



Title	LPSとIL-4の共刺激により誘導されるマクロファージの機能解析
Author(s)	石田, 溪
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/101947">https://doi.org/10.18910/101947</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

2024 年度 博士学位論文

LPS と IL-4 の共刺激により誘導される  
マクロファージの機能解析

石田 溪

大阪大学大学院 薬学研究科  
創成薬学専攻 ワクチン材料学分野

## 目次

要旨.....	2-4
背景.....	5-7
方法.....	8-15
結果.....	16-30
考察.....	31-40
謝辞.....	41-42
参考文献.....	43-48

## 要旨

マクロファージは腸管・肺・皮膚などほぼ全ての組織に存在し、細菌やウイルスなどの病原微生物を貪食して排除するだけでなく、炎症反応の促進と収束、組織の線維化などに深く関与する。特に、近年の研究から、その性質は画一的なものではなく、周囲の環境に応じて機能を変化させることが明らかにされている。これまでの多くの *in vitro* 研究は、菌体成分であるリポポリサッカライド(LPS)により誘導される炎症型 (M1)マクロファージと、IL-4 によって誘導される抗炎症型 (M2)マクロファージの 2 つに大別されるものが主流であった。しかしながら、複雑多様な組織微小環境を想定すると、M1 と M2 マクロファージの概念だけで生体内の免疫応答を十分に理解することは困難である。例えば、M1 と M2 マクロファージの誘導に使用される LPS と IL-4 だけを考えても、アレルギー患者に細菌感染が起こった場合には、アレルギー誘導に関わる IL-4 と LPS が共存する組織環境が想定され、その場に存在するマクロファージは共刺激を受けれる可能性が考えられる。そこで、LPS と IL-4 で共刺激したマクロファージ(LPS/IL-4 マクロファージ)の機能多様性について明らかにすることを目的に本研究を行った。

顕微鏡で細胞形態を観察したところ、未刺激 (M0) マクロファージに比べて、M1 マクロファージは丸い輪郭を帶びており、M2 マクロファージは両端から突起が伸びている一方で、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージと同様に全体的に丸い輪郭を帶びつつ、一部の細胞で樹状突起が認められた。また、フローサイトメトリー解析から、LPS/IL-4 マクロファージは異なる細胞表面抗原発現パターンを示さず、均一な細胞

集団であることが判明した。M1 マクロファージで発現誘導が認められる MHCIIは、LPS/IL-4 マクロファージでさらに発現が促進される一方、同じく M1 マクロファージで発現誘導が認められる誘導型一酸化窒素合成酵素の発現は抑制された。また、M1 マクロファージで発現誘導が認められる *Tnfa* や *Il12p40* の遺伝子発現は、LPS/IL-4 マクロファージにおいて、M0 マクロファージと同等レベルまで低下することが分かった。M2 マクロファージで発現誘導が認められる CD206 は、M2 マクロファージに比べて、LPS/IL-4 マクロファージは発現が低下することが分かった。また、同じく M2 マクロファージで発現誘導が認められる遺伝子 *ArgI* は、LPS/IL-4 マクロファージでさらに発現が増加し、その発現制御に *Socs1* や *Stat3* の関与が示唆された。さらに、LPS/IL-4 マクロファージは、M2 マクロファージで発現誘導が認められる *Chi3l3* の発現が同等レベルであることや、*Fizz1* の発現が全く認められることから、本細胞は M1 や M2 マクロファージのどちらかに偏らず、分子ごとに遺伝子発現パターンが異なることが分かった。

LPS/IL-4 マクロファージの細胞内シグナル伝達について、Western blot 解析を行ったところ、M1 マクロファージにおいて LPS により活性化される NF-κB 経路のシグナル分子 p65 のリン酸化や、M2 マクロファージにおいて IL-4 により活性化される STAT6 のリン酸化が認められた。一方で、LPS により活性化される STAT1 のリン酸化レベルは、M1 マクロファージに比べて LPS/IL-4 マクロファージで低下することが分かった。さらに、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージと同様に解糖系依存的に貪食活性を増加させる一方で、M1 マクロファージで優位な解糖系と、M2 マクロファージで優

位な酸化的リン酸化の両経路を同時に活性化させることができた。これらのことから、

LPS/IL-4 マクロファージは、M1 や M2 マクロファージとは異なる独自の性質を示す細

胞であることが明らかになった。

## 背景

19世紀半ば頃、死細胞の残骸や体内に侵入してきた病原微生物を細胞内に取り込む白血球としてマクロファージに注目が集まり、その後、宿主の生体防御に関連していることが見出された<sup>1,2</sup>。また、Toll様受容体 (toll like receptor: TLR)の発見を皮切りに、マクロファージは画一的な性質を示さず、周囲の環境によって性状を変化させることが明らかになった<sup>3</sup>。これまでの一般的な *in vitro* 実験では、炎症型 (M1)マクロファージと抗炎症型(M2)マクロファージに大別するものが主流とされてきた<sup>3</sup>。

M1 マクロファージは菌体成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS)により誘導され、抗原提示を担う主要組織適合性遺伝子複合体(major histocompatibility complex: MHC)IIや共刺激分子 CD86 を高発現させる特徴を示す。また、M1 マクロファージは腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF) $\alpha$  やインターロイキン(interleukin: IL)-6・IL-12p40 のような炎症性サイトカインと、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase: iNOS)を介したアルギニンからの一酸化窒素(nitric oxide: NO)や活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の産生を促進させる。これらの性状変化は、細菌やウイルスなどの病原微生物の排除だけでなく、動脈硬化やがん、糖尿病などの炎症性疾患の病態形成に深く関与する<sup>3</sup>。

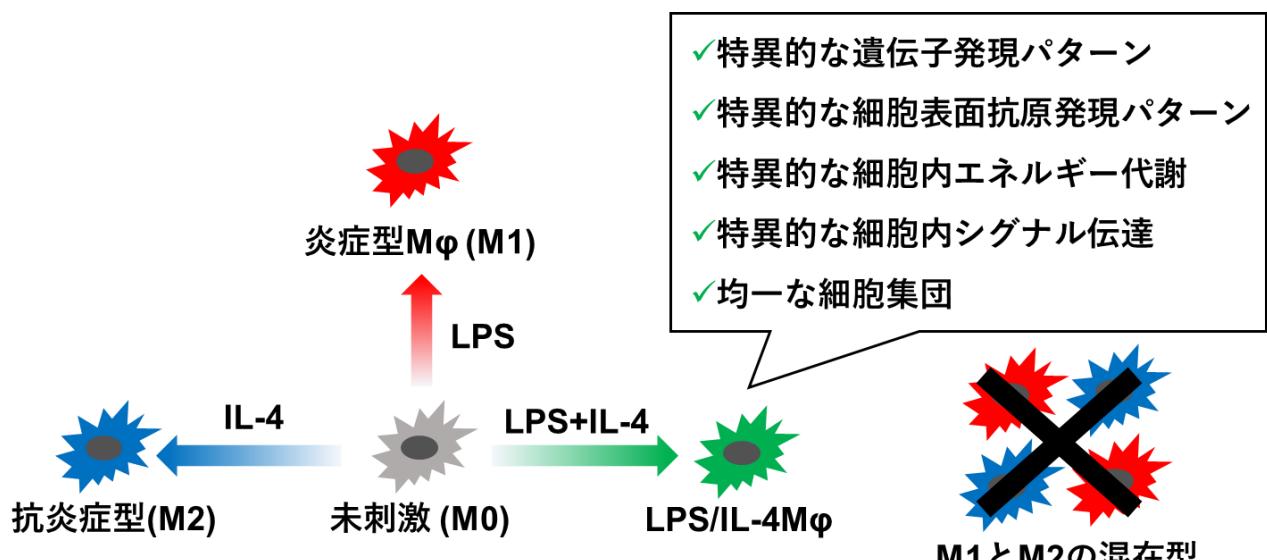
一方、M2 マクロファージは IL-4 によって誘導され、レクチン受容体である CD206 を高発現させる。また、アルギニン代謝においては、M2 マクロファージはアルギナーゼ

1(arginase: Arg1)を高発現させて iNOS と競合することにより、アルギニンからの NO 産生を阻害する。さらに、M2 マクロファージは chitinase 3-like 3(Chi3l3、または Ym1) および found in inflammatory zone-1(Fizz1、または resistin like alpha; RELMa)を高発現させ、アレルギー炎症性疾患の病態形成や損傷した組織の修復に深く関与することが明らかにされている<sup>3</sup>。

このようなマクロファージの機能は、サイトカインや転写因子だけでなく、エネルギー代謝によっても制御されることが明らかにされている<sup>4</sup>。例えば、免疫細胞は解糖系やトリカルボン酸(tricarboxylic acid: TCA)回路、酸化的リン酸化などのエネルギー代謝の依存性が、細胞の各種サブセットや活性化状態によって異なる<sup>4</sup>。特に、M1 マクロファージは解糖系を優位にさせることにより、病原微生物などの取り込み(ファゴサイトーシス)活性や、ROS などの殺菌分子の産生を促進させる一方で、M2 マクロファージは β 酸化や TCA 回路、酸化的リン酸化を促進させ、大量のアデノシン三リン酸(adenosine triphosphate: ATP)を産生し、長期にわたって炎症収束や組織修復に関与する<sup>5-7</sup>。

このように、M1 や M2 マクロファージの概念は、マクロファージの性質を示す指標として多用され、互いに異なった性状を示すことから、in vitro においても活発な研究が行われている<sup>3</sup>。しかしながら、サイトカインや菌体成分が混在する複雑多様な生体内の微小環境を想定したとき、M1 や M2 マクロファージの表現型を対象にした解析だけでは十分ではないと考えられる。実際に、近年増加しているアトピー性皮膚

炎や細菌感染を伴う重症喘息患者では、菌体成分や2型ヘルパーT細胞から産生されるIL-4などの2型サイトカイン産生が顕著に増加しており、また、疾患に伴うバリア機能低下や細菌叢の変化により、菌体成分や各種サイトカインが同時にマクロファージに暴露される環境が考えられる<sup>8-11</sup>。したがって、生体内では均一ではなく多様なマクロファージサブセットが存在すると考えられるが、その全容は不明である。そこで、本博士学位論文では、LPSとIL-4の共刺激により誘導されるマクロファージ（LPS/IL-4マクロファージ）の機能解明を目指した研究を行った。



博士学位論文の概要図

## 方法

### 【実験動物】

5~6 週齢の C57BL/6J の雄マウスを日本 SLC より購入し、実験に供するまで 1 週間以上、医薬基盤・健康・栄養研究所内の SPF 動物施設で飼育した。解剖時はイソフルランを用いて麻酔後、頸椎脱臼により安楽死させた。動物の飼育及び実験は、全て国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験規程に準じ、承認を得た計画に従って行った。

