

「マクロファージを取り囲む組織内微小環境変化の解析」

神戸薬科大学薬学部 衛生化学研究室

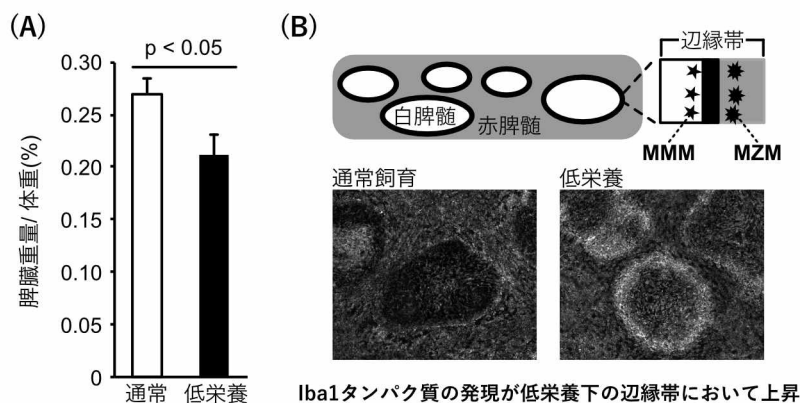
中山 啓

1 研究の背景と目的

低栄養は身体に様々な影響を与える。国際連合食糧農業機関の調査では、全世界の約10%の人々が低栄養にあると推計されている（The State of Food Security and Nutrition in the World 2022）。日本においても、高齢者の16.8%が低栄養にあるとされている（令和元年 国民健康・栄養調査）。そのため、低栄養による身体への影響の緩和は、現代社会における重要な課題である。

低栄養による影響の1つとして免疫機能の低下が挙げられる。低栄養による免疫機能の低下は、リンパ組織の変化に起因する。例えば、T細胞の分化・成熟を担う一次リンパ組織である胸腺が低栄養によって退縮することが知られている。し

図1.低栄養による脾臓の退縮と
辺縁帯でのマクロファージ活性化



かしながら、低栄養下における胸腺以外のリンパ組織の変化は、ほとんど明らかにされていない。申請者は、新たに、免疫応答を担う二次リンパ組織である脾臓が低栄養において退縮することを見出した（図1A, Nakayama *et al.*, Life Sciences, 2022）。脾臓は、循環系と免疫系の接点であり、赤血球の品質管理を担う「赤脾髄」、B細胞の成熟を担う「白脾髄」、血液中の物質を監視する「辺縁帯」という領域を持つ。それぞれの領域には、機能の異なるマクロファージが存在する。辺縁帯に存在するマクロファージは、血液中の抗原を認識し、抗原提示やサイトカイン産生を介して、脾臓内の他の細胞に作用する（Karlsson *et al.*, JEM, 2003; Backer *et al.*, PNAS, 2010）。申請者のこれまでの研究によって、低栄養による脾臓退縮では、辺縁帯に存在するマクロファージが活性化し、中心的な役割を担うことも明らかとなった（図1B）。しかし、低栄養によるマクロファージの活性化がどのような分子レベルの変化を誘導するかという課題が残されていたため、その解明を本研究の目的とした。

2 研究方法・研究内容

低栄養による脾臓退縮に伴う分子レベルでの変化の全体像を捉えるために、遺伝子発現を網羅的に解析した。さらに、網羅的遺伝子発現解析から推定された分子レベルでの変化について組織免疫染色によって解析した。

脾臓退縮に伴う遺伝子発現変動の網羅的な解析

本研究では、9週齢のICR雄マウスを用いた。48時間絶食させたマウスを低栄養群と

し、通常飼育したマウス (通常飼育群) と比較した。通常飼育群と低栄養群の脾臓から全 RNA をセパズール RNA I (ナカライテスク) を用いて抽出した。得られた全 RNA より TruSeq standard mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いてライブラリーを作製した。その後、NovaSeq6000 (Illumina) を用いた次世代シーケンスによってトランスクリプトーム解析を行なった。さらに、トランスクリプトーム解析より得られたデータに対して IPA (Qiagen) を用いてパスウェイ解析を行い、遺伝子発現変化を誘導した上流のシグナル伝達経路を推定した。

