

マクロファーシジ分極化 識別センサー分子の開発と応用

埼玉大学大学院 理工学研究科
准教授 鈴木 美穂

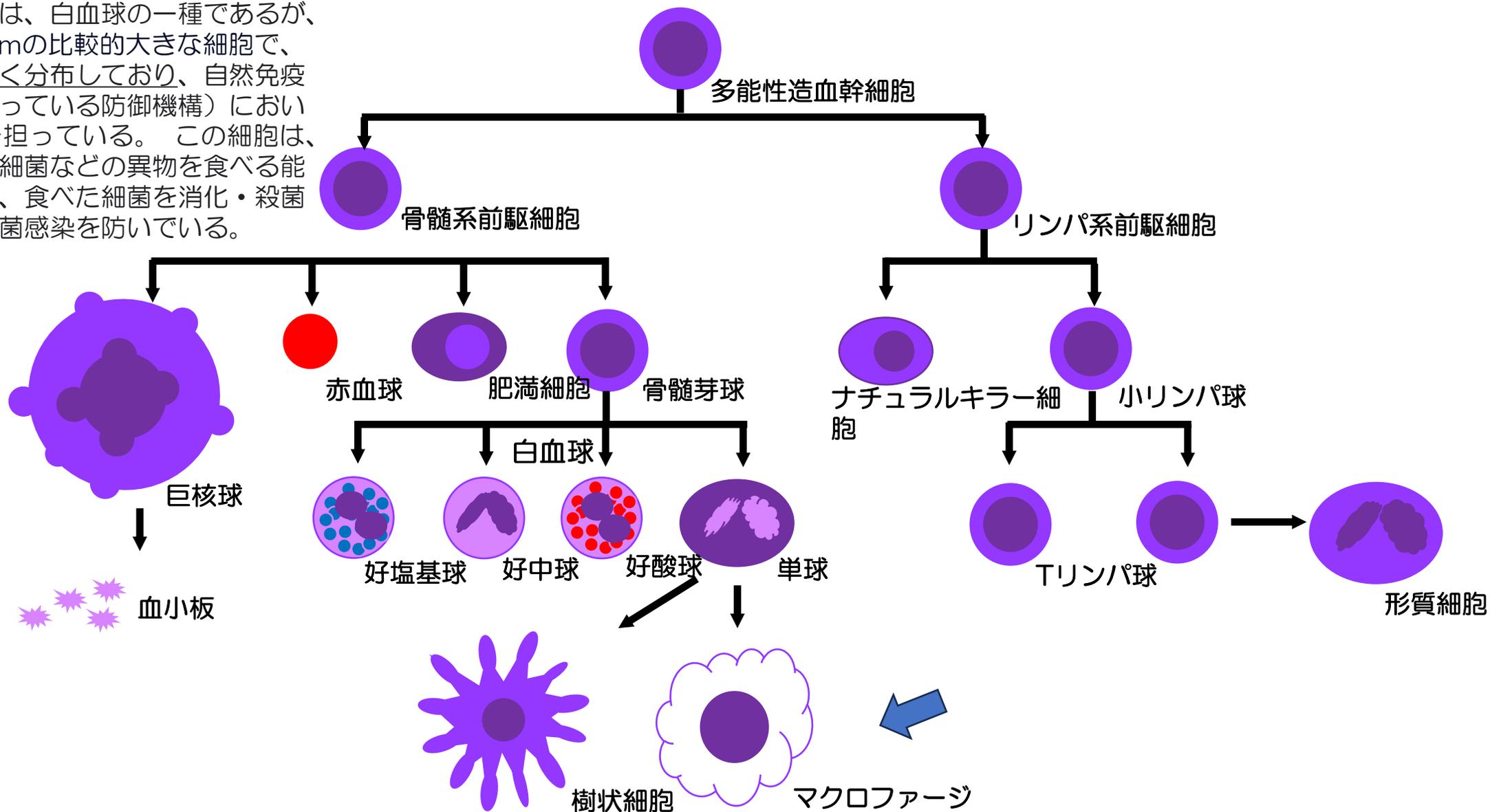
2024年10月22日

- (1) マクロファージとは
- (2) マクロファージの由来
- (3) マクロファージの役割
- (4) マクロファージの分極化
- (5) マクロファージや白血球などと炎症の関係性
- (6) マクロファージと疾病の関係性
- (7) マクロファージ識別技術
- (8) 本技術について
- (9) 本技術の類似・競合技術
- (10) 新技術の特徴・従来技術との比較
- (11) 想定される用途
- (12) 実用化に向けた課題
- (13) 企業への期待
- (14) 企業への貢献・PRポイント
- (15) 本技術に関する知的財産権
- (16) 産学連携の経歴
- (17) お問い合わせ

