

「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

H24 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)

本研究は、次世代の光学技術と最新の医学・生物学の知識を融合させた学際的なアプローチにより、画期的な慢性炎症研究を目指すものである。光学・生物学的な要素技術開発による次世代の生体イメージング研究技術の確立(項目A:次世代イメージング基盤技術開発)と、これを駆使した慢性炎症のモデル系としての肥満脂肪組織における単球・マクロファージ機能の時空間制御、およびそれらによる炎症の慢性化機序を解明(項目B:慢性炎症探索研究)の2つ大きなテーマについて、それぞれ協調的に研究を遂行しているが、本計画研究の2年目である平成24年度(※平成22年度採択課題ではあるが平成23年より研究開始)では、以下の研究を行った。

### 項目A:次世代イメージング基盤技術開発

本項目では、慢性炎症で集積するマクロファージの機能解析のために、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ている。平成23年度よりいくつかのラインを作成したが、FACSなどでは解析ができるものの、生体イメージングで解析できるに十分な蛍光シグナルをもったラインの作成に難渋していたが、平成24年度に新たに共同研究で作成を開始したラインについては十分な有用性が期待されており、平成25年度前半には利用可能となる。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っており、こちらも順調に進行している。特に、全身に PA-GFP を発現させるリポーターマウスについてはすでに個体が存在し、これからマクロファージのみを分取・染色し、養子移入した野生型マウスの脂肪組織において動態観察と GFP マーキングを行う基礎的技術開発についてはほぼ完了した。また、PA-GFP だけではなく、光刺激によって色調が変化するリポーターマウスを利用して、生体内でのマクロファージを追跡する技術を確立した 4)。

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(遺伝子発現を光操作する)新しい方法論の開発を同時に行っているが、前年度より行ってきた植物の光指向性分子を利用した開発に加えて、別の光感受性分子やケージド化合物を利用した新たな開発を開始した。一方で本研究では、蛍光生体イメージングの技術開発にも取り組み、実験系を改良することで、これまでのように細胞の動きを追跡するだけではなく、生きた個体内の生きた細胞内で、特定の分子動態を解析する方法論を開発した。これにより、活性化するマクロファージ内でのプロトンポンプの局在の時空間的变化を可視化することができ、種々の活性化状態でのマクロファージの機能様式を分子レベルで理解することが可能となった 5)。

### 項目B:慢性炎症探索研究

本研究者が有する蛍光生体イメージング技術を活用して、脂肪組織の慢性炎症過程でのマクロファージ動態について詳細な解析を行った。これまでからも、高脂肪食を負荷して肥満を誘導す

ると脂肪組織に慢性炎症が誘導されることは知られており、アポトーシスを起こした細胞の周囲にマクロファージが取り巻いて **Crown-like structure (CLS)** が形成される。本研究で負荷後の時系列を詳細に検討した結果、興味深いことに、高脂肪食負荷の早期より、マクロファージの動態が大きく変化していることが明らかになった。さらに、網羅的解析により、この動態に関与する分子の同定に成功した。この分子機構は、炎症の初期過程から慢性化につながる過程において重要な役割を果たすと考えられる。平成25年度以降は、この分子の発現・作動メカニズムの詳細を解析していくと同時に、この分子を標的として、「初期の段階で作用して、脂肪組織での慢性炎症化を未然に防ぐ」新しい治療の開発を目指して研究を進める。

上記に加えて、項目 A で得られたマーキングマウスを活用して、慢性炎症での CLS 形成に関与する種々の分子の探索を本格的に開始する。今後の研究展開の中で、上記の分子と合わせて、慢性化の各ステップにおいてどのような分子群が時空間的に作用していくかを具体的かつ統合的に解明していく計画としている。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Manato Kotani, Junichi Kikuta, Frederick Klauschen, Toshinao Chino, Yasuhiro Kobayashi, Hisataka Yasuda, Katsuto Tamai, Atsushi Miyawaki, Osami Kanagawa, Michio Tomura, Masaru Ishii\*. “Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques.” *Journal of Immunology*, vol.190, no. 2, pp. 605-612, 2013 (DOI: 10.4049/jimmunol.1201345).
2. Junichi Kikuta, Yoh Wada, Toshiyuki Kowada, Ze Wang, Ge-Hong Sun-Wada, Issei Nishiyama, Shin Mizukami, Nobuhiko Maiya, Hisataka Yasuda, Atsushi Kumanogoh, Kazuya Kikuchi, Ronald N. Germain, Masaru Ishii\*. “Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function.” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, pp. 866–873, 2013 (DOI: pii: 65054. 10.1172/JCI65054).
3. Masashi Ueno, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, Toshihide Yamashita. “Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development.” *Nature Neuroscience*, published online, 2013 (DOI: 10.1038/nn.3358).
4. Junichi Kikuta, Shunsuke Kawamura, Fumie Okiji, Mai Shirazaki, Sadoaki Sakai, Hitoshi Saito, Masaru Ishii\* (2013) “Sphingosine1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D.” *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, published online, 2013 (DOI: 10.1073/pnas.1218799110).

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)