

腎線維化を誘導する

M2 マクロファージの極性化機構の解析

名古屋大学大学院創薬科学研究科

基盤創薬学専攻

細胞生化学分野

篠田 祥希

目次

略語.....	2
要旨.....	3
序論.....	5
研究材料および実験方法.....	7
実験結果.....	12
考察.....	17
参考文献.....	26
謝辞.....	33
図表およびその説明.....	34

略語

ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase
α SMA	Alpha-smooth muscle actin
BMDM	Bone marrow-derived macrophage
BPA	Biotin-pentylamine
CCL22	C-C motif chemokine ligand 22
CKD	Chronic kidney disease
CLEC4A	C-type lectin domain family 4 member A
ECM	Extracellular matrix
F13A1	Coagulation factor XIII A chain
GFP	Green fluorescent protein
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
IL	Interleukin
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetate
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
RUNX2	RUNX family transcription factor 2
SA-POD	Peroxidase-conjugated streptavidin
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TBP	TATA-box binding protein
TGF- β	Transforming growth factor β
TG2	Transglutaminase 2
UUO	Unilateral Ureteral Obstruction

要旨

マクロファージは組織の微小環境の変化に応じて、大きく分けて M1 型と M2 型の 2 種類のサブタイプに極性化し、炎症や感染防御もしくは恒常性の維持に関与する。慢性腎臓病において生じる組織硬化を伴う線維化は M2 マクロファージにより誘導され、腎臓の機能低下と密接に関係する。病態の悪化を抑制するためには線維化の制御が重要であるが、線維化の誘導に関わる M2 マクロファージの極性化機構の詳細は未だ明らかでなく、有効な治療法が存在しない。近年の研究において、M2 マクロファージの誘導機構の解析が進められているものの、ヒトとマウスでは遺伝子発現の変動が異なることから、病態モデルマウスを用いて得られた知見をヒトへ適用することには困難が伴う。Martinez らはトランスクリプトームやプロテオームの相互解析から、ヒトとマウスで唯一共通する M2 マクロファージのマーカーとしてタンパク質架橋化酵素 Transglutaminase 2 (TG2) を見出した。TG2 は哺乳類では全身に発現しており、TG2 によるタンパク質の架橋修飾は様々な生命現象に関わる。マクロファージにおいては死細胞の貪食やサイトカイン分泌、細胞遊走に関わることが過去に報告されているが、M2 極性化における機能は明らかでない。本研究では M2 マクロファージの極性化における TG2 の機能を解明するとともに、マクロファージの TG2 が腎線維化の病態形成に与える影響を検証することを目的とした。

本研究ではまず、一側尿管結紮法 (UUO) により線維化を誘導したマウスを用いて TG2 の発現とマクロファージ誘導の相関性を検証した。蛍光免疫染色の結果から、病変部に存在する一部のマクロファージは TG2 を発現することが分かった。UUO 処置 12 日後の腎臓のマクロファージ浸潤量を調べると、野生型 (WT) と比較して TG2 欠損 (KO) マウスでは顕著に減少していた。このマクロファージのサブタイプをフローサイトメトリーにて解析したところ、 $CD45^+CD11b^+F4/80^{hi}CD206^+Ly6C^{int}$ の M2 マクロファージ集団が有意に減少することが分かった。線維化の病態解析において、TG2KO マウスでは α -smooth muscle actin の発現やコラーゲンの蓄積が WT と比較して有意に減少しており、線維化の抑制が確認された。同様に、TG2 の活性阻害剤を投与した WT マウスにおいても M2 マクロファージの減少と線維化の抑制が見られた。以上の結果から、TG2 は M2 マクロファージの誘導と腎線維化の病態形成を促進することが示唆された。

では、線維化した腎臓で増加する M2 マクロファージはどこから来るのだろうか。全身で GFP を発現する GFP トランスジェニックマウスから骨髄を単離し、WT マウスに移植してその由来を検証したところ、 $CD45^+CD11b^+F4/80^{hi}CD206^+$ M2 マクロファージの 90%以上は骨髄細胞に由来した。この結果を踏まえ、WT と TG2KO マウスの骨髄を入れ替えて腎線維化を誘導したところ、TG2KO マウス由来の骨髄細胞が移植されたマウスでは腎線維化の病態形成が顕著に抑制された。一方、WT マウスの骨髄が移植された TG2KO マウスでは逆に病態が悪化した。さらに、WT マウスの骨髄由来マクロファージ (BMDM) から M2 マクロファージを誘導した後、UUO 処置した TG2KO マウスの腎被膜下に移植したところ、やはり腎線維化の病態は悪化した。一方で TG2KO マウス由来の M2 マクロファージの移植では、腎線維化の病態に影響は見られな

かった。以上の結果から、TG2 を介して誘導される骨髄由来マクロファージが線維化の病態進展に必須であることが証明された。

次に、M2 マクロファージの極性化における TG2 の役割を調べるため、マウスおよびヒト由来マクロファージを Interleukin (IL) -4 処理することにより M2 マクロファージを誘導した。BMDM を TG2 活性阻害剤で処理すると、極性化における M2 マーカーの発現増加が有意に抑制された。また、ヒト単球細胞株 (THP-1) 由来マクロファージにおいても同様に、TG2 の発現抑制や活性阻害は極性化を抑制した。これらの結果から、TG2 の架橋活性にはヒトとマウスに共通した分子機構により M2 マクロファージの極性化を促進する役割があることが示唆された。

TG2 が M2 マクロファージの極性化を誘導する分子機構を解明するため、TG2 の架橋活性に依存して発現が変動する因子をトランスクリプトーム解析により網羅的に探索した。IL-4 処理下で TG2 依存的に 55 個の遺伝子が発現増加し、35 個が減少することを見出したが、中でも Arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15) の発現は IL-4 処理による増加率が最も大きく、TG2 の活性阻害により顕著に減少した。ALOX15 による M2 マクロファージの極性化制御について検証するため、ALOX15 の活性阻害剤を処理したところ、M2 マーカーの発現は抑制された。一方で ALOX15 の代謝物である 15S-hydroxy-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoic acid (15(S)-HETE) を処理すると M2 マーカーの発現が増加した。これらの結果から、TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して M2 極性化を促進することが示唆された。また、線維化した腎臓での ALOX15 発現マクロファージの細胞数は TG2KO マウスにおいて顕著に減少したことから、ALOX15 を介した TG2 の M2 マクロファージ極性化の誘導は腎線維化モデルマウスでも再現された。

以上のように本研究では、TG2 が ALOX15 の発現誘導と M2 マクロファージの極性化制御を介して線維化の病態形成を促進することを明らかにした。これまで、腎線維化において TG2 は細胞外基質の架橋による安定化や TGF- β の活性化を介して病態進展に関わることが報告されていた。これに対し、本研究では M2 マクロファージの細胞内の TG2 が極性化を促進し、線維化の病態進展に関わる新たな知見を見出した。さらに、このような TG2 を介した極性化の制御機構はヒトとマウスで共通する現象であり、腎線維化の病態分子機構の更なる理解や新規治療法開発への貢献が期待される。

序論

慢性腎臓病（Chronic kidney disease: CKD）は肥満や2型糖尿病、高血圧を原因とした腎障害により発症し、世界中で8億4000万人以上、日本でも成人の7人に一人が罹患していることから、新たな国民病として認識されている¹⁻³。CKDは3ヶ月以上にわたる持続的な腎臓の構造異常や機能異常を特徴としており、持続的な腎障害はマクロファージをはじめとする様々な免疫細胞や筋線維芽細胞の過剰な活性化と腎機能不全を誘発する。腎不全に対する有効な治療法は血液透析や腹膜透析、腎移植に限られているため、CKDの治療では腎不全への進行を抑えることが重要となる。腎不全に至る病態の特徴として、尿細管間質の線維化があげられる。線維化は組織にコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリクス（Extracellular matrix: ECM）が蓄積して組織が硬化、正常な機能が失われる疾患である。組織障害における線維化は組織修復に向けたプロセスの一部であるが、慢性炎症においては障害部位の修復が追い付かず、過剰なECMの蓄積が生じた結果、不可逆的な線維化が生じる。線維化の進展は腎不全と密接に関わることから治療法の確立や治療薬の開発が望まれるが、詳細な病態形成機構が未解明であることから、現在のところ効果的な治療法はない。

マクロファージは、組織の微小環境の変化に応じてM1型とM2型の大きく分けて2つのサブタイプに極性化する^{4,5}。M1マクロファージはLipopolysaccharide/Interferon- γ によって活性化され、Interleukin (IL)-1 β やTumor necrosis factor- α を産生して炎症を促進することにより細菌感染防御や死細胞除去を進める。反対にM2マクロファージはIL-4/IL-13により活性化され、Transforming growth factor- β (TGF- β)やIL-10を産生して炎症反応を収束させるとともに、障害を受けた組織の再生や修復を進める。正常状態ではそれぞれのマクロファージが適切なバランスで作用することにより組織の恒常性が保たれているが、CKDのような慢性炎症性疾患においてはM2マクロファージの活性化状態が持続して組織の恒常性が破綻、機能障害が生じる。腎線維化の病態形成もM2マクロファージによって促進されることが知られている。これまでに、一側尿管結紮（Unilateral ureteral obstruction: UUO）による尿細管間質線維化モデルマウスにおいて、マクロファージの除去により線維化の病態形成が抑制されることが報告されている⁶。特にM2マクロファージが産生するTGF- β は上皮間葉転換による筋線維芽細胞の活性化と線維化の病態形成を促進する^{7,8}。また、M2マクロファージはMacrophage-to-myofibroblast transitionによるコラーゲン産生を介して腎線維化の病態進展に関わる⁹⁻¹¹。さらに、近年では線維化特異的に誘導される単球・マクロファージの存在も報告されており¹²、マクロファージを中心とした線維化病態形成機構の解析が重要視されている。しかしながら、ヒトとマウスの細胞表面抗原マーカー等の非類似性の問題から、腎線維化モデルマウスを用いて得たM2マクロファージの特性に関する知見を直接ヒトへ適用するのは困難であり、病態形成の理解や治療法の開発へ応用できないという課題がある。

Martinezらはトランスクリプトームおよびプロテオームの相互解析から、ヒトとマウスで唯一共通して発現するM2マクロファージマーカーとしてタンパク質架橋化酵素 Transglutaminase 2 (TG2)を見出した¹³。TG2はトランスグルタミナーゼ (TGase) ファミリーの一つであり、カ

ルシウムイオン依存的に標的タンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間にイソペプチド結合を形成する翻訳後修飾酵素である (Suppl. Fig. S1) ¹⁴⁻¹⁶。TGase は哺乳類では 8 種類のアイソザイムがあり、各アイソザイムは生体内の異なる部位に存在してアミノ酸の一次配列や二次配列が異なるタンパク質を架橋することにより、血液凝固やアポトーシスなど様々な生命現象に関わる ^{15,17}。TG2 は哺乳類では全身に発現しており、マクロファージにおいてはインテグリン $\beta 1$, $\beta 3$ サブユニットとフィブロネクチンの結合を介して細胞接着や遊走に関わることが報告されている ^{18,19}。また、TG2 の架橋活性は単球からマクロファージへの分化や機能的成熟、死細胞の貪食にも関わる ²⁰⁻²³。しかしながら、腎線維化における M2 マクロファージの誘導に対する役割は未だ明らかでない。一方で、TG2 欠損 (KO) および TG2 活性阻害剤投与マウスでは野生型 (WT) マウスと比較して線維化の病態形成が抑制されることが知られている ²⁴⁻²⁶。そこで、筆者は TG2 は M2 マクロファージの極性化を介して腎線維化の病態形成に関わるのではないかと考えた。本研究では、TG2 による M2 マクロファージの極性化制御機構を明らかにするとともに、TG2 により誘導される M2 マクロファージが腎線維化の病態形成におよぼす影響を評価することにより、腎線維化の病態形成機構の理解を深めることを目的とした。

本論文では、腎線維化モデルマウス、ヒトおよびマウスマクロファージの培養細胞を用いて TG2 が M2 マクロファージの極性化を制御することを見出した。特に、前半に示す腎線維化モデルマウスを用いた解析では、TG2 依存的に誘導される M2 マクロファージが腎線維化の病態形成を促進することを明らかにした。また、後半に示すヒトマクロファージを用いた解析では、細胞内 TG2 が架橋活性を介して Arachidonate 15-lipoxygenase の発現を誘導し、M2 マクロファージの極性化を促進することを明らかにした。TG2 を介した M2 マクロファージの極性化制御はヒトとマウスで共通する現象であり、本研究成果は M2 マクロファージが病態形成に関わる様々な炎症性疾患や組織線維化などの病態理解や新規治療法開発への応用が期待される。

研究材料および実験方法

試薬

試薬は主に富士フイルム和光純薬株式会社の特級品を使用した。蛍光免疫染色、フローサイトメトリー、免疫ブロットティングで用いた一次抗体および蛍光標識二次抗体は Suppl. Table S1 に示す。Anti-TG2 polyclonal antibody は所属研究室にて作製したものをを使用した²⁷。Cystamine は Sigma-Aldrich から、Z-DON および Boc-DON は Zedira から購入した。PD146176 および 15S-hydroxy-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoic acid (15(S)-HETE) は Cayman Chemical より購入した。

動物

C57BL/6J マウスは日本エスエルシー株式会社から購入し、水分や食餌が自由摂取できる状態で飼育した。TG2KO マウスは Dr. Robert M. Graham (Victor Chang Cardiac Research Institute)²⁸ から、GFP トランスジェニック (GFP-Tg) マウスは岡部 勝 教授 (大阪大学)²⁹ から供与いただいた。

腎線維化モデルマウスの作製

腎線維化は Shweke らの報告をもとに、一側尿管結紮法 (UUO) により誘導した²⁴。8-10 週齢の C57BL/6J および TG2KO 雄マウスを 2% イソフルランにて麻酔処理し、左尿管を 2ヶ所結紮した。Sham マウスは左尿管の剥離のみ行い、結紮せずに閉腹した。UUO 処置後のマウスは水分や食餌が自由摂取できる状態で飼育し、記述の日数にて組織を回収した。腎組織は PBS 還流により血液を除去してから回収し、一部は 4% PFA により固定した後、O.C.T. compound (サクラフィンテック) にて凍結包埋した。TG2 の競合阻害剤である Cystamine は UUO 処置 2 日前から経口投与 (1.86 mg/kg/day) した。

骨髄移植実験

ドナーマウスの大腿骨、脛骨、腸骨から 3% FBS in PBS を用いて骨髄細胞を単離し、70 μ m セルストレーナーに通した。溶血剤 (144 mM NH_4Cl , 17 mM Tris-HCl) を加えて溶血処理した後、3% FBS in PBS で wash した。3 \times 10⁶ cells の骨髄細胞を 8.5 Gy のエックス線を照射した 8 週齢雄レシピエントマウスに尾静脈注射により移植した。移植 4 週間後のマウスを UUO 処置して実験に使用した。骨髄置換率は末梢血 CD45 陽性細胞の GFP 陽性率に基づいて算出した。WT および TG2KO マウスの骨髄入れ替え実験においては、エックス線照射後に骨髄移植を行わないコントロールマウスの死亡を確認して骨髄移植モデルマウスの確立を判断した。

腎被膜下細胞移植実験

後述の方法によりマウス骨髄細胞をマクロファージに分化させた。Accumax (Innovative Cell Technologies) を用いて culture dish より細胞を剥離した。チューブに回収した細胞を 1500 rpm, RT, 3 min 遠心した後、20 ng/ml recombinant mouse IL-4 (PeproTech) を含む 5% FBS in RPMI で懸濁、RT, 2 h, Rotate して M2 マクロファージへの極性を誘導した。細胞を 3% FBS in PBS を用いて 3 回 wash した後、細胞数をカウントし、 4.75×10^5 cells/10 μ l となるように細胞を調製した。取得した細胞は TG2KO マウス (UUO Day 9) に移植した。移植は UUO 処置した左腎の被膜下にマイクロシリンジ (伊藤製作所, MS-25) を用いて 4.75×10^5 cells/mouse の細胞をインジェクションすることにより実施した。

フローサイトメトリー

マウス尾静脈血 100 μ l に Suppl. Table S1 で示す抗体を添加し、氷上で 1 h インキュベートした。1 ml の Fixative-Free Lysing Solution (Invitrogen) を加えて RT, in dark, 15 min インキュベートして溶血処理を行い、 $2000 \times g$, 4°C , 10 min 遠心した後上清を取り除いた。沈殿を 1 ml の Fixative-Free Lysing Solution を用いて懸濁し、Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life technologies) を用いて解析した。腎臓はハサミで 1 mm 以下に細断し、1 mg/ml Collagenase と 1.25 U/ μ l の DNase I (タカラバイオ) が入った Hanks' balanced salt solution (HBSS) 中で 37°C , 40 min 反応させた。 $300 \times g$, 4°C , 5 min 遠心して得られた沈殿を 4 mM EDTA in HBSS を用いて懸濁し、 37°C , 40 min 振とうした。 $50 \times g$, 4°C , 5 min 遠心後、上清を新しいチューブに移して氷上で保存した。残った沈殿は 4 mM EDTA, 1 mg/ml Collagenase 含有 HBSS 中で 37°C , 40 min 振とうした。この反応液と氷上保存した細胞を 70 μ m セルストレーナーに通した後、 $300 \times g$, 4°C , 5 min 遠心した。上清を取り除き、1 ml の溶血剤 (144 mM NH_4Cl , 17 mM Tris-HCl) を加えて RT, 3 min 静置し、溶血処理を行った。5 ml の PBS を加えて $300 \times g$, 4°C , 5 min 遠心し、上清を取り除いた。沈殿を 0.1% BSA in PBS で懸濁し、 1×10^6 cells/100 μ l の細胞を Suppl. Table S1 に示す抗体を用いて染色した。0.1% BSA in PBS を用いて 2 回 wash した後、0.1% BSA in PBS 1 ml で懸濁し、Attune Acoustic Focusing Cytometer にて解析した。

蛍光免疫染色

厚さ 5 μ m の凍結切片を 4% PFA in PBS を用いて固定した。0.1% Triton X-100 in PBS を用いて膜透過処理を行った後、100 μ g/ml Non-immune goat IgG in 2.5% BSA in PBS を用いてブロッキングを行った。TG2, F4/80, α -SMA, ALOX15 抗体と反応させ、シグナルを蛍光標識二次抗体により検出した。Negative control は一次抗体と同一の動物種由来の Non-immune IgG (NI-IgG) を等量加えて反応させた。観察は BZ-9000 microscope (キーエンス) にて行い、取得した画像からのシグナル定量は Fiji image software を用いた³⁰。

ピクロシリウスレッド染色

線維化に伴い腎臓に蓄積するコラーゲンの検出はピクロシリウスレッド染色にて行った。厚さ 10 μm の組織切片をホルマリンと氷酢酸を加えた水飽和ピクリン酸にて固定した後、0.05% Sirius red in 水飽和ピクリン酸と室温で 1 時間反応させ、BZ-9000 microscope (キーエンス)にて観察した。コラーゲンの沈着を示す赤色のシグナルは Fiji image software を用いて定量した³⁰。なお、黄色に染色された領域は細胞質を示す。

L929-conditioned medium の取得

付着細胞用ディッシュに L929 線維芽細胞を播種して 10% FBS in RPMI 培地で 7 日間培養した。回収した培養上清はフィルター滅菌を行い、 -80°C で保存した。

マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) の培養

BMDM の培養は戸田らが報告した方法を参考に行った³¹。6-8 週齢の C57BL/6J または TG2KO 雄マウスの大腿骨・脛骨から骨髄細胞を採取し、10% L929-conditioned medium + 10% FBS in RPMI 中で 6 日間培養してマクロファージへと分化させた。細胞を実験用ディッシュにまきなおして無血清 RPMI で一晩インキュベートし、20 ng/ml recombinant mouse IL-4 (PeproTech) を含む 5% FBS in RPMI に培地交換をして M2 マクロファージへの極性を誘導した。

ヒトマクロファージの培養

ヒトマクロファージはヒト単球白血病細胞株 THP-1 から取得した。3.5 cm dish に 3×10^5 cells 播種し、150 nM Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA; AdipoGen Life Sciences) を含む 10% FBS in RPMI で 24 h 分化誘導を行った。Starvation を行った後、20 ng/ml recombinant human IL-4 (PeproTech) を含む 5% FBS in RPMI に培地交換して M2 マクロファージの極性を誘導した。TG2 のノックダウンは siRNA (sense 5'-CCCUGAUCGUUGGGCUGAATT-3', antisense 5'-UUCAGCCCAACGAUCAGGGTT-3') (Sigma-Aldrich) を用いた。また、Negative control には MISSION siRNA universal negative control #1 (SIC-001)を用いた。

Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

培養細胞からの total RNA の回収は Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク) を用いて行った。cDNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて調製した。Real-time PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて、LightCycler96 (Roche Diagnostics) により実施した。PCR に用いたプライマーセットは Suppl. Table S2 に示す。また、反応は 95°C , 3 min を 1 サイクル、 95°C , 15 sec, 58°C , 15 sec, 72°C 30 sec を 50 サイクル、 95°C , 15 sec, 58°C , 15 sec, 98°C , 15 sec を 1 サイクルという条件で行った。

イムノブロットティング

培養細胞からのタンパク質抽出は Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% NP-40, 1 mM NaF, Phosphatase inhibitor and Protease inhibitor cocktail) を用いて行った。回収した溶液は超音波破碎し、12,000 rpm, 4°C, 10 min 遠心して取得した上清を解析に用いた。細胞内タンパク質分画抽出は Minute Cytoplasmic and Nuclear Extraction kit for cells (Invent Biotechnologies) を用いて行った。タンパク質濃度は BCA assay (タカラバイオ) により定量した。電気泳動用サンプルは、タンパク抽出液と SDS-containing buffer を混合し、95°Cで 5 min boil することにより調製した。サンプルを Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)にて分画し、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。5% skim milk または 5% BSA in 0.1% tween containing TBS buffer (TBST)を用いてブロッキングを行った後、Suppl. Table S1 に示す一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。二次抗体として Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse または anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) と室温で 1.5 h 反応させた後、化学発光法による検出を行った。検出は FUSION (VILBER) を用いて行った。また、バンド定量は Fiji image software を用いて行った³⁰。

TG2 架橋活性の検出

Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1% NP-40 and Protease inhibitor cocktail) を用いて培養細胞からタンパク質を抽出し、BCA assay (タカラバイオ) を用いてタンパク質濃度を測定した。タンパク質 25 µg を 100 µM biotin-pentylamine (BPA), 5 mM CaCl₂ and 1 mM DTT を含む反応液中で 37°C, 15 min インキュベートした。反応後は final 20 mM となるように EDTA を加えて架橋反応を停止させた。活性検出の Negative control として、反応液に予め 20 mM EDTA を加えて架橋反応が生じないようにしたサンプルを用いた。電気泳動用サンプルは反応液と SDS-containing buffer を混合し、95°Cで 3 min boil することにより調製した。サンプルは SDS-PAGE にて分画し、PVDF 膜に転写した。5% skim milk in TBST を用いてブロッキングを行った後、peroxidase-conjugated streptavidin (SA-POD)と室温で 1.5 h 反応させ、化学発光法により BPA 修飾されたタンパク質を検出した。

次世代シーケンス

THP-1 由来マクロファージから tissue total RNA mini kit (チヨダサイエンス) を用いて total RNA を抽出した。Quality check を実施した後、total RNA をトランスクリプトーム解析サービスへ委託した (Filgen)。その後の手順は下記の通りである。まず mRNA を oligo(dT)ビーズを用いて濃縮し、rRNA を除去した。次に fragmentation buffer を添加して mRNA をランダムに断片化し、random hexamer primer を用いて cDNA を合成した。さらに、second-strand synthesis buffer (Illumina), dNTP, RNase H, DNA polymerase I を用いて第二鎖 cDNA を合成した。末端修復、ライゲーション、シーケンスアダプターの付加、サイズセレクション、PCR による濃縮を行って二本鎖 cDNA ライブラリーを作製した。シーケンスは NovaSeq6000 (Illumina) を用いて行い、取得した配列データは RNA-Seq Alignment App on Basespace (Illumina) を用いてヒトゲノム (hg38) にマッピングした。得られた実験結果は Gene Expression Omnibus の公共データベースサーバー

にアップロードした (GSE222284; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。

各群間での遺伝子発現の比較は Perseus software (version 1.6.14.0)を用いて行った。各群 3 連のサンプルで Read count 50 以上の遺伝子 38,552 個について、FDR < 0.01 の基準で発現変動遺伝子 (Differential expressed genes; DEGs) を選出した。IL-4 処理と Vehicle 処理で発現が 2 倍以上変動、かつ IL-4 処理と IL-4+Z-DON 処理で発現が 1.5 倍以上変動した遺伝子は 90 個あり、TG2 の活性依存的に発現が増加する因子は 55 個、発現が減少する因子は 35 個であった (Suppl. Tables S3 and S4)。ヒートマップおよび階層クラスタリングは Morpheus を用いて作成した。

統計検定

定量データは 3 連以上のデータの平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計的有意性は Student's *t*-test または one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test を用いて評価し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test は R をベースとした統計ソフトである EZR を用いて行った³²。

実験結果

TG2KO マウスでは腎線維化に伴うマクロファージ浸潤が抑制される

はじめに、腎線維化モデルマウスにおける TG2 の発現と腎臓へのマクロファージ浸潤の相関を検証した。蛍光免疫染色により TG2 とマウスマクロファージマーカーの F4/80 の発現を調べたところ、TG2 の発現は WT マウスの UUO Day 3 から増加し、Day 12 にかけて尿細管間質で強く発現が見られた (Fig. 1A)。F4/80 の発現は Day 7 で最も強く、Day 12 では減少傾向にあった。また、一部で TG2 と F4/80 が共局在していたことから、線維化において腎臓に誘導されるマクロファージの一部は TG2 を発現することが示された (Fig. 1B)。F4/80 positive area を定量した結果、UUO Day 7 では WT と TG2KO マウス間で大きな差はないものの、UUO Day 12 では TG2KO マウスにおける positive area は WT マウスよりも有意に低下していた (Fig. 1C)。これらの結果から、TG2KO マウスでは UUO 後期におけるマクロファージ浸潤が抑制されることが分かった。

TG2 は腎線維化にともなう M2 マクロファージの誘導を促進する

TG2KO 腎線維化モデルマウスで減少したマクロファージのサブタイプを特定するため、UUO Day 12 の腎臓についてフローサイトメトリーを用いた解析を行った。解析した全細胞から CD45 陽性細胞をゲートし (Fig. 2A)、CD11b-F4/80 plot を作成したところ、CD45⁺CD11b⁺F4/80^{low} cells (R1 = M1 マクロファージ) と CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi} cells (R2 = M2 マクロファージ) の 2 つの細胞集団を確認した (Fig. 2B) ³³。M2 マクロファージマーカーの CD206 陽性細胞をバックゲートによりマゼンタでプロットしたところ、R2 の細胞集団が CD206 陽性 M2 マクロファージであることが分かった (Figs. 2C and 2D)。各集団の細胞数を調べたところ、R1 は WT マウスと TG2KO マウス間で有意な差がなかったが、R2 は TG2KO マウスで減少していた (Figs. 2B and 2E)。さらに、CD45 陽性細胞を CD11b-Ly6C plot を用いて分画したところ、CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{hi} (R3), Ly6C^{int} (R4), Ly6C^{low} (R5) の 3 つの細胞集団を確認した (Fig. 2F)。CD206 陽性 M2 マクロファージは R4 と R5 の画分に存在しているが (Fig. 2G)、各集団の細胞数を調べたところ、R4 画分の細胞が WT マウスと比較して TG2KO マウスで減少していることが分かった (Fig. 2H)。これらの結果から、TG2 は腎線維化の病態形成において CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺Ly6C^{int} M2 マクロファージの誘導に関与することが示唆された。また、腎線維化の病態形成について、コラーゲンの産生に関わる筋線維芽細胞のマーカーである Alpha-smooth muscle actin (α SMA) の発現を指標に評価したところ、WT マウスと比較して TG2KO マウスでは UUO 処置による発現増加が抑制されることが分かった (Fig. 2I)。また、組織でのコラーゲン蓄積量をピクロシリウスレッド染色にて評価したところ、TG2KO マウスではコラーゲンの蓄積が少なく、病態形成が抑制されていた (Fig. 2J)。線維化の病態形成は M2 マクロファージによって促進されることから、TG2KO マウスでは CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺Ly6C^{int} M2 マクロファージの腎臓への誘導が減少したために線維化の病態形成が抑制されたと考えられた。

TG2 依存的に誘導される骨髄由来の M2 マクロファージが腎線維化の病態進展に関わる

慢性腎障害において腎臓で増加するマクロファージには、骨髄もしくは組織常在性のマクロファージに由来する 2 種類が考えられる。Qian Yang らは骨髄由来の Ly6C⁺ macrophage が腎線維化を促進することを報告しているが³⁴、一方で F4/80^{hi} resident macrophage が腎線維化の進展に関与する³⁵ という報告もある。TG2KO マウスの UUO モデルにおいて減少が見られたマクロファージがどこに由来し、線維化の病態形成にどのように関わるか調べるために骨髄移植を用いた解析を行った。致死量のエックス線を照射した C57BL/6J マウスに対して GFP-Tg マウスから採取した骨髄細胞を尾静脈注射により移植した。移植 4 週間後のマウスを UUO 処置し、UUO Day 0, 3, 7, 12 のマウスから採取した細胞の GFP 発現の有無をフローサイトメトリーにより解析した (Fig. 3A)。はじめに実験モデルマウスの骨髄置換率を調べるため、末梢血における GFP 陽性細胞の割合を調べた。回収した血液サンプルから CD45 陽性細胞をゲートし、GFP の発現をヒストグラムにより解析した結果、GFP-Tg マウス由来の骨髄を移植した全てのサンプルで 98%以上の細胞が GFP 陽性細胞であったことから、骨髄移植マウスの作製に成功していることが分かった (Suppl. Figs. S2A and S2B)。続いて線維化に伴い腎臓で増加する M2 マクロファージの GFP 発現について解析した。CD45 陽性細胞のうち、CD206 陽性細胞を CD11b-F4/80 plot にバックゲートした。CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺ M2 マクロファージの細胞数は UUO Day 3 から Day 7 にかけて大きく増加しており、Day 7 と 12 は同程度であった。UUO Day 7 および Day 12 でみられる M2 マクロファージの約 95%が GFP 陽性であり、UUO により誘導される M2 マクロファージのほとんどが骨髄由来であることが分かった (Figs. 3B and 3C)。

TG2KO マウスでは M2 マクロファージの誘導と尿細管間質の線維化が抑制されていたことから、骨髄由来の M2 マクロファージが線維化の病態形成を進めることが筆者の結果からも示唆された。これを検証するため、WT と TG2KO マウスの骨髄を入れ替えた UUO モデルマウスを作製し、腎線維化の病態形成を評価した (Fig. 3D)。UUO Day 14 の病態を α SMA の蛍光免疫染色とピクロシリウスレッド染色にて評価すると、レシピエントが WT マウスの場合、TG2KO マウス由来の骨髄を持つマウスでは WT マウス由来の骨髄を持つマウスと比較して病態形成が抑制された (Figs. 3E, 3G upper column; Figs. 3F, 3H lanes 3 vs. 4)。一方で、レシピエントが TG2KO マウスの場合、WT マウス骨髄細胞の移植により線維化の病態は悪化した (Figs. 3E, 3G lower column; Figs. 3F, 3H lanes 5 vs. 6)。レシピエントが WT, TG2KO マウスどちらであっても TG2KO 骨髄細胞を持つマウスにおいて病態形成が有意に抑制されたことから、TG2 依存的に誘導される骨髄由来の CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺ M2 マクロファージが腎線維化の病態形成を促進することが示唆された。

TG2 の架橋活性はマウス M2 マクロファージの極性を促進する

TG2KO 腎線維化モデルマウスでは M2 マクロファージが減少していたことから、マクロファージの TG2 には極性を制御する役割があるのではないかと考えた。これを検証するため、マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) を IL-4 で処理して M2 マクロファージに極性を誘導する実験を行った。この際、TG2 の活性阻害剤である Cystamine や Z-DON を加えて極性を誘導すると、TG2 およびマウス M2 マクロファージマーカーである CD206, Arginase (Arg)-1, Transferrin receptor (TFR) の mRNA の発現増加が抑制された (Figs. 4A and 4B)。同様の変動はタンパク質発現においても確認された (Figs. 4C, 4D, Suppl. Figs. S3 and S4)。以上の結果から、TG2 は架橋活性を介してマウス M2 マクロファージの極性を誘導することが示唆された。

TG2 依存的に極性を誘導する M2 マクロファージは腎線維化の病態進展に関わる

TG2 の活性依存的に極性を誘導する骨髄由来 M2 マクロファージの病態形成能を評価するため、WT または TG2KO マウス由来の BMDM を IL-4 で処理し、UUO 処置した TG2KO マウスの腎被膜下に移植した (Fig. 5A)。 α SMA の発現とコラーゲン蓄積量をもとに病態評価を行ったところ、WT マウス由来 BMDM を移植した群では TG2KO マウスに Vehicle を移植した群と比較して病態増悪が見られた (Figs. 5B and 5C lanes 2 vs. 3)。特に、 α SMA の発現は Vehicle を移植した WT マウスより高く、コラーゲンの沈着は同程度にまで増加していた (Figs. 5B and 5C lanes 1 vs. 3)。一方で、TG2KO マウス由来 BMDM を移植した群では Vehicle 移植群と病態に差は見られなかった (Figs. 5B and 5C lanes 2 vs. 4)。これらの結果から、TG2 依存的に極性を誘導する M2 マクロファージが腎線維化の病態形成を促進することが示唆され、骨髄移植実験において TG2KO レシピエントマウスに WT マウス由来骨髄を移植すると線維化が進行する Figs. 3E, 3F, 3G and 3H で示した実験結果とも一致していた。

TG2 活性阻害剤の投与は M2 マクロファージの誘導と線維化の進行を抑制する

TG2 依存的に極性を誘導する M2 マクロファージが腎線維化の病態形成を促進する結果を踏まえ、腎線維化モデルマウスへの Cystamine 投与が M2 マクロファージの誘導と線維化病態形成を抑制するかどうか検証した。UUO 処置 2 日前から 12 日目まで Cystamine を連日経口投与し、フローサイトメトリーを用いて腎臓へ誘導されるマクロファージを解析したところ、CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi} M2 マクロファージ (R2) が Vehicle 投与群と比較して Cystamine 投与群で減少した。一方で、CD45⁺CD11b⁺F4/80^{low} M1 マクロファージ (R1) の誘導に差は見られなかった (Figs. 6A–6C)。また、Ly6C の発現による分画から、Cystamine 投与群では CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺Ly6C^{int} M2 マクロファージ (R4) が減少することが分かった (Figs. 6D and 6E)。一方で、CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺Ly6C^{low} M2 マクロファージ (R5) に有意な変化は見られなかった。これらの結果は TG2KO マウスを用いた実験結果と類似している。 α SMA の発現およびコラーゲンの蓄積は Vehicle 投与群と比較して Cystamine 投与群で有意に少なく、Cystamine 投与により線維化の病態形成が抑制されることが示された (Figs. 6F and 6G)。

細胞内 TG2 の架橋活性はヒト M2 マクロファージの極性化を促進する

TG2 はヒトとマウスにおいて唯一共通する M2 マクロファージマーカーとして知られることから、TG2 を介したヒト M2 マクロファージの極性化制御についても検証を行った。ヒト単球白血病細胞 (THP-1) を PMA 処理によりマクロファージへと分化させ、IL-4 処理により M2 マクロファージに極性化させた。ヒト M2 マクロファージの極性化により、TG2 およびヒト M2 マクロファージマーカー (C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and CD209) の発現が増加した (Fig. 7)。TG2 の発現と極性化の相関を検証したところ、siRNA を用いた TG2 のノックダウン (TG2KD) により M2 マーカーの発現増加は顕著に抑制された (Fig. 7A, Suppl. Fig. S5)。一方で、M1 マクロファージの極性化には影響しなかった (Suppl. Fig. S6)。このことから、TG2 はマウス M2 マクロファージと同様に、ヒト M2 マクロファージの極性化制御にも関与することが示唆された。また、TG2 の活性と極性化制御について検証するため、細胞膜透過型 TG2 活性阻害剤である Cystamine や Z-DON を用いて TG2 の活性阻害を行ったところ、Vehicle 処理群と比較して M2 マーカーの発現は抑制された (Figs. 7B and 7C)。一方で、細胞膜非透過型の活性阻害剤である Boc-DON を用いて処理した場合は M2 マーカーの発現抑制は見られなかった (Fig. 7D)。これらの結果から、ヒトおよびマウス M2 マクロファージの極性化は細胞内 TG2 の架橋活性を介して促進されることが示唆された。

TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して M2 マクロファージの極性化を促進する

TG2KD や活性阻害により M2 マクロファージの極性化が抑制される分子機構を解明するため、TG2 による M2 極性化制御機構の解析を行った。M2 マクロファージの極性化は IL-4 により誘導されるため、TG2 は IL-4 signaling pathway の制御に関わると考えた。STAT6 は IL-4 受容体の活性化によりリン酸化され、二量体を形成して核へと移行、M2 マクロファージの極性化に関わる様々な因子の発現を誘導する最も重要なシグナル伝達因子である。TG2 が STAT6 のリン酸化制御を介して極性化を制御するか調べるため、TG2 活性阻害剤 Z-DON を添加して極性化を誘導した際の STAT6 リン酸化レベルをイムノブロットイングにより評価した。IL-4 刺激により STAT6 のリン酸化レベルは増加したが、IL-4 刺激 24, 48 h における STAT6 リン酸化レベルは Z-DON 処理群と Vehicle 処理群で変わらなかったことから (Fig. 8A and Suppl. Fig. S7)、TG2 による M2 マクロファージの極性化制御は STAT6 のリン酸化制御によるものではないことが分かった。そこで、M2 マクロファージの極性化において TG2 の架橋活性に依存して発現が変動する因子群を次世代シーケンス (NGS) を用いて網羅的に解析することにした。IL-4 処理により発現が 2 倍以上増加、かつ Z-DON 処理により発現が 2/3 以下に抑制された因子として 55 個の遺伝子を見出した (Fig. 8B, Suppl. Table S3)。中でも Arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15) は IL-4 処理による発現増加率が最も大きく、TG2 の活性阻害により発現が 40%減少した (Fig. 8C, Suppl. Table S3)。ALOX15 は M2 マクロファージの極性化に関与することが報告されていたことから^{36,37}、TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して極性化を制御するのではないかと考えた。そこで、ALOX15 と TG2 の発現の相関を検証したところ、siRNA を用いた TG2KD により ALOX15 の発現は顕著に抑制された。また、TG2 の架橋活性との相関を検証したところ、Cystamine や Z-DON 処理により ALOX15 の発現は抑制された (Fig. 8D and Suppl. Fig. S5)。続いて、ALOX15

による M2 マクロファージの極性化制御について検証した。ALOX15 の活性阻害剤である PD146176 を IL-4 と共処理したところ、M2 マクロファージマーカーの発現は減少した (Fig. 8E)。一方で、ALOX15 の代謝産物である 15(S)-HETE の添加は、M2 マクロファージマーカーの発現を増加させた (Fig. 8F)。以上の結果から、TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して M2 マクロファージの極性化を促進していることが示唆された。

腎線維化 TG2KO マウスでは ALOX15 発現マクロファージの誘導が抑制される

最後に、UUO 処置により腎臓で増加するマクロファージにおける ALOX15 の発現を検証した。蛍光免疫染色の結果から、UUO Day 12 の腎臓において ALOX15 を発現する F4/80 陽性マクロファージを確認した (Fig. 9A)。この ALOX15⁺F4/80⁺マクロファージの細胞数をカウントした結果、TG2KO マウスでは WT マウスと比較して 90%程度減少していることが分かった (Fig. 9B)。この変化は 40%程度減少する F4/80⁺マクロファージの細胞数と比較して、より顕著であった。ALOX15 欠損マウスや阻害剤投与マウスでは UUO 処理による腎線維化の病態形成が抑制されることから³⁸、マクロファージの細胞内 TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して M2 マクロファージの極性化を促進、腎線維化の病態進展に関わることが考えられた。

考察

本研究では細胞内の TG2 がその架橋活性を介してヒトおよびマウス M2 マクロファージの極性を促進し、腎線維化の病態進展に関わることを明らかにした。これまでに、TG2 はコラーゲンやフィブロネクチンといった ECM の架橋安定化を介して腎線維化の病態形成を促進することが報告されている³⁹⁻⁴¹。本研究では、腎線維化 TG2KO マウスにおいて CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺Ly6C^{int} M2 マクロファージの誘導が抑制されることを見出しており、TG2 が M2 マクロファージの極性化制御を介して線維化の病態進展に関わるという点で病態分子機構のさらなる理解につながる研究だと考えている。