### 【骨髄由来マクロファージの調製および M1/M2 マクロファージの分化誘導】

6~12 週齢の雄のマウスから大腿骨と脛骨を回収し、27 G シリンジ（テルモ）を用いて、10% (vol/vol) ウシ胎仔血清（fetal bovine serum: FBS, Corning）、100 units/mL ペニシリン-100 μg/mL ストレプトマイシン（nacalai tesque）を含む Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose (DMEM, nacalai tesque) 培地で骨髄を吐出し、100 μm セルストレイナー (FALCON) に供して骨髄細胞を得た。溶血処理は溶血バッファー (0.16 mol/L NH<sub>4</sub>Cl、tris-hydroxymethyl aminomethane 0.17 mmol/L、pH 7.2) を 2 mL/sample で処置し (1 分、室温)、2% (vol/vol) 仔ウシ血清 (newborn calf serum: NCS, Equitech Bio) 入りの PBS を 40 mL/sample 加えて溶血反応を止め、100 μm セルストレイナーに供することで凝集塊を除いた。遠心後に上清を捨て (4°C、400×g、5 分)、培地で骨髄細胞を懸濁後、RepCell™

6 cm (CellSeed) に  $5 \times 10^5$  cells/5 mL/dish で播種した。このとき、recombinant murine macrophage colony stimulating factor (M-CSF, PeproTech; 50 ng/mL) を培地に添加して培養した (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。培養開始から 3 日目と 5 日目は、半分量の培地を新鮮なものに置換することで培地交換した。M1、M2 マクロファージは、培養 6 日目に 20 ng/mL LPS (O127:B8, Sigma Aldrich) と 20 ng/mL IL-4 (PeproTech) をそれぞれ添加し、24 時間培養することで分化誘導した (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。また、実験群として、20 ng/mL LPS + 20 ng/mL IL-4 を添加した。

### 【フローサイトメトリー解析】

分化誘導したマクロファージは、RepCell™ を冷却 (4°C、20 分) することで回収した。各サンプルは、2% NCS-PBS で洗浄して遠心した後 (4°C、400 × g、5 分)、FACS tube に懸濁し、TruStain FcX (anti-mouse CD16/32) 抗体 (dilution 1:100; BioLegend, catalog no. 101320) で Fc 受容体を介した非特異的な結合をブロッキングし、以下に示す標識抗体で染色した {FITC 標識抗 CD206 抗体 (1:20; BioLegend, 141704, clone C068C2)、PE 標識抗 I-A<sup>b</sup> 抗体 (1:100; BioLegend, 116408, clone AF6-120.1)、PE 標識抗 iNOS 抗体 (1:100; eBioscience, 12-5920-82, clone CXNFT)、PE-Cy7 標識抗 F4/80 抗体 (1:100; BioLegend, 123114, clone BM8)、APC-Cy7 標識抗 CD11b 抗体 (1:100; BioLegend, 101216, clone M1/70)、BV421 標識抗 CD45 抗体 (1:100; BioLegend, 103133, clone 30-F11)}。標識抗体で染色する際は、蛍光退色を防ぐために遮光し、氷上で 30 分間反応させた。また、細胞内抗原

を染色する際は、Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences)を用いて細胞を固定透過処理した後に染色した。死細胞は、解析前に 7-aminoactinomycin D (1:100; BioLegend, 420404) や Zombie-NIR Fixable Viability Kit (1:100; 423106, BioLegend) を用いて解析から除外した。サンプルの分析は FACS AriaIIIu (BD Biosciences)を使用し、データ解析は FlowJo9.9 ソフト (TreeStar)を使用した。

### 【逆転写と定量 PCR】

RepCell<sup>TM</sup> を冷却してマクロファージを回収した後、遠心し (4°C、400×g、5 分)、細胞数を測定した。1.5 mL エッペンチューブに 1 mL のセパゾール RNA I Super G (nacalai tesque) を用意し、そこに  $2 \times 10^4$  個の細胞を加えた。フェノール・クロロホルム抽出によって細胞の全 RNA を抽出し、DNase I (Invitrogen)を添加することで混入しているゲノム DNA を除去し、RNA を精製した。さらに、Super Script VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen)を用いて cDNA に逆転写し、FastStart Essential DNA Probes Master (Roche)を用いて LightCycler 480 II (Roche)および CFX Opus Real-Time PCR Systems (Bio-Rad)で定量 PCRを行った。使用したプライマーは、Table 1 および Table 2 に示した。

**Table 1. Primer sequences for LightCycler 480II**

Species	Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Mouse	<i>Arg1</i>	gaatctgcataggcaacc	gaatcctggtacatctggaaac
Mouse	<i>Chi3l3</i>	aagaacactgagctaaaaactctcct	gagaccatggcactgaacg
Mouse	<i>Fizz1</i>	ccctccactgtaacgaagactc	cacacccagtagcagtcatcc
Mouse	<i>Il12p40</i>	ttgctggtgtctccactcat	gggagtccagtcaccctcta
Mouse	<i>Tnfa</i>	ctgtagcccacgtcgtagc	ttgagatccatgccgttg
Mouse	<i>Actb</i>	aaggccaaccgtgaaaagat	gtggtacgaccagaggcatac

**Table 2. Unique assay ID of PrimePCR Probe for  
CFX Opus Real-Time PCR Systems**

Species	Gene	Unique Assay ID
Mouse	<i>Stat3</i>	qMmuCEP0053124
Mouse	<i>Socs1</i>	qMmuCEP0057945
Mouse	<i>Actb</i>	qMmuCEP0039589

### 【フランクスアナライザー解析】

解析前日に Seahorse Bioscience XF24 Extracellular Flux Analyzer (Agilent)の電源を ON にし、センサーカードトリッジ (Agilent Technology)は XF Calibrant(Agilent Technology)で インキュベートした (37°C、overnight、CO<sub>2</sub> free)。また、0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> (nacalai tesque) 水溶液で 22.4 μg/mL Cell-TAK™(Corning)溶液を調製し、24 cell culture Microplates (Agilent Technologies) にコーティングすることで、解析中に細胞がプレート底面から離れない

ようにした（室温、25分）。コーティングを行った後は、滅菌水で24 cell culture microplatesを洗浄し、風乾させ、翌日まで4°Cで保管した。

解析当日は、RepCellから回収したマクロファージを解析用培地（培地の組成：2 mmol/L Glutamine（Agilent）、10 mmol/L Glucose（Agilent）、1 mmol/L pyruvate（Agilent）を含むXF RPMI Medium（Agilent Technologies））で懸濁し、24 cell culture microplatesに $8 \times 10^4$  cells/100 μL/wellで播種した。遠心（室温、400×g、10分、DECEL: low）して細胞を底面に接着させた後、さらに400 μLの解析用培地を加え、解析までインキュベートした（37°C、1時間、CO<sub>2</sub> free）。センサーカートリッジの各ポートにはoligomycin（終濃度：1.5 μmol/L）、carbonyl cyanide 4-（trifluoromethoxy）phenylhydrazone（FCCP）（終濃度：1.5 μmol/L）、rotenone and antimycin（終濃度：各0.50 μmol/L）を入れてインキュベートした（37°C、30分、CO<sub>2</sub> free）。その後、24 cell culture microplatesとセンサーカートリッジをFlux analyzerに設置し、Seahorse XF Cell Mito Stress Testを選択して解析した。酸化的リン酸化などの活性化レベルの指標となる基礎呼吸量（basal respiration）と解糖系の活性化レベルは、解析ソフトの計算式に従って、以下に示す式で求めた（基礎呼吸量 = oligomycin添加直前の酸素消費速度（oxygen consumption rate: OCR） - rotenone and antimycin添加後から3回目計測時のOCR、解糖系の活性化レベル = oligomycin添加直前の細胞外酸性化速度（extracellular acidification rate: ECAR））。

## 【ファゴサイトーシス解析】

RepCell<sup>TM</sup> から回収したマクロファージを  $1 \times 10^5$  cells/well で 24 well plate (FALCON) に播種し、遠心後 (室温、 $200 \times g$ 、10 分、DECEL: low)、インキュベートした (37°C、over night、5% CO<sub>2</sub>)。大腸菌は COMPITENT high DH5α (TOYOBO) を使用し、LB 培地 (nacalai tesque) で振とう培養した (37°C、over night、200 rpm)。その後、終濃度 100 µg/mL FITC (Sigma Aldrich) となるように菌液  $5 \times 10^8$  /mL を染色し (37°C、1 時間、遮光)、PBS で 2 回洗浄した後、DMEM 培地で懸濁してから 500 multiple of infection となるよう菌液を細胞に添加した。その後、遠心し (室温、 $200 \times g$ 、10 分)、ファゴサイトーシス活性を評価した後 (37°C、30 分、5% CO<sub>2</sub>)、PBS で 3 回洗浄し、0.5 g/L-Trypsin / 0.53 mmol/L-EDTA 溶液 (nacalai tesque) でマクロファージを回収した (37°C、5-10 分、5% CO<sub>2</sub>)。また、ファゴサイトーシス活性は、フローサイトメトリー解析から平均蛍光強度を算出することで評価した。同様の操作によって、蛍光標識された YG Carboxylate Microspheres (Popysciences、size: 1.0 µm) に対するファゴサイトーシス活性も評価した。解糖系を阻害する目的で用いた 2-デオキシ-D-グルコース (Sigma Aldrich) は、ファゴサイトーシス活性の評価開始より 30 分前に 50 mmol/L で処置した。

## 【ウェスタンプロット解析】

細胞を PBS で洗浄した後、Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) および PhosSTOP<sup>TM</sup> (Roche) を含有した RIPA Lysis buffer (Sigma Aldrich) を添加し、振とうさせた (20 分間、

4°C)。その後、細胞溶解液は 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心(13,000×g、20 分、4°C)して上清を回収した。上清のタンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて算出し、SimpleWestern™(ProteinSimple, Bio-Techne, Minneapolis, USA)の操作手順に従って自動キャピラリー電気泳動イムノアッセイを行った。一次抗体は以下に示すものを使用した {Actin-β(dilution 1:100; catalog no. A5441, Sigma Aldrich)、NF-κB p65(1:50; 8242, Cell Signaling Technology)、phospho-NF-κB p65 (p-p65)(1:50; 3033, Cell Signaling Technology)、STAT6(1:50; 5397, Cell Signaling Technology)、phospho-STAT6(1:50; 56554, Cell Signaling Technology)、STAT1(1:50; 9172, Cell Signaling Technology)、phospho-STAT1(1:50; 7649, Cell Signaling Technology)}。また、二次抗体は抗ウサギ IgG 抗体(042-206, ProteinSimple) と抗マウス IgG 抗体(042-205, ProteinSimple)を使用し、streptavidin-HRP(042-414, Simple western)は所定のキャピラリーに添加した。Lumino-S(043-311, Protein Simple) と Peroxidase(043-379, ProteinSimple)は、混合液を調製してから所定のキャピラリーに添加した。