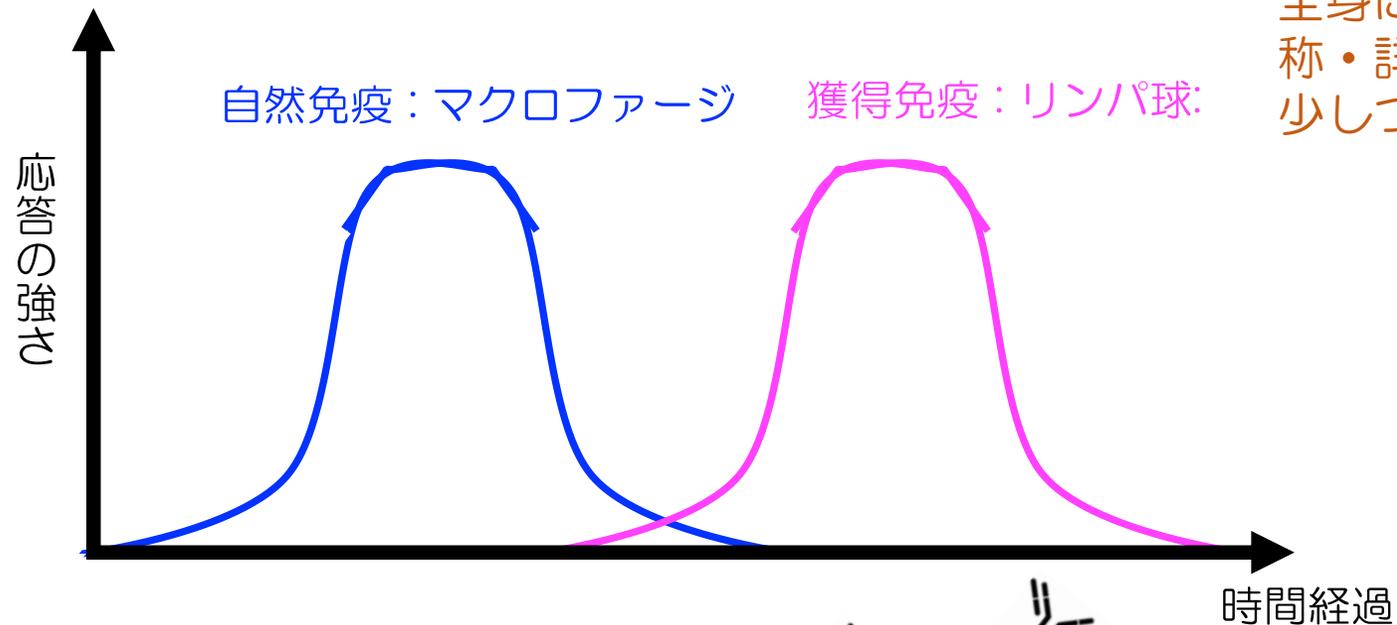
(2) マクロファージの由来

(1) マクロファージとは

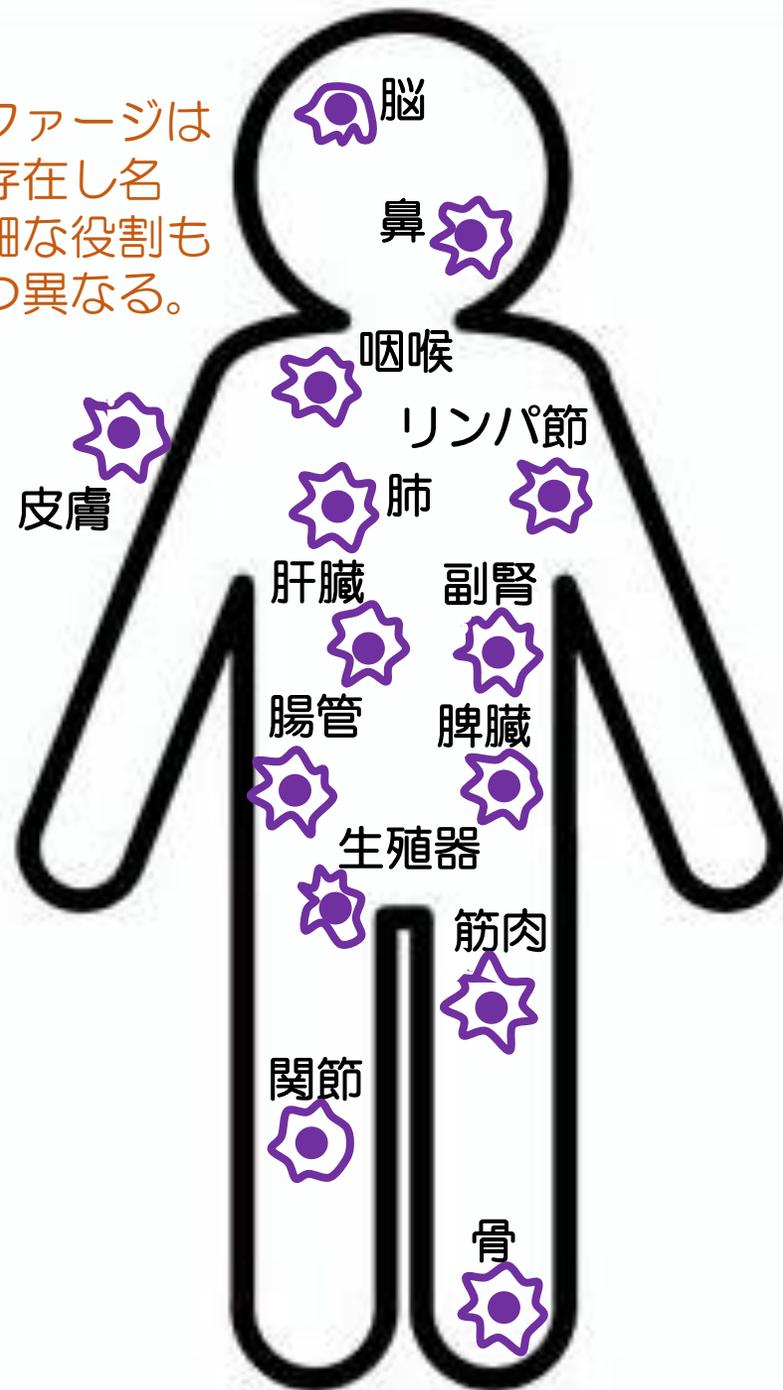
マクロファージは、白血球の一種であるが、直径15~20 μ mの比較的大きな細胞で、全身の組織に広く分布しており、自然免疫（生まれつき持っている防御機構）において重要な役割を担っている。この細胞は、体内に侵入した細菌などの異物を食べる能力に優れており、食べた細菌を消化・殺菌することで、細菌感染を防いでいる。



