

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」  
平成 22 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告
----------------

石井 優

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任教授

次世代の生体イメージングによる慢性炎症マクロファージの機能的解明

## §1. 研究実施体制

(1)「石井」グループ

① 研究代表者： 石井 優 （大阪大学免疫学フロンティア研究センター、特任教授）

② 研究項目

- ・炎症細胞の分化・形質変化イメージング系, 光操作系の開発
- ・光活性化 GFP を用いたマクロファージスクリーニング系の開発
- ・慢性炎症マクロファージの生体イメージング系の確立

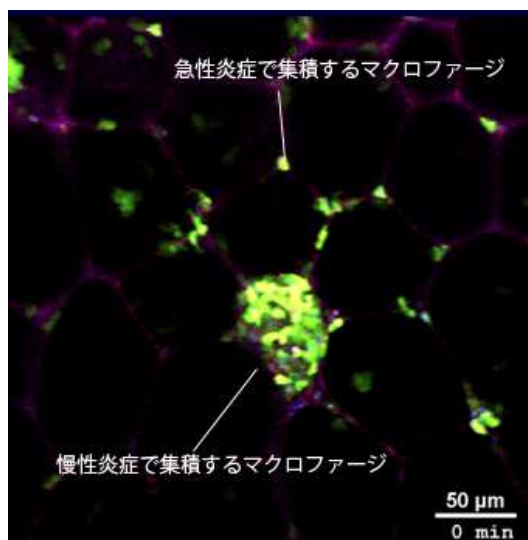
## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本研究では、光学・生物学的な技術開発により次世代の生体イメージング研究技術を確立し、これを駆使して肥満脂肪組織や動脈硬化血管での慢性炎症における単球・マクロファージ系細胞の動態および機能分化の時空間制御を実体的に解明し、これらによって誘導される炎症の慢性化機序の本質を解明することを目指している。このため、本計画研究の初年度である平成 23 年度(※平成 22 年度採択課題ではあるが平成 23 年度 4 月より研究開始)では、研究遂行のための基盤技術の開発や、以下の予備的解析を中心に遂行した。

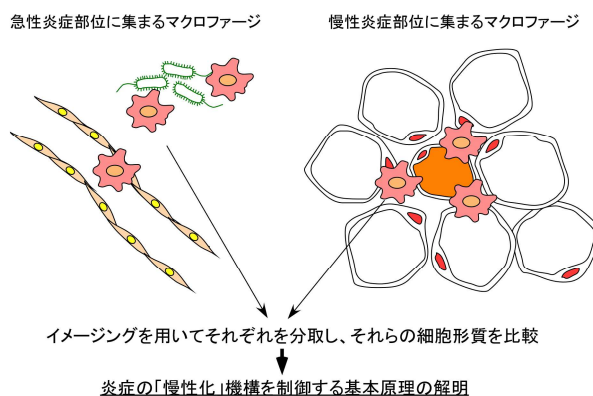
慢性炎症部位に集積するマクロファージの機能を解析するために、独自の蛍光標識トランスジェニックラインの作製を行った。現在いくつかのラインについて有効な BAC-tg ラインを得ており、平成 24 年度前半には必要なマウスラインの作製・評価を完了する予定としている。また、特定の部位に集積する細胞をマーキングして分取するために、Rosa26 locus に光刺激で活性化可能な photo-activatable GFP (PA-GFP) を発現させるノックインマウスについても作製を行い、組み換え体の作製をほぼ終了した。本マーキングマウスについては平成 24 年度中盤には完成の予定である。また、本研究では、慢性炎症マクロファージを単に可視化して解析するだけではなく、炎症組織内での単球の動態・形質変化を光刺激によって操作する新しい方法論の開発を同時に行っているが、平成 23 年度は植物の光指向性分子 phototropin の機能部位である LOV ドメインを利用して、光刺激により転写を制御する新しいプローブの作製を行った。