マクロファージは出生前より広く全身に存在し、自己複製により維持されているため、健常人においては骨髄由来単球の組織浸潤はほとんど見られない⁴²。しかしながら、組織障害により炎症が惹起されると血中を循環する骨髄由来単球が組織に浸潤、マクロファージへと分化して炎症反応に関わる^{43,44}。本研究では、GFP-Tg マウス由来骨髄の移植実験から、UUO により腎臓に誘導される M2 マクロファージのほとんどが骨髄を起源とし、骨髄由来 M2 マクロファージが腎線維化の病態増悪に関わることを明らかにした (Fig. 3)。この結果は Yang らの報告と類似している³⁴。一方で、組織常在性マクロファージの関与については議論が必要である。UUO Day 7, 12 において腎臓に誘導されるマクロファージの 95% は GFP を発現しているが、UUO Day 0 においても M2 マクロファージの 77% が GFP を発現している。正常状態では骨髄由来単球の組織浸潤がほとんどないことから、UUO Day 0 では GFP 陰性の組織常在性マクロファージが存在するのが適当だと考えていた。しかしながら、実際は多くが GFP 陽性細胞であり、エックス線照射を起因とした炎症により組織常在性マクロファージの入れ替わりが生じたと考えている。腎線維化における骨髄由来 M2 マクロファージの寄与については、エックス線照射量の検討や 2 匹のマウスを結合して血液循環を共有させる Parabiosis を用いた解析の検討を試みると、より深い理解が可能となる。蛍光免疫染色の結果から TG2KO マウスの腎臓におけるマクロファージの浸潤量を調べたところ、WT マウスと比較して F4/80 陽性マクロファージが 40% 程度減少していた。減少した要因として、骨髄由来単球の遊走および M2 マクロファージの極性化の抑制の両方が考えられる。なぜなら、骨髄移植実験において WT マウス由来骨髄を移植した TG2KO マウスの病態は、WT マウス由来骨髄を移植した WT マウスほど進行しなかったからだ (Figs. 3D-3H)。腎臓に誘導される M2 マクロファージの 95% が骨髄由来の細胞であれば、病態は WT マウスと同程度に進行すると予想していた。予想と異なる結果となった一つの要因として、組織中の TG2 が欠損しているために単球のフィブロネクチンとの接着が抑制され、腎臓へのマクロファージ浸潤が減少したことが考えられる。このことから腎線維化の病態形成には骨髄由来マクロファージの寄与が大きいことが推察される。一方で、TG2KO マウスにおいてマクロファージの減少が見られたのは UUO 後期 (Day 12) のみであったこと、特に ALOX15⁺F4/80⁺ マクロファージは 90% も減少しており、フローサイトメトリーを用いた解析から TG2KO マウスでは特定の M2 マクロファージのみ減少したことから、TG2 は単球の組織浸潤よりも M2 マ

クロファージの極性化に対して大きく寄与することが考えられる。

WT マウス由来 BMDM を腎被膜下へ移植すると線維化の病態が顕著に悪化したのに対し、TG2KO マウス由来 BMDM の移植は病態に変化を及ぼさなかったことから、TG2 を介した M2 マクロファージの極性化制御は線維化の病態進展と密接に関わることが推察される。これまでは、ECM の架橋修飾による安定化や、TGF- β の活性化による上皮間葉転換の誘導および筋線維芽細胞の活性化が線維化の病態形成における TG2 の主な機能だと考えられてきた^{24,45,46}。これらは細胞外の TG2 による作用であるが、本研究はマクロファージ細胞内の TG2 が線維化に関わるという点で興味深い知見が得られたと考えている。また、腎被膜下への細胞移植実験において、TG2 依存的に極性化する M2 マクロファージが腎線維化の病態形成を強力に進めたことから、TG2 を標的とした M2 マクロファージの極性化制御が腎線維化の治療に有効なのではないかと考えた。本研究では Cystamine 投与による TG2 活性阻害が M2 マクロファージの極性化制御と腎線維化の抑制に有効であることを確認しており、TG2 の活性阻害が腎線維化に対する有効な治療法となりうることを期待できる。ただ、活性阻害剤についてはさらなる研究開発が必要だと考えている。実験で使用した Cystamine は第 1 級アミンとジスルフィド基を含む競合阻害剤であり、グルタミン-リジン残基間の架橋反応においてリジン側のアミン基の反応を競合的に阻害する他、TGase の活性中心のシステイン残基とジスルフィド基が反応することにより、活性ポケットの構造を変化させて架橋活性を阻害する。このため、Cystamine は TGase ファミリーならびにシステイン残基を活性中心に持つプロテアーゼなどの活性も阻害するため、TG2 に特異的な活性阻害剤とは言えない。また、TG2 特異的な活性阻害剤である Z-DON は *in vitro* 実験で広く使用されているものの、生体内での安定性が低いことから *in vivo* 実験では使用できないことが開発元より報告されている。他の TG2 阻害剤として ERW1041E を用いた *in vivo* 実験の報告例はあるものの^{47,48}、半減期が 12 h と短く⁴⁹、浸透圧ポンプなどの継続的に投与できる特別な手法を用いなければ、CKD の治療に用いるのは難しいのではないかと考える。脂質二重膜から構成される小胞、リポソームは化合物の安定性を維持しながら病変部への薬物輸送を行うことができる⁵⁰。また、粒子径の調整や表面修飾を施すことにより、マクロファージを標的とした薬物輸送が可能である⁵¹。本研究では腎臓における CD206 (Mannose receptor) 陽性 M2 マクロファージの極性化を制御することを目的に、Mannose 修飾 Cystamine 封入リポソームの投与実験を試みた (データ非掲載)。Mannose 修飾によって CD206 陽性 M2 マクロファージを標的とした薬物送達が可能になることを期待したが、尾静脈内投与したリポソームのほとんどが肝臓のマクロファージ (クッパー細胞) にトラップされるためか、腎臓における M2 マクロファージの減少や線維化の抑制は見られなかった。TG2 を標的とした M2 マクロファージの制御や線維化制御法の構築には、安定性の高い阻害剤や薬物輸送システムの開発が必要である。

BMDM と THP-1 由来マクロファージを用いた実験結果から、TG2 はヒトとマウスの M2 マクロファージの極性化に重要な役割を持つことが分かった。Martinez らの報告以降¹³、TG2 は M2 マクロファージマーカーとして広く認識されるようになったが、その機能については解析されていない。本研究により TG2 は単なる M2 マクロファージマーカーではなく、ヒトとマウスの M2 マクロファージの極性化を制御する重要な因子であることが明らかとなった。マウス

M2 マクロファージの極性化制御は、腎線維化モデルマウスにおいて誘導される M2 マクロファージの 95%が骨髄由来であったことから BMDM を用いて検証した。WT マウス由来 BMDM を IL-4 と TG2 活性阻害剤を用いて共処理すると M2 マクロファージの極性化が抑制されたことから、TG2 は骨髄由来 M2 マクロファージの極性化を制御することが示唆された。一方で、TG2KO マウス由来 BMDM を用いた解析では、M2 マクロファージマーカーの発現が WT マウス由来 M2 マクロファージより抑制される場合もあれば、変動しない場合もあり、再現性に乏しい結果となった（データ非掲載）。腎線維化 TG2KO マウスを用いたフローサイトメトリーでは M2 マクロファージが再現性良く減少したことから、BMDM は、本来、生体内で誘導される骨髄由来マクロファージの性質を正確に反映していない恐れがある。要因として、TG2KO マウス由来 BMDM では分化段階から TG2 が欠損しているために、マクロファージの極性化や成熟、活性化に TG2 を必要とする特定の集団を骨髄細胞から分化培養することができなかった、あるいは、TG2 欠損による影響を補完するような極性化制御機構が強く働いてしまったと考えられる。また、*in vitro* 実験では限られた因子のみがマクロファージに作用することも *in vivo* 実験の再現が取れなかった原因の一つとして考えている。線維化病態においてはマクロファージだけでなく、好中球や T 細胞など様々な免疫細胞に加え、尿細管上皮細胞や、線維芽細胞、筋線維芽細胞など多様な細胞が相互作用し、多種類のサイトカイン、ケモカインを分泌してサブタイプが微妙に異なる M2 マクロファージの極性化誘導や病態形成に関わる。一方で、*in vitro* 実験において M2 マクロファージの極性化を誘導するのは IL-4 が主であり、*in vivo* 実験と比較すると誘導される細胞の多様性が失われるため、極性化の抑制が見えにくくなっていると考えた。検討実験では培養液中に含まれる細胞外因子が極性化に与える影響も解析した（データ非掲載）。具体的には、産地やロットが異なる血清を用いて BMDM の培養を行ったところ、血清の種類によって M2 マクロファージマーカーの発現レベルに変動が生じた。試用した血清の中には M2 マクロファージマーカーの増加が認められないものもあり、M2 マクロファージの極性化には細胞外因子も重要であることが窺える。では、なぜ、TG2KO マウス由来 BMDM を腎被膜下に移植した際に線維化病態が促進しなかったのだろうか。理由の一つとして、マクロファージ細胞外因子の影響が考えられる。移植した細胞は IL-4 を用いて 2 h のみ処理した未熟な細胞であり、移植後の組織環境中のシグナルを受け、本来誘導されるサブタイプに近い M2 マクロファージに極性化したのではないだろうか。これはフローサイトメトリーを用いて、移植したマクロファージのサブタイプを解析することにより検証可能である。検証実験として GFP-Tg マウス由来 BMDM に IL-4 を 1 h 処理し、腎被膜下に移植した（Suppl. Fig. S8A）。3 日後の腎臓における GFP 陽性マクロファージのサブタイプを解析したところ、驚くことに、GFP 陽性マクロファージは存在せず、代わりに、M1 マクロファージに相当する CD11b⁺F4/80^{low} cells が多量に誘導されていた（Suppl. Figs. S8B–S8D）。このことから、移植した細胞は 3 日後には消失することが推察される。一方で、 α SMA の発現は BMDM の移植により増加したことから（Figs. 5B and 5C）、移植したマクロファージは TGF- β などのサイトカイン産生を介して病態形成に作用する可能性がある。特に、WT マウス由来 BMDM を移植した群における α SMA の発現は WT レシピエントマウスに Vehicle を移植した群よりも高く（Figs. 5B and 5C）、移植したマクロファージは筋線維芽細胞を強力に誘導することがわかる。一方で TG2KO マウス由来の BMDM を移植し

た群における α SMA の発現は Vehicle 投与群と差がないことから、TG2KO マクロファージはサイトカイン産生量が少ないことが推察される。移植したマクロファージが作用したことは明白だが、移植後の挙動に関しては移植早期の解析を検討する必要がある。腎線維化モデルマウスにおいて誘導されるマクロファージの病態形成能については、 $CD45^+ CD11b^+ F4/80^{hi} CD206^+ Ly6C^{int}$ または $CD45^+ CD11b^+ F4/80^{hi} CD206^+ Ly6C^{low} M2$ マクロファージの移植実験を検討した。実験計画として、セルソーターを用いて腎線維化モデルマウスから目的の細胞集団を分取して腎被膜下に移植することを考えたが、実験実施段階で使用できるセルソーターの性能（スピード、正確性、Multiway sorting への対応など）が求める性能と著しく乖離しており、実施は困難であった。TG2 依存的に極性化する M2 マクロファージの病態形成能の評価には最新のセルソーターを用いて実験を行う必要がある。

本実験では、極性化制御には細胞外の TG2 ではなく、細胞内の TG2 が関わるということが分かった。また、トランスクリプトーム解析により、TG2 は架橋活性依存的に ALOX15 の発現を誘導することが分かった。ALOX15 はアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸を酸化して 15(S)-HETE のような酸化脂肪酸を産生する酵素であり、動脈硬化や喘息、がんなど様々な疾患と関連がある^{52,53}。ヒトとマウスのマクロファージでは IL-4/IL-13 刺激により発現が強力に誘導されることが知られている^{36,37}。また、ALOX15 の産生する 15-HETE は PPAR γ のリガンドとして結合し、PPAR γ による M2 マクロファージマーカーの発現誘導を促進して、炎症反応を抑制することが報告されており³⁷、本研究においてもヒトマクロファージへの 15(S)-HETE の添加により M2 マクロファージマーカーの発現が亢進することを確認した (Fig. 8F)。また、腎線維化を誘導した TG2KO マウスの腎臓において ALOX15 陽性マクロファージの細胞数が減少したことから、TG2 が ALOX15 の発現を誘導して M2 マクロファージの極性化を促進するという現象は腎線維化モデルマウスにおいても生じることが推察される。そして、TG2 を介した ALOX15 陽性マクロファージの誘導は線維化の病態進展に関わることが考えられる。Montford らは ALOX15 欠損マウスや活性阻害剤投与マウスにおいて腎臓へのマクロファージ浸潤と線維化の病態形成が抑制されること、ALOX15 トランスジェニックマウスではマクロファージの浸潤増加と病態増悪が見られることを報告している³⁸。また、ALOX15 の線維化促進作用は 5/6 腎摘出術、糖尿病性腎症、敗血症誘導性急性腎不全モデルマウスを用いた研究でも同様に示されている⁵⁴⁻⁵⁶。これらの報告は ALOX15 の全身での欠損や活性阻害による報告であり、マクロファージの ALOX15 に限定した研究ではないが、ALOX15 を介した線維化の病態進展という点で本研究と一致するところがある。このことから、ALOX15 を標的とした線維化制御法の開発も有用であることが期待できる。そこで、TG2 を介して誘導される ALOX15 陽性マクロファージを標的とした線維化治療法の開発に向けた展開方策を考える。ヒト疾患治療法開発への展開として、ヒト培養細胞株で確認した M2 マクロファージの極性化に伴う TG2 および ALOX15 の発現増加が、初代培養細胞であるヒト末梢血単核細胞を分化させて取得したマクロファージにおいても成立するか検証しておきたい。この時、TG2 または ALOX15 の活性阻害剤を IL-4 と共処理することにより、M2 マクロファージの極性化が抑制されることを確認できるとなるとよい。ここで培養するマクロファージと CKD 患者の腎臓で誘導されるマクロファージは異なる性質を示す

ことも有り得るが、今後行う、培養細胞を用いた実験系の構築に活用可能な点で貴重なデータとなる。次に、CKD 患者における TG2 および ALOX15 陽性マクロファージの存在を確認したい。CKD 患者における TG2 の発現であるが、136 個の腎生検サンプルの解析から、糸球体や尿細管、尿細管間質において発現が増加することが報告されている⁵⁷⁻⁵⁹。しかしながら、マクロファージにおける TG2 の発現までは解析されていない。次に、ALOX15 の発現であるが、腎線維化モデルマウスにおける発現や機能について報告されたのはごく最近であり、ヒト CKD 患者における発現や機能の解析に関する報告は見つけれられていない。本研究をヒト疾患治療へ応用するためには、ヒト CKD 患者の腎生検サンプルに対して、TG2, ALOX15、ヒトマクロファージマーカーの CD68 の共染色を行い、腎組織における TG2, ALOX15 陽性マクロファージの存在を確認する必要がある。存在を確認できた際は、CKD の進行度とマクロファージ細胞数に正の相関が成立するかどうか、相関関係を調べたい。本研究では TG2 依存的に誘導される ALOX15 陽性マクロファージが線維化の病態形成を促進すると考えている。腎機能低下が進んだ患者の組織や同一患者の組織でも特に線維化病変部で目的のマクロファージ細胞数が多ければ、病態形成への関与が疑われる。その後は当該マクロファージの性質を解析するため、腎生検サンプルから細胞を単離し、Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq)を行う。単一細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、TG2, ALOX15 を発現する M2 マクロファージの詳細なサブタイプの同定が可能である。また、同 M2 マクロファージ集団に特徴的な遺伝子発現と既報告を照合することにより、線維化病態形成への寄与が推測できる可能性がある。特に、細胞間相互作用ネットワークを解析することにより、M2 マクロファージをはじめとする線維化病変部に存在する細胞同士の連携やリガンド-受容体の組み合わせを予測できる他、病態の進行度に応ずる細胞間相互作用の変化を解析することにより、ヒト腎線維化におけるマクロファージの役割について理解を深めることが可能である。さらに、細胞膜表面マーカーの発現を調べることによりセルソーターを用いた細胞分取が可能となり、患者組織から単離したマクロファージを、線維芽細胞をはじめとした相互作用する細胞と共培養することにより、その活性化を誘導するかどうか検討可能である。TG2, ALOX15 の発現をもとに見出したマクロファージサブタイプが腎線維化の病態進展と密接に関わることが推察された場合は、同マクロファージの活性制御を目的とした治療法の検討に進む。検討段階では培養細胞を用いた実験が望ましい。使用する細胞はヒト細胞株由来、末梢血細胞由来、iPS 細胞由来など多様な細胞種から当該マクロファージの性質を反映するものを選択する。scRNA-seq の解析結果から当該マクロファージの細胞系譜が解析できれば、より正確な表現型を示す細胞が培養可能である。治療標的としては、1) TG2 または ALOX15、2) TG2 および ALOX15 以外のマクロファージ細胞内因子、3) マクロファージ細胞膜表面分子、4) マクロファージが誘導、または相互作用する他の細胞の4つが考えられる。標的 1) は酵素活性阻害によるマクロファージ活性制御機構が本研究により解明されている点にメリットがある。また、TG2KO マウスおよび ALOX15KO マウスに致死的な表現型がないことから、活性阻害剤をマクロファージ特異的に作用させる必要性は低いと考えられる。一方で、両者ともに阻害剤開発に課題がある。TG2 を標的とする場合は、先にも述べたが、生体内で安定的に作用可能な化合物の開発が必要である。TG2 の活性阻害剤である ZED1227 は小腸の炎症を伴う重篤な自己免疫疾患であるセリアック病に対する治療薬として第 II 相試験が実施され、

有効性が実証された^{60,61}。また、ZED1227は線維化を伴う非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) に対する治療薬として第 II 相試験が行われている。本化合物はマクロファージを標的としたものではないが、従来の化合物と比較して安定性と活性阻害効果の高い化合物であることから、マクロファージ制御に対する効果を検証する価値があると考えられる。ALOX15の活性阻害剤について、本研究では PD146176 を使用した。同化合物はアテローム性動脈硬化モデル動物において、病態制御に有効であることが報告されている^{62,63}。一方で、1997年の最初の報告から20年以上が経過しながらも、ALOX15を標的とした承認薬がないことを考えると、ヒト疾患治療に応用可能な安定性および阻害効果の高い化合物がないことが推察される。実際に、MontfordらはUUOモデルマウスに対して、浸透圧ポンプを用いた持続投与を行っている。一方で、2022年にはベイズ推定機械学習モデルを用いた新規活性阻害剤の開発が試みられており⁶⁴、今後の発展が期待される。標的 2) について、scRNA-seqの結果をもとに新たなマクロファージ制御因子を見出した場合は、それを標的とした制御法の構築に取り組むことが可能である。創薬モダリティは低分子医薬、アンチセンス医薬、siRNA 医薬など標的因子に合わせて柔軟に選択すべきである。選出した新規標的因子を標的とした治療薬が既に存在する場合は、マクロファージ細胞内に作用可能であること、標的因子の阻害がマクロファージの病態形成能に影響することを検証する必要があるが、化合物開発や安全性試験の点でアドバンテージが高い。標的 3) について、scRNA-seqの結果から、マクロファージの活性制御に重要な膜表面分子を見出した場合は、それを標的とした活性阻害剤や抗体医薬の開発が有用であると考えられる。特に、抗体医薬は特異性の高さから、線維化誘導型の M2 マクロファージを標的に制御できる可能性がある。近年のがん治療研究では、従来の抗がん剤と併用して、抗 Colony-stimulating factor 1 receptor 抗体や抗 CD40 アゴニスト抗体を用いてがん関連マクロファージの誘導や活性を制御するような治療戦略が研究され、臨床試験が行われている⁶⁵⁻⁶⁹。線維化においても、CKDの原因となる高血圧や糖尿病の治療薬とマクロファージの活性制御を目的とした抗体医薬を併用し、線維化の病態を制御するような治療戦略があっても良いのではないだろうか。しかしながら、CKD治療に対して高価な抗体医薬を用いるのは治療費の高騰という点で課題があり、治療薬使用の時期や治療可能な病態進行度について慎重に検討する必要がある。標的 4) はマクロファージを直接の標的としていないが、細胞間相互作用ネットワークの解析から線維化誘導型の M2 マクロファージと強く関連する細胞が判明すれば、それを標的として治療薬を開発するという考えである。創薬モダリティは標的とする細胞や因子に応じて幅広く検討すべきである。各標的、創薬モダリティの検討を通して、有効性を確認できた場合はリード化合物の最適化、非臨床試験に進む。非臨床試験をクリアした後は臨床試験に進む。臨床試験においては患者の層別化が重要だと考えている。ここで標的としているマクロファージサブタイプがすべての CKD 患者に共通して存在するとは限らず、治療効果が期待できる適応患者層を明確に定めて治療を行うプレジジョンメディシンの実現を目指して開発試験を行うのが望ましい。

