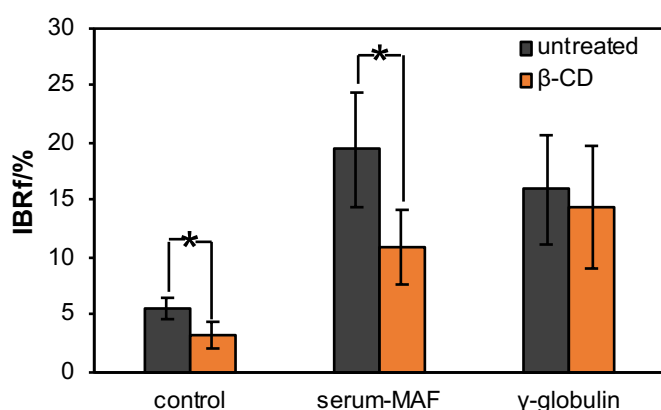


Figure 8-1. マイクロドメイン破壊実験

THP-1 マクロファージに脂質ラフト形成阻害剤; β -シクロデキストリン (5 mM) と serum-MAF (6 μ g/mL) または γ -globulin (2 μ g/mL) を 1 時間暴露し、食食能を測定した。エラーバーは SD (n=3) * p <0.05 (t -test)

スフィンゴ脂質やコレステロールに富むマイクロドメインは、低温条件で TritonX-100 に不溶性であり、その比重は比較的軽い。そのため、4°Cで TritonX-100 処理した細胞のライセートをシヨ糖密度勾配遠心にかけることでマイクロドメインは低密度画分に回収される (Brown *et al.*, 1992)。今回の手法では、シヨ糖密度勾配を 5 つの Fraction に分画しており、シヨ糖密度 5%と 25%との境界画分である Fraction 2 を中心にマイクロドメイン画分が回収されることが知られている。それぞれの Fraction を SDS-PAGE 後、銀染色を行い比較したところ、control と比較して serum-MAF 処理したマクロファージは、マイクロドメイン画分のタンパク量が増加しており、serum-MAF 処理によってマイクロドメインが誘導されていることが示された (Figure 8-2)。この結果から serum-MAF による食食能上昇にマイクロドメインが関与している可能性が考えられる。

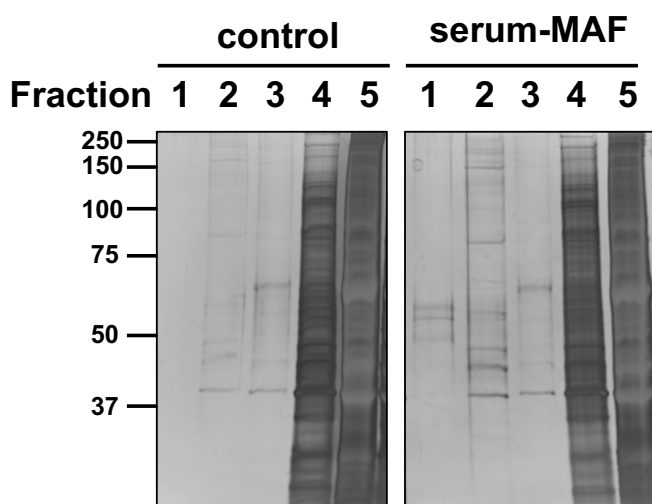


Figure 8-2. シヨ糖密度勾配法によるマイクロドメイン画分の抽出

シヨ糖密度遠心勾配法による脂質ラフト分画の抽出。THP-1 マクロファージに serum-MAF (6 μ g/ml) を 1 時間暴露し、スクロース (5-42.5%) を加えて遠心し 5 分画に分け、SDS-PAGE 後、銀染色を行なった。

またこれらの実験でみているマイクロドメインは脂質ラフトやカベオラ構造、Galectin lattice が含まれるため、serum-MAF により増加するマイクロドメインが脂質ラフト、カベオラ構造、Galectin

lattice のどれであるかを調べるため、まずカベオラ構造のマーカである抗 caveolin-1 抗体でマイクロドメインが含まれる画分 (Fraction 2) を調べた。その結果、顕著なバンドは認められなかったことから、serum-MAF により増加するマイクロドメインに caveolin-1 は含まれず、さらに細胞ライセートで検討した結果でも caveolin-1 の発現は低いことが分かった (Figure 8-3)。また caveolin-1 の遺伝子発現をチップ解析で調べた結果、THP-1 マクロファージにおける caveolin-1 の遺伝子発現は低かった (data not shown)。これらの結果から、serum-MAF 処理によって誘導されるマイクロドメインはカベオラ構造ではなく脂質ラフトもしくは Galectin lattice であることが考えられた。

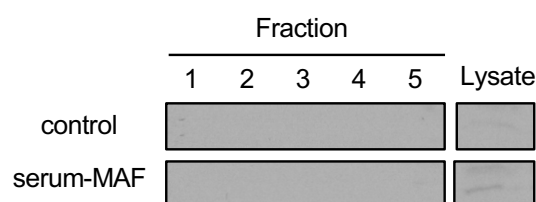


Figure 8-3. ライセートおよび各画分における CAV-1 の発現

シヨ糖密度遠心勾配法によって抽出した5分画(マイクロドメイン画分は Fraction2)と細胞ライセートの caveolin-1 の発現を、抗 caveolin 抗体を用いてウェスタンブロッティングで調べた。

脂質ラフトに集積する分子はアシル化などの修飾を受けること、もしくはラフト会合分子への親和性を有することによって脂質ラフトに局在化される (Simons *et al.*, 2000)。例えば Src ファミリーチロシンキナーゼはパルミトイル化修飾を受けることによって脂質ラフトに局在する (Mukherjee *et al.*, 2003)。そこで次に serum-MAF による脂質ラフトを介したマクロファージの食能上昇にパルミトイル化されたタンパク質が関与しているかをパルミトイル化酵素阻害剤である 2-ブロモパルミチン酸 (2-BP) を用いて調べた (Figure 8-4)。その結果、control では untreated; $7.0 \pm 0.7\%$ 、2-BP 処理; $6.6 \pm 0.5\%$ ($p=0.55$)、serum-MAF では untreated; $24.6 \pm 3.0\%$ 、2-BP 処理; $16.9 \pm 2.6\%$ ($p=0.01$)、 γ -globulin では untreated; $20.8 \pm 2.8\%$ 、2-BP 処理; $12.8 \pm 2.0\%$ ($p=0.03$) となり、serum-MAF と γ -globulin 処理マクロファージに 2-BP を添加すると食能が有意に低下した (p 値は全て各因子添加時の untreated と 2-BP 処理間の t 検定の結果を表している。n=3)。

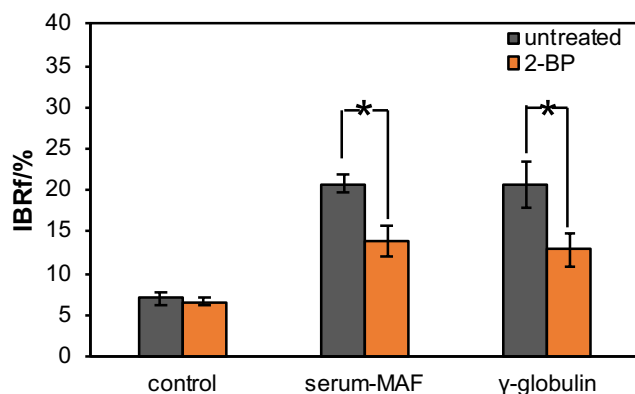


Figure 8-4. パルミトイル化阻害実験

THP-1 マクロファージにパルミトイル化阻害剤; 2-Bromohexadecanoic acid (2-BP:100 μ M) と serum-MAF (6 μ g/ml) または γ -globulin (2 μ g/ml) を 4 時間暴露し、食能を測定した。エラーバーは SD (n=3) * $p < 0.05$ (t -test)

パルミトイル化を行うパルミトイル化酵素はヒトで 23 種類（ZDHHC10 以外の ZDHHC1-ZDHHC24）報告されている（Lemonidis *et al.*, 2015）。serum-MAF 処理マクロファージの貪食能上昇にどのパルミトイル化酵素が関係しているかを、パルミトイル化酵素をノックダウンすることで調べた（Table 8-3）。スクリーニングにおいては、それぞれの基質となるタンパク質が報告されているパルミトイル化酵素もあったことから、可能性の高い 11 種の酵素に限定してノックダウンを行った。

Table 8-3. パルミトイル化酵素のノックダウンによるマクロファージの貪食能

Gene name	Description	AR
control siRNA		2.4
ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3	2.2
ZDHHC4	zinc finger, DHHC-type containing 4	2.0
ZDHHC5	zinc finger, DHHC-type containing 5	2.1
ZDHHC6	zinc finger, DHHC-type containing 6	1.9
ZDHHC7	zinc finger, DHHC-type containing 7	2.1
ZDHHC11	zinc finger, DHHC-type containing 11	1.9
ZDHHC12	zinc finger, DHHC-type containing 12	2.3
ZDHHC16	zinc finger, DHHC-type containing 16	3.1
ZDHHC17	zinc finger, DHHC-type containing 17	3.3
ZDHHC21	zinc finger, DHHC-type containing 21	2.5
ZDHHC24	zinc finger, DHHC-type containing 24	2.1

AR; activation raio (IBRf of serum-MAF/IBRf of control)