### 【細胞の形態観察】

細胞の形態観察は、オールインワン蛍光顕微鏡(BZ-X800/BZ-X810, KEYENCE)を用いた。

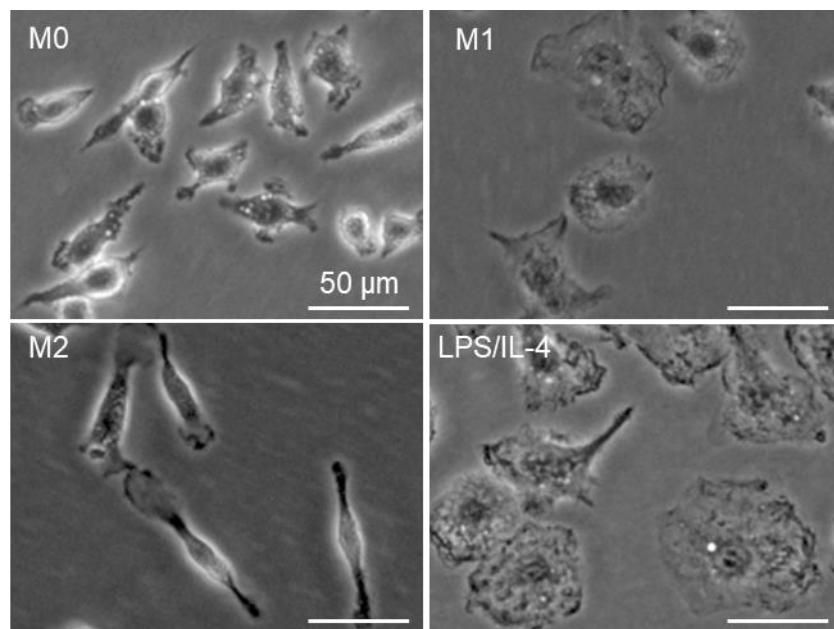
## 【統計解析】

統計解析は Prism 3.03 software(GraphPad Software)を用いて行った。データは平均値±標準誤差として表記し、2群間比較は対応のない t-test、多群間比較は Turkey 法によつて行った。有意水準は  $P<0.05$  とした。

## 結果

### 1. LPS/IL-4 マクロファージは丸い輪郭を帯びている

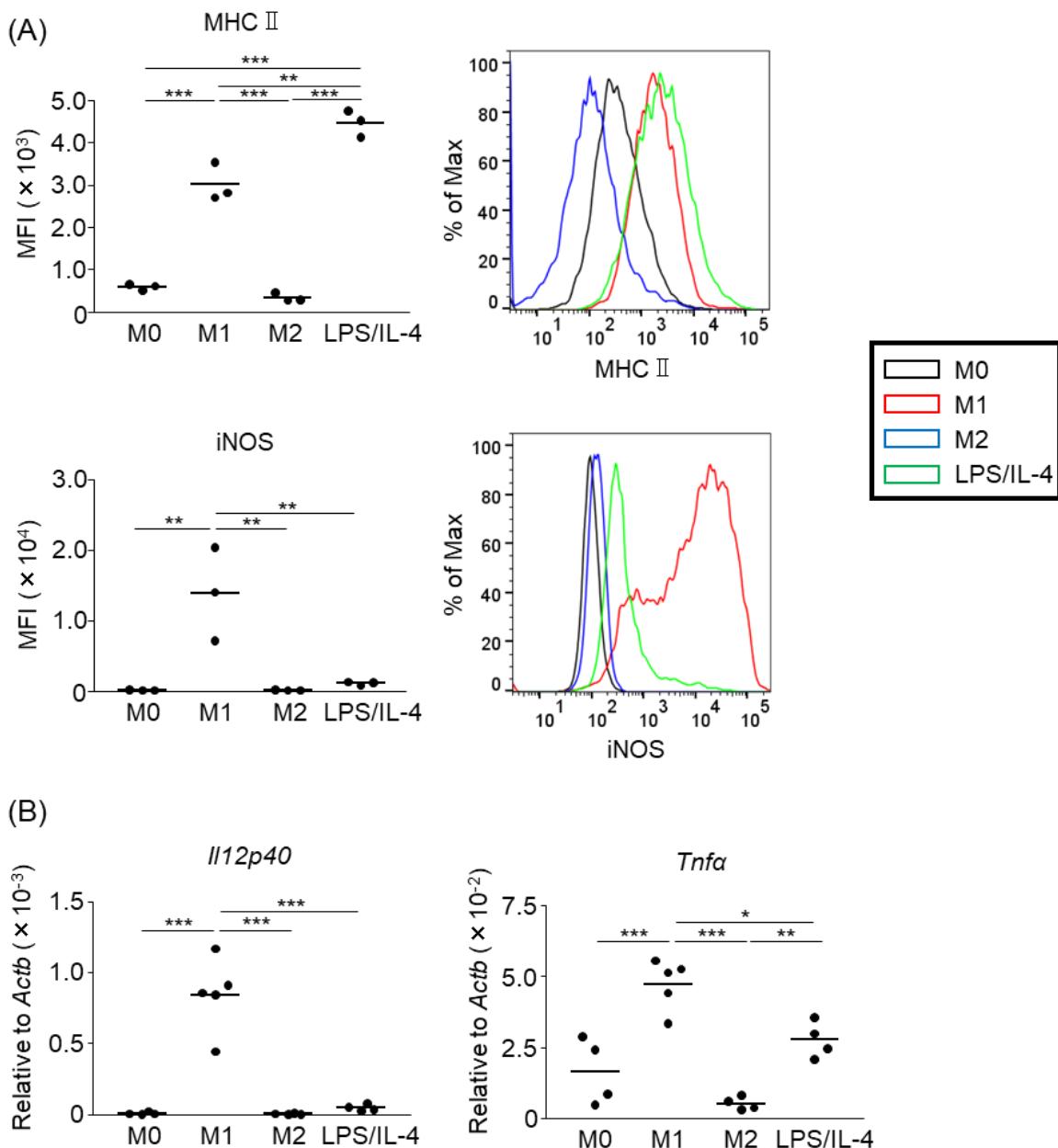
マウス大腿骨と脛骨から骨髓細胞を取り出し、M-CSF 刺激により骨髓由来マクロファージを分化させた。本マクロファージに対して、LPS 刺激により M1 マクロファージを、IL-4 刺激により M2 マクロファージを誘導し、刺激から 24 時間後の細胞形態を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、未刺激のマクロファージ (M0) に比べて、M1 マクロファージは丸い輪郭を帶びており、M2 マクロファージは細胞の両端から突起が伸びていた (Fig. 1)。一方、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージと同様に全体的に丸い輪郭を帶びつつ、一部の細胞で樹状突起が認められた (Fig. 1)。



**Figure 1. Morphology of each macrophage.** Bone marrow-derived macrophages were prepared and stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4. Data are representative of three independent experiments. Scale bars 50  $\mu$ m.

## 2. LPS/IL-4 マクロファージは独自の細胞表面分子および遺伝子発現パターンを示す

M1 マクロファージで高発現する細胞表面分子をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、過去の報告と一致し<sup>3</sup>、M1 マーカーの I-A<sup>b</sup>(MHCII)は、M0 マクロファージに比べて M1 マクロファージで増加し、LPS/IL-4 マクロファージはさらに M1 マクロファージよりも MHCII の発現レベルが高かった(Fig. 2A)。また、M1 マクロファージの iNOS 発現は、M0 マクロファージに比べて増加したが、M0 や M2 マクロファージは同等レベルであった(Fig. 2A)。一方、LPS/IL-4 マクロファージの iNOS 発現レベルは、M0 や M2 に比べてわずかに増加する傾向が認められた(Fig. 2A)。次に、M1 マクロファージで発現誘導される *Il12p40* と *Tnf $\alpha$*  の遺伝子発現レベルを評価した。その結果、M0 に比べて、M1 マクロファージは *Il12p40* の発現が増加した一方、LPS/IL-4 マクロファージは M0 マクロファージと同等レベルであった(Fig. 2B)。また、*Tnf $\alpha$*  は M0 マクロファージでも発現が認められ、M1 マクロファージでは増加し、M2 マクロファージでは低下する傾向を示した(Fig. 2B)。一方で、LPS/IL-4 マクロファージの *Tnf $\alpha$*  は、M0 マクロファージと同等の発現レベルであった(Fig. 2B)。

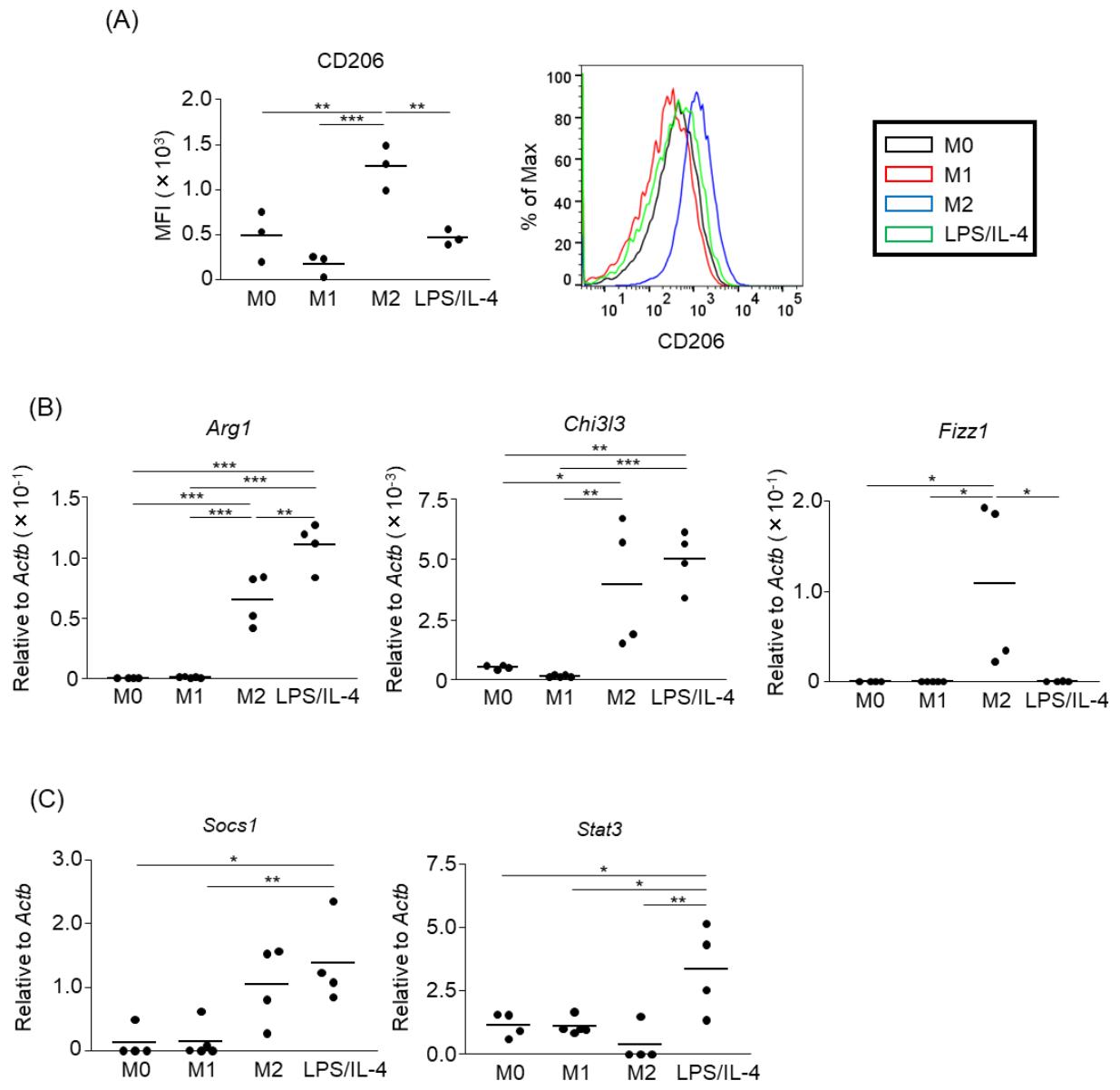


**Figure 2. M1 marker expression profiles of M1 macrophages and LPS/IL-4-induced macrophages.** Bone marrow-derived macrophages were prepared and stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4 for 24 h (A, B). (A) Flow cytometric analysis was performed to examine the expression of M1 markers (i.e., MHCII and iNOS). Mean fluorescence intensity and representative histogram data were shown, and were gated on  $CD45^+$   $CD11b^+$   $F4/80^+$  for MHCII or only live of cells for iNOS. (B) Gene expression levels were examined by reverse

transcription-quantitative PCR analysis. The expression levels of *Il12p40* and *Tnfα* were normalized to that of *Actb*. Each point represents data from an individual experiment. Horizontal bars indicate mean value. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