本研究では、TG2 は ALOX15 の発現誘導を介して M2 マクロファージの極性化を促進することを報告したが、TG2 による ALOX15 の発現誘導機構は明らかでない。IL-4/IL-13 刺激による ALOX15 の発現は STAT6 によって誘導されることが知られており⁷⁰⁻⁷²、STAT6 のリン酸化阻害により ALOX15 の発現が顕著に抑制されることを確認した (Suppl. Fig. S9)。しかしながら、TG2 の活性阻害は STAT6 のリン酸化に影響しなかったことから (Fig. 8A)、TG2 による ALOX15 の発現制御は STAT6 のリン酸化制御を介さないことが考えられる。では、TG2 はどのようにして ALOX15 の発現を制御するのだろうか。抗糖尿病薬の Phenformin は ALOX15 プロモーターへの STAT6 の結合やヒストン H3 の Lys-9 アセチル化を阻害することにより、IL-4 誘導性 M2 マクロファージの極性化を阻害することが報告されている⁷³。他にも、ALOX15 の発現誘導にはヒストン H3 のトリメチル化された 27 番目のリジン (H3K27me3) の脱メチル化が必須であることが知られており⁷⁴、TG2 はエピジェネティックな機構により ALOX15 の発現を制御する可能性がある。これには核内での TG2 の存在が重要となるが、THP-1 由来マクロファージを核と細胞質に分画してイムノブロッティングを行ったところ、IL-4 刺激により核内における TG2 の発現が増加することが分かった (Suppl. Fig. S10)。核内において TG2 は、ヒストン H3 の 4 番目のリジンがトリメチル化 (H3K4me3) されたヌクレオソームの 5 番目のグルタミンをセロトニン化 (Q5ser) することにより、転写因子 TFIID のリクルートを促進することが報告されている⁷⁵。従って、TG2 はセロトニン化やヒストン H3 のメチル・脱メチル・アセチル化のようなヒストン修飾によるクロマチン構造変化を介して種々の遺伝子発現制御に関わることが考えられる。

ALOX15 以外に M2 マクロファージの極性化制御に関わる因子はあるだろうか。IL-4 処理による発現増加率が 2 番目に大きかった Coagulation factor XIII A chain (F13A1) は血液凝固において重要な役割を持つ TGase ファミリーの一つである。これまでに、IL-4 を用いて誘導したヒト M2 マクロファージで mRNA およびタンパク質発現が増加すること、F13A1 欠損マクロファージでは M2 マクロファージの極性化が抑制されることが報告されている^{76,77}。本研究では TG2 の架橋活性依存的に発現が変動する因子として F13A1 が選出されており、TG2 が TGase の発現を制御して M2 マクロファージの極性化を進めるという点で興味深い。C-type lectin domain family 4 member A (CLEC4A) は樹状細胞マーカーとして有名であり、CD8 α 陰性樹状細胞の活性化を抑制することにより過剰な炎症反応や自己免疫疾患の進行を防ぐ働きをしている⁷⁸。ヒトマクロファージでは IL-4 処理によって発現が増加することが報告されているが⁷⁹、マクロファージにおける機能については解析例が少ない。筆者は、CLEC4A のノックダウンを行った THP-1 由来マクロファージを IL-4 処理したところ、M2 マクロファージマーカーの発現が減少傾向にあることを確認した (Suppl. Fig. S11)。後進の研究として CLEC4A に着目した解析を検討しても面白いかもしれない。RUNX family transcription factor 2 (RUNX2) は NGS 解析にて選出した、IL-4 処理により発現が増加する転写因子の一つである。RUNX2 は骨芽細胞の分化に必須の転写因子として知られる⁸⁰。M2 マクロファージは破骨細胞の骨吸収を抑制するだけでなく、一部のサブタイプは骨形成に寄与することが報告されている^{81,82}。IL-4 処理によって誘導される RUNX2 は M2 マクロファージの極性化を制御して骨代謝に関与する可能性がある。上述した因子は IL-4 処理により発現が増加する因子であるが、今後は発現が減少した因子について

ても解析を進めていきたい。TG2 の架橋活性依存的に発現が減少した因子として 35 個の遺伝子を選出しており (Suppl. Table S4)、これらの因子を過剰発現させた場合の M2 マクロファージマーカーの発現を解析し、極性化との関連を調べたいと考えている。現在、エレクトロポレーションやレンチウイルスを用いた THP-1 への遺伝子導入を試みているが、難航しており、後進の研究でさらなる発展があることを期待する。

M2 マクロファージの極性化における TG2 の直接の標的因子を探索するため、第一級アミンを含む Biotin-pentylamine (BPA) のタンパク質への取り込みを指標とした TG2 架橋基質の探索も試みた。しかしながら、THP-1 由来マクロファージの培養液への BPA 添加においては、TG2 を介した BPA のタンパク質への取り込み活性を検出することができなかった(データ非掲載)。原因として、1) BPA 修飾されたタンパク質の抽出効率が低い、2) BPA がヒトマクロファージの細胞膜を透過しない、あるいは細胞内の BPA が迅速に分解、細胞外へ排出される、3) BPA 修飾されたタンパク質が急速に分解される、4) BPA の取り込み活性がストレプトアビジンの非特異的な結合や内在性ビオチン結合タンパク質をはじめとするバックグラウンドシグナルよりも低い、などが考えられる。原因 1) について検討するため、Lysis buffer として使用する界面活性剤を NP-40 から SDS に変更したが、BPA の取り込み活性は検出できなかった (データ非掲載)。次に、原因 2, 3) にあげた BPA の分解・排出について検討するため、BPA 添加時間を 3 h から 1, 5, 10 min へと短くしたが、BPA の取り込み活性は検出できなかった (データ非掲載)。また、Proteasome inhibitor (MG132)、Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor (PYR-41)、Autophagy inhibitor (Autophinib) を BPA と共処理してタンパク質分解系を阻害したが、BPA の取り込み活性は検出できなかった (データ非掲載)。最後に、原因 4) について検討すべく、BPA の架橋産物を増やす方法を試みた。TG2 の活性はカルシウムイオンに依存するため、Ca²⁺ ionophore である Ionomycin を BPA と共処理したが、やはり、BPA の取り込み活性は検出できなかった (データ非掲載)。培養中のマクロファージを用いた TG2 の架橋活性の検出は困難と考え、タンパク抽出液を用いた TG2 の活性検出を試みた。その結果、IL-4 処理した THP-1 由来マクロファージのタンパク抽出液では、BPA の取り込み活性が IL-4 未処理のサンプルと比較して増加することを確認した。また、BPA の取込み活性は TG2 活性阻害剤の添加によって抑制された (Suppl. Fig. S12)。M2 マクロファージの極性化における TG2 の架橋基質や制御機構の理解にはさらなる解析が必要である。

本研究では M2 マクロファージの極性化に伴い TG2 の発現が増加することを確認しているが、TG2 の発現制御機構の全容は明らかでない。TG2 のプロモーター領域には STAT6 の結合サイトが存在したことから⁸³、STAT6 のリン酸化阻害における TG2 の発現を調べたところ、IL-4 刺激による TG2 の発現増加は抑制された (Suppl. Fig. S9)。つまり、TG2 は STAT6 による発現制御を受けることが分かる。TG2 の発現は PPAR γ が誘導するレチノイン酸シグナルによっても誘導されることが報告されており^{83,84}、PPAR γ のアゴニストである Rosiglitazone を加えて極性化を誘導すると TG2 の発現は増加した (Suppl. Fig. S13)。ALOX15 の代謝産物の添加実験において TG2 の発現が増加した (Fig. 8F) 原因として、15(S)-HETE が PPAR γ のリガンドとして働き、転写活性を促進した結果であると考えており、M2 マクロファージの極性化において TG2

が ALOX15 の発現制御を介して TG2 の発現を誘導するというフィードバックループが存在するのではないかと推察している (Fig. 9C)。

以上、本研究では TG2 が ALOX15 の発現誘導を介して M2 マクロファージの極性を促進し、腎線維化の病態進展に関わることを明らかにした。TG2 を介した M2 マクロファージの極性制御はヒトとマウスで共通した現象であり、TG2 および M2 マクロファージが関わる様々な疾患の病態形成機構の理解や新規治療法開発への応用が期待される。

参考文献

1. Cheung AK, Chang TI, Cushman WC, et al. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2021;99(3):S1-S87. doi:10.1016/j.kint.2020.11.003
2. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney Int.* 2019;96(5):1048-1050. doi:10.1016/j.kint.2019.07.012
3. Nagai K, Asahi K, Iseki K, Yamagata K. Estimating the prevalence of definitive chronic kidney disease in the Japanese general population. *Clin Exp Nephrol.* 2021;25(8):885-892. doi:10.1007/s10157-021-02049-0
4. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13(4):453-461. doi:10.2741/2692
5. Mills CD. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(6):463-488. doi:10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10
6. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, et al. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *J Pharmacol Sci.* 2009;111(3):285-292. doi:10.1254/jphs.09227FP
7. Shen B, Liu X, Fan Y, Qiu J. Macrophages regulate renal fibrosis through modulating TGF β superfamily signaling. *Inflammation.* 2014;37(6):2076-2084. doi:10.1007/s10753-014-9941-y
8. Yeh YC, Wei WC, Wang YK, Lin SC, Sung JM, Tang MJ. Transforming growth factor- β 1 induces Smad3-dependent β 1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubulointerstitial fibrosis. *American Journal of Pathology.* 2010;177(4):1743-1754. doi:10.2353/ajpath.2010.091183
9. Wang S, Meng XM, Ng YY, et al. TGF- β /Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget.* 2016;7(8):8809-8822. doi:10.18632/oncotarget.6604
10. Meng XM, Wang S, Huang XR, et al. Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis. *Cell Death Dis.* 2016;7(12):1-9. doi:10.1038/cddis.2016.402
11. Wang YY, Jiang H, Pan J, et al. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2053-2067. doi:10.1681/ASN.2016050573
12. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature.* 2017;541(7635):96-101. doi:10.1038/nature20611
13. Martinez FO, Helming L, Milde R, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: Similarities and differences. *Blood.* 2013;121(9):57-70. doi:10.1182/blood-2012-06-436212

14. Chen JSK, Mehta K. Tissue transglutaminase: An enzyme with a split personality. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1999;31(8):817-836. doi:10.1016/S1357-2725(99)00045-X
15. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(2):140-156. doi:10.1038/nrm1014
16. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: Lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev*. 2009;89(3):991-1023. doi:10.1152/physrev.00044.2008
17. Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminkaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev*. 2014;94(2):383-417. doi:10.1152/physrev.00019.2013
18. Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *Journal of Cell Biology*. 2000;148(4):825-838. doi:10.1083/jcb.148.4.825
19. Akimov SS, Belkin AM. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*. 2001;98(5):1567-1576. doi:10.1182/blood.V98.5.1567
20. Kannagi R, Teshigawara K, Noro N, Masuda T. Transglutaminase activity during the differentiation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;105(1):164-171. doi:10.1016/S0006-291X(82)80026-0
21. Murtaugh MP, Mehta K, Johnson J, Myers M, Juliano RL, Davies PJ. Induction of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(18):11074-11081. doi:10.1016/s0021-9258(17)44387-0
22. Murtaugh MP, Arend WP, Davies PJ. Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1984;159(1):114-125. doi:10.1084/jem.159.1.114
23. Tóth B, Garabuczi É, Sarang Z, et al. Transglutaminase 2 Is Needed for the Formation of an Efficient Phagocyte Portal in Macrophages Engulfing Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*. 2009;182(4):2084-2092. doi:10.4049/jimmunol.0803444
24. Shweke N, Boulos N, Jouanneau C, et al. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF- β activation and cell infiltration. *American Journal of Pathology*. 2008;173(3):631-642. doi:10.2353/ajpath.2008.080025
25. Johnson TS, Fisher M, Haylor JL, et al. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(12):3078-3088. doi:10.1681/ASN.2006070690
26. Badarau E, Wang Z, Rathbone DL, et al. Development of potent and selective tissue transglutaminase inhibitors: Their effect on TG2 function and application in pathological conditions. *Chem Biol*. 2015;22(10):1347-1361. doi:10.1016/j.chembiol.2015.08.013
27. Tatsukawa H, Abe N, Ohashi S, Hitomi K. Distribution of transglutaminase family members in

- mouse whole body sections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(4):1046-1051. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.001
28. Nanda N, Iismaa SE, Owens WA, Husain A, Mackay F, Graham RM. Targeted Inactivation of Gh/Tissue Transglutaminase II. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(23):20673-20678. doi:10.1074/jbc.M010846200
 29. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997;407(3):313-319. doi:10.1016/S0014-5793(97)00313-X
 30. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
 31. Toda G, Yamauchi T, Kadowaki T, Ueki K. Preparation and culture of bone marrow-derived macrophages from mice for functional analysis. *STAR Protoc*. 2021;2(1):100246. doi:10.1016/j.xpro.2020.100246
 32. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(3):452-458. doi:10.1038/bmt.2012.244
 33. Katsuhito Fujii, Ichiro Manabe and RN. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. 2011;121(9):3425-3441. doi:10.1172/JCI57582.The
 34. Yang Q, Wang Y, Pei G, et al. Bone marrow-derived Ly6C⁺ macrophages promote ischemia-induced chronic kidney disease. *Cell Death Dis*. 2019;10(4). doi:10.1038/s41419-019-1531-3
 35. Sears SM, Vega AA, Kurlawala Z, et al. F4/80 hi Resident Macrophages Contribute to Cisplatin-Induced Renal Fibrosis . *Kidney360*. 2022;3:10.34067/KID.0006442021. doi:10.34067/kid.0006442021
 36. Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):217-221. doi:10.1073/pnas.89.1.217
 37. Huang JT, Welch JS, Ricote M, et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*. 1999;400(6742):378-382. doi:10.1038/22572
 38. Montford JR, Bauer C, Rahkola J, et al. 15-Lipoxygenase worsens renal fibrosis, inflammation, and metabolism in a murine model of ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2022;322(1):F105-F119. doi:10.1152/ajprenal.00214.2021
 39. Johnson TS, Griffin M, Thomas GL, et al. The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(12):2950-2960. doi:10.1172/JCI119490
 40. Scarpellini A, Huang L, Burhan I, et al. Syndecan-4 knockout leads to reduced extracellular transglutaminase-2 and protects against tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(5):1013-1027. doi:10.1681/ASN.2013050563
 41. Burhan I, Furini G, Lortat-Jacob H, et al. Interplay between transglutaminases and heparan sulphate in progressive renal scarring. *Sci Rep*. 2016;6(July):1-18. doi:10.1038/srep31343

42. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-449. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024
43. Sprangers S, Vries TJD, Everts V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/1475435
44. Park MD, Silvin A, Ginhoux F, Merad M. Macrophages in health and disease. *Cell*. 2022;185(23):4259-4279. doi:10.1016/j.cell.2022.10.007
45. Kojima S, Nara K, Rifkin DB. Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor- β in bovine endothelial cells. *Journal of Cell Biology*. 1993;121(2):439-448. doi:10.1083/jcb.121.2.439
46. Verderio E, Gaudry C, Gross S, Smith C, Downes S, Griffin M. Regulation of cell surface tissue transglutaminase: Effects on matrix storage of latent transforming growth factor- β binding protein-1. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1999;47(11):1417-1432. doi:10.1177/002215549904701108
47. Chrobok NL, Bol JGJM, Jongenelen CA, et al. Correction: Characterization of transglutaminase 2 activity inhibitors in monocytes in vitro and their effect in a mouse model for multiple sclerosis (PLoS One (2018) 13:4 (e0196433) DOI: 10.1371/journal.pone.0196433). *PLoS One*. 2018;13(12):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0209522
48. Liu C, Luo R, Wang W, et al. Tissue transglutaminase-mediated AT1 receptor sensitization underlies pro-inflammatory cytokine LIGHT-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2019;32(5):476-485. doi:10.1093/ajh/hpz018
49. DiRaimondo TR, Klock C, Warburton R, et al. Elevated transglutaminase 2 activity is associated with hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice. *ACS Chem Biol*. 2014;9(1):266-275. doi:10.1021/cb4006408
50. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm*. 2021;601(March). doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120571
51. Chono S. Development of drug delivery systems for targeting to macrophages. *Yakugaku Zasshi*. 2007;127(9):1419-1430. doi:10.1248/yakushi.127.1419
52. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Prog Lipid Res*. 2019;73(June 2018):28-45. doi:10.1016/j.plipres.2018.11.001
53. Kühn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res*. 2006;45(4):334-356. doi:10.1016/j.plipres.2006.02.003
54. Takahashi N, Kikuchi H, Usui A, et al. Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney. *Clin Exp Nephrol*. 2021;25(5):445-455. doi:10.1007/s10157-021-02021-y
55. Elmarakby AA, Ibrahim AS, Katary MA, et al. A dual role of 12/15-lipoxygenase in LPS-induced acute renal inflammation and injury. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(11):1669-1680. doi:10.1016/j.bbalip.2019.07.009
56. Yuan H, Reddy MA, Deshpande S, et al. Epigenetic histone modifications involved in profibrotic

- gene regulation by 12/15-lipoxygenase and its oxidized lipid products in diabetic nephropathy. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(7):361-375. doi:10.1089/ars.2015.6372
57. Johnson TS, El-Koraie AF, Skill NJ, et al. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14(8):2052-2062. doi:10.1097/01.ASN.0000079614.63463.DD
58. Ikee R, Kobayashi S, Hemmi N, et al. Involvement of transglutaminase-2 in pathological changes in renal disease. *Nephron Clin Pract*. 2007;105(3):139-146. doi:10.1159/000098646
59. Moon JJ, Choi Y, Kim KH, et al. Inhibiting Transglutaminase 2 Mediates Kidney Fibrosis via Anti-Apoptosis. *Biomedicines*. 2022;10(6). doi:10.3390/biomedicines10061345
60. Schuppan D, Mäki M, Lundin KEA, et al. A Randomized Trial of a Transglutaminase 2 Inhibitor for Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(1):35-45. doi:10.1056/nejmoa2032441
61. Büchold C, Hils M, Gerlach U, et al. Features of ZED1227: The First-in-Class Tissue Transglutaminase Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Celiac Disease. *Cells*. 2022;11(10). doi:10.3390/cells11101667
62. Sendobry SM, Cornicelli JA, Welch K, et al. Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol*. 1997;120(7):1199-1206. doi:10.1038/sj.bjp.0701007
63. Bocan TMA, Rosebury WS, Mueller SB, et al. A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis*. 1998;136(2):203-216. doi:10.1016/S0021-9150(97)00204-9
64. Liao Y, Cao P, Luo L. Identification of Novel Arachidonic Acid 15-Lipoxygenase Inhibitors Based on the Bayesian Classifier Model and Computer-Aided High-Throughput Virtual Screening. *Pharmaceuticals*. 2022;15(11):1440. doi:10.3390/ph15111440
65. Beatty GL, Torigian DA, Gabriela Chiorean E, et al. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(22):6286-6295. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1320
66. Hoves S, Ooi CH, Wolter C, et al. Rapid activation of tumor-associated macrophages boosts preexisting tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(3):859-876. doi:10.1084/jem.20171440
67. Razak ARA, Cleary JM, Moreno V, et al. Safety and efficacy of AMG 820, an anti-colony-stimulating factor 1 receptor antibody, in combination with pembrolizumab in adults with advanced solid tumors. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):1-9. doi:10.1136/jitc-2020-001006
68. O'Hara MH, O'Reilly EM, Varadhachary G, et al. CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M (sotigalimab) and chemotherapy, with or without nivolumab, for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label, multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol*.