その結果 ZDHHC6 および ZDHHC11 ノックダウン細胞で serum-MAF による貪食能の上昇が 1.9 以下に減少していたため（Table 8-3 のマーカー部参照）、ZDHHC6 および ZDHHC11 ノックダウン細胞での再現性を調べた（Table 8-4）。ZDHHC6 ノックダウン細胞で serum-MAF 処理時の AR が減る傾向にあるものの、有意な差は見られなかった。一方で ZDHHC6 ノックダウン細胞において γ -globulin 処理時の AR は有意に減少した。このことは、 γ -globulin と serum-MAF とでは、マクロファージの貪食能上昇のメカニズムが異なっているというこれまでの結果を支持している。serum-MAF では特定のパルミトイル化酵素のノックダウンによって貪食能は変化しなかったものの、パルミトイル化酵素を全般的に阻害できる阻害剤では貪食能が阻害されたことを考慮すると、serum-MAF では複数のパルミトイル化酵素が働いているのではないかと考えている。つまり、serum-MAF による貪食能活性化には複数のパルミトイル化されたタンパク質が集積する脂質ラフトが関与していると考えられた。

Table 8-4. パルミトイル化酵素のノックダウンによるマクロファージの貪食能

Gene name	Description	AR		Transfection efficiency (%)
		serum-MAF	γ -globulin	
non-targeting		3.7 \pm 0.5	3.8 \pm 0.5	0.0
<i>S-acyltransferases</i>				
ZDHHC6	zinc finger, DHHC-type containing 6	3.0 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2*	49.0
ZDHHC11	zinc finger, DHHC-type containing 11	4.8 \pm 0.5	4.2 \pm 0.9	60.0

AR; activation ratio (IBRf of serum-MAF or γ -globulin/IBRf of control)

* $p < 0.05$ (non-targeting siRNA 細胞における γ -globulin の AR との t -test)

8-3-2 Galectin lattice の解析

次に Galectin lattice が serum-MAF による貪食能上昇に関与しているかを調べるため、serum-MAF 処理マクロファージおよび γ -globulin 処理マクロファージで Galectin の分布や量に変化があるかを、免疫染色を行うことで調べた (Figure 8-5)。ほ乳類では 15 種の Galectin が知られているが、Galectin lattice 形成においては Galectin-3 が関与しており、Galectin-3 はアクチンの再構成の促進にも関与していることが知られているため、本研究では Galectin-3 の挙動を調べた。免疫染色の結果、Galectin-3 は細胞質および細胞膜に存在し、一部核にも存在が見られた。control および γ -globulin 処理マクロファージに比べ、serum-MAF 処理マクロファージでは Galectin-3 が細胞膜上に点状に多数集積しているのが観察された。この集積は写真から 100~500 nm 程度の大きさであり、巨大な脂質ラフトとも考えられる大きさである。

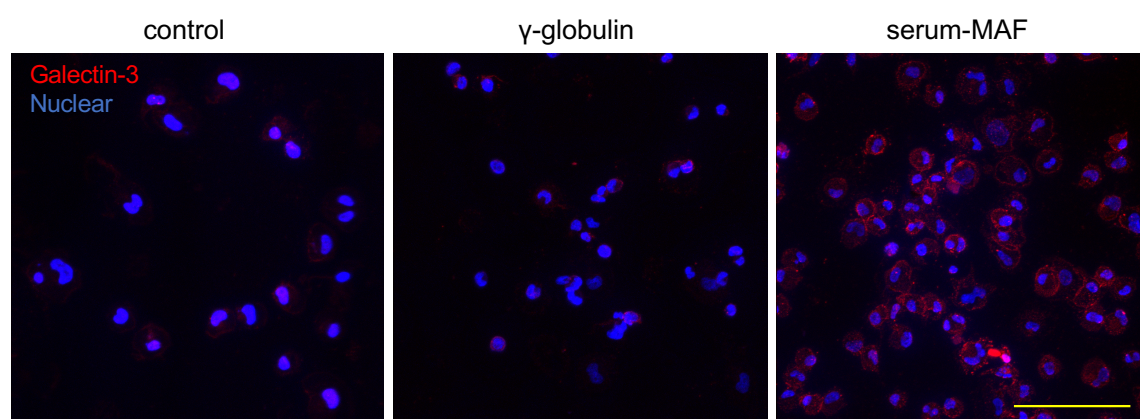


Figure8-5. γ -globulin および serum-MAF 処理マクロファージにおける Galectin-3 の局在

γ -globulin (2 μ g/ml) および serum-MAF (6 μ g/ml) を 5 分間処理した THP-1 マクロファージを固定し、一次抗体は anti-Galectin-3、二次抗体は Alexa532 を用いて抗体染色を行った (赤)。核は DAPI (青) で染色している。スケールバー; 100 μ m

またこの Galectin-3 の集積と membrane ruffling との関係を Lifeact-THP-1 マクロファージを用いた免疫染色により詳細に検討した。大きな点状の Galectin-3 の集積は、細胞膜上に散在している

様にも見えるが、serum-MAF 処理マクロファージでみられる細胞輪郭部の membrane ruffling 部に見られることも多い (Figure 8-6)。さらによく観察すると、点状の集積の大きさは様々であり、小さな点が集まったように見えるところや点状には見えないものの雲のように Galectin-3 の染色が濃く見える部分、さらには雲状の集積の中に点状の集積が見られるところもあった。特にアクチンが強く大きく集積している部分には、雲状の集積や点状の集積が共局在していた (Figure 8-6 の黄矢尻)。

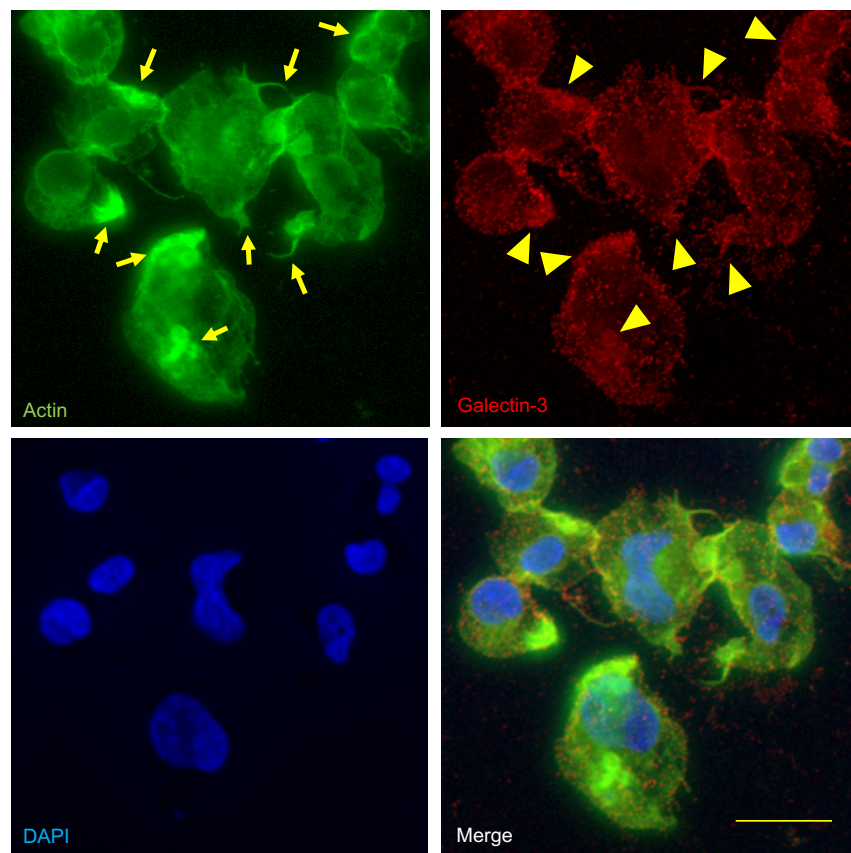


Figure 8-6. マクロファージの細胞輪郭部のアクチン集積と Galectin-3 の関連

serum-MAF (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 5 分間暴露した Lifeact-THP-1 マクロファージを固定し、一次抗体は anti-Galectin-3、二次抗体は Alexa532 を用いて抗体染色を行った(赤)。核は DAPI (青) で染色している。アクチンは緑で示している。黄矢印はアクチン集積、黄矢尻は Galectin 集積を示している。スケールバー; 10 μm

serum-MAF 処理で見られた Galectin-3 の集積が、serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇に関与しているかを調べるため、Galectin との高い親和性をもつラクトースを用いて拮抗阻害実験を行なった (Figure 8-7)。その結果、Untreated の control が $7.0 \pm 0.9\%$ 、Lactose 処理 control が $7.2 \pm 0.8\%$ ($p=0.80$)、Untreated の serum-MAF が $23.7 \pm 1.6\%$ 、Lactose 処理 serum-MAF が $19.3 \pm 0.6\%$ ($p=0.004$) となり、serum-MAF によって上昇したマクロファージの貪食能が、Lactose を添加することで有意に低下したが、阻害効果としては少なかった (p 値は untreated の control または serum-MAF との t 検定の結果を表している。n=3)。この結果についての詳しい考察は後述するが、以上の結果より、serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇に Galectin が関与していることが明らかとなった。