次に、M2 マクロファージで発現誘導される細胞表面分子 CD206 の発現レベルを評価した。その結果、M0 マクロファージの CD206 発現に比べて、M1 マクロファージは低下する傾向を示し、M2 マクロファージは増加した(Fig. 3A)。一方、LPS/IL-4 マクロファージの CD206 発現は、M0 マクロファージと同等レベルであった(Fig. 3A)。また、M2 マクロファージで発現誘導される遺伝子 *Argl*、*Chi3l3*、*Fizz1* を解析したところ、LPS/IL-4 マクロファージは、M2 マクロファージに比べて *Argl* がさらに高く、*Chi3l3* は同等レベル、*Fizz1* はほとんど発現が認められなかつた(Fig. 3B)。さらに、LPS/IL-4 マクロファージの *Argl* の発現レベルが、M2 に比べてさらに高くなるメカニズムについて検討した。先行研究では *Socs1* が *Argl* 発現に重要な転写因子としてはたらくことが示されているため<sup>12</sup>、本研究においても解析したところ、M0 に比べて M2 マクロファージは *Socs1* の発現が高くなる傾向を示した(Fig. 3C)。また、LPS/IL-4 マクロファージも同様に、M0 や M1 マクロファージに比べて *Socs1* の発現が高いことが分かった(Fig. 3C)。また、*Socs1* と同様に *Argl* 発現に重要な *Stat3* の遺伝子発現レベルを評価した<sup>13</sup>。その結果、M2 マクロファージの *Stat3* 発現は、M0 や M1 マクロファージと同等レベルである一方、LPS/IL-4 マクロファージは、M0 や M1、M2

マクロファージに比べて高いことが分かった(Fig. 3C)。したがって、LPS/IL-4 マクロファージは、*Socs1* だけでなく *Stat3* を介した制御により、*Arg1* 発現を促進させる可能性が示唆された(Fig. 3C)。以上の結果から、従来の M1 や M2 マクロファージとは異なり、LPS/IL-4 マクロファージは、独自の細胞表面分子または遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった。



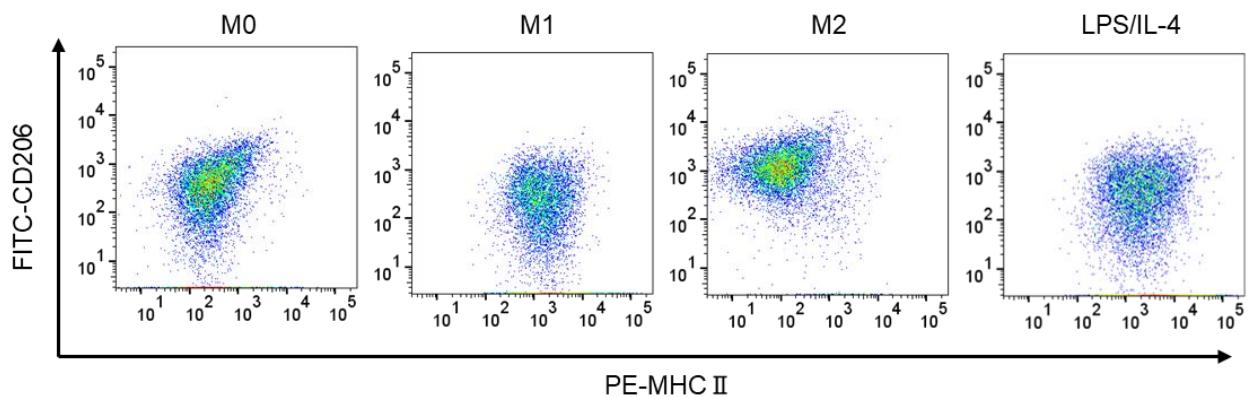
**Figure 3. M2 marker expression profiles of M2 macrophages and LPS/IL-4-induced macrophages.** Bone marrow-derived macrophages were prepared and stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4 for 24 h (A, B). (A) Flow cytometric analysis was performed to examine the expression of the M2 makers (i.e., CD206). Mean fluorescence intensity and representative histogram data were shown and gated on  $CD45^+ CD11b^+ F4/80^+$ . (B, C) Gene expression levels were examined by reverse transcription-quantitative PCR analysis. The expression levels of *Arg1*, *Chi3l3*, *Fizz1*, *Socs1* and *Stat3* were normalized to that of *Actb*. Each

point represents the data from an individual experiment. Horizontal bars indicate mean value.

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

### 3. LPS/IL-4 マクロファージは均一な細胞集団である

LPS/IL-4 マクロファージは、M1 と M2 マクロファージが混在する可能性が考えられた。そこで、フローサイトメトリーで細胞集団を解析したところ、少なくとも MHCII および CD206 で展開したドットプロットデータから、M1 や M2 マクロファージの混在型ではなく、MHCII<sup>+</sup> CD206<sup>-</sup> の均一な細胞集団であることが示唆された (Fig. 4)。

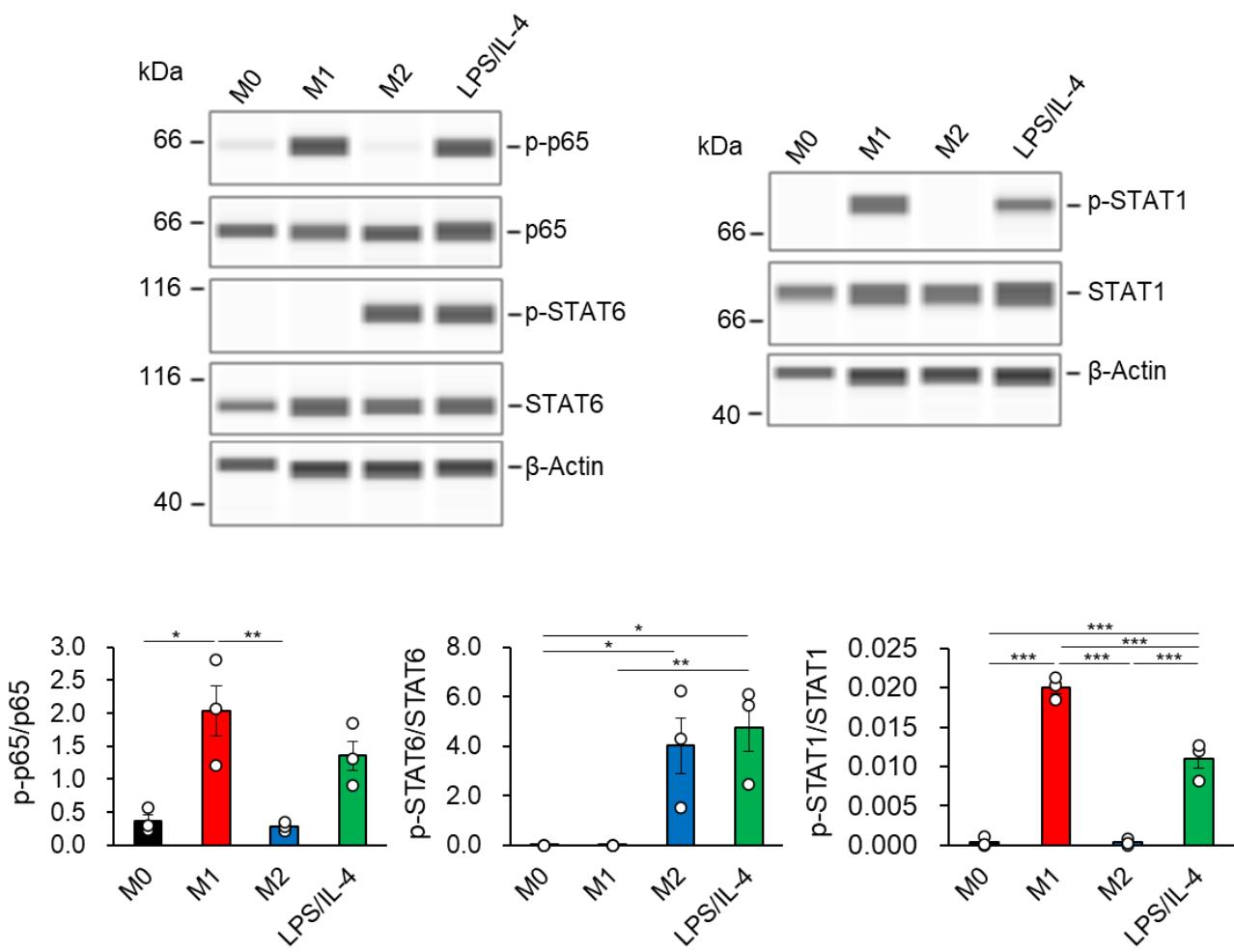


**Figure 4. LPS/IL-4-induced macrophages show a homogeneous population.** Bone marrow-derived macrophages were prepared and stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4 for 24 h. Flow cytometric analysis was performed to examine the expression of MHCII and CD206 gated on CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>. Representative dot plot data are shown.