- 2021;22(1):118-131. doi:10.1016/S1470-2045(20)30532-5
69. Mantovani A, Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. 2022;21(November). doi:10.1038/s41573-022-00520-5
70. Kelavkar U, Wang S, Montero A, Murtagh J, Shah K, Badr K. Human 15-lipoxygenase gene promoter: Analysis and identification of DNA binding sites for IL-13-induced regulatory factors in monocytes. *Mol Biol Rep*. 1998;25(3):173-182. doi:10.1023/A:1006813009006
71. Heydeck D, Thomas L, Schnurr K, et al. Interleukin-4 and -13 Induce Upregulation of the Murine Macrophage 12/15-Lipoxygenase Activity: Evidence for the Involvement of Transcription Factor STAT6. *Blood*. 1998;92(7):2503-2510. doi:10.1182/blood.v92.7.2503
72. Shankaranarayanan P, Chaitidis P, Kühn H, Nigam S. Acetylation by Histone Acetyltransferase CREB-binding Protein/p300 of STAT6 Is Required for Transcriptional Activation of the 15-Lipoxygenase-1 Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(46):42753-42760. doi:10.1074/jbc.M102626200
73. Namgaladze D, Snodgrass RG, Angioni C, et al. AMP-activated protein kinase suppresses arachidonate 15-lipoxygenase expression in interleukin 4-polarized human macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(40):24484-24494. doi:10.1074/jbc.M115.678243
74. Han H, Xu D, Liu C, Claesson HE, Björkholm M, Sjöberg J. Interleukin-4-mediated 15-lipoxygenase-1 trans-activation requires UTX recruitment and H3K27me3 demethylation at the promoter in A549 cells. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0085085
75. Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, et al. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature*. 2019;567(7749):535-539. doi:10.1038/s41586-019-1024-7
76. Töröcsik D, Bárdos H, Nagy L, Ádány R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005;62(18):2132-2139. doi:10.1007/s00018-005-5242-9
77. Töröcsik D, Széles L, Paragh G, et al. Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thromb Haemost*. 2010;104(4):709-717. doi:10.1160/TH09-11-0805
78. Uto T, Fukaya T, Takagi H, et al. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms11273
79. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, et al. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045466
80. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:629-648. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113308
81. Sun Y, Li J, Xie X, et al. Macrophage-Osteoclast Associations: Origin, Polarization, and Subgroups. *Front Immunol*. 2021;12(December):1-15. doi:10.3389/fimmu.2021.778078
82. Olmsted-Davis E, Mejia J, Salisbury E, Gugala Z, Davis AR. A Population of M2 Macrophages Associated With Bone Formation. *Front Immunol*. 2021;12(October):1-15.

doi:10.3389/fimmu.2021.686769

83. Daniel B, Nagy G, Horvath A, et al. The IL-4/STAT6/PPAR γ signaling axis is driving the expansion of the RXR heterodimer cistrome, providing complex ligand responsiveness in macrophages. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(9):4425-4439. doi:10.1093/nar/gky157
84. He L, Jhong JH, Chen Q, et al. Global characterization of macrophage polarization mechanisms and identification of M2-type polarization inhibitors. *Cell Rep.* 2021;37(5). doi:10.1016/j.celrep.2021.109955

謝辞

本研究を実施するにあたり素晴らしい研究環境を与えて頂くとともに多くのご指導を賜りました人見清隆 教授、辰川英樹 助教に心からの感謝を申し上げます。また、研究内容や実験手法について適切なお助言を頂いた辻徳治 助教にも深く感謝しております。名古屋大学 環境医学研究所 分子代謝医学分野 菅波孝祥 教授、田中都 講師には骨髄移植実験やフローサイトメトリーについて親切なお助言を頂きました。また、北海道科学大学 薬学部 丁野純男 教授、戸上紘平 准教授にはリポソーム製剤投与実験において多大なるご協力とお助言を頂きました。この場をお借りして心からのお礼を申し上げます。入学以来、研究や日々の生活を支えてくださいました先輩方、後輩の皆様にも深く感謝いたします。

図表およびその説明

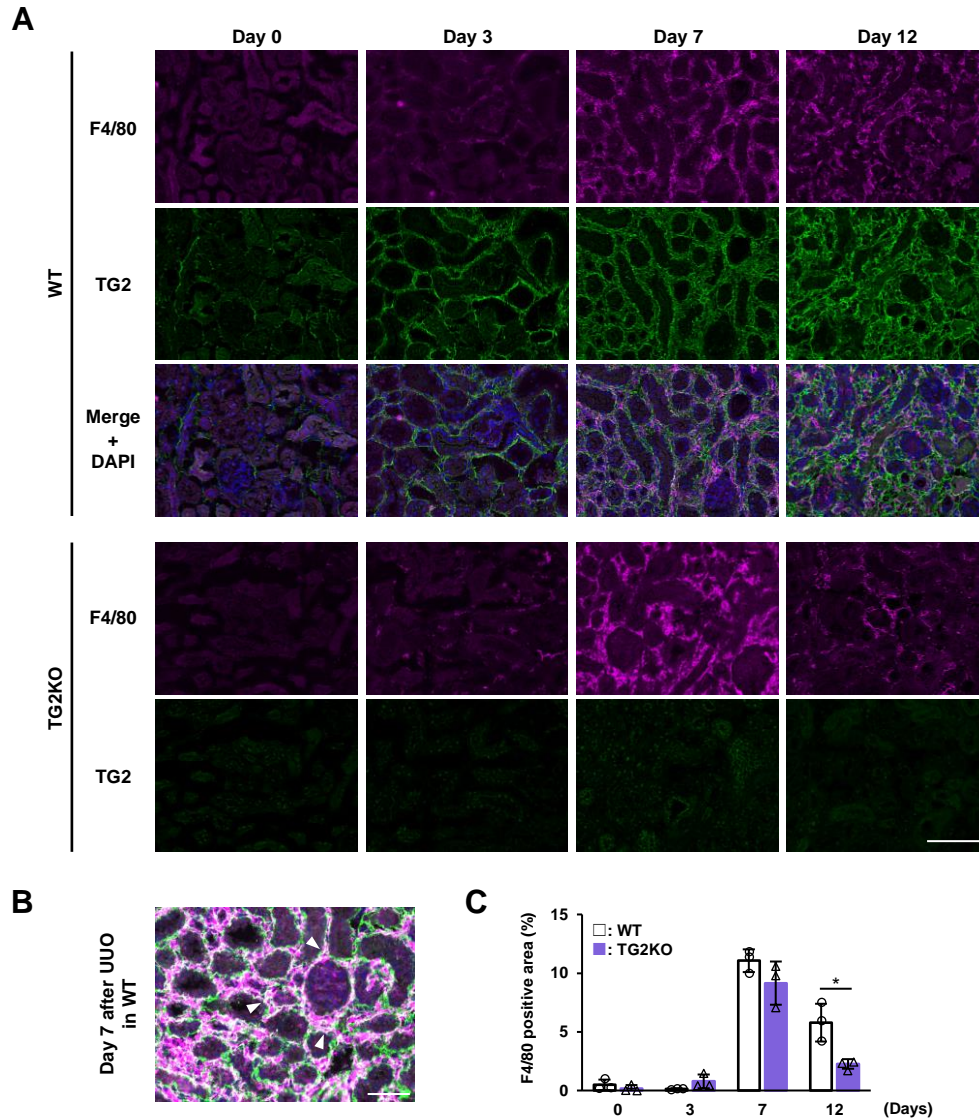


Fig. 1 UUO における腎へのマクロファージ浸潤の解析

(A) UUO 処置したマウスから腎組織を回収し、4% paraformaldehyde (PFA)を用いて固定した後、F4/80 + Alexa Fluor 594 anti-rat antibody と TG2 + Alexa Fluor 488 anti-rabbit antibody を用いて蛍光免疫染色を行った。また、DAPI を用いて核を染色した。Scale bar = 100 μ m.

(B) 強拡大で撮影した WT UUO Day 7 の腎染色像のマージ画像を示した。白矢印は F4/80 と TG2 が共局在した箇所を示す。Scale bar = 50 μ m.

(C) 染色画像を定量して得られた F4/80 positive area の割合を示した。データは平均値 \pm SD で示した (n = 3)。* p < 0.05, two-tailed Student's t -test.

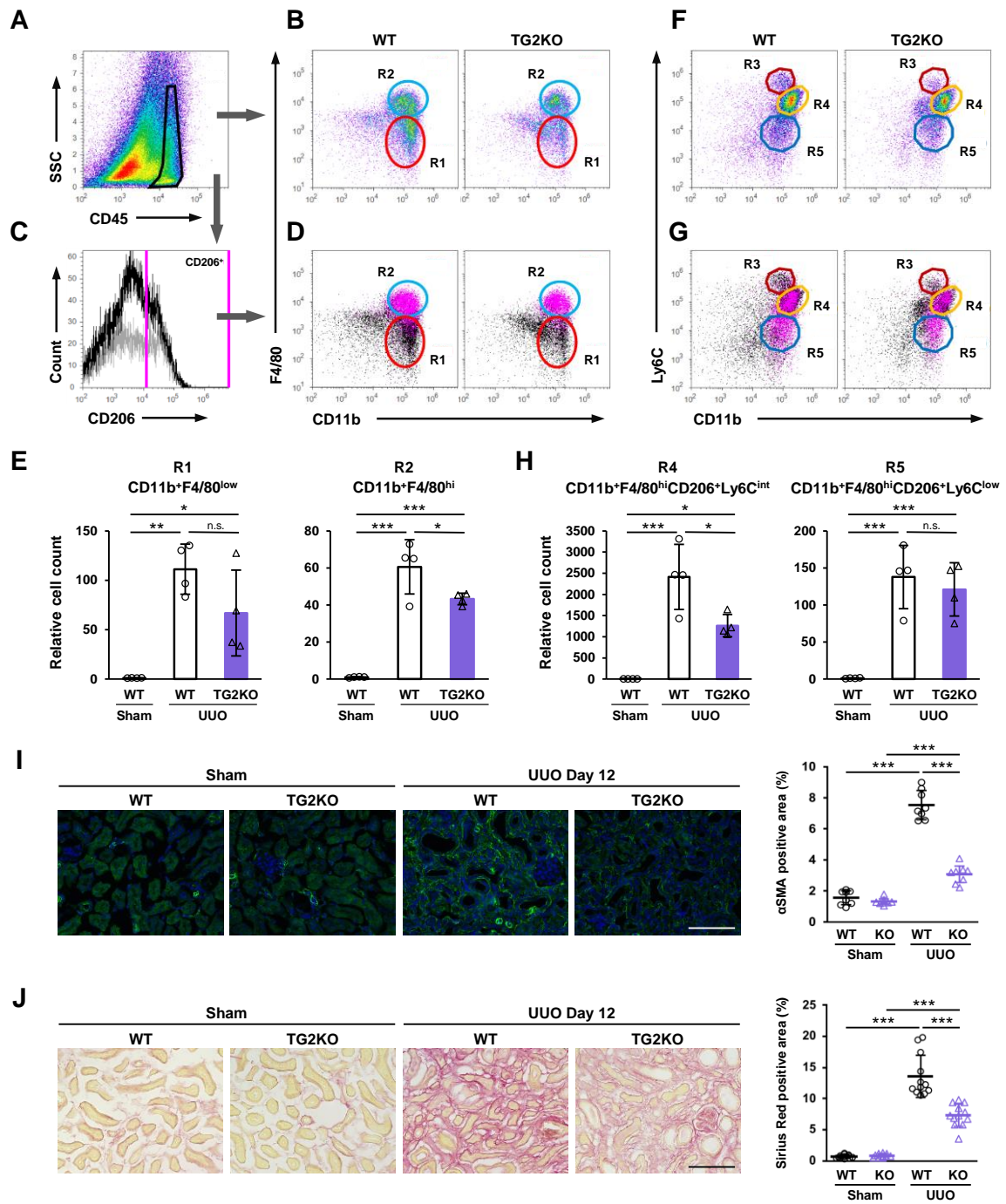


Fig. 2 TG2KO マウスにおける腎マクロファージの解析と線維化病態評価

(A) 解析した全細胞の中から CD45 陽性細胞を分画した (黒枠)。

(B) CD11b-F4/80 plot を作成すると CD11b⁺F4/80^{low} (R1) と CD11b⁺F4/80^{hi} (R2) の 2 つのマクロファージ集団を確認した。

(C) ヒストグラムをもとに CD206 陽性細胞をゲートした (Black: WT, Gray: TG2KO)

(D) CD11b-F4/80 plot に CD206 陽性細胞をマゼンタでプロットした。

(E) R1 および R2 それぞれの細胞数をカウントしたデータを示した。

(F) CD45 陽性細胞を CD11b-Ly6C plot を用いて分画したところ、CD11b⁺Ly6C^{hi} (R3), CD11b⁺Ly6C^{int} (R4), CD11b⁺Ly6C^{low} (R5) の 3 集団を確認した。

(G) CD11b-Ly6C plot に CD206 陽性細胞をマゼンタでプロットした。

(H) F4/80^{hi} かつ CD206 陽性の R4 および R5 の細胞数をカウントした結果を示した。

(I) UUO Day 12 の腎組織における α SMA の発現を α SMA の一次抗体および Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 二次抗体を用いて検出した。また、DAPI を用いて核を染色した。グラフには α SMA positive area の割合を測定した結果を示す。Scale bar = 100 μ m.

(J) ピクロシリウスレッド染色にて組織に沈着したコラーゲン線維を染色し (赤色)、positive area を測定した結果をグラフに示した。Scale bar = 100 μ m.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test.

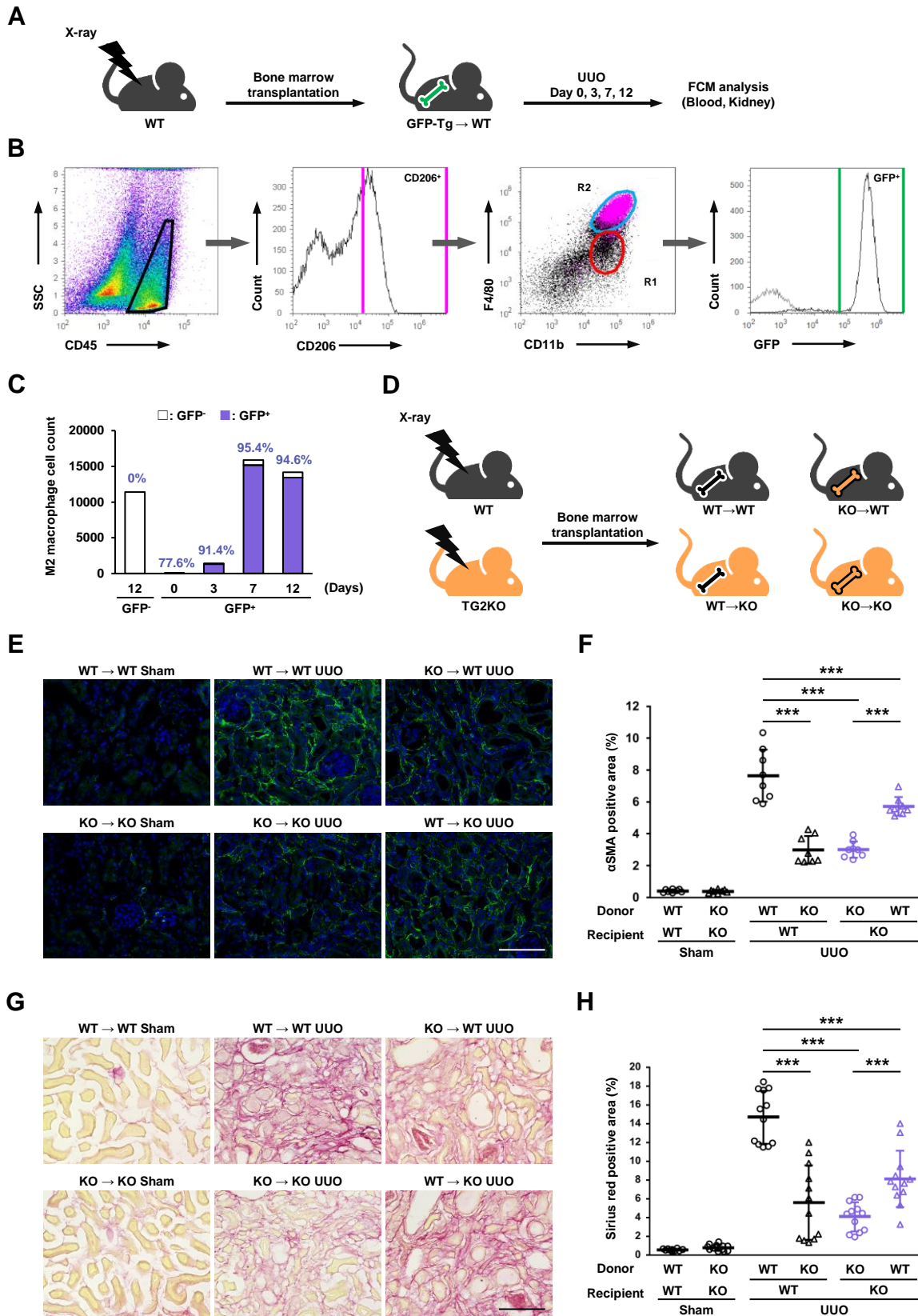


Fig. 3 UUO において誘導される骨髄由来マクロファージの解析と線維化病態形成に対する評価

(A) 致死量である 8.5 Gy のエックス線を照射したマウスに GFP-Tg マウスから採取した骨髄細胞を尾静脈注射により移植した。移植 4 週間後のマウスに対して UUO 処置を行い、UUO Day 0, 3, 7, 12 の血液および腎臓をフローサイトメトリーにより解析した。

(B) CD45 陽性細胞を CD11-F4/80 plot にて分画するとともに、CD206 陽性細胞をマゼンタで表示した。R2 画分の CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺ cells の GFP の発現をヒストグラムにて解析した。

(C) CD45⁺CD11b⁺F4/80^{hi}CD206⁺ cells (R2) における GFP 陽性細胞の割合を示す。

(D) 8.5 Gy のエックス線を照射した WT または TG2KO マウスに対して、WT マウスまたは TG2KO マウスから採取した骨髄細胞を尾静脈注射により移植した。移植 4 週間後に UUO 処置を行い、UUO Day 14 における線維化の病態を調べた。

(E) α SMA の発現を α SMA の一次抗体および Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 二次抗体を用いて検出した。また、DAPI を用いて核を染色した。Scale bar = 100 μ m.

(F) α SMA positive area を定量した結果を示す。

(G) 組織に沈着したコラーゲンをピクロシリウスレッド染色にて検出した。Scale bar = 100 μ m.

(H) Sirius red positive area を定量した結果を示す。

*** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test.

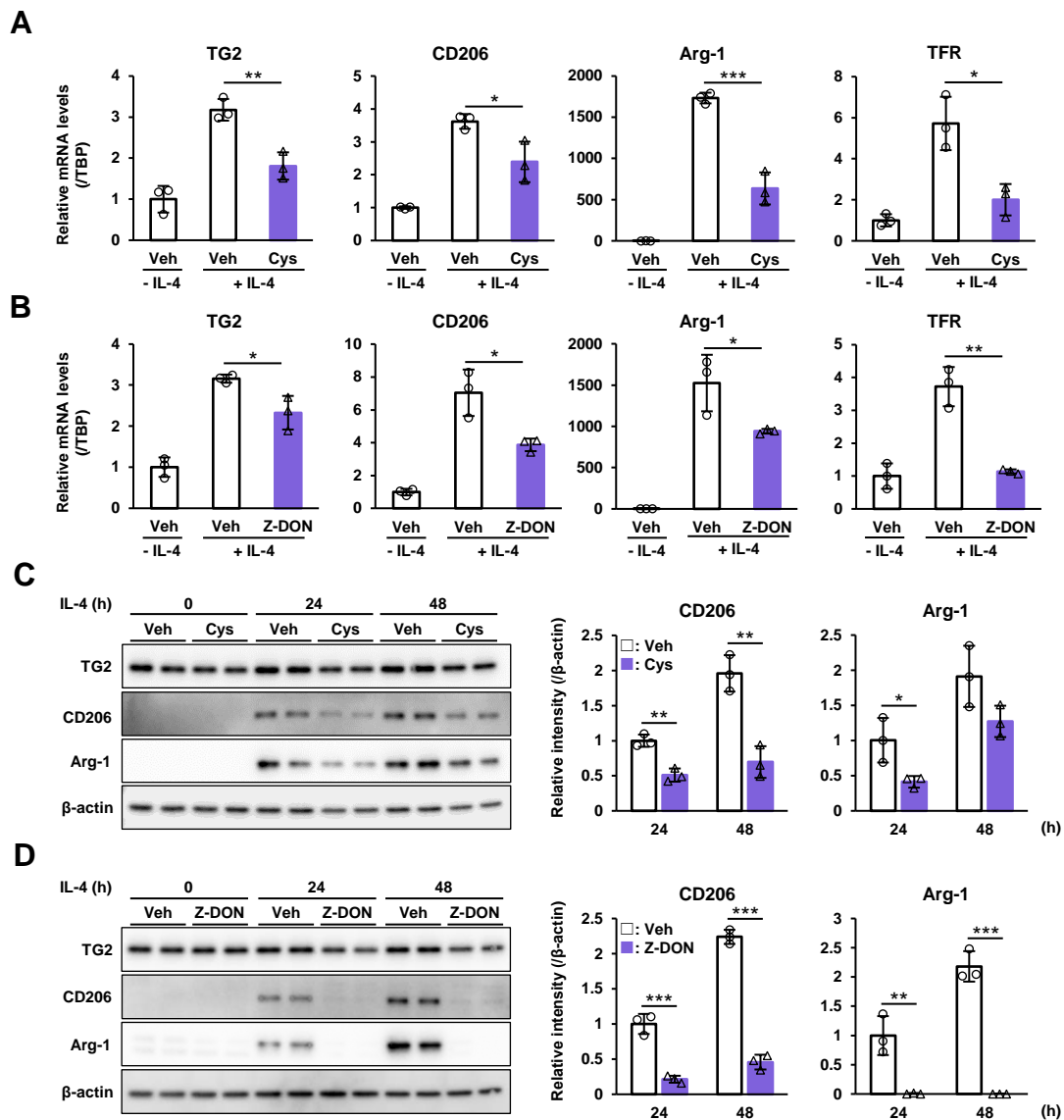


Fig. 4 TG2 の活性阻害によるマウス M2 マクロファージの極性化制御の解析

WT マウスから単離した骨髄細胞を L929-conditioned medium 含有培地で培養し、マクロファージに分化させた。20 ng/ml recombinant mouse IL-4 とともに、

(A) 0.4 mM Cystamine または(B) 50 μ M Z-DON を加えて M2 マクロファージの極性化を誘導し、極性化 24 h における TG2 およびマウス M2 マクロファージマーカーの発現を RT-qPCR により解析した。解析データはインターナルコントロールとして TATA-box binding protein (TBP) の発現をもとに補正し、平均値 \pm SD (n = 3) で示した。

(C) 0.4 mM Cystamine または(D) 50 μ M Z-DON を加えて極性化を誘導し、TG2 およびマウス M2 マクロファージマーカーの発現量をイムノブロットングにより解析した。ローディングコントロールには β -actin を用いた。バンドの定量データは β -actin の発現をもとに補正し、平均値 \pm SD (n = 3) で示した。分子量マーカを含めた full-length blots は Suppl. Figs. S3 および S4 に示した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.