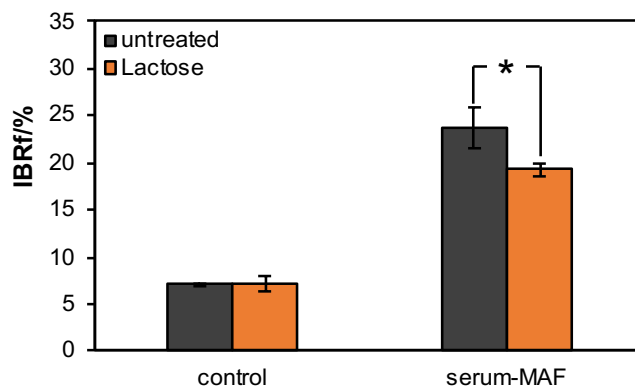
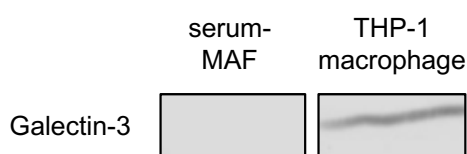


Figure 8-7. ガレクチン阻害実験

THP-1 マクロファージにガレクチンの阻害剤として作用するラクトース (50 mM) と serum-MAF (6 $\mu\text{g/ml}$) を 1 時間処理し、貪食能を測定した。エラーバーは SD (n=3) * $p < 0.05$ (t -test)

そこで Galectin-3 が serum-MAF 中に含まれており、有効成分として働いているのかを調べるため、serum-MAF 中に Galectin-3 が含まれるかを調べた (Figure 8-8A)。その結果、serum-MAF 中には Galectin-3 が含まれていなかったため、Galectin-3 は serum-MAF 中ではなくマクロファージ由来であることが明らかとなった。また精製 Galectin-3 を添加した際の貪食能を測定した結果 (Figure 8-8B)、control が $7.0 \pm 0.9\%$ 、Galectin-3 添加時が $8.3 \pm 1.4\%$ ($p=0.24$) となり、Galectin-3 を添加しても貪食能は変化しなかった (p 値は control との t 検定の結果を表している。n=3)。

(A)



(B)

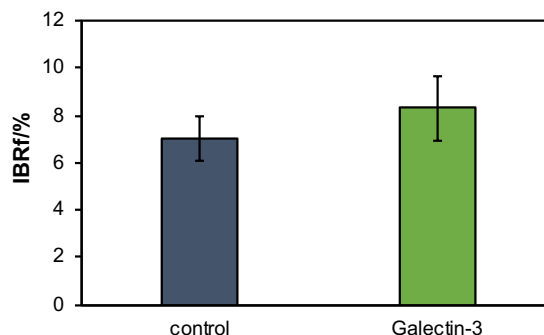


Figure 8-8. serum-MAF 中の Galectin-3 含有量および Galectin-3 添加時のマクロファージの貪食能の測定

(A) serum-MAF または THP-1 細胞に含まれる Galectin-3 をウエスタンブロッティングによって調べた。(B) THP-1 マクロファージに精製 Galectin-3 (1 μM) を 1 時間暴露し、貪食能を測定した。エラーバーは SD (n=3)。

8-3-3 Galectin lattice 上の候補タンパク質

serum-MAF によってマクロファージ内の Galectin-3 が集積し、Galectin lattice を形成することが明らかになったため、次に Galectin lattice 上に集積しているタンパク質の探索を行った。CD47 はマクロファージでも発現の高い膜タンパク質であり、T 細胞では脂質ラフト上でアクチン再編成を促進することが報告されているため (Rebres *et al.*, 2001)、serum-MAF 処理マクロファージで形成された Galectin lattice にも CD47 が集積しているのではないかと考え、CD47 と Galectin-3 の局在を免疫染色で調べた (Figure 8-9)。その結果、Galectin-3 の集積の少ない control においても CD47 と一部共局在を示し、serum-MAF で刺激したマクロファージでは Galectin-3 が強く集積したところに CD47 が共局在している様子が確認できた。CD47 は Galectin lattice 上に集積されるタンパク質の一つである可能性が示された。

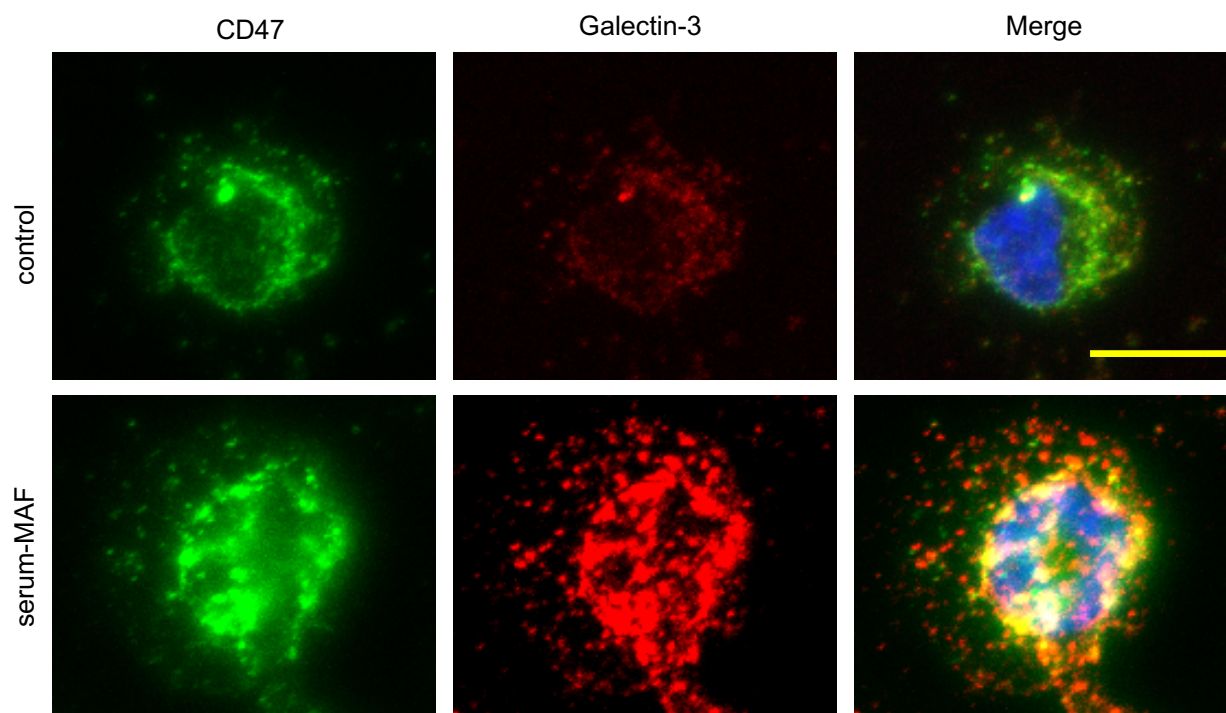


Figure 8-9. マクロファージ上の Galectin-3 と CD47 の局在

serum-MAF (6 μ g/ml) を 5 分間暴露した Lifeact-THP-1 マクロファージを固定し、一次抗体は anti-CD47 または anti-Galectin-3、二次抗体は Alexa488 または Alexa532 を用いて抗体染色を行った。撮影は共焦点顕微鏡を用いて行い、マクロファージの接着面から頂点までの optical section を stack した。スケールバー; 10 μ m

8-4 考察

serum-MAF によるマクロファージの食食能上昇メカニズムはマイクロドメインを介した pathway を有する

本章ではマイクロドメインが serum-MAF による食食能上昇に関与しているかを調べた。マイクロドメインの主要な構成成分であるコレステロールを除去した実験において、 γ -globulin 処理マクロファージでは食食能の低下が見られなかったのに対し、serum-MAF 処理マクロファージでは食食能の低下が見られた。さらにシヨ糖密度勾配法で膜分画を回収した結果、serum-MAF 処理マクロファージでマイクロドメインの形成が促進されていることが明らかとなった。この結果より、serum-MAF 中の γ -globulin 以外の有効成分がマイクロドメイン形成を促進していることが示唆された。

またこのマイクロドメインにはカベオリンが含まれていないことから、serum-MAF によって形成されたマイクロドメインはカベオラ構造ではなく Galectin lattice を含む脂質ラフト構造ではないかと考え、Galectin lattice の形成に関わる Galectin-3 の細胞内分布を免疫染色で観察したところ、control および γ -globulin と比較して serum-MAF 処理マクロファージで Galectin-3 の集積が増大しており、Galectin lattice を形成していることが示唆された。control および γ -globulin 処理マクロファージでは Galectin の染色が弱かったが、細胞の Galectin-3 のタンパク量は control と serum-MAF 処理マクロファージで差はなかった (data not shown)。したがって control および γ -globulin 処理マクロファージでは Galectin-3 は分散して存在しているが、serum-MAF を処理することで Galectin-3 が集積して Galectin lattice を形成していると考ええる。今後シヨ糖密度勾配法で分離した脂質ラフト画分に Galectin-3 が局在しているかをウエスタンブロッティングで解析することによって、serum-MAF 処理によって脂質ラフト上で Galectin lattice が形成されている裏付けを行なっていきたい。

また serum-MAF 中に Galectin-3 は含まれておらず、外部から添加しても control の食食能が上昇しなかったことから、serum-MAF の添加で観察される Galectin-3 の集積は、マクロファージが分泌している Galectin-3 によるものであり、serum-MAF 中の有効成分が Galectin lattice の形成促進を行なっていることが示唆された。この serum-MAF 処理で確認される Galectin-3 の集積を引き起こす有効成分を考えた際に、serum-MAF の有効成分の一つである γ -globulin では Galectin lattice が形成されなかったため、serum-MAF 中の γ -globulin 以外の有効成分が Galectin lattice の形成を促進していると考えられた。Galectin lattice の形成促進メカニズムは不明な点が多いため、今後 serum-MAF 中の Galectin lattice を形成する因子 (Factor X) を特定し、Galectin lattice 形成メカニ