#### 4. LPS/IL-4 マクロファージは LPS/NF-κB 経路と IL-4/STAT6 経路を活性化させると同時に LPS/STAT1 経路を抑制する

次に、LPS/IL-4 マクロファージの細胞内シグナル伝達経路について解析した。これまでの先行研究から、NF-κB 経路を介した LPS シグナル伝達は、マクロファージの *IL12p40* や *Tnfa* の発現誘導に関与することが明らかにされている<sup>14-16</sup>。一方、IL-4 によって活性化される STAT6 は、LPS 刺激による NF-κB 経路を介した炎症応答性を低下させるはたらきが報告されている<sup>17</sup>。本研究から、LPS/IL-4 マクロファージの *Il12p40* や *Tnfa* は、M1 マクロファージに比べて抑制されていたことから(Fig. 2B)、本細胞の NF-κB 経路の活性化レベルは、M1 マクロファージに比べて低下していることが予想された。そこで、NF-κB 経路の下流シグナル分子である p65 およびリン酸化(p)-p65 と、STAT6 および p-STAT6 の活性化レベルについて、ウェスタンプロット解析により評価した。その結果、過去の報告と一致して、M0 に比べて M1 マクロファージは p-p65 が活性化され、M2 マクロファージは p-STAT6 が活性化されることを確認した(Fig. 5)。一方で、LPS/IL-4 マクロファージは、p-p65 の活性化レベルは M1 マクロファージと同等であり、また、p-STAT6 の活性化レベルも M2 マクロファージと同等であることが分かった(Fig. 5)。そこで、NF-κB 経路以外にも、LPS による STAT1 経路の活性化が、*Il12p40* や *Tnfa* の発現誘導に関与することを示した先行研究に着目し<sup>18-20</sup>、STAT1 および pSTAT1 の活性化レベルをウェスタンプロット解析で評価した。その結果、過去の報告と一致して、M0 に比べて M1 マクロファージは pSTAT1 が活性化していることを確認した(Fig. 5)。一方、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージに比べ

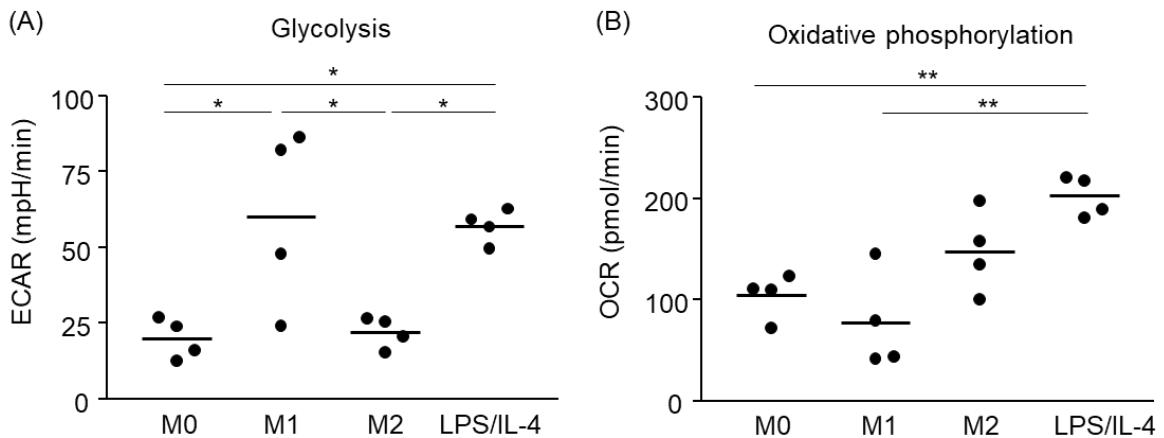
て pSTAT1 の活性化レベルが低下していることを見出した(Fig. 5)。以上の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 や M2 マクロファージとは異なり、LPS/NF-κB 経路と IL-4/STAT6 経路を両方活性化させながら、LPS/STAT1 経路の活性化を抑制する独自の細胞内シグナル伝達を示すことが明らかになった。



**Figure 5. LPS/IL-4-induced macrophages show increased of STAT6 phosphorylation with decreased expression of STAT1 phosphorylation but not p65 phosphorylation.** Each cell was stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4 for 1 h to assess p65, phosphorylated p65 (p-p65), STAT6, p-STAT6 and  $\beta$ -actin, and for 3 h to assess STAT1, p-STAT1 and  $\beta$ -actin. The cell lysates were analyzed by a capillary-based immunoassay with each antibody. Electropherograms could be visualized by calculating chemiluminescence intensity on the Compass Simple Western software. Representative data from three independent experiments are shown. Ratio to phosphorylation: non-phosphorylation was calculated by chemiluminescence intensity of each protein. Data were combined from three independent experiments. Data indicate mean  $\pm$  standard error. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

## 5. LPS/IL-4 マクロファージは解糖系と酸化的リン酸化を同時に活性化させる

過去の報告において、M1 や M2 マクロファージはエネルギー代謝経路の依存性が異なり、また、エネルギー代謝の依存度の違いが細胞の機能にも影響を与えることが明らかにされている<sup>5</sup>。例えば、M1 マクロファージは解糖系が優位となり、さらに解糖系がファゴサイトーシス活性の増強に必須であることが示されている<sup>5, 21, 22</sup>。そこで、フラックスアライザー解析で解糖系の活性化レベルを評価したところ、過去の報告と一致して、M1 マクロファージは M0 や M2 マクロファージよりも解糖系活性が高いことを確認した(Fig. 6A)。一方、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージと同等レベルの強い解糖系活性を示すことが分かった(Fig. 6A)。また、M2 マクロファージは解糖系ではなく酸化的リン酸化優位なエネルギー代謝を示すことが知られており<sup>5-7</sup>、本実験においても、M2 マクロファージの酸化的リン酸化は M0 マクロファージに比べて活性化している傾向が認められた(Fig. 6B)。一方、LPS/IL-4 マクロファージの酸化的リン酸化は、M0 や M1 マクロファージよりも有意に高く、M2 マクロファージに比べて高くなる傾向を示した(Fig. 6B)。以上の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、解糖系と酸化的リン酸化を同時に活性化させるユニークなエネルギー代謝を示すことが分かった。

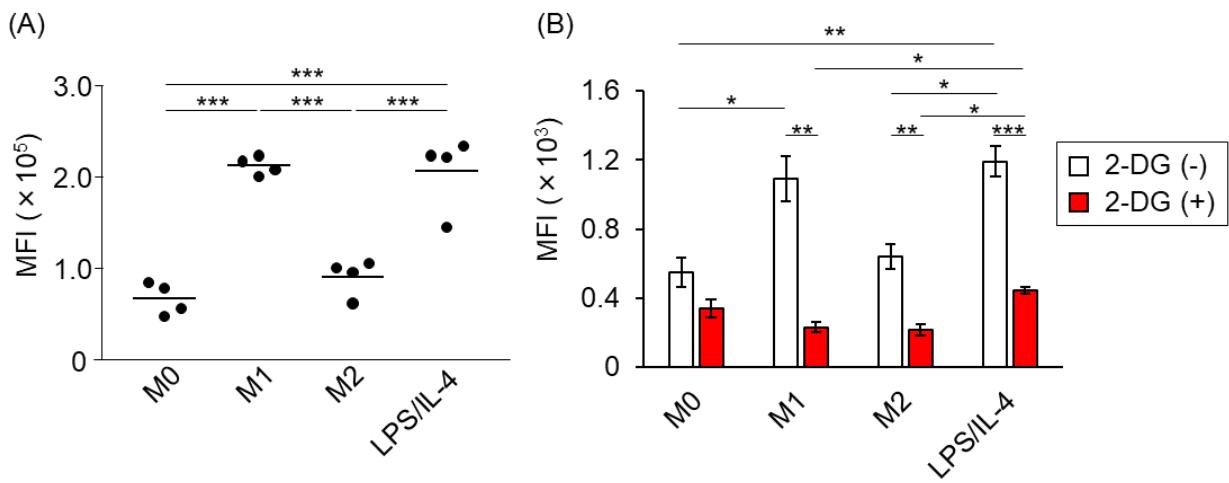


**Figure 6. LPS/IL-4-induced macrophages activate both glycolysis and oxidative phosphorylation.** Bone marrow-derived macrophages were prepared and stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4. (A) Extracellular acidification rate (ECAR) and (B) oxygen consumption rate (OCR) were measured by using a flux analyzer. Results of glycolysis (A) and oxidative phosphorylation (B) were measured by using an XF Mito Stress Kit. Data are combined from three or four independent experiments. Horizontal bars indicate mean. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

## 6. LPS/IL-4 マクロファージは解糖系を活性化させることで強いファゴサイトーシス活性を示す

次に、マクロファージのファゴサイトーシス活性を評価するために、蛍光標識されたビーズの取り込みレベルをフローサイトメトリー解析で評価した。その結果、M0とM2マクロファージは同等のファゴサイトーシス活性を示し、M1マクロファージはM0やM2に比べてファゴサイトーシス活性が高かった(Fig. 7A)。一方で、LPS/IL-4マクロファージは、M1マクロファージと同等レベルの強いファゴサイトーシス活性を示すことが分かった(Fig. 7A)。

また、解糖系の活性化がファゴサイトーシス活性の増強に必要であることから<sup>5</sup>、LPS/IL-4マクロファージで認められたファゴサイトーシス活性増強における解糖系の重要性について、蛍光標識した大腸菌を用いて評価した。その結果、蛍光標識した大腸菌においても、ビーズの取り込み実験と同様の結果が得られた(Fig. 7A)。一方で、グルコースのアナログである2-デオキシグルコースにより解糖系を阻害すると、M1マクロファージおよびLPS/IL-4マクロファージの強いファゴサイトーシス活性は、M0マクロファージと同等レベルまで抑制されることが分かった(Fig. 7B)。また、同条件下では、M1に比べてLPS/IL-4マクロファージのファゴサイトーシス活性が高いことが分かった(Fig. 7B)。以上の結果から、LPS/IL-4マクロファージは、解糖系依存的に強いファゴサイトーシス活性を示すことが明らかになった。



**Figure 7 LPS/IL-4-induced macrophages show strong, glycolysis-dependent phagocytic activity.** Bone marrow-derived macrophages were prepared and stimulated with either LPS, IL-4, or LPS plus IL-4. (A) Phagocytotic assay with fluorescently labeled microbeads (1  $\mu\text{m}$ ) was performed. Mean fluorescence intensity is shown on the basis of flow cytometric analysis. Data are combined from two independent experiments. Horizontal bars indicate mean value. \*\*\* $P<0.001$ . (B) Phagocytotic assay with FITC-staining *Escherichia coli* was performed in the absence or presence of 2-DG. Results are shown on the basis of flow cytometric analysis. Data are combined from two independent experiments. Horizontal bars indicate mean  $\pm$  standard error. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

			M0	M1 (LPS)	M2 (IL-4)	LPS +IL-4
Cell surface	M1 marker	MHCII	Positive	↑↑	(-)	↑↑↑
		iNOS	Negative	↑↑↑	(-)	↑
	M2 marker	CD206	Positive	↓	↑↑	(-)
Gene expression	M1 marker	<i>Il12-p40</i>	Negative	↑↑↑	(-)	(-)
		<i>Tnfa</i>	Positive	↑↑↑	↓	(-)
	M2 marker	<i>Arg1</i>	Negative	(-)	↑↑	↑↑↑
		<i>Chi3l3</i>	Positive	↓	↑↑↑	↑↑↑
		<i>Fizz1</i>	Negative	(-)	↑	(-)
		Phagocytosis (FITC-labeled beads and FITC-staining <i>Escherichia coli</i> )	Positive	↑↑↑	(-)	↑↑↑
Energy metabolism	Glycolysis	Positive	↑↑↑	(-)	↑↑↑	
	Oxidative phosphorylation	Positive	↓	↑↑	↑↑↑	
Expected features of LPS/IL-4 macrophages in vivo						
【Where it can be induced】		Severe asthma, atopic dermatitis, cancer tissue, etc				
【What is the function】		Activated phagocytosis for killing pathogens (ref: Fig. 2A, Fig. 7) Enhanced antigen presentation for induction of T cells proliferation (ref: Fig. 2A) Increased ATP production for cell survival, and mROS production for bacterial killing (ref: Fig. 6) Enhanced Th2 differentiation and abnormal tissue fibrosis (Fig. 3B, Discussion pp. 39-40)				

**Table 1 Summary of LPS/IL-4-induced macrophage features.**

## 考察

本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、従来型の M1 や M2 マクロファージとは異なり、独自の表現型や機能性を示すことが明らかになった(Table 1)。