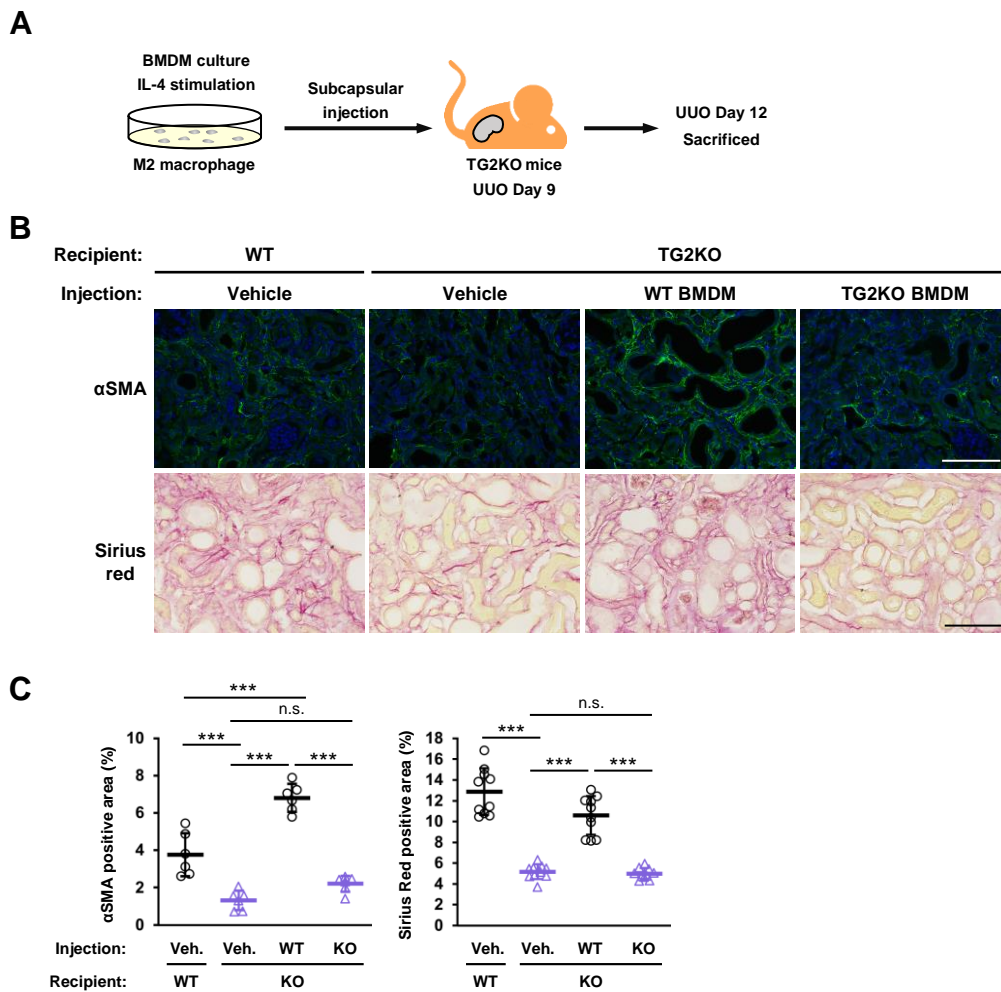


Fig. 5 骨髓由来マクロファージの移植による線維化病態形成の解析

(A) WT または TG2KO マウス由来の BMDM を 20 ng/ml recombinant mouse IL-4 + 5% FBS in RPMI を用いて 2 h インキュベートし、UUO 処置した WT または TG2KO マウスの腎被膜下に移植した (4.75×10^5 cells/mouse)。移植 3 日後のマウスから腎臓を回収し、線維化の病態を評価した。

(B) 筋線維芽細胞の活性化を α SMA の蛍光免疫染色により、コラーゲンの沈着をピクロシリウスレッド染色により調べた。 α SMA の蛍光免疫染色では核を DAPI により染色した。Scale bars = 100 μ m.

(C) α SMA positive area および sirius red positive area を定量した結果を示す。

*** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test.

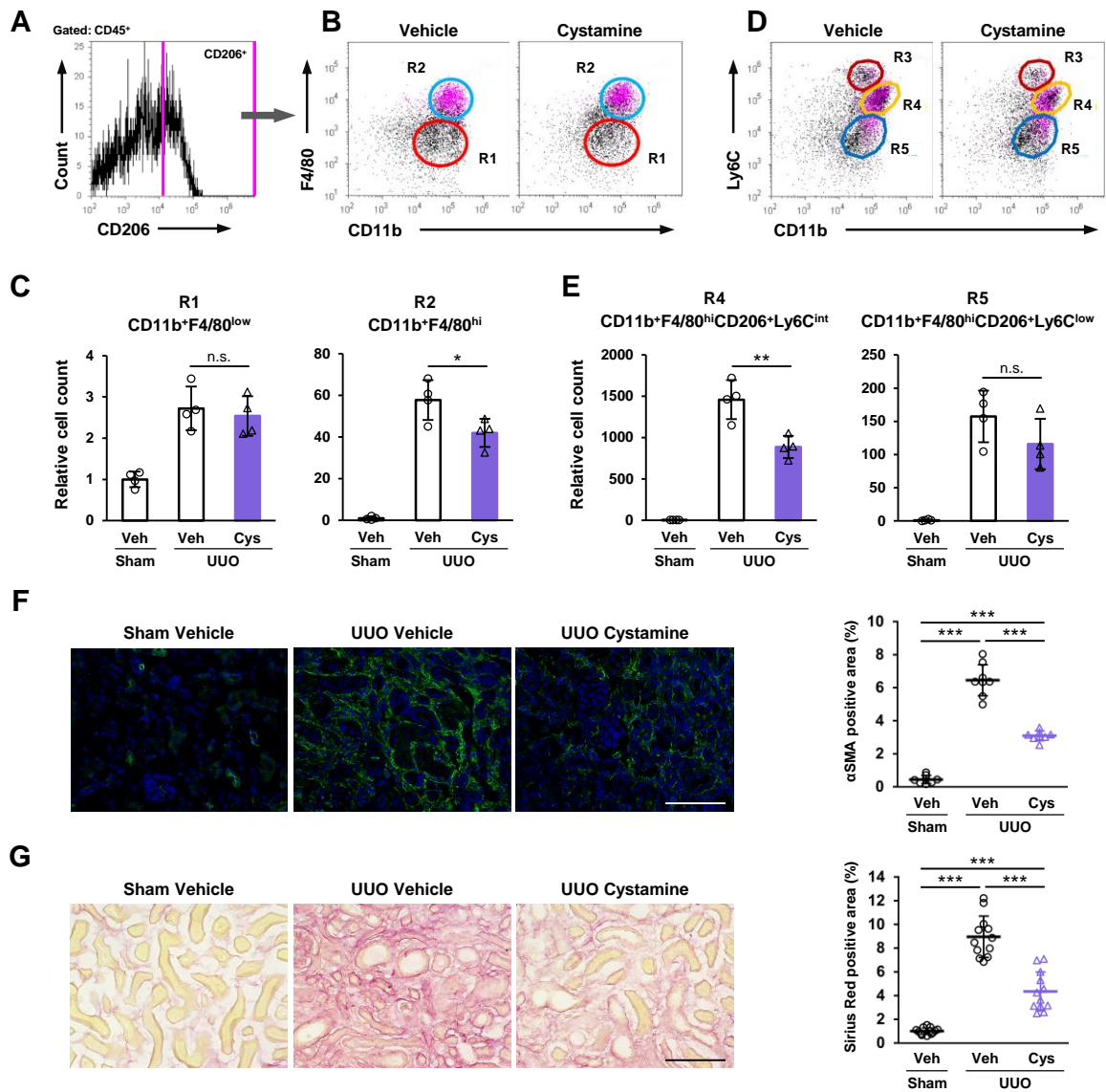


Fig. 6 Cystamine 投与による M2 マクロファージの誘導と病態形成制御の解析

UUO 処置したマウスに Cystamine (1.86 mg/kg/day) を経口投与した際の M2 マクロファージの誘導と線維化病態形成について調べた。

(A) CD45 陽性細胞の中から CD206 陽性細胞をゲートした。

(B) CD45 陽性細胞を CD11b-F4/80 plot にて分画すると CD11b⁺F4/80^{low} (R1), CD11b⁺F4/80^{hi} (R2) の 2 種類の細胞集団に分かれた。また、CD206 陽性細胞をマゼンタでプロットした。

(C) R1 および R2 の細胞数をカウントした結果を示す。

(D) CD45 陽性細胞を CD11b-Ly6C plot にて分画したところ、CD11b⁺Ly6C^{hi} (R3), CD11b⁺Ly6C^{int} (R4), CD11b⁺Ly6C^{low} (R5) の 3 集団に分けられた。また、CD206 陽性細胞をマゼンタで示した。

(E) F4/80^{hi} かつ CD206 陽性の R4 および R5 の細胞数をカウントした結果を示した。

(F) UUO Day 12 の腎組織における α SMA の発現を蛍光免疫染色により検出した。DAPI を用いて核を染色した。 α SMA positive area を定量した結果をグラフに示す。Scale bar = 100 μ m.

(G) コラーゲンの蓄積量をピクロシリウスレッド染色にて解析した。Sirius red positive area を定量した結果をグラフに示す。Scale bar = 100 μ m.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test.

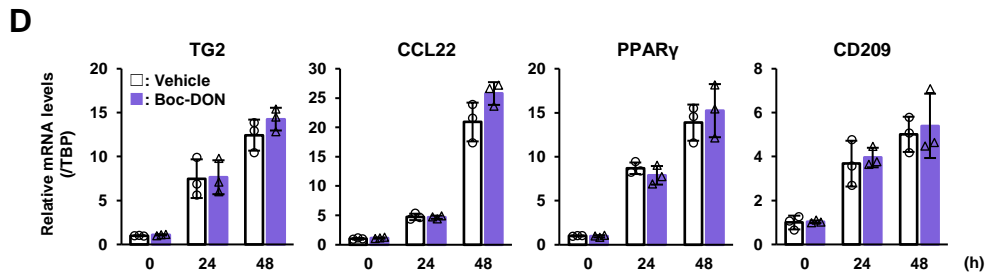
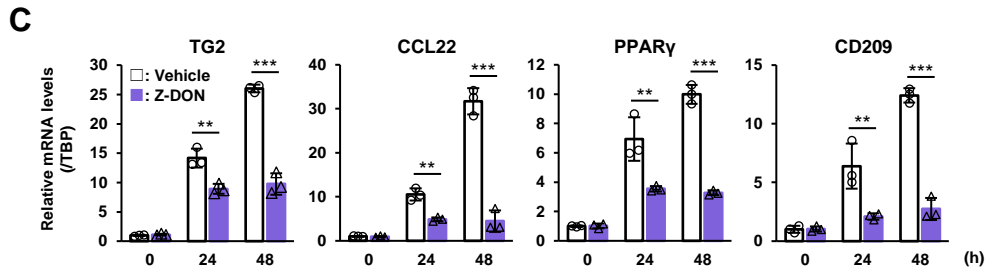
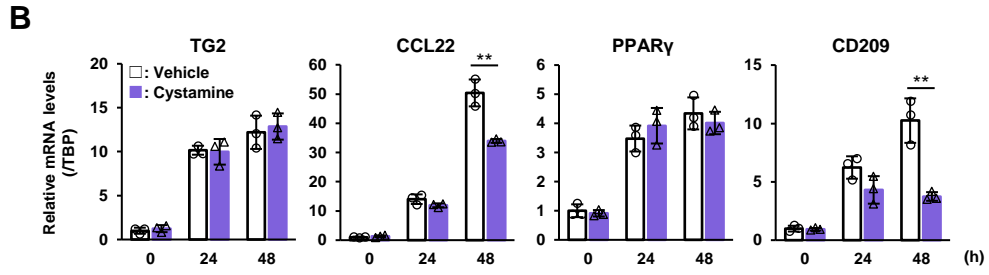
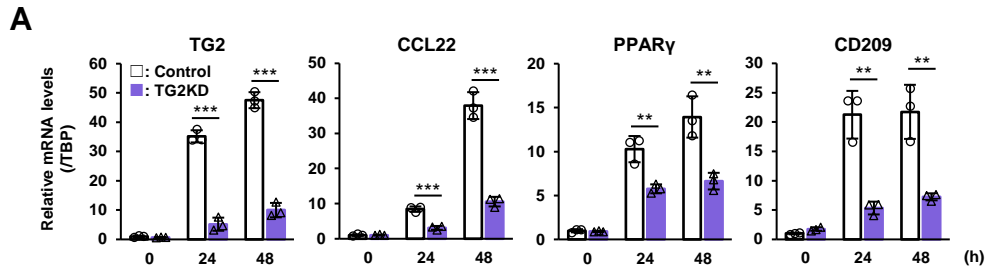


Fig. 7 TG2 によるヒト M2 マクロファージの極性化制御の解析

ヒト単球白血病細胞株 THP-1 を 150 nM PMA 存在下で 24 h インキュベートしてマクロファージに分化させた。20 ng/ml recombinant human IL-4 を用いて M2 マクロファージの極性化を誘導し、RT-qPCR にて TG2 およびヒト M2 マクロファージマーカーの発現を調べた。

(A) siRNA を用いて TG2 のノックダウンを行った。Control サンプルは等量の scrambled siRNA を用いて処理した。

(B) 0.4 mM Cystamine, (C) 50 μ M Z-DON を用いて細胞内 TG2 の活性を阻害した。

(D) 100 μ M Boc-DON を用いて細胞外 TG2 の活性を阻害した。

RT-qPCR のデータは TBP の発現をもとに補正し、平均値 \pm SD (n=3) で示した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.

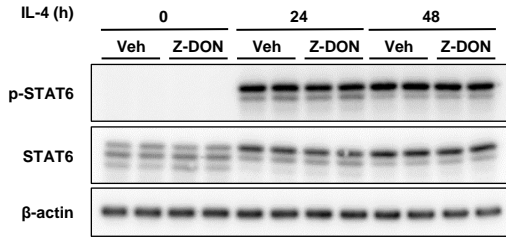
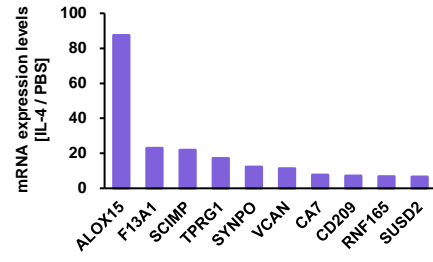
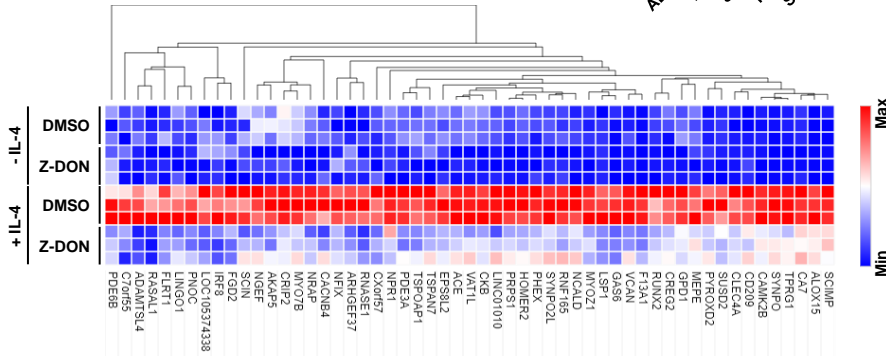
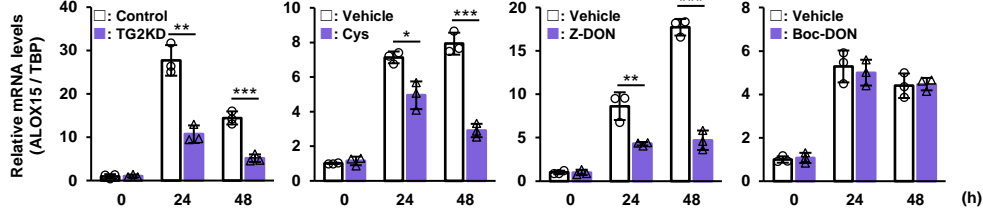
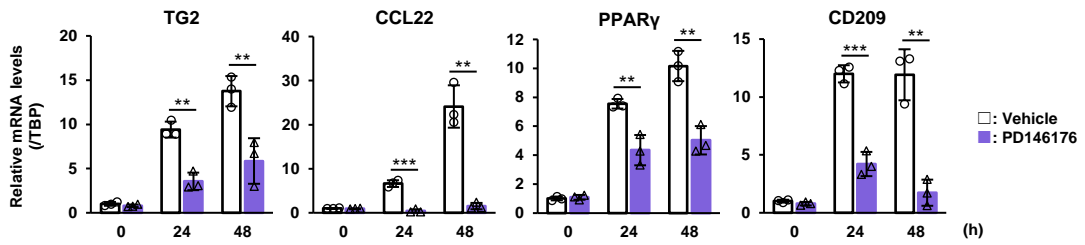
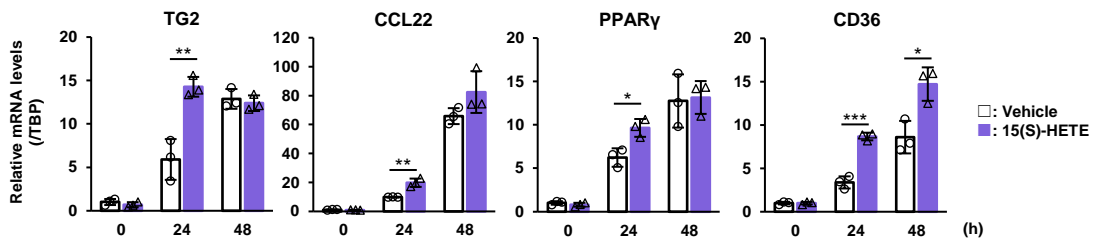
A**C****B****D****E****F**

Fig. 8 TG2 によるヒト M2 マクロファージの極性化制御機構の解析

(A) THP-1 由来ヒトマクロファージを 20 ng/ml recombinant human IL-4 で処理した。その際に 50 μ M Z-DON を加えて TG2 の活性阻害を行い、STAT6 のリン酸化をイムノブロットイングにより解析した。分子量マーカーを含む full-length blots は Suppl. Fig. S7 に示す。

(B) M2 マクロファージの極性化において TG2 の活性依存的に発現が変動する因子を次世代シーケンスにより解析した。ここでは TG2 の活性依存的に発現が増加した 55 個の因子をヒートマップにて示す。

(C) 55 個の因子の中で IL-4 刺激による発現増加率が最も高かった遺伝子、上位 10 個の遺伝子を示した。

(D) THP-1 由来ヒト M2 マクロファージの極性化において、siRNA による TG2 の発現抑制、0.4 mM Cystamine, 50 μ M Z-DON, 100 μ M Boc-DON による活性阻害を行った際の ALOX15 の mRNA 発現を RT-qPCR にて解析した。

(E) 5 μ M PD146176 を共処理して ALOX15 の活性を阻害した際の TG2 および M2 マクロファージマーカーの mRNA 発現量を RT-qPCR にて解析した。

(F) 24 μ M 15(S)-HETE を共処理して M2 マクロファージの極性化を誘導した際の TG2 および M2 マクロファージマーカーの mRNA 発現量を RT-qPCR により解析した。

RT-qPCR のデータは TBP の発現をもとに補正し、平均値 \pm SD (n = 3) で示した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.