ズムを解析することは、serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムの解明だけでなく、Galectin lattice の新規形成メカニズムに繋がるため非常に興味深い (Figure 8-10)。

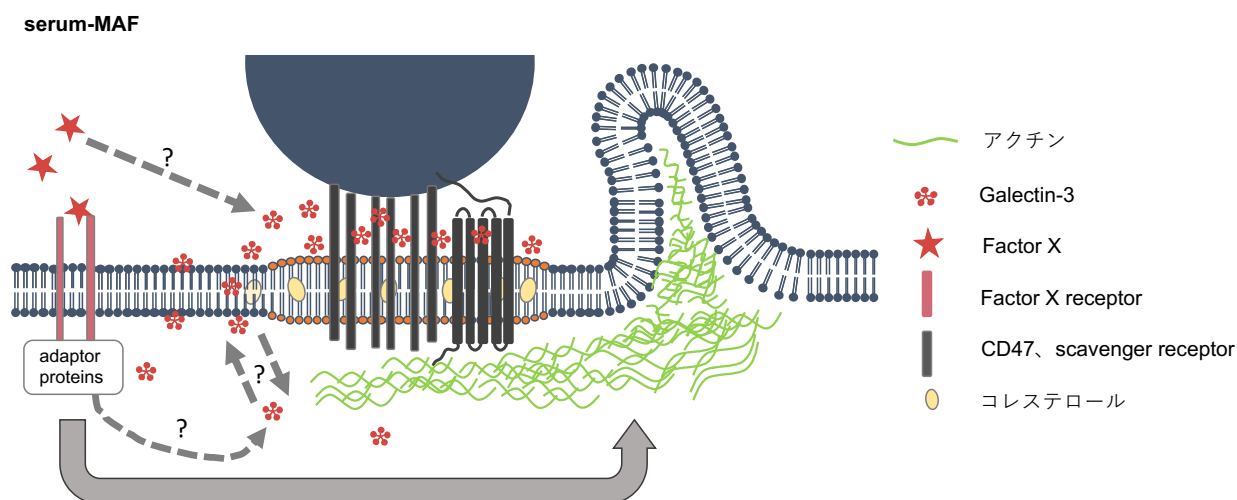


Figure 8-10. 本章から予想される Galectin lattice を介した serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇メカニズム

serum-MAF により形成される Galectin lattice の役割

ここまでは Galectin lattice の形成メカニズムについての議論を行ってきたが、次に形成された Galectin lattice の役割について議論を進めていく。形成された Galectin lattice と、serum-MAF の添加で見られる membrane ruffling の局在を観察した結果、アクチンと Galectin lattice の共局在がみられた。脂質ラフトの下流でアクチンの再編成が起こることは報告されているため (Holowka *et al.*, 2000, Simons *et al.*, 2000)、Galectin lattice と membrane ruffling は協調して働いていることが考えられ、Galectin lattice を誘導する γ -globulin 以外の成分が、serum-MAF のみで見られる membrane ruffling も引き起こしていることが示唆される。また membrane ruffling と Galectin lattice の共局在は見られたものの、形成されている Galectin lattice の大きさは雲状の集積から点状の集積など様々であった。(Figure 8-6 の Galectin-3 染色の黄矢尻)。この Galectin lattice の大きさの違いについて現在次の仮説を考えている。

Galectin lattice は消長を繰り返しているため、様々な大きさの集積ができています。Galectin lattice の消長は Galectin lattice 上の様々な分子によるシグナル伝達の活発なフィードバックループによって生じています。また上述したが、Galectin lattice と membrane ruffling が共局在していることから、Galectin lattice の下流はアクチンに繋がっていると考えられるため、Galectin lattice からの活

発なシグナル伝達により、アクチン再編成も活発になることで、アクチンの集積が引き起こされていると考える。今後、細胞内の Galectin-3 の挙動を live imaging で確認できるシステムを作ること、Galectin-3 と membrane ruffling の形成の関係を解析していきたい。また Galectin-3 は phagocytic cup および phagosome でアクチンと共局在しており、Galectin-3 をノックダウンすることでアクチンの再構成が抑制されとの報告があるため (Sano *et al.*, 2003)、Galectin-3 ノックダウン細胞で serum-MAF によるマクロファージの membrane ruffling に変化があるかを調べることで、Galectin-3 と membrane ruffling の関係も明らかになると考える。

ここまでは Galectin lattice と membrane ruffling の関係について考察を行ってきたが、次に Galectin lattice が serum-MAF による貪食能上昇メカニズムに関与しているかを考察する。Lactose による Galectin の拮抗阻害実験を行なった結果、serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇が有意に抑制されたため、Galectin が serum-MAF による貪食能上昇に関与していることが考えられる。しかし Lactose による貪食能の阻害効果は 100%ではなかったため、Galectin が serum-MAF の貪食能上昇メカニズムの全てを担っているわけではないと考える。先行研究において、Galectin-3 をノックダウンすると貪食のスピードが低下することが報告されている (Sano *et al.*, 2003)。この報告は Galectin lattice がビーズ添加 10 分後にみられる serum-MAF が引き起こす強い貪食能の上昇に関与している可能性を支持している。今後 Lactose での阻害実験で、Galectin lattice が崩壊しているかを確認するとともに、ビーズ添加 10 分後における貪食能の測定を行っていきたい。さらに Galectin-3 をノックダウンさせた THP-1 マクロファージで、serum-MAF でみられるビーズ添加後 10 分で見られる強い貪食能の上昇 (Figure 7-6) が変化するかを確かめることによって、本実験系でみられる serum-MAF によるマクロファージの貪食能の強い活性化に Galectin-3 および Galectin lattice が関与しているかを明らかにできると考えている。

予想される Galectin lattice 上の分子

Galectin-3 と CD47 が共局在していたことから、Galectin lattice 上に存在しているタンパク質の候補として CD47 が挙げられた。CD47 は膜糖タンパク質であり、アクチンの再構成を促進することも報告されているため、Galectin lattice に集積した CD47 が serum-MAF でみられる membrane ruffling に関与している可能性も考えられる (Rebres *et al.*, 2001)。その他にも Galectin lattice 上に存在していると予想しているタンパク質の一つとしてインテグリン $\alpha 3$ がある。先行研究で Galectin-3 は細胞膜上のインテグリン $\alpha 3$ 上の N-glycan に結合し、インテグリン $\alpha 3$ 同士を架橋することで、ラメリポディアの形成を促進することが報告されている (Saravanan *et al.*, 2009)。

Galectin-3 で架橋されることや、アクチンへの関与から、serum-MAF で見られる Galectin-3 の集積によって架橋されている受容体がインテグリン $\alpha 3$ である可能性もあるため、今後、Galectin-3 とインテグリン $\alpha 3$ の共局在を免疫染色で確認していきたい。

また serum-MAF および γ -globulin によるマクロファージの貪食能上昇に関わっているパルミトイル化は翻訳後脂質修飾の一種で、飽和脂肪酸であるパルミチン酸を基質タンパク質に付加する反応である。パルミトイル化酵素の一つである ZDHHC6 をノックダウンした THP-1 マクロファージに γ -globulin を処理すると貪食能が有意に低下した。ZDHHC6 はタンパク質間相互作用に関わる既知の機能ドメインである SH3 ドメインをもつことが知られているものの、基質となるタンパク質はほとんど報告されていない。また ZDHHC6 がマクロファージの貪食に関わることは知られていないため、この結果は非常に興味深い。また serum-MAF では ZDHHC6 ノックダウン細胞によって貪食能は低下する傾向があるものの、有意差はみられなかった。 γ -globulin によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムは serum-MAF と比較して単一もしくは少数の pathway で行われているため、ZDHHC6 のノックダウンで貪食能が有意に下がったと考える。一方で serum-MAF によるマクロファージ活性化メカニズムは単一ではなく複数のメカニズムを有しているため、そこに関わるパルミトイル化酵素も複数存在するため貪食能の有意な低下がみられなかったと考えている。パルミトイル化される分子は多数報告されているが、その中で貪食に関わる分子としてシグナル伝達分子である Lyn や Src が挙げられる。これらの分子がパルミトイル化されて Galectin lattice に留まることによって、活発なシグナル伝達がおこっていると考ええる。

以上の結果より、serum-MAF による Galectin lattice の形成によって、様々な受容体やシグナル分子が凝集し、活発なシグナル間の相互作用がおこっていると考ええる。第 6 章で行なったシグナル伝達分子の阻害実験や、候補遺伝子のノックダウン実験では serum-MAF による貪食能上昇は抑制されなかった。この考察として、serum-MAF では複数のメカニズムが介在しているため、単一の分子を阻害しても貪食能の上昇が阻害されないということを第 6 章では記述したが、Galectin lattice の結果はこの考察を強く裏付けるものであると考えている。またパルミトイル化の阻害剤では serum-MAF によって上昇した貪食能が抑制されたものの、パルミトイル化酵素を一つずつノックダウンすると貪食能が抑制されなかった結果も、様々なタンパク質が Galectin lattice に集まっており、複数のパルミトイル化酵素がそれぞれの標的分子に対して働いていることを示していると考ええる。