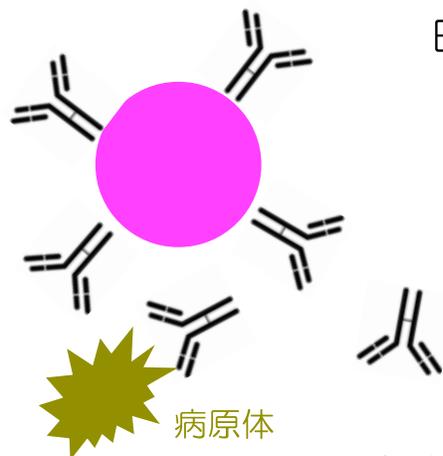
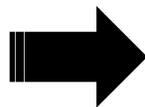
(3) マクロファージの役割



マクロファージは全身に存在し名称・詳細な役割も少しずつ異なる。

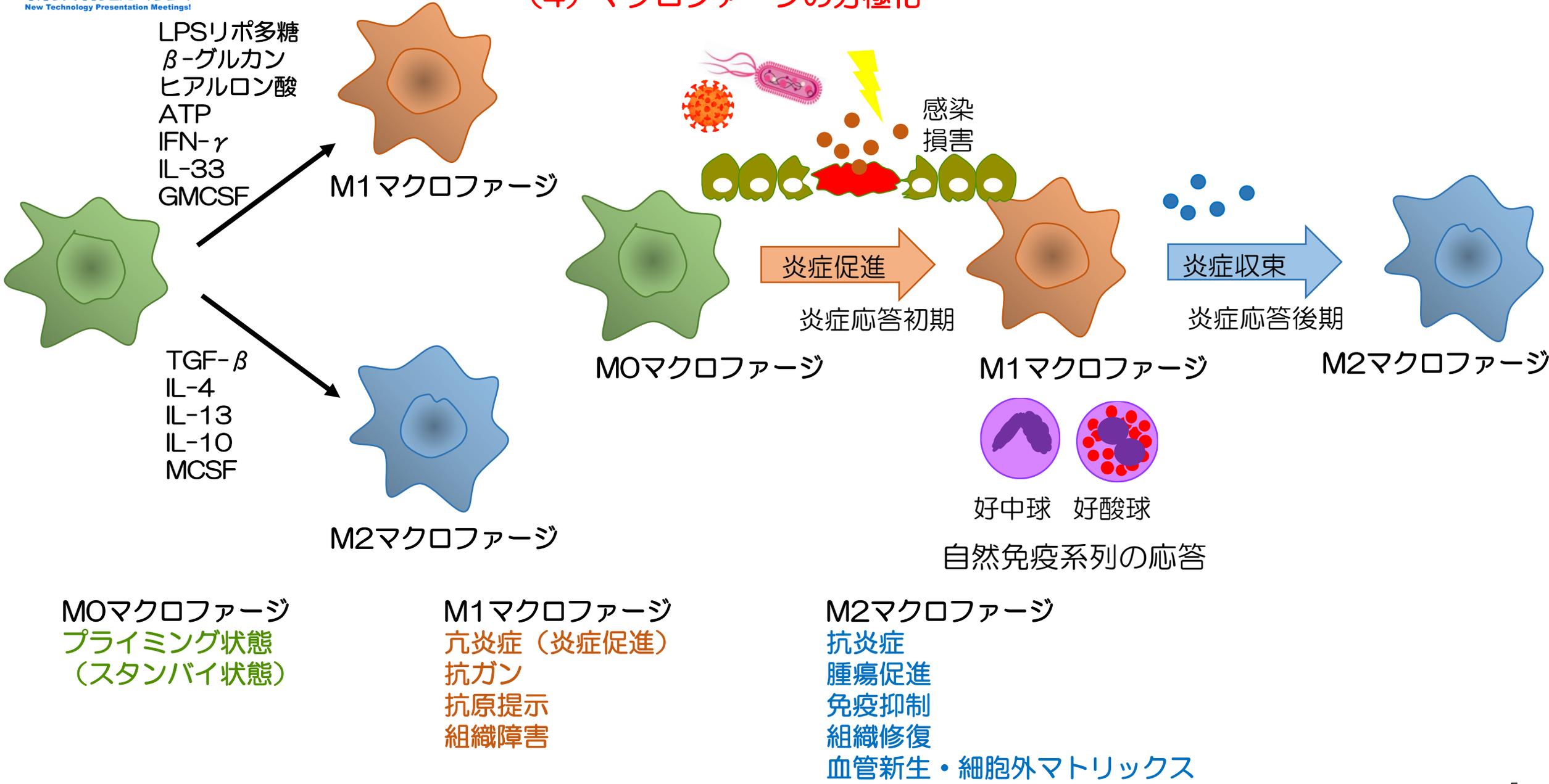


貪食による応答



抗体による応答

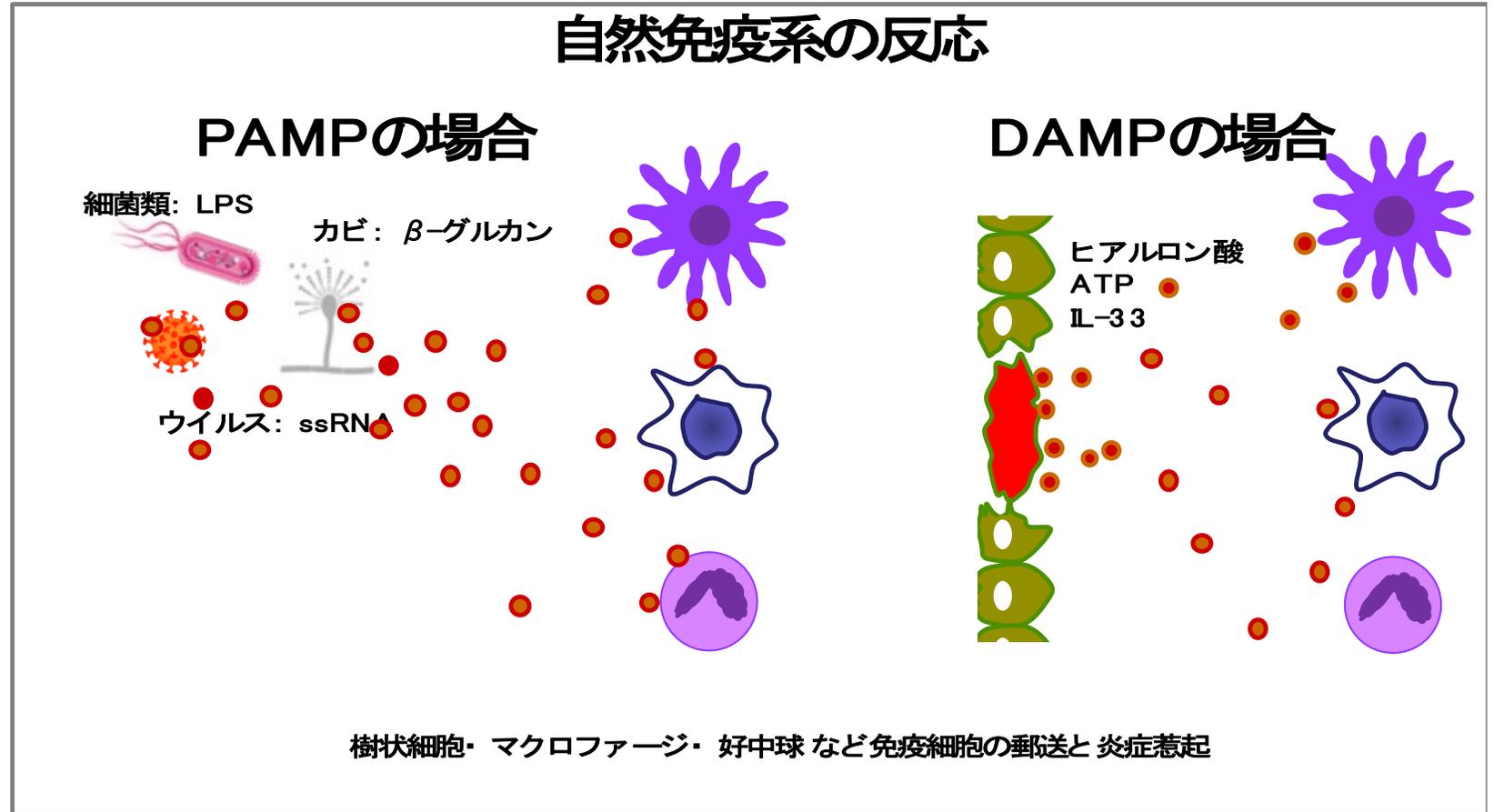