免疫染色による脾臓退縮に伴う分子レベルでの変化の観察

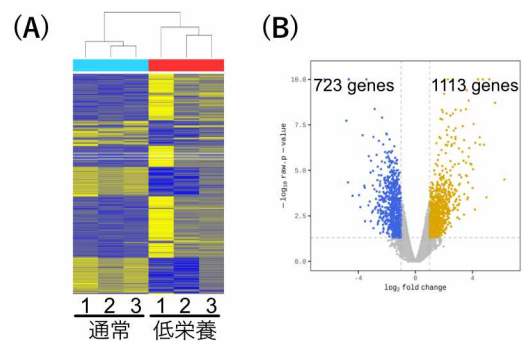
退縮した脾臓において、細胞外マトリックスが影響を受けている可能性やその上流因子である TGF- β /Smad シグナル伝達経路が活性化される可能性について免疫染色法によって検討した。通常飼育群と低栄養群の脾臓よりクリオスタットを用いて組織切片を作製し、抗 I 型コラーゲン抗体・抗 V 型コラーゲン抗体・抗ラミニン抗体・抗リン酸化 Smad2 抗体を用いて免疫染色を行なった。免疫染色した組織切片は、蛍光顕微鏡 (Zeiss, Axio) を用いて観察した。

3 研究成果

(結果 1) 脾臓退縮に伴い細胞外マトリックス関連遺伝子の発現が上昇する

まず、脾臓退縮を司る分子機構の実体を解明するために、通常飼育群と低栄養群の脾臓より mRNA を抽出し、次世代シーケンスによって網羅的な遺伝子発現解析を行なった。発現プロファイルの類似性をもとにクラスター解析を行なったところ、通常飼育群と低栄養群は異なるクラスターへと分類された (図 2 A)。通常飼育群と低栄養群を比較した結果、発現量が 4 倍以上に有意に増加する 1113 遺伝子、1/4 以下に有意に発現が減少する 723 遺伝子が同定された (図 2 B)。次に、低栄養によって発現が上昇する遺伝子の特徴を明らかにするためにジーンオンロジー解析を行なった。ジーンオンロジー解析の結果、発現量が増加する遺伝子には、「細胞間接着」「サイトカイン」に加えて「細胞外マトリックス」に関連する遺伝子が濃縮されていることがわかった。さらに、上記の遺伝子発現変化を誘導する分子機構を推定するために、IPA を用いたパスウェイ解析を行なった。その結果、線維症の発症につながるシグナル経路が脾臓退縮時に活性化されている可能性が示唆された。線維症は、ダメージを受けた組織が修復する際に I 型コラーゲンなどの膠原線維が過剰に蓄積し組織機能を低下させる疾患である。以上の結果より、脾臓では低栄養により細胞外マトリックスが影響を受ける可能性が浮上した。

図2.低栄養による脾臓退縮に伴う遺伝子発現変化



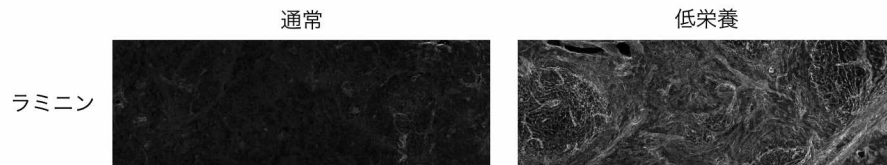
いることがわかった。さらに、上記の遺伝子発現変化を誘導する分子機構を推定するために、IPA を用いたパスウェイ解析を行なった。その結果、線維症の発症につながるシグナル経路が脾臓退縮時に活性化されている可能性が示唆された。線維症は、ダメージを受けた組織が修復する際に I 型コラーゲンなどの膠原線維が過剰に蓄積し組織機能を低下させる疾患である。以上の結果より、脾臓では低栄養により細胞外マトリックスが影響を受ける可能性が浮上した。