私たちの体を構成する細胞は、細胞増殖やアポトーシス、細胞分化などに関連して細胞の形状に変化をもたらす<sup>23-26</sup>。マクロファージは細胞表面に発現する受容体でシグナル分子を認識し、性状変化を誘導するような細胞内シグナル分子を活性化させる。例えば、マクロファージは LPS や IL-4 を認識し、NF-κB 経路や STAT6 経路などの細胞内シグナル分子を活性化させるとともに (Fig. 5)、M1 マクロファージは丸い輪郭を帶び、M2 マクロファージは両端から突起が伸長するような形状変化を示した (Fig. 1)。また、生体内においても、マウスの小腸に局在するマクロファージは、細胞表面に発現する G タンパク質共役型受容体 (GPR) 31 が乳酸やピルビン酸を認識し、腸管上皮細胞の間から樹状突起を伸長させる<sup>27</sup>。さらに、この GPR31<sup>+</sup>マクロファージは、樹状突起の伸長と関連して病原微生物を効率良く取り込み、宿主の病原微生物に対する免疫応答を増強させることができ<sup>27</sup>。このように、マクロファージの形状変化は、細胞の機能だけでなく、個体レベルの免疫応答にも大きな影響を及ぼすことが明らかにされている。一方で、マクロファージの機能変化は、サイトカインのような細胞外シグナル分子非依存的なメカニズムにより誘導されることも先行研究によって示されている<sup>28</sup>。例えば、M2 マクロファージに特徴的な細胞の樹状突起を、IL-4/IL-13 非存在下で人工

的に誘導したところ、M2 マクロファージで高発現する Arg1 や CD206 の発現が増加する<sup>28</sup>。また、本細胞の樹状突起に関わるアクチン重合などを阻害すると、Arg1 発現が顕著に低下する<sup>28</sup>。本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージの細胞形状は、M1 マクロファージと同様に全体的に丸い輪郭を帶びながら、一部の細胞で樹状突起が認められた (Fig. 1)。LPS/IL-4 マクロファージの丸い輪郭は解糖系を活性化させる M1 マクロファージに、樹状突起は TCA 回路や酸化的リン酸化を活性化させる M2 マクロファージに特徴的であり、両経路を同時に活性化させる本細胞独自のエネルギー代謝変化と合致する一方で (Fig. 6)、本細胞の *IL12p40* や *Tnfa* が M0 マクロファージと同等レベルまで抑制されることや (Fig. 2B)、M2 マクロファージで高発現する *Fizz1* が本細胞で全く認められないことは (Fig. 3B)、細胞の形状変化と機能との関連に関する先行研究の知見<sup>28</sup>と合致しない点として挙げられる。以上のことから、LPS/IL-4 マクロファージは、常に画一的な細胞形態を示すのではなく、一定の時間毎に不特定多数の細胞が樹状突起を一時的に誘導するような形状変化を示す可能性が考えられる。これらを明らかにするためには、今後、M0 や M1、M2 マクロファージを含め、経時に LPS/IL-4 マクロファージの形状変化を観察する必要があり、また LPS/IL-4 マクロファージの樹状突起や細胞面積などを解析して定量化することが、本細胞特異的な形状変化と機能との関連解明に貢献するものと考えられる。

マクロファージは細菌などの病原微生物を排除するために、iNOS を高発現させてアルギニンから殺菌分子 NO を高産生させる<sup>29, 30</sup>。一方で、iNOS と競合的にアルギ

ニンを代謝する *ArgI* は、結核菌のような細胞内寄生菌の排除に関わる NO 産生を顕著に抑制するはたらきが報告されている<sup>31</sup>。つまり、iNOS や *ArgI* は、マクロファージの NO 産生制御において対極的な役割を果たすものと考えられる。本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージに比べて iNOS の発現が非常に低く、M2 マクロファージに比べて *ArgI* の発現が高いことが分かった (Fig. 2A、Fig. 3B)。したがって、LPS/IL-4 マクロファージは NO による殺菌能が低いものの、アルギニン代謝物を積極的に産生する可能性が示唆された。また、先行研究では、線維化した組織に局在する M2 マクロファージは *ArgI* を高発現していることや、ブレオマイシン誘導性肺線維症の動物モデルや特発性肺線維症のヒト患者の肺組織において、プロリンやオルニチンなどの線維化に関わるアルギニン代謝物が増加することが報告されている<sup>32-35</sup>。したがって、LPS/IL-4 マクロファージは、M2 マクロファージと同様にアルギニン代謝物を積極的に産生することで、組織の纖維化などの病態形成に深く関与する可能性が考えられる。

菌体成分やサイトカインなどの刺激により、その下流に存在する転写因子などのシグナル伝達分子は活性化される。活性化された転写因子などのシグナル伝達分子は、マクロファージの表現型を決定する重要な因子としてはたらく<sup>14-16</sup>。例えば、LPS 刺激により誘導される M1 マクロファージは、NF-κB 経路の p-p65 により IL-12p40、iNOS、TNFα の産生促進を介して炎症に深く関与する<sup>14-16</sup>。また、これまでの研究から、p65 のリン酸化部位が異なることで、炎症に関わる遺伝子の発現パターンが変化することが明らか

にされている。例えば、LPS 刺激による NF-κB 経路の活性化において、p65 をコードする 536 番目のセリン (Ser<sup>536</sup>) のリン酸化は炎症に関わる遺伝子の発現促進に関わるが、p65 (Ser<sup>534</sup>) のリン酸化は炎症に関わる遺伝子の発現増強を抑制するはたらきがある<sup>36-39</sup>。本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージに比べて *Il12p40*、iNOS、*Tnfa* の発現が抑制される一方で (Fig. 2A, B)、ウェスタンブロット解析から、LPS/IL-4 マクロファージの p65 (Ser<sup>536</sup>) のリン酸化レベルは M1 マクロファージと同等レベルであることが分かった (Fig. 5)。したがって、今後は、LPS/IL-4 マクロファージにおける p65 (Ser<sup>534</sup>) のリン酸化レベルが M1 マクロファージに比べて高い可能性など、リン酸化部位ごとに p65 の活性化レベルを明らかにすることで、本細胞特異的な性状変化を見出せる可能性があると考えられる。また、p65 だけでなく STAT1 のリン酸化も評価したところ、LPS/IL-4 マクロファージの STAT1 のリン酸化は M1 マクロファージに比べて抑制されることが分かった (Fig. 5)。p65 と同様に、STAT1 のリン酸化部位の違いも遺伝子発現や細胞内シグナル伝達を左右する重要な因子の 1 つとして見出されており、例えば、STAT1 (Thr<sup>748</sup>) のリン酸化は LPS 刺激により誘導される IL-12p40 などの遺伝子発現誘導に関わる一方、STAT1 (Tyr<sup>701</sup>) のリン酸化は IFN シグナル伝達に関与する<sup>18, 40</sup>。特に、IFN $\gamma$  により誘導されるマクロファージの STAT1 は、*Tnfa* や *Il12p40* のプロモーター領域のヒストンアセチル化を誘導することで、LPS による *Tnfa* や *Il12p40* の転写を促進することが報告されている<sup>19, 41</sup>。したがって、LPS/IL-4 マクロファージは、IFN シグナル伝達に関わる

STAT1 (Tyr<sup>701</sup>) のリン酸化抑制を介して、*Il12p40* や *Tnfa* のプロモーター領域のヒストンアセチル化誘導を抑制し、*Il12p40* と *Tnfa* の発現を M1 マクロファージに比べて低下させたと推察される。また、STAT1 (Tyr<sup>701</sup>) だけでなく、LPS に起因する炎症応答を担う STAT1 (Thr<sup>748</sup>) におけるリン酸化レベルも含めて包括的に解析することで、LPS/IL-4 マクロファージ独自の遺伝子発現制御メカニズムを明らかにできると考えられる。このようなシグナル分子のリン酸化だけでなく、核内転写レベルにおいても M1 と LPS/IL-4 マクロファージに差異があると予想される。過去の報告では、IL-4 によって誘導される STAT6 が、LPS/NF- $\kappa$ B によって誘導される遺伝子発現を転写レベルで抑制することが報告されている<sup>20</sup>。そのメカニズムとして、転写因子に結合して転写効率を高めるコアクチベーターCREB-binding protein (CBP) が、STAT6 と p65 によって競合的に利用される点について考察されている<sup>20</sup>。本考察を考慮すると、LPS/IL-4 マクロファージは、p65 だけでなく活性化された STAT6 も CBP を競合的に利用するため、p65 による *Il12p40*、iNOS、*Tnfa* の転写効率を M1 マクロファージに比べて低下させた可能性が考えられる。また、STAT1 も *Il12p40* の発現制御に CBP を利用することが報告されているため<sup>20</sup>、LPS/IL-4 マクロファージの *Il12p40* の遺伝子発現抑制に STAT1 の関与が示唆される。サイトカインや転写因子だけでなく、細胞内のエネルギー代謝変化と細胞の機能制御との関連が近年明らかにされている。特に、マクロファージの活性化状態やサブセットの種類によって、解糖系や酸化的リン酸化などのエネルギー代謝の要求性が変化する<sup>5</sup>。例えば、M1 マクロファージは解糖系を活性化させるために律速段階酵素であるホスホ

フルクトキナーゼを活性型アイソフォームへ変換することや<sup>42</sup>、M2 マクロファージはグルタミン代謝や糖鎖付加反応を促進してレクチン受容体を高発現させることが報告されている<sup>43</sup>。このようなエネルギー代謝の変化は、マクロファージの機能と深く関連することが明らかにされている。例えば、M1 マクロファージは解糖系と解糖系から分岐するペントースリン酸経路を活性化させることで、ROS 産生を促進し病原微生物の殺菌に寄与している<sup>5</sup>。また、M2 マクロファージは、CD36 を高発現させて超低密度リポタンパク質などを取り込み、β 酸化や酸化的リン酸化を活性化することで、寄生虫感染に対する免疫応答を担う M2 形質の維持に寄与する<sup>44</sup>。本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 や M2 マクロファージとは異なり、解糖系と酸化的リン酸化の両方を強く活性化する独特のエネルギー代謝を示すことが分かった (Fig. 6)。このような独自のエネルギー代謝変化は、以下のように、本細胞の性状や機能に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。

LPS/IL-4 マクロファージの性状について、M2 マクロファージは STAT6 依存的に CD206 発現を増加させるが<sup>45</sup>、本細胞の CD206 発現は M0 マクロファージと同等レベルまで抑制されることが分かった (Fig. 3A)。一方、M2 マクロファージの *Fizz1* の発現は、M0 マクロファージに比べて増加していたが、LPS/IL-4 マクロファージは全く発現が認められなかった (Fig. 3B)。これらの性状変化は、M2 マクロファージで活性化されるグルタミン代謝が、LPS/IL-4 マクロファージにおいて独自に変化したことによる起因すると考えられた。先行研究では、M2 マクロファージのグルタミンはウリジ