第9章 結論

本研究では、抗原侵入時にマクロファージが迅速に活性化するメカニズムを明らかにするため、素早い貪食能を測定できる評価系の確立を行なった。確立した評価系を用いてマクロファージ活性化因子のスクリーニングを行うとともに多様な因子のマクロファージに対する影響を評価した。また評価系確立の過程でマクロファージを迅速に活性化させる serum-MAF を発見し、それをモデル系として研究を行っていくことで、これまで知られていなかった新たなマクロファージ貪食能の活性化メカニズムを明らかにした。それらの結果を以下にまとめる。

9-1 結果のまとめ

(1) THP-1 マクロファージを用いてマクロファージの素早い貪食能を評価する評価法を確立した。確立した貪食能評価系の大きな特徴として、貪食させる抗原、貪食能の算出方法、因子処理時間の短さが挙げられる。さらにこの評価系は High-throughput 化が可能であるため、多くの化合物のスクリーニングに利用できる。pH 感受性の磁気ビーズを貪食させて、新規算出方法である IBRf で貪食能を算出することで、既存法と比較して、ビーズ量のばらつきに左右されない安定した実験結果が得られるようになった。また既存法では添加する因子で 4-24 時間程度処理するのに対し、本研究ではマクロファージの迅速な活性化を測定するのを目的としているため、5-60 分の処理時間で実験を行う評価系としている。さらに因子自体がオプソニン化の効果を示す可能性を排除するため、因子による活性化を行った後、因子を洗い流してから貪食能の評価を行うことで、抗原が侵入してからのマクロファージの迅速な貪食能をより正確に評価することが可能となった。

(2) 確立した評価系を用いてマクロファージの貪食と polarization との関連を解析した結果、ALA+SFC、PAPLAL、serum-MAF、それぞれの因子でマクロファージの polarization や貪食能の挙動は大きく異なった。この結果は、本研究で確立した実験系が様々な因子によって多様な状態に変化したマクロファージであっても、その貪食能を解析することが可能であることを示している。また serum-MAF をヒト末梢血から分化させたマクロファージを用いて同様の実験を行なった結果、THP-1 マクロファージと同じ傾向の結果が得られたため、本実験系は THP-1 マクロファージ特異的に起こる現象をみているわけではなく、汎用性の高い実験系となっていると考える。

(3) serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムを明らかにするため、形態・遺伝子発現・シグナル伝達経路・マイクロドメイン形成など多角的な解析を行なった結果、serum-MAF を 5 分間暴露すると貪食能の上昇が見られたことから、serum-MAF は LPS+IFN- γ などの 4 時間暴露でみられる早い貪食能の上昇よりもさらに早い、補体を介する貪食能の上昇などでみられる「迅速」な反応であることが明らかになった。さらに serum-MAF を 5 分間暴露することで、マクロファージの ruffling membrane が増大することが明らかとなった。serum-MAF は酵素処理したヒト血清であり、多数のタンパク質が含まれる。その中で serum-MAF 中の γ -globulin がマクロファージの貪食能を上昇させる有効成分の一つであることを明らかにした。しかし γ -globulin 処理マクロファージでは、5 分間の serum-MAF 暴露で見られた ruffling membrane の形成は見られなかった。さらに serum-MAF 処理マクロファージは、ビーズ添加 10 分後には control と比較した貪食能の上昇に有意な差が見られるのに対し、 γ -globulin 処理マクロファージではその貪食能の上昇が見られるのはビーズ添加 60 分後であることから、 γ -globulin は迅速な貪食能の上昇には関与しているものの、serum-MAF によるビーズ添加直後から既に違いがみられるような強い貪食能の活性化には関与していないことが明らかとなった。以上の結果から、serum-MAF 中の有効成分は γ -globulin だけではなく、迅速かつ 10 分間の貪食で貪食能を上昇させることのできる強い活性化を誘導できる何らかの因子が存在することを明らかにした。

また serum-MAF の添加によってマイクロドメイン形成が促進されることを明らかにした。serum-MAF の添加によって、 γ -globulin だけでは観察されない Galectin lattice が形成されて ruffling membrane と共局在している様子が免疫染色から確認された。また Galectin の阻害実験で貪食能が有意に低下したことから、Galectin lattice が serum-MAF でのみ観察される迅速で強い活性化に関与していることが明らかになった。CD47 と Galectin の共局在が免疫染色から確認されたため、Galectin lattice 上に存在する分子の候補として CD47 が挙げられる。以上の結果より本研究から考えられる serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムを以下に示す (Figure 9-1)。今後 serum-MAF 中の Galectin lattice 形成を促進する因子を同定し、Galectin lattice 形成メカニズムを明らかにすることは、serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムだけでなく、Galectin lattice の新規形成メカニズムに繋がると考える。

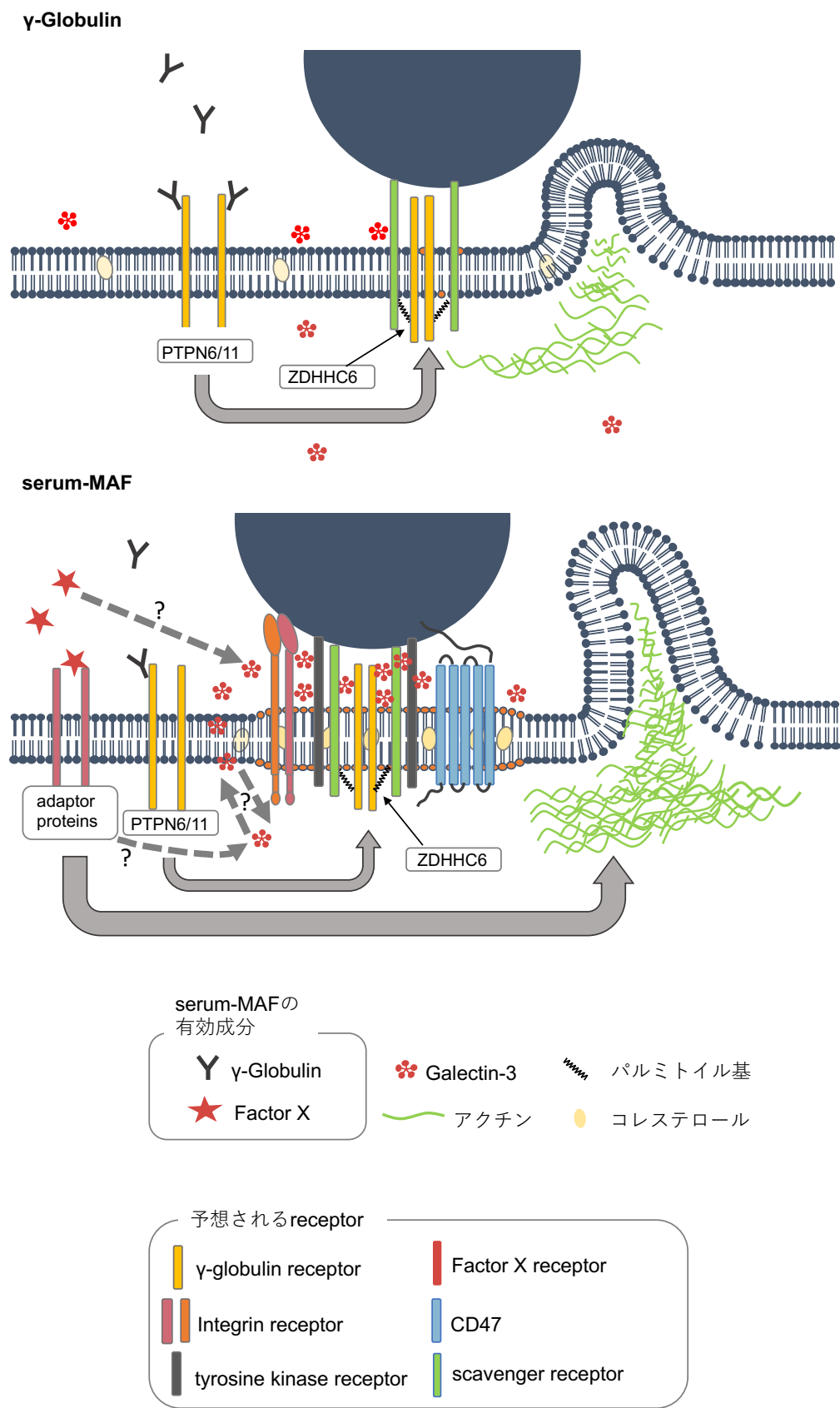


Figure 9-1. 本研究から予想される serum-MAF によるマクロファージの食食能上昇メカニズム

9-2 新規マクロファージ貪食活性化メカニズム

serum-MAF によるマクロファージの貪食能上昇メカニズムは大きく分けて二つの pathway が働いており、そのどちらも転写を介さない活性化である。一つは serum-MAF 中の γ -globulin を介した活性化、もう一つは serum-MAF 中の未知な有効成分である Factor X を介した活性化である。

γ -globulin を介した活性化

この pathway は迅速にマクロファージの貪食能を上昇させるが、ビーズ添加後 60 分間の貪食で違いが明らかとなる比較的弱い活性化を引き起こす。 γ -globulin を認識する受容体の下流で PTPN6 や PTPN11 が働く。さらに ZDHHC6 によってビーズの貪食に関わる scavenger receptor や低分子量 G タンパク質などのパルミトイル化がおこり、コレステロールの明確な凝集を示さない程度の受容体のクラスターリングがおこることで、control と比較してビーズと受容体との親和性が上がるため、貪食能が上昇する。