(結果 2) 脾臓退縮に伴い細胞外マトリックスタンパク質が蓄積する

線維症では、コラーゲンやラミニンといった細胞外マトリックスタンパク質の蓄積が観察される。そこで、脾臓退縮時に細胞外マトリックスの変化、特に線維症様病態を呈する可能性を検証するために、通常飼育群と低栄養群の脾臓より組織切片を作製し、免疫染色を行なった。その結果、絶食群では通常飼育群と比較して、I 型コラーゲン・V 型コラー

ゲン・ラミニンといった細胞外マトリックスタンパク質が蓄積しているという観察像が得られた（図3）。

図3.低栄養によって脾臓では細胞外マトリックスタンパク質が蓄積する



（結果3）脾臓退縮に伴い TGF- β /Smad シグナル経路が活性化する

線維症の発症を誘導する主要な因子として、サイトカインの一つである TGF- β が知られている (Biernacka *et al.*, Growth Factors, 2011)。TGF- β が細胞表面の受容体に結合すると、細胞内シグナル伝達経路が活性化し、転写因子 Smad2/Smad3 のリン酸化と核内移行を誘導する。その結果、コラーゲンやラミニンといった細胞外マトリックスタンパク質の産生や分泌が亢進し、線維症に至る。そこで、低栄養による脾臓退縮時に、TGF- β /Smad シグナル伝達経路が活性化するかを検証した。そのために、リン酸化型 Smad2 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、リン酸化 Smad2 のシグナル強度が低栄養によって上昇することが明らかになった。この観察結果より、低栄養によって、脾臓内で TGF- β /Smad シグナル伝達経路が活性化することが示された。

考察及び今後の課題

本研究で得られた上記の成果とこれまでの研究成果をあわせて、「低栄養によって脾臓辺縁帯に存在するマクロファージが活性化されて TGF- β を分泌し、コラーゲンやラミニンといった細胞外マトリックスタンパク質が蓄積し、組織が線維化する」というモデルを新たに立てることができた。TGF- β を分泌する細胞にマクロファージが含まれるという先行研究の成果は、本仮説を支持するが、低栄養によって血液中の TGF- β 濃度が増加することで繊維化が亢進する可能性も残されている。そこで、辺縁帯に存在するマクロファージでの TGF- β 産生が低栄養によって増加するか検証する。また、TGF- β /Smad シグナル伝達経路の活性化が脾臓の線維化を誘導するか検証するため、TGF- β /Smad シグナル伝達経路を阻害し、その影響について調べる。

線維症は、組織機能に大きく影響する。脾臓は、循環系と免疫系のインターフェースであり、免疫応答の場である。これまでに、低栄養によって脾臓でのイムノグロブリン IgG の産生が亢進することを見出している。本研究により新たに見出された低栄養による脾臓の線維化が、脾臓での免疫応答にどのように影響するかという新たな課題が浮上した。そこで、脾臓の繊維化が免疫機能に与える影響について今後解析を進めたい。

4 生活や産業への貢献および波及効果

低栄養刺激による免疫組織の変化については、主に胸腺（一次リンパ組織：免疫細胞の産生組織）に焦点が当てられて解析が進められてきた。一方、申請者は、脾臓（二次リンパ組織：免疫応答を担う組織）も、今まで見過ごされてきたが、低栄養刺激によって影響を受けることを見出した。そのため、申請者自身の研究成果を基盤とする本研究は、低栄養による免疫機能低下を、免疫応答の変化という新たな視点から理解するという特色を持

つ。特に、本研究で見出された低栄養による脾臓の線維化は、低栄養によるリンパ組織での新たな分子変化であり、低栄養による感染リスクの上昇を予防するための標的となることが期待される。

線維症に対する有効な治療法は、依然として確立されていない。肺線維症においてもマクロファージの関与が報告されていることから、マクロファージは線維症治療の有力な標的となりうる (Fukushimama *et al.*, Immunity, 2020)。そのため、本研究で得られた成果をもとに研究を進めることで、線維症の治療につながる知識基盤を得ることが期待される。