(4) マクロファージの分極化



(5) マクロファージや白血球などと炎症の関係性

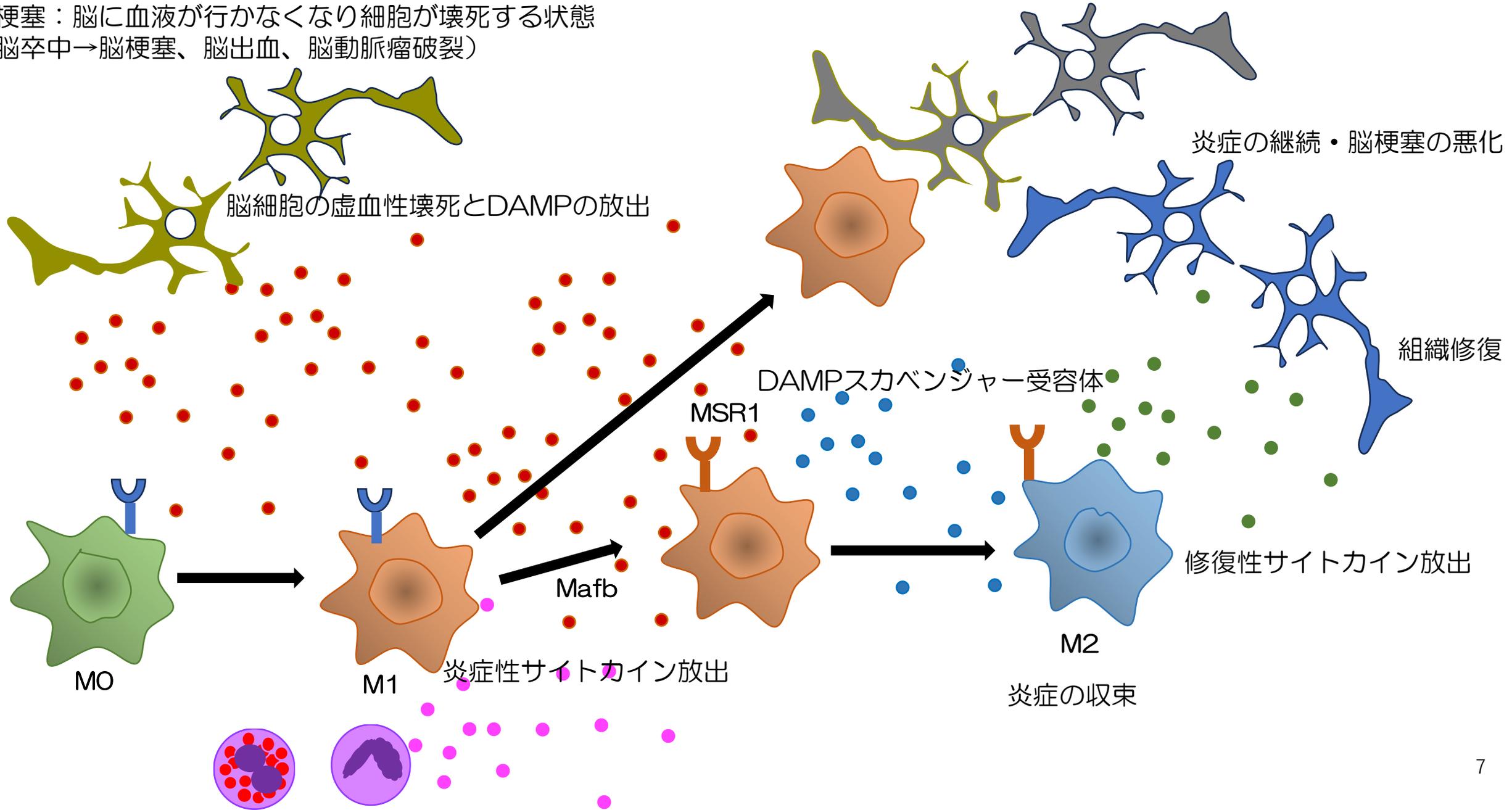
炎症とは？

物理的刺激（火傷や凍傷、紫外線など）、や化学的な刺激（化学薬品接触など）や、ウイルス、細菌などの微生物の感染に対して起こす生体の防御反応、自然免疫反応の1種である。発赤、熱感、腫脹、疼痛を炎症の4兆候という。感染や損傷を受けた細胞を除去する事、感染源への攻撃、免疫細胞の活性化や遊走を起こす様、役割を担う白血球が働く。急性炎症と慢性炎症に区別され、急性炎症の場合、感染源に共通のPathogen associated molecular patterns (PAMP)が、損傷などの場合損傷を受けた細胞が分泌するDamage associated molecular patterns (DAMP)がマクロファージ、好中球、好酸球などを活性化、誘因する。

