

マクロファージ・マーカー遺伝子のツメガエル相同遺伝子の同定

Identification of *Xenopus* orthologs for macrophage marker genes

生命科学専攻 柳澤マリア

[背景と目的]

マクロファージは、病原菌などの異物を排除する炎症反応に寄与する、自然免疫の主要なプレーヤーとして知られている。しかし、近年、抗炎症性サイトカインを放出することで炎症反応に対し抑制的にはたらく、抗炎症性のマクロファージが存在することも報告されてきている。また、抗炎症性マクロファージと似た性質を持つが、由来が異なる組織常在性のマクロファージも存在し、これらの抗炎症性マクロファージ細胞群が組織の発生および再生に関与していることが示唆されている。例えば、クロドロン酸処理によりマクロファージを枯渇させることで、マウスでは肝臓再生が、サンショウウオでは四肢再生能が低下することが報告されている。しかしマクロファージが組織再生に関与する仕組みはよくわかっていない。

再生時におけるマクロファージの動態を調査するには、組織再生能の低い哺乳類より、もともと再生能が高い両生類を利用することが望ましい。しかし、両生類における抗炎症性マクロファージおよび組織常在性マクロファージの存在や、その役割については不明な点が多い。これは、そもそも両生類マクロファージの同定が進んでいないため、その分布や性質についての知見が明らかでないことに起因する。そこで、本研究では、ツメガエルのマクロファージ関連遺伝子を探索し、これらの発現を調査することでマクロファージを同定するためのマーカーとしての有用性を調査した。

[結果]

・哺乳類相同遺伝子の探索

哺乳類の抗炎症性マクロファージや組織常在性マクロファージでは、単球由来細胞に共通に発現しているコロニー刺激因子1受容体 (colony stimulating factor-1 receptor; *csf1r*) や、M2様マクロファージで発現している *mrc1* (*cd206*), *arg1* などのマーカー遺伝子が知られている。そこで、複数の遺伝子について、アフリカツメガエルおよびネッタイツメガエルに存在するか、その探索をおこなった。ヒトおよびマウスの遺伝子を query とした blast による相同性探索や、ゲノムブラウザによるシンテニーの確認をおこない、これらの遺伝子のツメガエル相同遺伝子 (オーソログ) を同定した。*csf1r*, *mrc1*, *arg1* について、ヒトとツメガエルのアミノ酸配列相同性を比較したところ、それぞれ、41%, 53%, 69%であった。また、それぞれ近隣の遺伝子とその並び順であるシンテニーが一致していたことより、これらが *csf1r*, *mrc1*, *arg1* 相同遺伝子であると判断した。

・組織における組織常在性マクロファージマーカー候補遺伝子の発現解析

哺乳類では組織常在性マクロファージがさまざまな組織に存在していることが報告されている。両生類においても、マクロファージが豊富な組織ではこれらの遺伝子が発

現していることが期待されるので、ネッタイツメガエルの各組織を用いて、遺伝子発現の有無を調査した。観察した、肺、血液、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、皮膚、腎臓、脳、腸、卵巣のうち、卵巣以外で全ての組織で *csf1r* の発現が確認された。比較的発現量が多い組織として、血液、心臓、肝臓、脾臓、腎臓があげられる。また、*mrc1* は血液、心臓、肝臓、膵臓で、*arg1* は血液、肝臓、脾臓、腎臓で比較的高い発現が見られた。

・蛍光フローサイトメトリー (FACS) による組織常在性マクロファージ画分の分取

マーカー遺伝子を同定するためには、マクロファージ画分を分取し、この細胞群で発現している遺伝子を調査することが望ましい。そこで、FACS を用いてネッタイツメガエル成体臓器からの組織常在性マクロファージの単離を試みた。*csf1r*、および、*mrc1*、*arg1* を発現していた肝臓を使用した。肝臓を分散後、赤血球およびデブリの除去のため、30%パーコール液および 70%パーコール液を用いて密度勾配遠心法を行い、各画分の遺伝子発現を RT-PCR 法によって調査した。30%パーコール液と 70%パーコール液の界面層で *csf1r* および *mrc1* の発現が確認できたので、この画分をフローサイトメトリーで解析した。界面層画分の細胞を SSC と FSC で展開し、4 つの細胞集団に分けて分取した。各細胞集団におけるマクロファージマーカー遺伝子の発現を調査したところ、*csf1r* のみが発現している分画と *mrc1* と *csf1r* が同時に発現している分画を分離することに成功した。

[考察]

免疫系の遺伝子はウイルスなどのターゲットになりやすいため、哺乳類の間でも配列相同性が比較的低いことが知られている。今回、ツメガエルの *csf1r* について、細胞内のキナーゼドメインが 69%に対して細胞外領域の配列相同性は 24%であり、オーソログであるにも関わらず全体的に低い相同性となったのは、ウイルスなどの外敵からの淘汰圧に起因すると考えられる。

発現パターンは予想通り様々な組織で発現が見られた。特に脾臓では高い発現が見られたが、これは組織常在性のものだけでなく骨髄由来の単球やマクロファージの存在の影響が原因であると考えられる。また心臓で *mrc1* の発現量が多いという結果が出たが、これは以前の報告がなく興味深い。

組織常在性マクロファージの同定について、当初、該当細胞の絶対数が少ない上に赤血球およびデブリの混入が多く、蛍光フローサイトメトリーによる分画が困難であった。しかし、パーコール密度勾配遠心法と Reverse Transcription with Random Displacement Amplification 法を用いて、骨髄由来マクロファージおよび組織常在性マクロファージを含むのではないかとと思われる画分を得ることができた。今後、この分画をさらに詳細にちょうさすることにより、組織常在性マクロファージとそのマーカー遺伝子を同定できると考えられる。