ン二リン酸-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)の合成に利用され、CD206 のグリコシル化や *Fizz1* の発現促進に関与することが示されている<sup>43</sup>。また、M2 マクロファージのグルタミンは UDP-GlcNAc の合成だけでなく、TCA 回路の主要な基質の 1 つである  $\alpha$ -ケトグルタル酸の合成にも利用されている<sup>43</sup>。一方、LPS/IL-4 マクロファージは、M2 マクロファージに比べて *Fizz1* の発現が全く認められず、CD206 の発現は M0 マクロファージと同等レベルまで抑制された (Fig. 3A, B)。また、LPS/IL-4 マクロファージは、M2 マクロファージに比べて酸化的リン酸化が高くなる傾向を示した (Fig. 6)。以上の結果から、LPS/IL-4 マクロファージのグルタミンは、M2 マクロファージとは異なり、UDP-GlcNAc 合成よりも  $\alpha$ -ケトグルタル酸合成に積極的に利用され、酸化的リン酸化を強く活性化している可能性が考えられた。一方で、LPS/IL-4 マクロファージの *Fizz1* 遺伝子発現が全く認められなかった点については、今後、LPS による *Fizz1* 遺伝子発現制御とグルタミン代謝との関連について明らかにしたいと考えている。

LPS/IL-4 マクロファージの機能について、本細胞は M1 マクロファージと同様に強いファゴサイトーシス活性を示し、本活性の増強には解糖系が必須であることを明らかにした (Fig. 7B)。また、解糖系を阻害した条件下では、M1 に比べて LPS/IL-4 マクロファージはファゴサイトーシス活性が高いことが分かった (Fig. 7B)。過去の報告では、脳に局在する貪食細胞として知られるミクログリア細胞は、ファゴサイトーシス活性を増強させると同時に酸化的リン酸化も活性化させることができるとされている<sup>46</sup>。また、肺がんの予後不良との関連が指摘されている特定の腫瘍隨伴マクロファージサブセッ

トは、がん細胞を貪食する際に酸化的リン酸化を活性化させることが明らかにされている<sup>47</sup>。したがって、LPS/IL-4 マクロファージのファゴサイトーシス活性は主に解糖系に依存しているが、少なからず酸化的リン酸化もファゴサイトーシス活性に関与する可能性が推察される。解糖系の重要性はファゴサイトーシスだけでなく、NO や ROS などの殺菌分子の產生においても明らかにされている<sup>5,21</sup>。本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、iNOS の発現レベルが非常に低いことから、NO 産生量は極めて低いと考えられる。一方で、解糖系の活性化レベルは M1 マクロファージと同程度であることから (Fig. 6A)、ペントースリン酸経路の活性化を介した LPS/IL-4 マクロファージの ROS 産生量は、M1 マクロファージと同等レベルであることが推察される。また、NADPH オキシダーゼ由来の ROS に加えて、ミトコンドリア由来の ROS (mitochondrial ROS; mROS) も殺菌分子として重要なことが報告されている<sup>48</sup>。本研究の結果から、LPS/IL-4 マクロファージは、M0 や M1 マクロファージよりも酸化的リン酸化の活性化レベルが高く、M2 マクロファージよりも高くなる傾向を示した (Fig. 6B)。したがって、LPS/IL-4 マクロファージの mROS 産生レベルは高いことが推察される。以上のことから、LPS/IL-4 マクロファージは、M1 マクロファージよりも NO 産生能が低い一方で、mROS を含む ROS の総生産量は M1 マクロファージよりも高い可能性が考えられる。今後、LPS/IL-4 マクロファージのファゴサイトーシス後の殺菌能について、NO 産生だけでなく ROS 産生及び mROS 産生との関連を含めて明らかにしたいと考えている。

生体内のマクロファージは複雑多様な生体内因子に暴露されているため、单一刺激で誘導される M1 や M2 マクロファージに区分されない表現型を示すことが複数の論文で報告されている。例えば、炎症から回復する時期に単離されたマクロファージは、炎症促進や収束に関わる iNOS や IL-10 を同時に高産生することが明らかにされている<sup>49</sup>。

また、慢性静脈うっ滞性下腿潰瘍の皮膚組織に局在するマクロファージは、M1 マクロファージで高発現する TNF- $\alpha$  や IL-12p40、M2 マクロファージで高発現する Arg1 や CD206 を同時に発現することが明らかにされている<sup>50</sup>。さらに、新しい悪玉破骨細胞の前駆体として同定された CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> Ly6C<sup>int</sup> F4/80<sup>+</sup> I-A<sup>+</sup> / I-E<sup>+</sup>マクロファージや、アレルギー・線維症・メタボリックシンドロームのような疾患特異的に誘導されるマクロファージなど、従来の M1 や M2 マクロファージに区分されないサブセットが次々と同定されている<sup>51-56</sup>。本研究の実験条件を考慮すると、例えば、喘息時に細菌感染が生じることで発症する難治性喘息では、肺組織に LPS および IL-4 が共存するため<sup>11, 17</sup>、LPS/IL-4 マクロファージサブセットが存在する可能性は高いと考えられる。また、LPS/IL-4 マクロファージは、CD4<sup>+</sup>T 細胞からの IL-5 および IL-13 産生を抑制するタンパク質 *Fizz1* の発現が認められなかったことから<sup>57</sup>、喘息の病態をさらに増悪化させる可能性が考えられる。さらに、LPS/IL-4 マクロファージは、M2 マクロファージに比べて *Arg1* 発現が高いことから、病的組織の線維化に関与する可能性が考えられる。今後、上述した難治性喘息の肺組織を含め、LPS と IL-4 が共存すると予想される生体内組織環境を中心に、

LPS/IL-4 マクロファージサブセットの検出と同定、さらには生理学的意義を明らかに  
したいと考えている。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始格別のご指導を賜り、研究に対する姿勢や研究者の魅力をご教授下さいました恩師、大阪大学大学院薬学研究科ワクチン材料学分野 國澤純 招  
へい教授（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所 副所長/ヘルス・メディカル微生物研究センター長）に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、修士課程の2年間、当研究室の主任研究員としてご指導を賜り、いつも温かく見守り励ましてくださいました、長竹貴広 博士（明治大学農学部生体機構学研究室 専任准教授）に心から深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、日々種々のご指導を賜り支えていただきました、医薬基盤・健康・栄養研究所ヘルス・メディカル微生物研究センターワクチンマテリアルプロジェクト・腸内環境システムプロジェクト 細見晃司 博士（現：大阪公立大学獣医感染症学教室 准教授）、河合総一郎 博士、近藤早希 博士、雑賀あづさ 博士（現：Agency for Science, Technology and Research）、真田喬行 博士（現：国際医療福祉大学成田病院呼吸器内科 准教授）、堀田将志 医師、Prabha Tiwari 博士（現：慶應義塾大学微生物学・免疫学教室 特任助手）、平田宗一郎 博士（現：サノフィ株式会社）に心から深く感謝いたします。

また、実験の技術的なサポートや活発なディスカッション、滞りなく研究活動に打ち込める環境を作ってくださいました、医薬基盤・健康・栄養研究所ヘルス・メディカル

微生物研究センターウクチンマテリアルプロジェクト・腸内環境システムプロジェクトの皆様、大阪大学大学院薬学研究科・医学系研究科の連携大学院生の皆様、研究を通じて知り合えた友人に心から深く感謝いたします。

最後に、在学中に経済的な援助を賜りました、次世代研究者挑戦的研究プログラム、日本学術振興会、また、学生生活をいつも温かく見守り支えてくれた家族に心から深く感謝いたします。

## 参考文献

- (1) Chernyak, L.; Tauber, A. I. The birth of immunology: Metchnikoff, the embryologist. *Cell Immunol* **1988**, *117*(1), 218-233. DOI: 10.1016/0008-8749(88)90090-1.
- (2) Gordon, S. Phagocytosis: The Legacy of Metchnikoff. *Cell* **2016**, *166* (5), 1065-1068. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.017.
- (3) Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S. A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J. T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* **2018**, *233*(9), 6425-6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.
- (4) O'Neill, L. A.; Kishton, R. J.; Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* **2016**, *16*(9), 553-565. DOI: 10.1038/nri.2016.70.
- (5) Viola, A.; Munari, F.; Sánchez-Rodríguez, R.; Scolaro, T.; Castegna, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1462. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01462.
- (6) O'Neill, L. A.; Pearce, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* **2016**, *213*(1), 15-23. DOI: 10.1084/jem.20151570.
- (7) Liu, Y.; Xu, R.; Gu, H.; Zhang, E.; Qu, J.; Cao, W.; Huang, X.; Yan, H.; He, J.; Cai, Z. Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark Res* **2021**, *9* (1), 1. DOI: 10.1186/s40364-020-00251-y.
- (8) Ogger, P. P.; Byrne, A. J. Macrophage metabolic reprogramming during chronic lung disease. *Mucosal Immunol* **2021**, *14* (2), 282-295. DOI: 10.1038/s41385-020-00356-5.
- (9) Luger, T.; Amagai, M.; Dreno, B.; Dagnelie, M. A.; Liao, W.; Kabashima, K.; Schikowski, T.; Proksch, E.; Elias, P. M.; Simon, M.; et al. Atopic dermatitis: Role of the skin barrier, environment, microbiome, and therapeutic agents. *J Dermatol Sci* **2021**, *102* (3), 142-157. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2021.04.007.
- (10) Czimmerer, Z.; Halasz, L.; Daniel, B.; Varga, Z.; Bene, K.; Domokos, A.; Hoeksema, M.; Shen, Z.; Berger, W. K.; Cseh, T.; et al. The epigenetic state of IL-4-polarized macrophages enables inflammatory cistromic expansion and extended synergistic response to TLR ligands. *Immunity* **2022**, *55* (11), 2006-2026.e2006. DOI: 10.1016/j.jimmuni.2022.10.004.
- (11) Wang, L.; Netto, K. G.; Zhou, L.; Liu, X.; Wang, M.; Zhang, G.; Foster, P. S.; Li, F.; Yang, M. Single-cell transcriptomic analysis reveals the immune landscape of lung in steroid-resistant asthma exacerbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118* (2). DOI: 10.1073/pnas.2005590118.
- (12) Whyte, C. S.; Bishop, E. T.; Rückerl, D.; Gaspar-Pereira, S.; Barker, R. N.; Allen, J. E.; Rees, A. J.; Wilson, H. M. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *J Leukoc Biol* **2011**, *90* (5), 845-854. DOI: 10.1189/jlb.1110644.