Factor X を介した活性化

この pathway は迅速にマクロファージの貪食能を上昇させ、さらにビーズ添加後 10 分間の貪食でも違いが明らかとなる強い活性化を引き起こす。serum-MAF 中の Factor X により Galectin-3 の集積が誘導され、コレステロールやスフィンゴ脂質などに富む脂質ラフトと Galectin lattice が形成される。Galectin lattice が形成されることで受容体の凝集がおこり、素早いアクチン再編成が引き起こされる。さらに活発な membrane ruffling が起こるとともに、Galectin lattice 上に凝集している CD47 等の受容体が接触したビーズを確実に捉えることで貪食の効率を上げることで、ビーズ添加 10 分で貪食能の上昇を引き起こすような強い活性化を誘導する。また Galectin lattice の集積には多様な形態が観察されており、一般的なマイクロドメインの寿命を考慮すると、マクロファージ上でもマイクロドメインは活発な消長を繰り返していると考えており、アクチン細胞骨格の再編成を含めた下流のシグナル伝達が活発に生じ、フィードバックループが形成され、貪食能活性化を維持していることが考えられる。

9-3 本研究の意義

・評価系確立の意義

本研究では抗原が侵入してきた際に働くマクロファージの迅速な活性化メカニズムに着目しており、マクロファージの迅速な貪食能を測定することができる評価系が確立できた。ヒト由来の株化細胞である THP-1 から分化させたマクロファージを用いた結果と、ヒトの末梢血から採取し、分化させたマクロファージを用いた結果で、同じ傾向の結果が得られた。この結果から細胞株で

見られる特殊な反応を見ているのではなく、正常なヒトのマクロファージの貪食を解析できる系であると考え。また貪食能の算出方法である IBR は、異なった貪食ターゲットを使用した際にも有用であると考え。さらにこの評価系は pH 感受性ビーズを貪食させた High-throughput な系であるため、新規マクロファージ活性化因子をスクリーニングする際に非常に有用である。またマクロファージの迅速な活性化を誘導する因子を発見し、そのメカニズムを明らかにすることを目的としているが、発見した因子がその後のマクロファージの polarization にどのような影響を与えるかまで確認しなかったため、polarization の解析も行えるように条件を整えた。その結果、迅速な貪食能からその後の polarization に与える影響までを測定できる「マクロファージの機能を包括した」評価系になったと考える。確立した評価系が有用であるかを調べるため、確立した評価系を用いて、PAPLAL および ALA+SFC を処理した際のマクロファージの polarization および貪食能を測定した。その結果 PAPLAL および ALA+SFC は M1 マクロファージへの polarization を抑制したため、過剰な炎症反応がおこる自己免疫疾患の治療に対して応用できる可能性がある。

・初期攻撃における Galectin lattice を介したマクロファージの活性化を発見した意義とアジュバントとしての可能性

本研究で serum-MAF が Galectin lattice の形成を誘導し、マクロファージの迅速な貪食能を強く活性化させるであろうことを明らかにした。今後初期攻撃におけるマクロファージの貪食能活性化メカニズムの一つとして、Galectin lattice を介した pathway を考慮するべきである。また Galectin lattice の形成メカニズムは不明な点が多いため、serum-MAF 中の Galectin lattice 形成を促進する因子を明らかにし、Galectin lattice 形成メカニズムを明らかにすることは serum-MAF の研究だけでなく、マイクロドメインや糖鎖の研究分野にもインパクトを与えるものである。

また serum-MAF はマクロファージの polarization には影響を与えなかった。LPS や IFN- γ を含むマクロファージ活性化因子は polarization を変化させるものが多いため、アジュバントとして使用した際に炎症反応が引き起こされる可能性がある。その点において serum-MAF は、現在のアジュバントで問題とされている炎症反応などの副作用がおこる可能性が低いということを示しており、その有効成分を明らかにすることができれば、優れたアジュバントとして有用であろうと考える。

このように本研究ではマクロファージの迅速な活性化を測定する評価系の確立を行い、そこから迅速に貪食能の強い活性化を引き起こす serum-MAF を発見した。その活性化メカニズムの解

析も行なったところ、マクロファージ貪食能上昇メカニズムでは Galectin lattice の形成促進など、膜タンパク質のダイナミックな変化が関わっており、基礎的なメカニズムとして非常に興味深い。また現在のがん免疫療法において、腫瘍周辺で生じているマクロファージの貪食能の抑制を解除することで腫瘍退縮の効果があることが報告されている (Yanagita *et al.*, 2017)。serum-MAF は polarization を変化させずに、マクロファージの貪食能を上昇させることができるため、マクロファージをターゲットとしたがん免疫療法のアジュバントとして用いることで、より効果的ながん治療が行えるのではないかと期待している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として適切なご指導、ご助言をいただき、また本稿の精読と批評をしていただきました西方 敬人 教授に心よりお礼申し上げます。

甲南大学フロンティアサイエンス学部 川上 純司 教授および藤井 敏司 教授、神戸大学大学院医学研究科 斎藤 泰之 講師には、本稿の精読と批評をしていただきました。深く感謝いたします。

serum-MAF の研究において共同研究者にあたる神戸大学バイオシグナル総合研究センター 鎌田 真司 教授、岩崎 哲史 助教授、徳島大学大学院 STS 研究部 宇都 義浩 教授、医療法人再生未来 乾 利夫 先生、近畿大学薬学総合研究所 森山 博由 准教授、森山 麻里子 准教授、武庫川女子大学生生活環境学部 有井 康博 准教授、西澤 果穂 助手、ヤエガキ醗酵技研株式会社 山下 和彦 氏に深く感謝いたします。

PAPLAL の研究において共同研究者にあたる BTR 銀座アーツクリニック 市橋 正光 先生、京都府立大学生命環境科学研究科 南山 幸子 教授、ムサシノ製薬株式会社 齊藤 武志 氏、医療法人しばた皮フ科クリニック芝田 孝一 先生、九州大学医学部 辻 学 講師、大阪市立大学医学研究科 竹村 茂一 講師に深く感謝いたします。

ALA+SFC の研究において共同研究者にあたる SBI ファーマ株式会社 石塚 昌宏 氏、中川 仁 氏、北嶋 勇也 氏に深く感謝いたします。

また本研究を遂行するにあたって、有用なご助言を頂きました甲南大学フロンティアサイエンス学部川内 敬子 准教授、白井 健二准教授、甲元 一也教授、長濱 宏治 准教授、甲南大学先端生命工学研究所 遠藤 玉樹 准教授、日本精化株式会社 仁木 洋子 氏、株式会社ビオスタ 高木 滋樹 氏、厳原 美穂 氏、自然免疫応用技研株式会社 稲川 雄介氏、河内 千恵 氏、岡山理科大学 安藤 秀哉 教授に深く御礼申し上げます。

本研究を共同で進め、常に刺激的な議論をして下さいました西方研究室 OB 井上 貴裕 氏、西方研究室 OG 角谷 祐 氏、西方研究室 OB 小林 由基 氏、真柴 里歩 氏、川勝 薫平 氏、Tran Ngoc Kiet 氏、赤松 実憲 氏に深く感謝いたします。適切かつ有用なご助言を下さいました西方研究室

の OB・OG である北海道大学電子科学研究所 石井 宏和 特任助教授、西方研究室 OG 国広 潮里氏、西方研究室 OB 白井 琢馬 氏、アステラス製薬株式会社 高松 一彦 氏に深く感謝いたします。またいつも議論に加わり、有用なご助言を下さいました分子細胞発生学研究室の皆様、さらに本大学で接する機会の全ての皆様に感謝いたします。後輩各位におかれましては益々のご活躍を祈っております。研究を遂行するにあたって心の支えとなった澤田 美香 氏、佐野 由倫 氏、大橋 卓史 氏に心より感謝いたします。

本研究は JSPS 特別研究員奨励費 16J03508 の助成を受けたものです。また 2014 年にギリシャで開催された 9th International Conference of Anticancer Research への参加の際には内藤科学技術振興財団 2014 年度 内藤記念若手研究者海外派遣助成金をいただきました。深く感謝いたします。

最後になりましたが、母、兄、叔父、祖父母のサポートがなければ、長い研究生生活を送ることができませんでした。心から感謝いたします。

参考文献

- Akira S, Takeda K, Kaisho T.** (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* **2**, 675-680.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124**, 783-801.
- Akira S.** (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **366**, 2748-2755.
- Anderson, R.G. and K. Jacobson.** (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* **296**, 1821-1825.
- Aramaki Y, Murai M, Tsuchiya S.** (1993). Contribution of N-acetyl-beta-D-galactosamine-specific lectin to Fc receptor-mediated phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. *Immunology.* **79**, 403-407.
- Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, Hirose K.** (2014). Acidic-pH-activatable fluorescence probes for visualizing exocytosis dynamics. *Angew Chem Int Ed Engl.* **53**, 6085-6089.
- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G.** (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* **4**, 114.
- Banerjee S, Xie N, Cui H, Tan Z, Yang S, Icyuz M, Abraham E, Liu G.** (2013). MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. *J Immunol.* **190**, 6542-6549.
- Bayeva M, Gheorghiade M, Ardehali H.** (2013). Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* **61**, 599-610.
- Bhalla S, Shiratsuchi H, Craig DH, Basson MD.** (2009). beta(1)-integrin mediates pressure-stimulated phagocytosis. *Am J Surg.* **198**, 611-616.
- Brown DA, Rose JK.** (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* **68**, 533-544.
- Byrne JC, Ní Gabhann J, Lazzari E, Mahony R, Smith S, Stacey K.** (2012). Genetics of SLE: functional relevance for monocytes/macrophages in disease. *Clin Dev Immunol.* **582352**, 1-15.
- Cai X, Yin Y, Li N, Zhu D, Zhang J, Zhang CY, Zen K.** (2012). Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J Mol Cell Biol.* **4**, 341-343.
- Cannon GJ, Swanson A.** (1992). Effect of the Gc-derived macrophage-activating factor precursor (preGcMAF) on phagocytic activation of mouse peritoneal macrophages. *J Cell Sci.* **101**, 907-913.
- Chan ED, Riches DW.** (2001). IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**, 441-450.

- Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ.** (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 1213-1217.
- Dominici S, Schiavano GF, Magnani M, Buondelmonte C, Celeste AG, Brandi G.** (2012). Involvement of Stat1 in the phagocytosis of *M. avium*. *Clinical and developmental immunology.* **652683**, 1-9.
- Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, Suzuki S, Suzuki N, Modlin RL, Yeh WC, Lane TF, Cheng G.** (2004). Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med.* **199**, 81-90.
- Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan GC.** (2016). MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock.* **46**, 122-131.
- Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S.** (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, **7**, 61-98.
- Foster LJ, De Hoog CL, Mann M.** (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**, 5813-5818.
- Gordon S.** (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* **3**, 23-35.
- Gritzmacher CA, Robertson MW, Liu FT.** (1988). IgE-binding protein. Subcellular location and gene expression in many murine tissues and cells. *J. Immunol.* **141**, 2801-2806.
- Hamilton JA.** (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* **8**, 533-544.
- Holowka D, Sheets ED, Baird B.** (2000). Interactions between Fc(epsilon)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* **113**, 1009-1019.
- Hooda J, Cadinu D, Alam MM, Shah A, Cao TM, Sullivan LA.** (2013). Enhanced heme function and mitochondrial respiration promote the progression of lung cancer cells. *PLoS One.* **8**, e63402.
- Inui T, Amitani H, Kubo K, Kuchiike D, Uto Y, Nishikata T, Mette M.** (2016). Case Report: A Non-small Cell Lung Cancer Patient Treated with GcMAF, Sonodynamic Therapy and Tumor Treating Fields. *Anticancer Res.* **36**, 3767-3770.
- Inui T, Katsuura G, Kubo K, Kuchiike D, Chenery L, Uto Y, Nishikata T, Mette M.** (2016). Case Report: GcMAF Treatment in a Patient with Multiple Sclerosis. *Anticancer Res.* **36**, 3771-3774.
- Inui T, Makita K, Miura H, Matsuda A, Kuchiike D, Kubo K, Mette M, Uto Y, Nishikata T, Hori H, Sakamoto N.** (2014). Case Report: A Breast Cancer Patient Treated with GcMAF, Sonodynamic Therapy and Hormone Therapy. *Anticancer Res.* **34**, 4589-4593.

- Ishikawa M, Inoue T, Inui T, Kuchiike D, Kubo K, Uto Y, Nishikata T.** (2014). A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line. *Anticancer Res.* **34**, 4577-4581.
- Ishizuka M, Abe F, Sano Y, Takahashi K, Inoue K, Nakajima M, Kohda T, Komatsu N, Ogura S, Tanaka T.** (2011). Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy, *Int Immunopharmacol*, **11**, 358–365.
- Itoh H, Matsuo H, Kitamura N, Yamamoto S, Higuchi T, Takematsu H, Kamikubo Y, Kondo T, Yamashita K, Sasada M, Takaori-Kondo A, Adachi S.** (2015). Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains, *J Leukoc Biol.* **98**, 107–117.
- Kang J, Park KH, Kim JJ, Jo EK, Han MK, Kim UH.** (2012). The role of CD38 in Fcγ receptor (FcγR)-mediated phagocytosis in murine macrophages. *J Biol Chem.* **287**, 14502-14514.
- Kant AM, De P, Peng X, Yi T, Rawlings DJ, Kim JS, Durden DL.** (2002). SHP-1 regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. *Blood.* **100**, 1852-9.
- Keller P, Simons K.** (1998). Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol.* **140**, 1357-1367.
- Knodler LA, Celli J, Finlay BB.** (2001). Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 578-588.
- Kong L, Ge BX.** (2008). MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Res.* **18**, 745-755.
- Kuchiike D, Uto Y, Mukai H, Ishiyama N, Abe C, Tanaka D, Kawai T, Kubo K, Mette M, Inui T, Endo Y, Hori H.** (2013). Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and in vivo antitumor activity. *Anticancer Res.* **33**, 2881-2885.
- Lee S, Nguyen MT.** (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.* **15**, 51-57.
- Lemonidis K, Werno MW, Greaves J, Diez-Ardanuy C, Sanchez-Perez MC, Salaun C, Thomson DM, Chamberlain LH.** (2015). The zDHHC family of S-acyltransferases. *Biochem Soc Trans.* **43**, 217-221.
- Li C, Levin M, Kaplan DL.** (2016). Bioelectric modulation of macrophage polarization. *Sci Rep.* **6**, 21044.
- Li F, Yang Y, Zhu X, Huang L, Xu J.** (2015). Macrophage Polarization Modulates Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Physiol Biochem.* **37**, 1279–1288.
- Lili Y, Yi W, Ji Y, Yue S, Weimin S, Ming L.** (2012). Global activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes

- correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo. *PLoS ONE*. **7**, e37513.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL.** (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta*. **60**, 263-273.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M.** (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677-686.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A.** (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* **177**, 7303-7311.
- Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S.** (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. **121**, e57-69.
- McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC.** (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*. **96**, 3231-3240.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166-6173.
- Minamiyama Y, Ishikawa M, Shibata T, Tsuji G, Nishikata T, Takemura S, Ichihashi M.** (2018). Effects of platinum and palladium nanocolloid on macrophage polarization in relevance to repigmentation of vitiligo. *J Cutan Immunol Allergy*. **1**, 139-146
- Mohamad D, Suppian R, Mohd NN.** (2014). Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing MSP-1C of Plasmodium falciparum on LPS- or LPS+IFN- γ -stimulated J774A.1 cells. *Hum Vaccin Immunother.* **10**, 1880–1891.
- Montane J, Bischoff L, Soukhatcheva G, Dai DL, Hardenberg G, Levings MK, Orban PC, Kieffer TJ, Tan R, Verchere CB.** (2011). Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J Clin Invest.* **121**, 3024–3028.
- Mukherjee A, Arnaud L, Cooper JA.** (2003). Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem.* **278**, 40806-40814.

- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA.** (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. **41**, 14-20.
- Nabi IR, Le PU.** (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* **61**, 673-677.
- Nabi IR, Shankar J, Dennis JW.** (2015). The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci.* **128**, 2213-2219.
- Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S.** (2007). Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **282**, 1374-1383.
- Oh P, Schnitzer JE.** (2001). Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. Gq binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas Gi and Gs target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell.* **12**, 685-698.
- Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T.** (2011). Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in drosophila. *Developmental cell.* **20**, 315-328.
- Okamoto H, Horii K, Fujisawa A, Yamamoto Y.** (2012). Oxidative deterioration of platinum nanoparticle and its prevention by palladium. *Exp Dermatol.* **21**, 5-7.
- Ota U, Hara T, Nakagawa H, Tsuru E, Tsuda M, Kamiya A, Kuroda Y, Kitajima Y, Koda A, Ishizuka M, Fukuhara H, Inoue K, Shuin T, Nakajima M, Tanaka T.** (2017). 5-aminolevulinic acid combined with ferrous ion reduces adiposity and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice via enhancing mitochondrial function. *BMC Pharmacol and Toxicol.* **18**, 7.
- Patti ME, Corvera S.** (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* **31**, 364-395.
- Patti ME, De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J, Arnould T.** (2009). Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol*, **175**, 927-939.
- Paulick MG, Bertozzi CR.** (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry.* **47**, 6991-7000.
- Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR.** (2009). Microbiology: Application Based Approach. *New York: McGraw-Hill Education.*
- Poole ICL, van den Wijngaard RMJGJ, Westerhof W, Das PK.** (1996). Presence of T cells and

- macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance. *Am J Pathol.* **148**, 1219–1228.
- Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, Mantovani A, Sozzani S.** (2005). Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol.* **174**, 6561-5652.
- Rebres RA, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ.** (2001). Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells. *J Biol Chem.* **276**, 7672-7680.
- Roff CF, Wang JL.** (1983). Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 10657-10663.
- Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, Vacca C, Bistoni F, Fioretti MC, Grohmann U, Segal BH, Puccetti P.** (2008). Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease, *Nature.* **451**, 211–215.
- Saitoh S, Okano S, Nohara H, Nakano H, Shirasawa N, Naito A, Yamamoto M, Kelly VP, Takahashi K, Tanaka T, Nakajima M, Nakajima O.** (2018). 5-aminolevulinic acid (ALA) deficiency causes impaired glucose tolerance and insulin resistance coincident with an attenuation of mitochondrial function in aged mice. *PLoS ONE.* **13**, e0189593.
- Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT.** (2003). Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* **112**, 389-397.
- Saravanan C, Liu FT, Gipson IK, Panjwani N.** (2009). Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *J Cell Sci.* **122**, 3684-3693.
- Schiavano FG, Dominici S, Rinaldi L, Cangiano MA, Brandi G, Magnani M.** (2016). Modulation of stat-1 in human macrophages infected with different species of intracellular pathogenic bacteria. *Journal of immunology research.* **5086928**, 1-8.
- Self-Fordham JB, Naqvi AR, Uttamani JR, Kulkarni V, Nares S.** (2017). MicroRNA: Dynamic Regulators of Macrophage Polarization and Plasticity. *Front Immunol.* **8**, 1062.
- Severs NJ.** (1988). Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci.* **90**, 341-348.