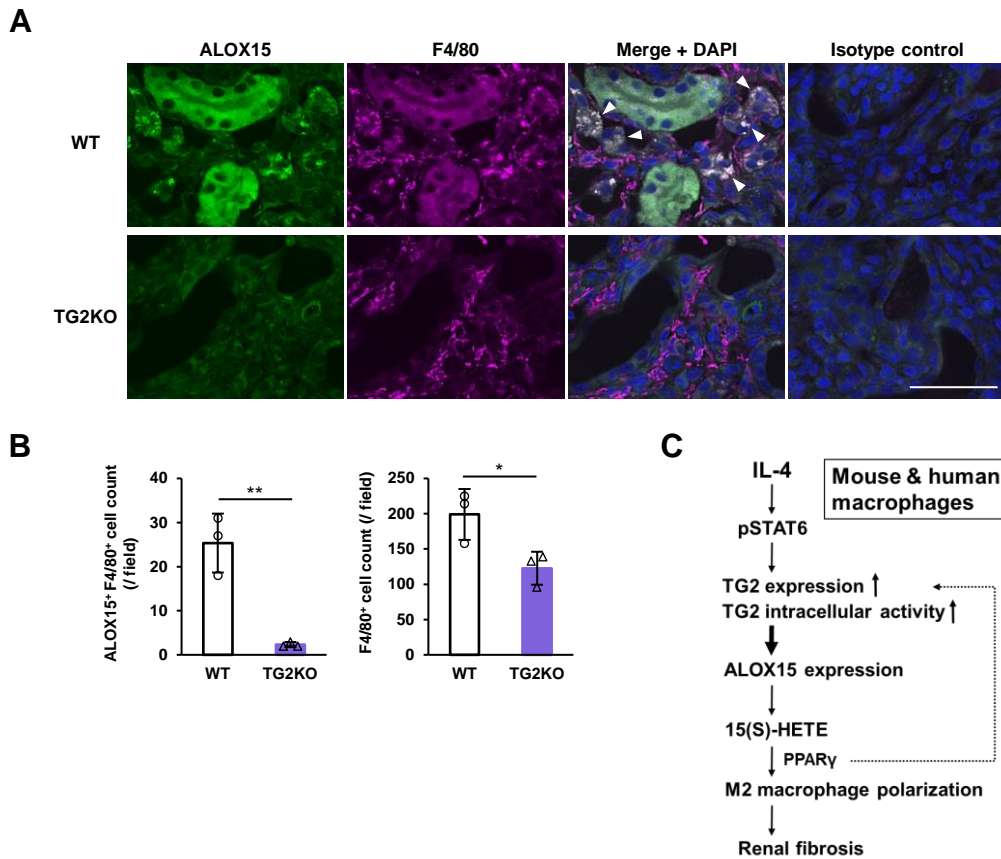


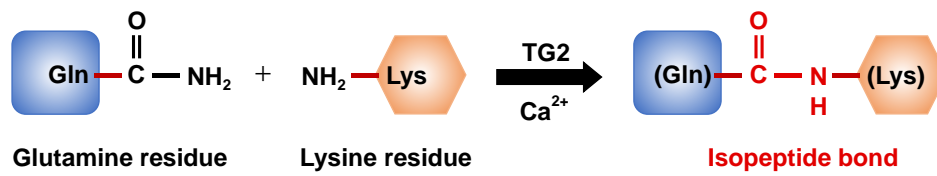
Fig. 9 腎線維化における ALOX15 の発現解析

(A) WT または TG2KO マウスの UO Day 12 の腎組織を回収して 4% paraformaldehyde にて固定した。Anti-15 lipoxygenase 1 antibody (Abcam) + Alexa Fluor 488 anti-rabbit antibody および Rat anti-mouse F4/80 (Bio-rad) + Alexa Fluor 594 anti-rat antibody を用いて蛍光免疫染色を行った。Isotype control として各一次抗体を等量の rabbit および rat Non-immune IgG に置換して染色した際の染色像を示す。白矢印は ALOX15 と F4/80 が共局在する箇所を示す。Scale bar = 50 μ m.

(B) 染色像から得られた ALOX15⁺F4/80⁺ cells および F4/80⁺ cells の細胞数をカウントしたグラフを示す。データは平均値 \pm SD (n = 3) で示す。* p < 0.05, ** p < 0.01, two-tailed Student's t -test.

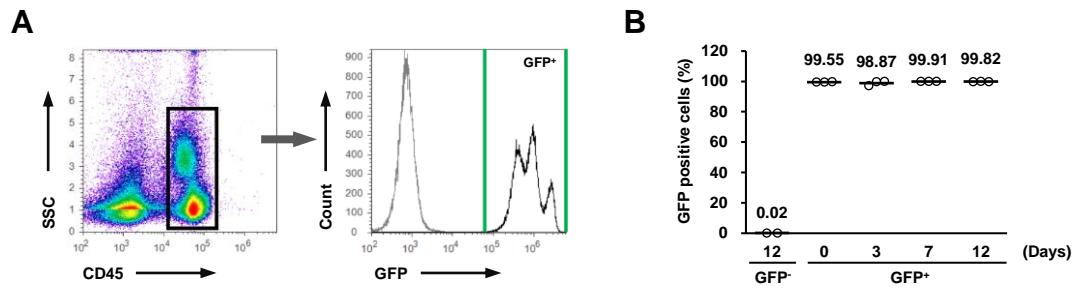
(C) TG2 が ALOX15 の発現誘導を介してヒトおよびマウス M2 マクロファージの極性化および腎線維化の病態形成を促進するフローチャートを示す。

Supplementary Figures



Suppl. Fig. S1 TG2 の反応機構

TG2 はカルシウムイオン依存的にタンパク質の特定のグルタミン残基とリジン残基、または一級アミンとの間にイソペプチド結合を形成する反応を触媒する。

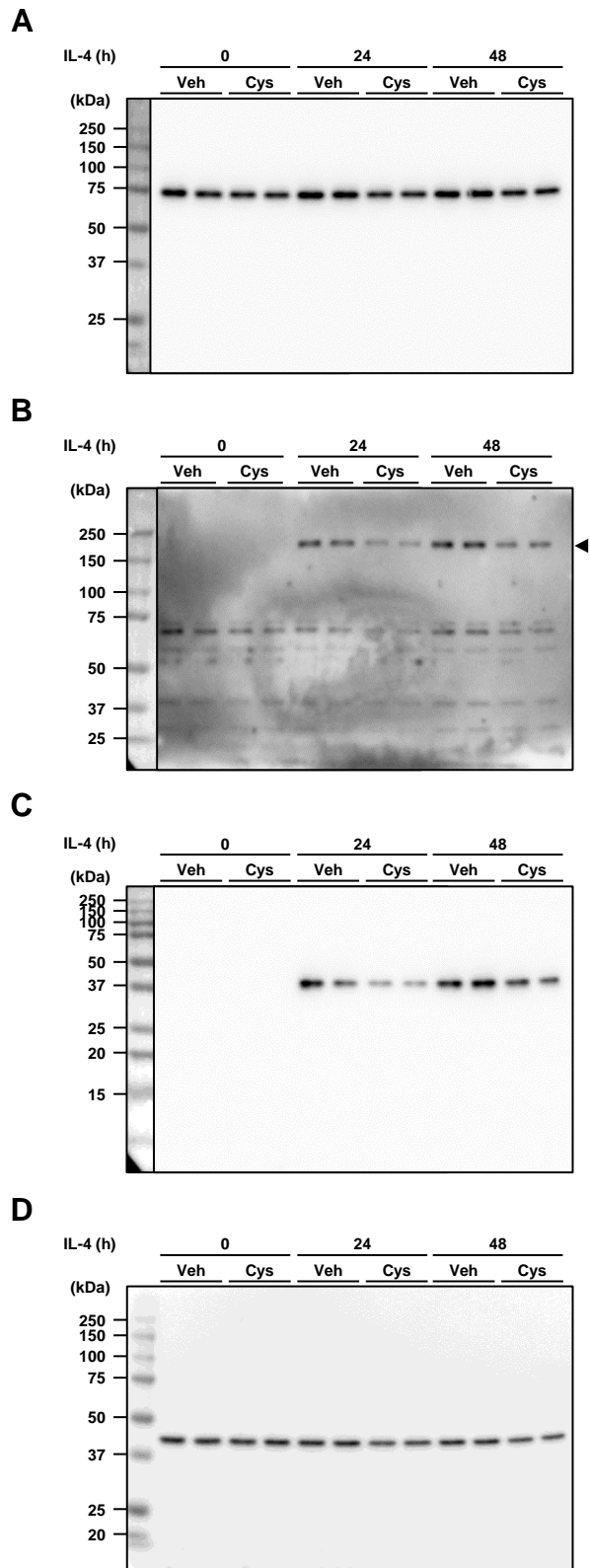


Suppl. Fig. S2 骨髄移植実験における骨髄置換率の解析

致死量である 8.5 Gy のエックス線を照射した WT マウスに GFP-Tg マウスから採取した骨髄細胞を尾静脈注射により移植した。移植 4 週間後のマウスに対して UUO 処置を行い、UUO Day 0, 3, 7, 12 のマウスから末梢血を採取してフローサイトメトリーを実施した。

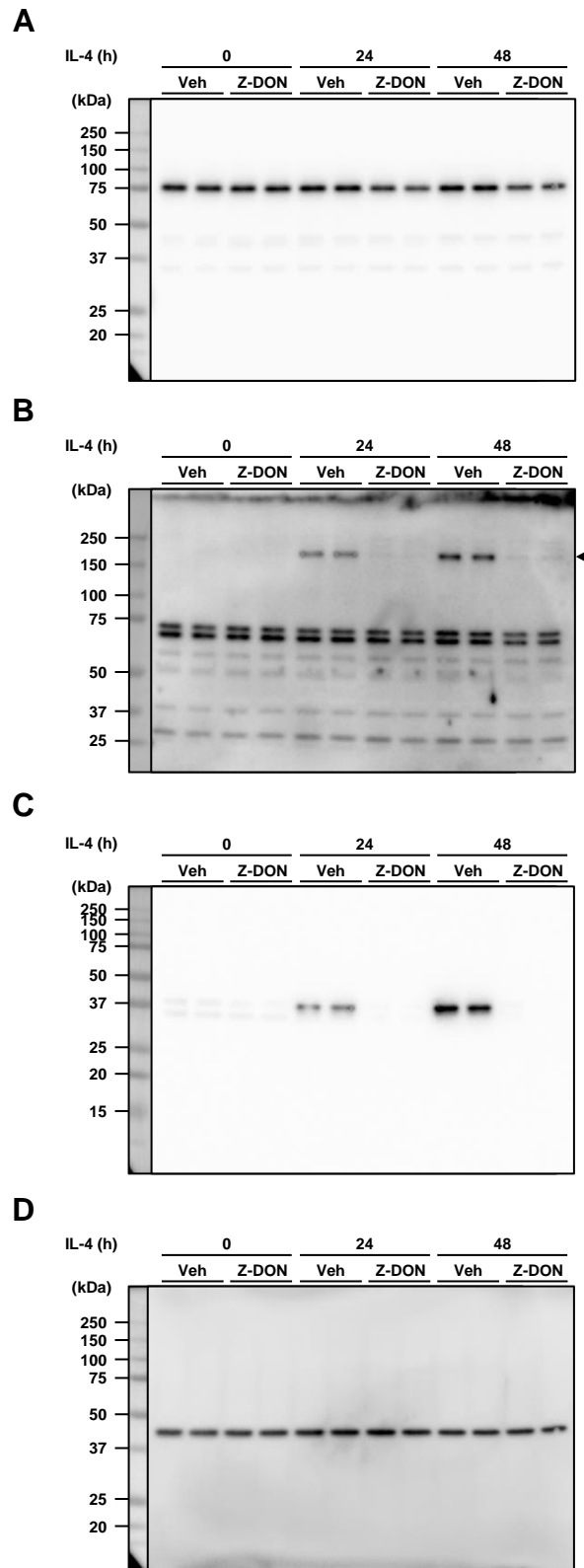
(A) 末梢血中の CD45 陽性細胞をゲートし (黒枠)、GFP の発現をヒストグラムを用いて解析した。グレーのヒストグラムは negative control として WT マウス由来骨髄細胞を移植した群の結果を示す。

(B) CD45 陽性細胞における GFP 陽性細胞の割合を示す。



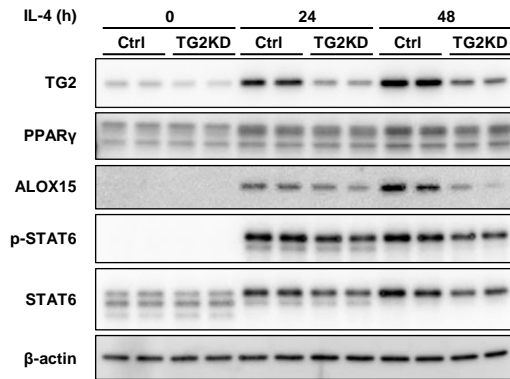
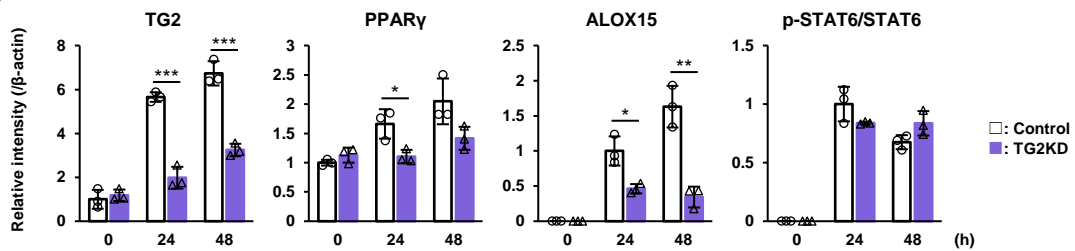
Suppl. Fig. S3 Cystamine によるマウス M2 マクロファージの極性化制御の解析

Fig. 4C で示したイムノブロットイングについて、(A) TG2, (B) CD206, (C) Arg-1, (D) β -actin を検出した full-length blot を示す。



Suppl. Fig. S4 Z-DON によるマウス M2 マクロファージの極性化制御の解析

Fig. 4D で示したイムノブロッティングについて、(A) TG2, (B) CD206, (C) Arg-1, (D) β -actin を検出した full-length blot を示す。

A**B**

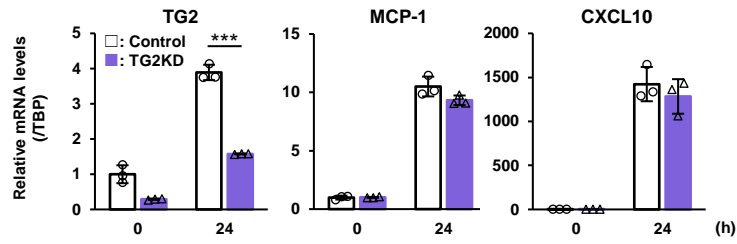
Suppl. Fig. S5 TG2 発現抑制による THP-1 由来ヒト M2 マクロファージの極性化制御の解析

ヒト単球白血病細胞株 THP-1 を 150 nM PMA 存在下で 24 h インキュベートしてマクロファージに分化させた。siRNA を用いて TG2 のノックダウンを行った後、20 ng/ml recombinant human IL-4 を加えて M2 マクロファージの極性化を誘導した。Negative control (Control) として等量の scrambled siRNA を用いて処理したサンプルを調製した。

(A) TG2, PPAR γ , ALOX15, STAT6 の発現、STAT6 のリン酸化レベルをイムノブロットングにて解析した。抗 ALOX15 抗体は Anti-15-LO Antibody (Santa Cruz)を用いた。また、ローディングコントロールとして β -actin の発現を調べた。

(B) 各タンパク質のバンドを定量した結果を示す。定量結果は β -actin の発現量により補正した。リン酸化 STAT6 は STAT6 の発現量により補正した。データは平均値 \pm SD で示した (n = 3)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.



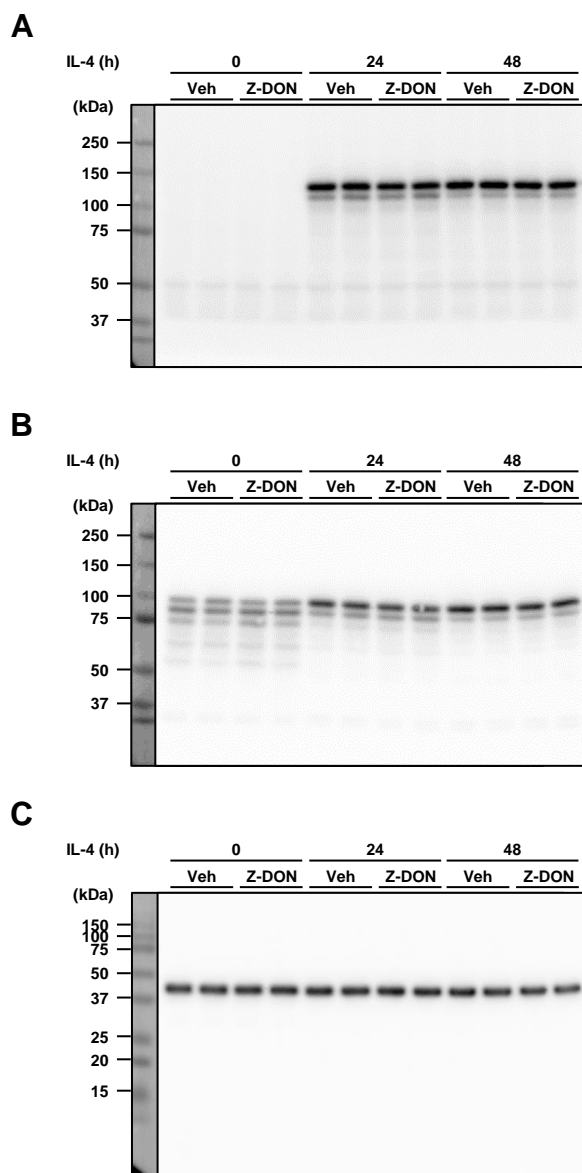
Suppl. Fig. S6 TG2 発現抑制による THP-1 由来ヒト M1 マクロファージの極性化制御の解析

THP-1 由来マクロファージに対して siRNA を作用させ、TG2 の発現抑制を行った。50 ng/ml recombinant human Interferon- γ と 0.1 $\mu\text{g/ml}$ Lipopolysaccharide を加えて M1 マクロファージの極性化を誘導し、TG2 および M1 マクロファージマーカー (Monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1, C-X-C motif chemokine ligand 10; CXCL10) の mRNA 発現量を RT-qPCR にて解析した。