- (13) Miki, S.; Suzuki, J. I.; Takashima, M.; Ishida, M.; Kokubo, H.; Yoshizumi, M. S-1-Propenylcysteine promotes IL-10-induced M2c macrophage polarization through prolonged activation of IL-10R/STAT3 signaling. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 22469. DOI: 10.1038/s41598-021-01866-3.
- (14) Tak, P. P.; Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* **2001**, *107* (1), 7-11. DOI: 10.1172/JCI11830.
- (15) Li, Q.; Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2002**, *2* (10), 725-734. DOI: 10.1038/nri910.
- (16) Wang, N.; Liang, H.; Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* **2014**, *5*, 614. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00614.
- (17) Czimmerer, Z.; Daniel, B.; Horvath, A.; Rückerl, D.; Nagy, G.; Kiss, M.; Peloquin, M.; Budai, M. M.; Cuaranta-Monroy, I.; Simandi, Z.; et al. The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity* **2018**, *48* (1), 75-90.e76. DOI: 10.1016/j.jimmuni.2017.12.010.
- (18) Metwally, H.; Tanaka, T.; Li, S.; Parajuli, G.; Kang, S.; Hanieh, H.; Hashimoto, S.; Chalise, J. P.; Gemechu, Y.; Standley, D. M.; et al. Noncanonical STAT1 phosphorylation expands its transcriptional activity into promoting LPS-induced IL-6 and IL-12p40 production. *Sci Signal* **2020**, *13* (624). DOI: 10.1126/scisignal.aay0574.
- (19) Nakanishi, Y.; Sato, T.; Takahashi, K.; Ohteki, T. IFN-γ-dependent epigenetic regulation instructs colitogenic monocyte/macrophage lineage differentiation in vivo. *Mucosal Immunol* **2018**, *11* (3), 871-880. DOI: 10.1038/mi.2017.104.
- (20) Ohmori, Y.; Hamilton, T. A. Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. *J Biol Chem* **2000**, *275* (48), 38095-38103. DOI: 10.1074/jbc.M006227200.
- (21) Michl, J.; Ohlbaum, D. J.; Silverstein, S. C. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. *J Exp Med* **1976**, *144* (6), 1484-1493. DOI: 10.1084/jem.144.6.1484.
- (22) Pavlou, S.; Wang, L.; Xu, H.; Chen, M. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *J Inflamm (Lond)* **2017**, *14*, 4. DOI: 10.1186/s12950-017-0151-x.
- (23) Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* **1978**, *273* (5661), 345-349. DOI: 10.1038/273345a0.
- (24) Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* **1997**, *276* (5317), 1425-1428. DOI: 10.1126/science.276.5317.1425.
- (25) Versaevel, M.; Grevesse, T.; Gabriele, S. Spatial coordination between cell and nuclear

- shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun* **2012**, *3*, 671. DOI: 10.1038/ncomms1668.
- (26) McBeath, R.; Pirone, D. M.; Nelson, C. M.; Bhadriraju, K.; Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* **2004**, *6*(4), 483-495. DOI: 10.1016/s1534-5807(04)00075-9.
- (27) Morita, N.; Umemoto, E.; Fujita, S.; Hayashi, A.; Kikuta, J.; Kimura, I.; Haneda, T.; Imai, T.; Inoue, A.; Mimuro, H.; et al. GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1. *Nature* **2019**, *566*(7742), 110-114. DOI: 10.1038/s41586-019-0884-1.
- (28) McWhorter, F. Y.; Wang, T.; Nguyen, P.; Chung, T.; Liu, W. F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (43), 17253-17258. DOI: 10.1073/pnas.1308887110.
- (29) Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol* **2015**, *36*(3), 161-178. DOI: 10.1016/j.it.2015.01.003.
- (30) Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* **1997**, *100*(10), 2417-2423. DOI: 10.1172/JCI119782.
- (31) El Kasmi, K. C.; Qualls, J. E.; Pesce, J. T.; Smith, A. M.; Thompson, R. W.; Henao-Tamayo, M.; Basaraba, R. J.; König, T.; Schleicher, U.; Koo, M. S.; et al. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* **2008**, *9*(12), 1399-1406. DOI: 10.1038/ni.1671.
- (32) Murthy, S.; Larson-Casey, J. L.; Ryan, A. J.; He, C.; Kobzik, L.; Carter, A. B. Alternative activation of macrophages and pulmonary fibrosis are modulated by scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure. *FASEB J* **2015**, *29* (8), 3527-3536. DOI: 10.1096/fj.15-271304.
- (33) Laskin, D. L.; Malaviya, R.; Laskin, J. D. Role of Macrophages in Acute Lung Injury and Chronic Fibrosis Induced by Pulmonary Toxicants. *Toxicol Sci* **2019**, *168* (2), 287-301. DOI: 10.1093/toxsci/kfy309.
- (34) Gao, L.; Zhang, J. H.; Chen, X. X.; Ren, H. L.; Feng, X. L.; Wang, J. L.; Xiao, J. H. Combination of L-Arginine and L-Norvaline protects against pulmonary fibrosis progression induced by bleomycin in mice. *Biomed Pharmacother* **2019**, *113*, 108768. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108768.
- (35) Zhao, Y. D.; Yin, L.; Archer, S.; Lu, C.; Zhao, G.; Yao, Y.; Wu, L.; Hsin, M.; Waddell, T. K.; Keshavjee, S.; et al. Metabolic heterogeneity of idiopathic pulmonary fibrosis: a metabolomic study. *BMJ Open Respir Res* **2017**, *4*(1), e000183. DOI: 10.1136/bmjresp-2017-000183.
- (36) Ghosh, S.; Karin, M. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* **2002**, *109 Suppl*, S81-96. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00703-1.
- (37) Sakurai, H.; Chiba, H.; Miyoshi, H.; Sugita, T.; Toriumi, W. IkappaB kinases phosphorylate NF- $\kappa$ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **1999**, *274*(43), 30353-30356. DOI: 10.1074/jbc.274.43.30353.

- (38) Pradère, J. P.; Hernandez, C.; Koppe, C.; Friedman, R. A.; Luedde, T.; Schwabe, R. F. Negative regulation of NF-κB p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Sci Signal* **2016**, *9* (442), ra85. DOI: 10.1126/scisignal.aab2820.
- (39) Chakravarty, S.; Varghese, M.; Fan, S.; Taylor, R. T.; Chakravarti, R.; Chattopadhyay, S. IRF3 inhibits inflammatory signaling pathways in macrophages to prevent viral pathogenesis. *Sci Adv* **2024**, *10* (32), eadn2858. DOI: 10.1126/sciadv.adn2858.
- (40) Metwally, H.; Elbrashy, M. M.; Ozawa, T.; Okuyama, K.; White, J. T.; Tulyeu, J.; Søndergaard, J. N.; Wing, J. B.; Muratsu, A.; Matsumoto, H.; et al. Threonine phosphorylation of STAT1 restricts interferon signaling and promotes innate inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2024**, *121* (17), e2402226121. DOI: 10.1073/pnas.2402226121.
- (41) Qiao, Y.; Giannopoulou, E. G.; Chan, C. H.; Park, S. H.; Gong, S.; Chen, J.; Hu, X.; Elemento, O.; Ivashkiv, L. B. Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon-γ-induced chromatin remodeling and toll-like receptor signaling. *Immunity* **2013**, *39* (3), 454-469. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.009.
- (42) O'Neill, L. A. A broken krebs cycle in macrophages. *Immunity* **2015**, *42* (3), 393-394. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.017.
- (43) Jha, A. K.; Huang, S. C.; Sergushichev, A.; Lampropoulou, V.; Ivanova, Y.; Loginicheva, E.; Chmielewski, K.; Stewart, K. M.; Ashall, J.; Everts, B.; et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* **2015**, *42* (3), 419-430. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.005.
- (44) Huang, S. C.; Everts, B.; Ivanova, Y.; O'Sullivan, D.; Nascimento, M.; Smith, A. M.; Beatty, W.; Love-Gregory, L.; Lam, W. Y.; O'Neill, C. M.; et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* **2014**, *15* (9), 846-855. DOI: 10.1038/ni.2956.
- (45) Cosín-Roger, J.; Ortiz-Masiá, D.; Calatayud, S.; Hernández, C.; Esplugues, J. V.; Barrachina, M. D. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol* **2016**, *9* (4), 986-998. DOI: 10.1038/mi.2015.123.
- (46) Song, S.; Yu, L.; Hasan, M. N.; Paruchuri, S. S.; Mullett, S. J.; Sullivan, M. L. G.; Fiesler, V. M.; Young, C. B.; Stolz, D. B.; Wendell, S. G.; et al. Elevated microglial oxidative phosphorylation and phagocytosis stimulate post-stroke brain remodeling and cognitive function recovery in mice. *Commun Biol* **2022**, *5* (1), 35. DOI: 10.1038/s42003-021-02984-4.
- (47) Gonzalez, M. A.; Lu, D. R.; Yousefi, M.; Kroll, A.; Lo, C. H.; Briseño, C. G.; Watson, J. E. V.; Novitskiy, S.; Arias, V.; Zhou, H.; et al. Phagocytosis increases an oxidative metabolic and immune suppressive signature in tumor macrophages. *J Exp Med* **2023**, *220* (6). DOI: 10.1084/jem.20221472.

- (48) West, A. P.; Brodsky, I. E.; Rahner, C.; Woo, D. K.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Walsh, M. C.; Choi, Y.; Shadel, G. S.; Ghosh, S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **2011**, *472* (7344), 476-480. DOI: 10.1038/nature09973.
- (49) Bystrom, J.; Evans, I.; Newson, J.; Stables, M.; Toor, I.; van Rooijen, N.; Crawford, M.; Colville-Nash, P.; Farrow, S.; Gilroy, D. W. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* **2008**, *112* (10), 4117-4127. DOI: 10.1182/blood-2007-12-129767.
- (50) Sindrilaru, A.; Peters, T.; Wieschalka, S.; Baican, C.; Baican, A.; Peter, H.; Hainzl, A.; Schatz, S.; Qi, Y.; Schlecht, A.; et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest* **2011**, *121* (3), 985-997. DOI: 10.1172/JCI44490.
- (51) Hasegawa, T.; Kikuta, J.; Sudo, T.; Matsuura, Y.; Matsui, T.; Simmons, S.; Ebina, K.; Hirao, M.; Okuzaki, D.; Yoshida, Y.; et al. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nat Immunol* **2019**, *20* (12), 1631-1643. DOI: 10.1038/s41590-019-0526-7.
- (52) Satoh, T.; Takeuchi, O.; Vandenbon, A.; Yasuda, K.; Tanaka, Y.; Kumagai, Y.; Miyake, T.; Matsushita, K.; Okazaki, T.; Saitoh, T.; et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* **2010**, *11* (10), 936-944. DOI: 10.1038/ni.1920.
- (53) Satoh, T.; Nakagawa, K.; Sugihara, F.; Kuwahara, R.; Ashihara, M.; Yamane, F.; Minowa, Y.; Fukushima, K.; Ebina, I.; Yoshioka, Y.; et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* **2017**, *541* (7635), 96-101. DOI: 10.1038/nature20611.
- (54) Fukushima, K.; Satoh, T.; Sugihara, F.; Sato, Y.; Okamoto, T.; Mitsui, Y.; Yoshio, S.; Li, S.; Nojima, S.; Motooka, D.; et al. Dysregulated Expression of the Nuclear Exosome Targeting Complex Component Rbm7 in Nonhematopoietic Cells Licenses the Development of Fibrosis. *Immunity* **2020**, *52* (3), 542-556.e513. DOI: 10.1016/j.jimmuni.2020.02.007.
- (55) Satoh, T.; Kidoya, H.; Naito, H.; Yamamoto, M.; Takemura, N.; Nakagawa, K.; Yoshioka, Y.; Morii, E.; Takakura, N.; Takeuchi, O.; et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature* **2013**, *495* (7442), 524-528. DOI: 10.1038/nature11930.
- (56) Malyshev, I.; Malyshev, Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 341308. DOI: 10.1155/2015/341308.
- (57) Nair, M. G.; Du, Y.; Perrigoue, J. G.; Zaph, C.; Taylor, J. J.; Goldschmidt, M.; Swain, G. P.; Yancopoulos, G. D.; Valenzuela, D. M.; Murphy, A.; et al. Alternatively activated macrophage-derived RELM- $\alpha$  is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung.

*J Exp Med* 2009, 206(4), 937-952. DOI: 10.1084/jem.20082048.