- Sieweke MH, Allen JE.** (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. **342**, 1242974.
- Simons K, Ikonen E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569-72.
- Simons K, Sampaio JL.** (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **3**, a004697.
- Simons K, Toomre D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **1**, 31-39.
- Singer SJ, Nicolson GL.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. **175**, 720-731.
- Steinman RM, Cohn ZA.** (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. **137**, 1142-1162.
- Sugihara H, Ishimoto T, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Komohara Y, Takeya M, Baba H.** (2013). Identification of miR-30e* regulation of Bmi1 expression mediated by tumor-associated macrophages in gastrointestinal cancer. *PLoS One*. **8**, e81839.
- Sugiyama Y, Hiraiwa Y, Hagiya Y, Nakajima M, Tanaka T, Ogura S.** (2018). 5-Aminolevulinic acid regulates the immune response in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *BMC Immunol*. **19**, 41.
- Suzuki KGN, Kasai RS, Hirose KM, Nemoto YL, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara TK, Kusumi A.** (2012). Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat. Chem. Biol*. **8**, 774-783.
- Swanson JA.** (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 639-649.
- Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Takemura M, Kanemura T, Ichihashi M, Furue M.** (2017). Palladium and platinum nanoparticles activate AHR and NRF2 in human keratinocytes: implication in vitiligo therapy. *J Invest Dermatol*. **137**, 1582–1588.
- Uto Y, Yamamoto S, Takeuchi R, Nagasawa Y, Hirota K, Terada H, Onizuka S, Nakata E, Hori H.** (2011). *Anticancer Res.*, **31**, 2489-92
- Yamamoto N, Homma S, Millman I.** (1991). Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. Role of vitamin D3-binding protein (group specific component, Gc) in lysophospholipid activation of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. **47**, 273-280.
- Yamamoto N, Naraparaju VR, Asbell SO.** (1996). Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res*. **56**, 2827-2831.

- Yamamoto N, Naraparaju VR.** (1997). Immunotherapy of BALB/c mice bearing Ehrlich ascites tumor with vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor. *Cancer Res.* **57**, 2187-2192.
- Yamamoto N, Suyama H, Nakazato H, Yamamoto N and Koga Y.** (2008). Immunotherapy of metastatic colorectal cancer with vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor, GcMAF. *Cancer Immunol Immunother.* **57**, 1007-1016.
- Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi S, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenborg PA, Garcia NV, Miyasaka M, Ishikawa O, Kanai Y, Komori T, Matozaki T.** (2017). Anti-SIRPα antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight.* **2**, e89140.
- Yang RY, Hsu DK, Liu FT.** (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 6737-6742.
- Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T.** (2010). Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity.* **33**, 326-339.
- Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HR.** (2002). Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.* **277**, 15819-15827.
- Zhu F, Zhou Y, Jiang C, Zhang X.** (2015). Role of JAK-STAT signaling in maturation of phagosomes containing staphylococcus aureus. *Scientific reports.* **5**, 14854.

業績リスト

公表論文（副論文）リスト

1. **Ishikawa, M.**, Inoue, T., Inui, T., Kuchiike, D., Kubo, K., Uto, Y. and Nishikata, T. (2014). A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line. *Anticancer Res.* **34**, 4577-4582.
2. Inoue, T., **Ishikawa, M.**, Sumiya, Y., Kohda, H., Inui, T., Kuchiike, D., Kubo, K., Uto, Y. and Nishikata, T. (2015). Establishment of a macrophage-activating factor (MAF) assay system using human- monocytic cell line, THP-1. *Anticancer Res.* **35**, 4441-4446.
3. **Ishikawa, M.**, Mashiba, R., Kawakatsu, K., Tran, N. K. and Nishikata, T. (2018). A high-throughput quantitative assay system for macrophage phagocytic activity. *Macrophage*. **5**, e1627.
4. Mashiba, R., **Ishikawa, M.**, Sumiya, Y., Kawakatsu, K., Tran N.K.a and Nishikata T. (2018). Phagocytic activation of macrophages with serum MAF depends on engulfment efficiency and not migratory activity. *Anticancer Res.* **38**, 4295-4298.
5. **Ishikawa, M.**, Mashiba, R., Kawakatsu, K., Nakagawa, H., Kitajima, Y., Ishizuka, M. and Nishikata, T. (2018). Anti-inflammatory effect of 5-Aminolevulinic acid on macrophage in vitro. *ALA-porphyrin science*. **7**, 3-11.
6. Minamiyama, Y., **Ishikawa, M.**, Shibata, T., Tsuji, G., Nishikata, T., Takemura, S. and Ichihashi, M. (2018). Effects of platinum and palladium nanocolloid on macrophage polarization in relevance to repigmentation of vitiligo. *J Cutan Immunol Allergy*. **1**, 1-8.

参考論文リスト

1. Nishikata, T., **Ishikawa, M.**, Matsuyama, T., Takamatsu, K., Fukuhara, T. and Konishi, Y. (2013). Primary culture of breast cancer: A model system for epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Anticancer Res.* **33**, 2867-2874.
2. **Ishikawa, M.**, Inoue, T., Shirai, T., Takamatsu, K., Kunihiro, S., Ishii, H. and Nishikata, T. (2014). Simultaneous expression of cancer stem cell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells. *Cancers*. **6**, 1570-1578.
3. Sumiya, Y., **Ishikawa, M.**, Inoue, T., Inui, T., Kuchiike, D., Kubo, K., Uto, Y. and Nishikata, T.

(2015). Macrophage activation mechanisms in human monocytic cell line-derived macrophages. *Anticancer Res.* **35**, 4447-4452.

4. Sumiya, Y., Inoue, T., **Ishikawa, M.**, Inui, T., Kuchiike, D., Kubo, K., Uto, Y. and Nishikata, T. (2016). Macrophages exhibit a large repertoire of activation states via multiple mechanisms of macrophage-activating factors. *Anticancer Res.* **36**, 3619-23.

学会発表リスト（国際学会）

1. **Ishikawa M**, Kouda H, Inoue T, Inui T, Kuchiike D, Kubo K, Uto Y, Nishikata T. Establishment and comparison of novel assay systems for activation of macrophage using two different types of human monocytic cell line. 9th international conference of anticancer research, Greece (October, 2014)
2. **Ishikawa M**, Inoue T, Sumiya Y, Inui T, Kuchiike D, Kubo K, Uto Y, Nishikata T. Establishment and comparison of assay systems for macrophage activation using pH-sensitive beads and HeLa cells. International conference of cancer immunotherapy and macrophages, Tokyo (July, 2015)
3. **Ishikawa M**, Inoue T, Sumiya Y, Inui T, Kuchiike D, Kubo K, Uto Y, Nishikata T Establishment of quantitative assay system for evaluating phagocytic activity using human monocyte cell lines THP-1 and U937. Cell symposia; 100 years of phagocytes, Italy (September, 2016)
4. **Ishikawa M**, Mashiba R, Kawakatsu K, Tran NK, Iwasaki T, Nishikata T Studies on the serum-MAF mediated phagocytic activation mechanism in macrophage. The 25th international symposium on molecular cell biology of macrophages, Osaka (June, 2018)

学会発表リスト（国内学会）

1. **Ishikawa M**, Inoue T, Nishikata T Studies of the GcMAF mediated activation mechanism in the U937 derived macrophage. 第 47 回日本発生生物学会, 名古屋 (2014 年 5 月)
2. **石川真実**, pH 感受性ビーズと HeLa 細胞を用いたマクロファージ活性化アッセイ法の確立およびその比較, 第 6 回生命機能研究会, 大阪 (2015 年 9 月)
3. **石川真実**, 角谷祐, 井上貴裕, 乾利夫, 口池大輔, 久保健太郎, 宇都義浩, 西方敬人, 細胞を標的としたマクロファージ活性化アッセイ法の確立, 第 19 回バイオ治療法研究会学術集会, 東京 (2015 年 12 月)
4. **Ishikawa M**, Nishikata T, The relationship between phagocytic activity and Gc-protein derived

macrophage-activating factor (GcMAF)-mediated macrophage activation, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 沖縄 (2016 年 12 月)

5. 石川 真実, 真柴 里歩, 川勝 薫平, トラン ゴック キェト, 岩崎 哲史, 西方 敬人, serum MAF によるマクロファージ活性化メカニズムの解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 兵庫 (2017 年 12 月)
6. 石川 真実, 真柴 里歩, 川勝 薫平, トラン ゴック キェト, 岩崎 哲史, 西方 敬人, serum-MAF によるマクロファージ貪食能上昇メカニズムの解析, 第 22 回バイオ治療法研究会学術集会, 東京 (2018 年 12 月)

その他

1. 2014 年 10 月 内藤記念若手研究者海外派遣助成金(秋期)
2. 2015 年 9 月 第 6 回生命機能研究会 口頭発表賞
3. 2016 年 4 月～ 日本学術振興会特別研究員 (DC1; 2019 年 3 月まで)
4. 2016 年 4 月～ 特別研究員奨励費 (2019 年 3 月まで)
5. 2018 年 7 月 教育振興募金特待生