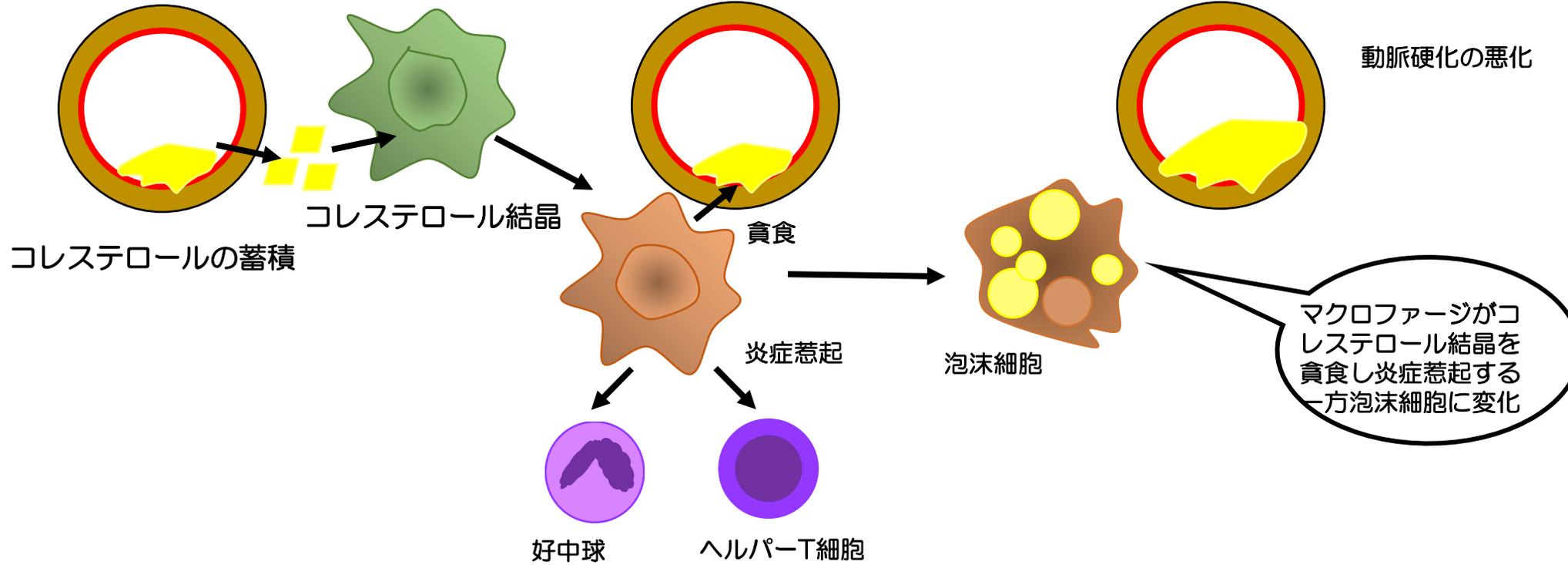


(6) マクロファージと疾病の関係性

脳梗塞：脳に血液が行かなくなり細胞が壊死する状態
(脳卒中→脳梗塞、脳出血、脳動脈瘤破裂)