Negative control (Control) は等量の scrambled siRNA を用いて処理した。

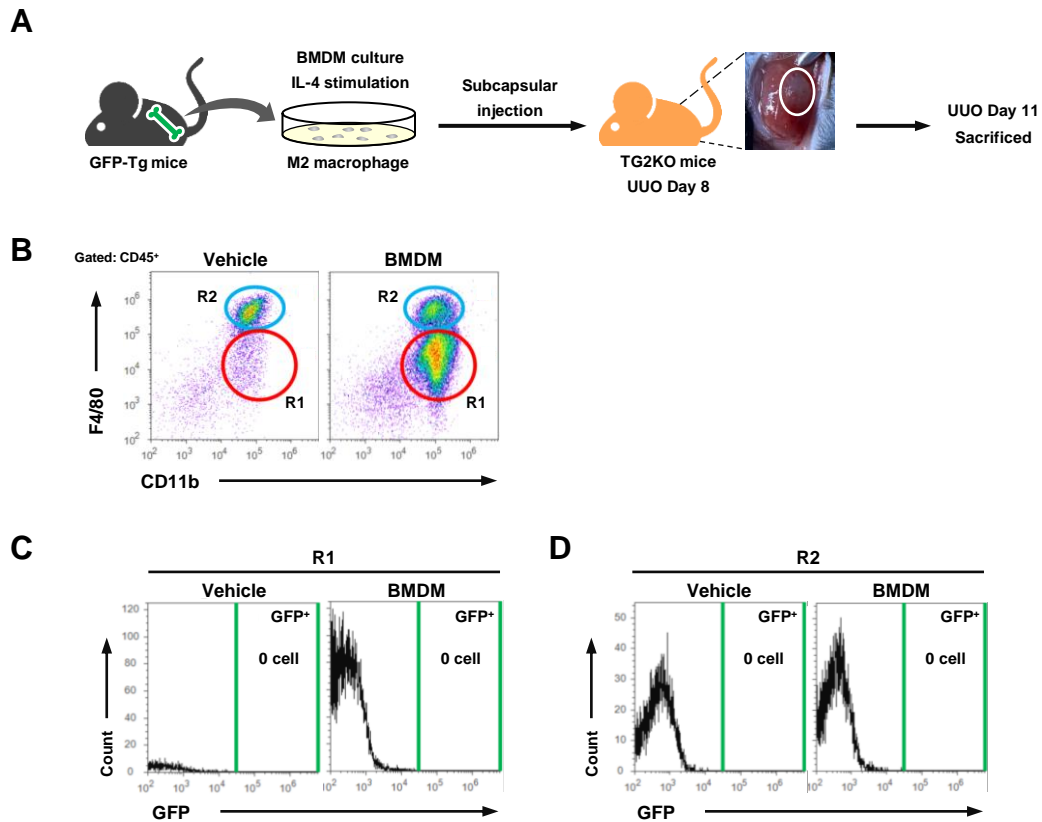
RT-qPCR の解析データは TBP の発現をもとに補正し、平均値 \pm SD (n = 3) で示した。

*** $p < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.



Suppl. Fig. S7 TG2 活性阻害による STAT6 リン酸化制御の解析

Fig. 8A で示したイムノブロットイングについて、(A) p-STAT6, (B) STAT6, (C) β -actin を検出した full-length blot を示す。

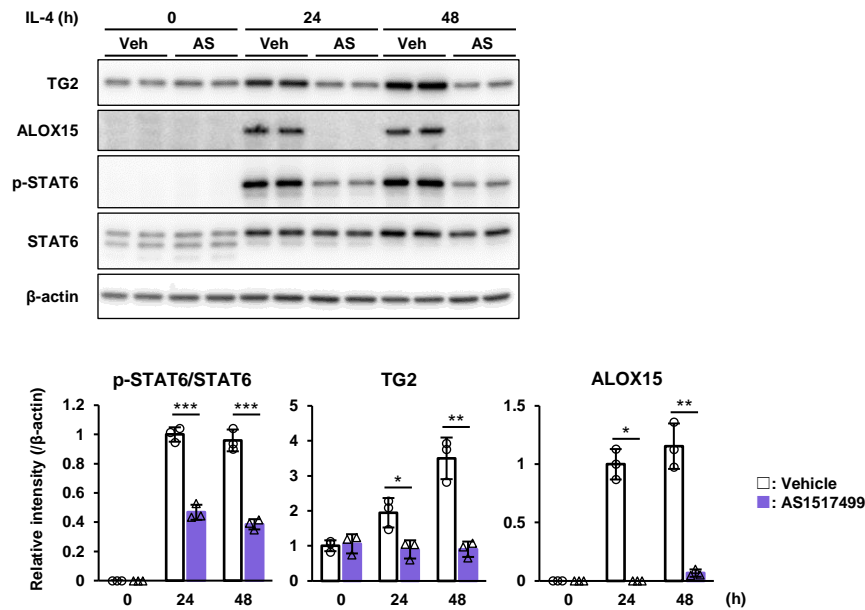


Suppl. Fig. S8 腎被膜下移植 3 日後の細胞定着率の解析

(A) GFP-Tg マウス由来の BMDM を 20 ng/ml recombinant mouse IL-4 + 5% FBS in RPMI を用いて 1 h インキュベートし、UUO 処置した TG2KO マウスの腎被膜下に移植した (2.74×10^6 cells/mouse)。移植 3 日後のマウスから腎臓を回収し、フローサイトメトリーを用いて解析した。

(B) CD45 陽性細胞を CD11b-F4/80 plot にて分画すると、CD11b⁺F4/80^{low} (R1), CD11b⁺F4/80^{hi} (R2) の 2 種類の細胞集団に分かれた。

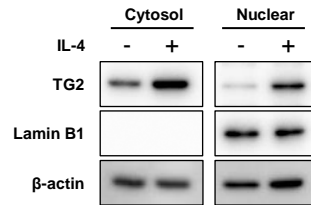
(C) R1 画分および(D) R2 画分の細胞について GFP の発現をヒストグラムを用いて解析した。



Suppl. Fig. S9 STAT6 リン酸化阻害による TG2, ALOX15 発現制御の解析

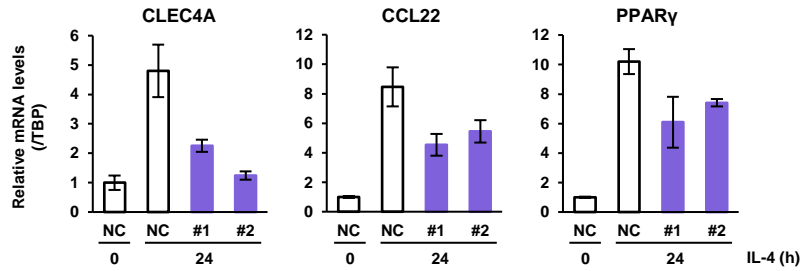
THP-1 由来マクロファージに 20 ng/ml recombinant human IL-4 および STAT6 のリン酸化阻害剤 (250 nM AS1517499) を添加して M2 マクロファージの極性を誘導した。極性化における TG2, ALOX15, phosphorylated STAT6, STAT6, β -actin の発現をイムノブロッティングにて解析した。抗 ALOX15 抗体は Anti-15-LO Antibody (Santa Cruz) を用いた。下のグラフは各タンパク質のバンドを定量した結果を示す。定量結果は β -actin の発現量を用いて補正した。phosphorylated STAT6 は STAT6 の発現量を用いて補正した。データは平均値 \pm SD で示した ($n=3$)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.



Suppl. Fig. S10 THP-1 由来 M2 マクロファージにおける TG2 の局在解析

THP-1 由来マクロファージを 20 ng/ml recombinant human IL-4 を用いて処理して M2 マクロファージへの極性を誘導した。極性化 24 h の細胞から、Minute Cytoplasmic and Nuclear Fraction kit (Invent Biotechnologies)を用いて細胞質画分と核画分を分けてタンパク抽出を行い、TG2, Lamin B1, β -actin の発現を免疫ブロッティングにて解析した。核画分のローディングコントロールとして Lamin B1 を、各サンプルのローディングコントロールとして β -actin を用いた。



Suppl. Fig. S11 CLEC4A のノックダウンによる極性化制御の解析

THP-1 を 150 nM PMA を用いてマクロファージに分化させた後、siRNA を用いて CLEC4A のノックダウンを行った。20 ng/ml recombinant human IL-4 を用いて M2 マクロファージの極性化を誘導し、RT-qPCR により CLEC4A および M2 マクロファージマーカーの発現を調べた。

CLEC4A のノックダウンは配列の異なる 2 種類の siRNA (#1, #2) を用いて行った。

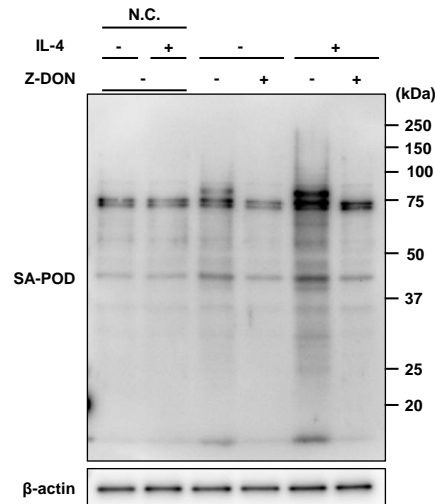
各々の配列を次に示す。

#1: sense 5'-GAUCCACUUAUGAACUGAATT-3', antisense 5'-UUCAGUUCAUAAGUGGAUCTT-3'

#2: sense 5'-GCAUCCACGUGAGCCCAGUTT-3', antisense 5'-ACUGGGCUCACGUGGAUGCTT-3'

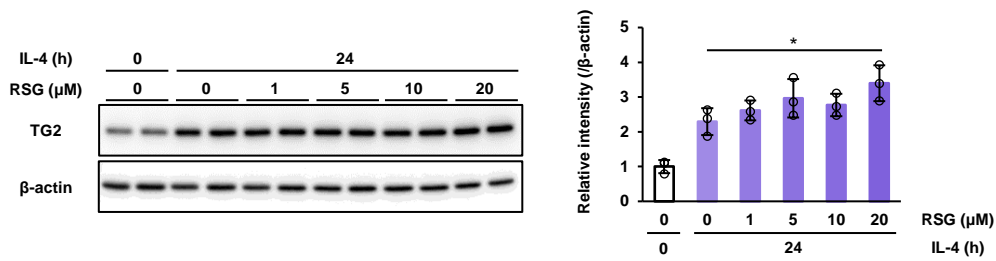
Negative control (NC) は等量の scrambled siRNA を用いて処理した。

RT-qPCR の解析データは TBP の発現をもとに補正した。



Suppl. Fig. S12 THP-1 由来 M2 マクロファージにおける TG2 架橋活性の検出

THP-1 由来マクロファージを 20 ng/ml recombinant human IL-4 にて 24 h 処理して M2 マクロファージを培養した。Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1% NP-40 and Protease inhibitor cocktail) を用いてタンパク質を抽出し、タンパク質 25 μ g を 100 μ M biotin-pentylamine (BPA), 5 mM CaCl₂ and 1 mM DTT を含む反応液中で 37°C, 15 min インキュベートした。反応は TG2 活性阻害剤の Z-DON を添加する群としない群の 2 群を調製し、TG2 依存的な架橋活性の検出を試みた。TG2 の架橋活性により BPA 修飾されたタンパク質は peroxidase-conjugated streptavidin (SA-POD)を用いた Western blotting にて検出した。Negative control (N.C.)は反応液に予め 20 mM EDTA を加えて架橋反応が生じないようにした。各サンプルのローディングコントロールとして β -actin を解析した。



Suppl. Fig. S13 PPAR γ agonist による TG2 発現誘導の解析

THP-1 由来マクロファージを 20 ng/ml recombinant human IL-4 と PPAR γ agonist (0–20 μ M Rosiglitazone, RSG)を用いて共処理し、M2 マクロファージを培養した。免疫ブロットティングにより回収したタンパク抽出液における TG2 および β -actin の発現を解析した。右のグラフは TG2 のバンドを定量した結果であり、平均値 \pm SD で示した (n=3)。各定量データは β -actin の発現をもとに補正した。

* $p < 0.05$ by one-way ANOVA with post hoc Tukey's multiple comparisons test.

Supplementary Tables

Suppl. Table S1. イムノプロット、フローサイトメトリーにて使用した抗体一覧

Antibodies	Source	Identifier	Dilution
<i>For western blotting and immunostaining</i>			
Rabbit anti-mouse TG2 antibody	Produced in house		1/4000
Rat anti-mouse F4/80 (Clone: A3-1)	Bio-rad	MCA497G	1/500
Rabbit anti- α -SMA antibody	Abcam	ab5694	1/200
Rabbit anti-CD206 antibody	Proteintech	18704-1-AP	1/500
Anti-arginase 1/ARG1 antibody (Clone: E-2)	Santa Cruz	sc-271430	1/500
Anti- β -Actin antibody (Clone: 8H10D10)	Cell Signaling technology	#3700	1/10000
Anti-Stat6 antibody	Cell Signaling technology	#9362	1/1000
Anti-p-Stat6 Antibody (pY641.18)	Santa Cruz	sc-136019	1/500
Anti-15 lipoxygenase 1 antibody (Clone: EPR22138)	Abcam	ab244205	1/500
Anti-15-LO Antibody (Clone: B-7)	Santa Cruz	sc-133085	1/500
AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	A-11008	1/2000
AlexaFluor 594 chicken anti-rat IgG	Invitrogen	A-21471	1/2000
<i>For flow cytometry</i>			
APC anti-CD206 (MMR) antibody (Clone: MR6F3)	Invitrogen	17-2061-80	0.125 μ g
APC/Cy7 anti-mouse/human CD11b Antibody	Biologend	101226	0.25 μ g
FITC anti-mouse F4/80 Antibody	Biologend	123107	0.25 μ g
PerCP-Cyanine5.5 anti-CD45 antibody (Clone: 30-F11)	Invitrogen	45-0451-80	0.125 μ g
PE/Cyanine7 anti-mouse F4/80 Antibody	Biologend	123113	0.25 μ g
PE-Cyanine7 anti-Ly-6C antibody (Clone: HK1.4)	Invitrogen	25-5932-80	0.125 μ g

Suppl. Table S2. RT-qPCR に用いた Primer リスト

Species	Gene	Forward	Reverse	Product
Mouse	<i>Arg-1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	185
	<i>CD36</i>	ATGGGCTGTGATCGGAACTG	GTCTTCTCAATAAGCATGTCTCC	110
	<i>CD206</i>	CGGTGAACCAAATAATTACCAAAAT	GTGGAGCAGGTGTGGGCT	158
	<i>CD301</i>	CCAACCTCCGGATATAGTTC	TGTCTGGACGGAAACCAAGAC	178
	<i>PPARγ</i>	GGAAAGACAACGGACAAATCAC	TACGGATCGAAACTGGCAC	156
	<i>TBP</i>	ACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC	CGCAGTTGTCCGTGGCTCTC	123
	<i>TFR</i>	CCAGTGTGGGAACAGGTCTT	ATAAGGGGCTGGCAGAAACT	249
	<i>TG2</i>	AGCCGATGATGTGTACCTAG	AGGATTCCATCCTCGAACTG	138
Human	<i>ALOX15</i>	CAACCACCAAGGATGCAACG	CCCACAGCCACCATAACGG	124
	<i>CCL22</i>	TACTGGACCTCAGACTCCTGC	CCACGGTCATCAGAGTAGGC	146
	<i>CD36</i>	CAAAACGGCTGCAGGTCAAC	TTCTCATCACCAATGGTCCCAG	127
	<i>CD209</i>	GGGAGAGTGGGGTGACATGAG	CCAAGAGCGTGAAGGAGAGG	176
	<i>CLEC4A</i>	GCTCTTCCCATTATGACTTCGG	CAACAGTGAGGCACAAAGCAG	166
	<i>CXCL10</i>	TGCCATTCTGATTGCTGCC	CAGTTCTAGAGAGAGGTACTCCTTG	71
	<i>MCP-1</i>	GATCTCAGTGCAGAGGCTCG	TTTGCTTGTCCAGGTGGTCC	155
	<i>PPARγ</i>	TGACCAGAAGCCTGCATTTCTG	TCCACGGAGCTGATCCCAAAG	186
	<i>TBP</i>	TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT	CCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGA	122
	<i>TG2</i>	ATGCCGACGTGGTAGACTGG	CACTGCCCATGTTTCATGCTC	270

Suppl. Table S3. THP-1 NGS 解析 IL-4 increased gene

Gene name	Description	FC[IL4_D/PBS_D]	FC[IL4_Z/IL4]
ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase	87.55	0.603
F13A1	coagulation factor XIII A chain	23.00	0.311
SCIMP	SLP adaptor and CSK interacting membrane protein	21.89	0.605
TPRG1	tumor protein p63 regulated 1	17.10	0.487
SYNPO	synaptopodin	12.14	0.561
VCAN	versican	11.37	0.378
CA7	carbonic anhydrase 7	7.60	0.637
CD209	CD209 molecule	7.13	0.616
RNF165	ring finger protein 165	6.69	0.465
SUSD2	sushi domain containing 2	6.46	0.516
CLEC4A	C-type lectin domain family 4 member A	6.35	0.548
PYROXD2	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2	6.07	0.575
PHEX	phosphate regulating endopeptidase homolog X-linked	5.89	0.509
GAS6	growth arrest specific 6	5.45	0.358
NCALD	neurocalcin delta	5.11	0.559
PNOC	prepronociceptin	4.34	0.389
FGD2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	4.14	0.407
LINC01010	long intergenic non-protein coding RNA 1010	3.86	0.464
CAMK2B	calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta	3.80	0.628
RNASE1	ribonuclease A family member 1, pancreatic	3.74	0.368
CACNB4	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 4	3.65	0.434
SYNPO2L	synaptopodin 2 like	3.54	0.580
CREG2	cellular repressor of E1A stimulated genes 2	3.48	0.581
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein	3.40	0.586
FLRT1	fibronectin leucine rich transmembrane protein 1	3.31	0.414
HOMER2	homer scaffold protein 2	3.00	0.527
CKB	creatine kinase B	2.99	0.487
VAT1L	vesicle amine transport 1 like	2.78	0.519
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	2.75	0.578
ACE	angiotensin I converting enzyme	2.70	0.555
TSPAN7	tetraspanin 7	2.65	0.546
PRPS1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	2.63	0.602
LOC105374338	uncharacterized LOC105374338	2.52	0.437
CXorf57	RPA1 related single stranded DNA binding protein, X-linked	2.48	0.521
NPR1	natriuretic peptide receptor 1	2.47	0.623
RUNX2	RUNX family transcription factor 2	2.46	0.657
ARHGEF37	Rho guanine nucleotide exchange factor 37	2.43	0.589
TSPOAP1	TSPO associated protein 1	2.42	0.505
NRAP	nebulin related anchoring protein	2.38	0.489
NFIX	nuclear factor I X	2.37	0.631
LINGO1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1	2.18	0.575

MYO7B	myosin VIIB	2.17	0.538
IRF8	interferon regulatory factor 8	2.16	0.508
PDE6B	phosphodiesterase 6B	2.15	0.611
RASAL1	RAS protein activator like 1	2.10	0.474
AKAP5	A-kinase anchoring protein 5	2.08	0.495
SCIN	scinderin	2.08	0.552
PDE3A	phosphodiesterase 3A	2.06	0.561
LSP1	lymphocyte specific protein 1	2.06	0.612
NGEF	neuronal guanine nucleotide exchange factor	2.06	0.465
MYOZ1	myozenin 1	2.04	0.657
ADAMTSL4	ADAMTS like 4	2.04	0.437
CRIP2	cysteine rich protein 2	2.03	0.468
C7orf55	formation of mitochondrial complex V assembly factor 1 homolog	2.03	0.580
EPS8L2	EPS8 like 2	2.00	0.619

Suppl. Table S4. THP-1 NGS 解析 IL-4 decreased gene

Gene name	Discription	FC[IL4_D/PBS_D]	FC[IL4_Z/IL4]
NCF1C	neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene	0.13	1.747
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	0.14	2.621
CD14	CD14 molecule	0.15	1.774
DAPK2	death associated protein kinase 2	0.15	2.140
PLEKHG3	pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G3	0.18	1.544
ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1	0.23	2.379
IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	0.24	1.608
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	0.24	3.626
HIC1	HIC ZBTB transcriptional repressor 1	0.25	2.454
TNF	tumor necrosis factor	0.26	1.969
MMP10	matrix metallopeptidase 10	0.27	2.234
CYP27A1	cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1	0.27	2.078
NT5E	5'-nucleotidase ecto	0.28	1.594
SEMA3A	semaphorin 3A	0.28	1.664
PCDH18	protocadherin 18	0.29	3.052
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	0.29	4.140
IL1A	interleukin 1 alpha	0.29	1.648
MARCKS	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	0.33	1.788
ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 1	0.33	1.954
EBF1	EBF transcription factor 1	0.35	1.762
CCL3L3	C-C motif chemokine ligand 3 like 3	0.37	2.587
MEG3	maternally expressed 3	0.37	1.572
IL1B	interleukin 1 beta	0.38	2.997
ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	0.38	1.525
ADORA2A	adenosine A2a receptor	0.38	1.699
C10orf54	V-set immunoregulatory receptor	0.41	1.630
FAM114A1	family with sequence similarity 114 member A1	0.42	2.012
MCOLN3	mucolipin TRP cation channel 3	0.43	1.583
PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	0.44	1.829
EDN1	endothelin 1	0.45	1.724
NRP2	neuropilin 2	0.45	1.953
SEMA6B	semaphorin 6B	0.46	2.024
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	0.47	2.452
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	0.48	1.631
SNAI1	snail family transcriptional repressor 1	0.50	1.672