これらのリポーター・マーキングツールを用いて、慢性炎症マクロファージの機能・動態を可視化して解析するための次世代生体イメージング観察系の最適化については平成 23 年度に完了した。本研究遂行のための独自の多光子励起顕微鏡システムの導入を行い、この基本システムの立ち上げ、および上記研究のためのカスタマイズについて完了した。さらには、この観察系を活用して、肥満脂肪組織における慢性炎症組織の高分解能生体イメージング系の確立を行った。健常マウスおよび高脂肪負荷肥満マウスにおける内臓脂肪組織におけるマクロファージの動態を高い時空間解像度で可視化することに成功し、慢性炎症および急性炎症マクロファージの細胞動態について詳細な解析を行った【図1】。平成 24 年度はこれらの基礎的検討結果をもとに、慢性炎症マクロファージの分子実体の解明を目指す【概念図参照】。



**【図1】慢性炎症と急性炎症のマクロファージ**  
本研究のカスタマイズした多光子励起顕微鏡システムで観察した炎症性 M1 マクロファージ。高脂肪負荷によりアポトーシスが誘導された脂肪細胞周囲に集まる(crown-like structure)慢性炎症マクロファージ(下方)、および LPS 刺激により速やかに集まる急性炎症マクロファージ(上方)を個別に可視化し、それぞれの動態・機能特性を解析する観察系を確立した。

また、本研究代表者はこれまでに、骨組織などの生体イメージングを通じて、免疫細胞の生体内動態を解析する研究を行ってきたが、平成 23 年度にもこの研究を続けており、関節リウマチなどでの慢性炎症局所における破骨細胞活性化・骨破壊の作動機序の解明(文献1、および論文投稿中)、単球系前駆細胞の生体内動態の解明(同じく論文投稿中)、免疫細胞動態を制御する SIP の濃度制御因子の同定(文献2)などの研究成果を挙げている。これらの成果も、本研究課題である慢性炎症マクロファージの動態制御解明において重要な知見であり、平成 24 年度以降に統合していく計画としている。



全5年(平成 23~27 年)計画である本研究の初年度である平成 23 年度には、基本イメージング系の確立、予備的解析、および慢性炎症マクロファージを可視化・同定するためのリポーターマウスおよびマーキングマウスの作製、などの基盤的技術の開発に注力した。各種ツールについては平成 24 年度の前半~中旬には作製が完了する見込みであり、24 年度の後半に向けて、これらの基盤技術とツールを活用して、慢性炎症マクロファージの実体的解明を行い、これらのマクロファージが急性炎症部位に集積するマクロファージと如何に異なるか、またそれらが各組織での炎症の慢性化に如何に関わっているかについての分子基盤を解明する。さらに平成 25 年度以降には、これら进行操作することにより炎症の慢性化を制御する新たな治療法の開発に向けた検討を行う。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Toshiyuki Kowada, Junichi Kikuta, Atsuko Kubo, Masaru Ishii, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi. "In vivo fluorescence imaging of bone-resorbing osteoclasts." *Journal of American Chemical Society*, vol. 33, pp. 17772-17776, 2011 (DOI: 10.1021/ja2064582)
2. Shigetomo Fukuhara, Szandor Simmons, Shunsuke Kawamura, Asuka Inoue, Yasuko Orba, Takeshi Tokudome, Yuji Sunden, Yuji Arai, Kazumasa Moriwaki, Junji Ishida, Akiyoshi Uemura, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Akiyoshi Fukamizu, Masanori Hirashima, Hirofumi Sawa, Junken Aoki, Masaru Ishii, Naoki Mochizuki. "The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice." *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, pp. 1416-1426, 2012 (DOI:10.1172/JCI60746).
3. Hisako Kayama, Yoshiyasu Ueda, Yukihisa Sawa, Seong Gyu Jeon, Ji Su Ma, Ryu Okumura, Atsuko Kubo, Masaru Ishii, Taku Okazaki, Masaaki Murakami, Masahiro Yamamoto, Hideo Yagita, Kiyoshi Takeda. "Intestinal CX3C chemokine receptor 1<sup>high</sup> (CX3CR1<sup>high</sup>) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis" *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, vol. 109, no. 13, pp. 5010-5015, 2012 (DOI: 10.1073/pnas.1114931109).

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)