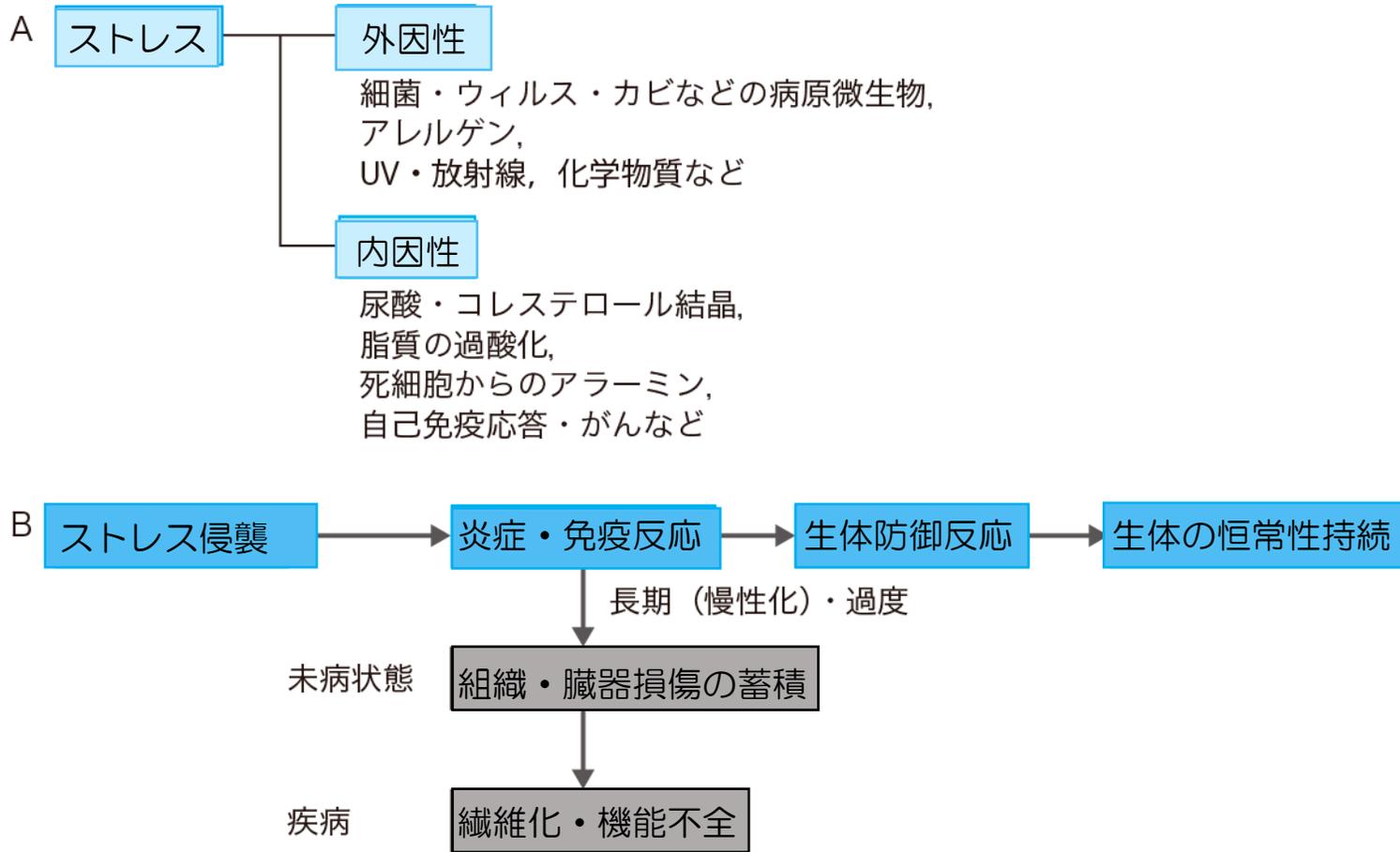
動脈硬化は慢性炎症性疾患



炎症が止まらない！

慢性炎症状態とは、体の同じ部分で、長い期間、炎症が続いてしまう事を指す。この「長引く炎症」は様々な病気と関係がある事が分かっており、炎症が続くと、細胞や血管が傷ついて、劣化していくため、病気を引き起こす。この慢性炎症状態は体のどこでも起こる可能性があり、全身の多くの病気の原因になる。例えば、がんや心筋梗塞、脳梗塞、動脈硬化、認知症、糖尿病などの生活習慣病、肝炎、喘息、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、アトピー性皮膚炎、うつ病などの病気は、長引く炎症が原因になっていると考えられている。

体の内外のストレス侵襲と炎症・疾病発症の関係

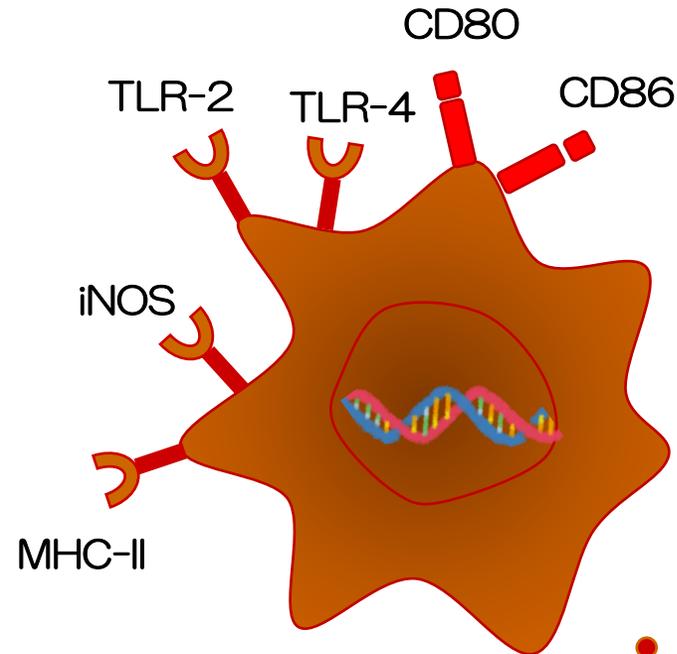


細胞レベルでの炎症現象は、異物や死んでしまった自分の細胞を排除して生体の恒常性を維持しようという反応と考えられている。例えば細菌やウイルス（異物）が体の中に侵入しようとした際に、さまざまな細胞などの生体内成分がその排除に働いた結果が炎症性反応と言える。この防御反応が過剰に起こると必要以上に体に損傷が起こる。これによって疾病が誘発される場合がある。また、害の無い異物への反応、自己を遺物として認識してしまう場合も疾病の誘発原因となる。

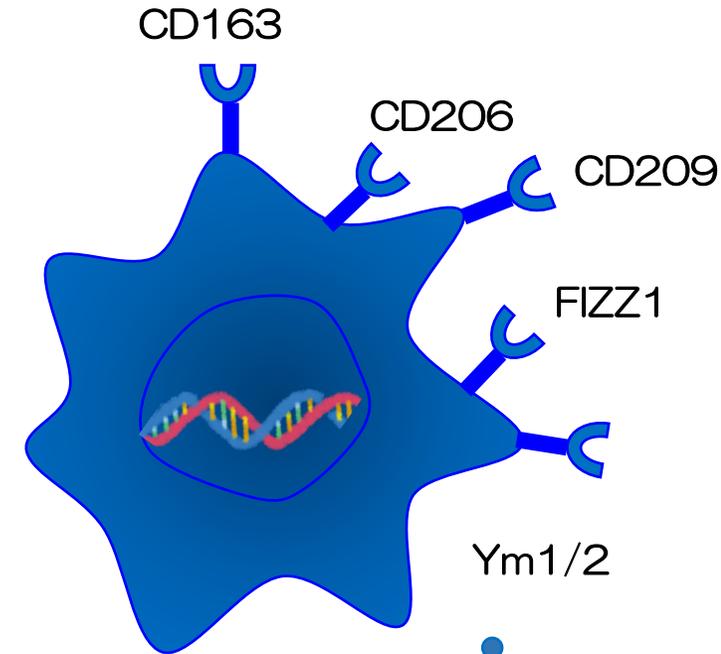
マクロファージの活性化(分極化)の誘導とマーカー

マクロファージの活性化または分極化は、微小環境からのシグナルにตอบสนองしてマクロファージが異なる機能的プログラムをとるようになる過程である。この能力は、マクロファージが生体内で有する複数の役割と関係している。マクロファージは自然免疫応答の強力な鍵となる細胞であるだけでなく、細胞の残骸の除去、胚発生、組織修復にも重要である。単純な分類では、マクロファージの表現型はM1とM2という2つのグループに分けられる。培養マクロファージをさまざまな物質で処理して特定の表現型状態へ切り替える*in vitro*での研究をもとに行われている。こうした化学的刺激以外にも、マクロファージが生育する基質の硬さによってもその極性化状態や機能的役割、遊走状態に影響が生じることが示されている。また、極性化を刺激するサイトカインや基質の硬さの違いがない場合でも、M1-M2間の連続的な極性化状態が生じる可能性がある。

個体の状態のシグナルを受け取る受容体！



- TNF- α
- IL-1 α
- IL-1 β
- IL-6
- IL-12
- CXCL9
- CCL5

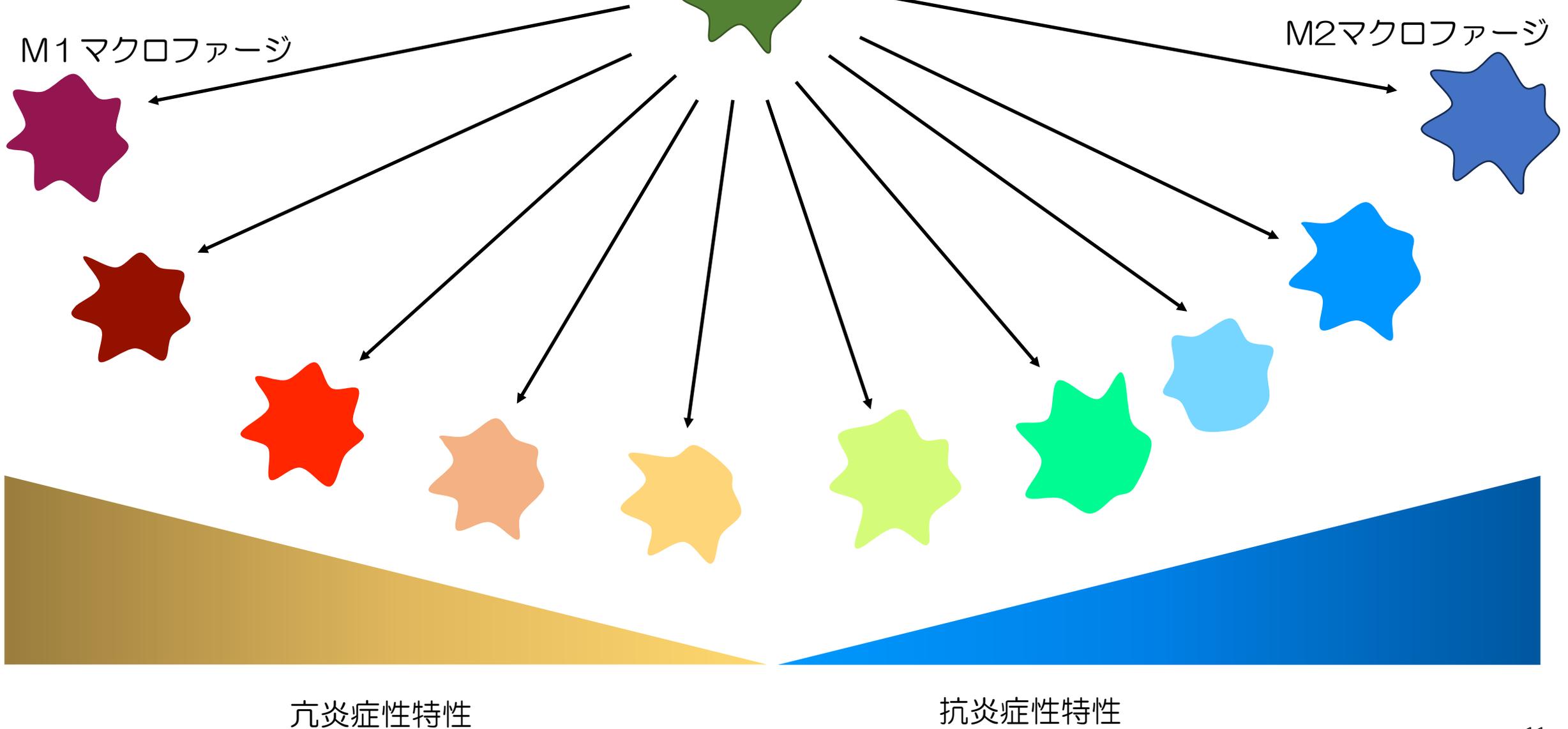


- IL-10
- TGF- β
- CCL1
- CCL17
- CCL18
- CCL22
- VEGF

個体に指令を出すサイトカイン！

MOマクロファージ

マクロファージの活性化(分極化)の実際

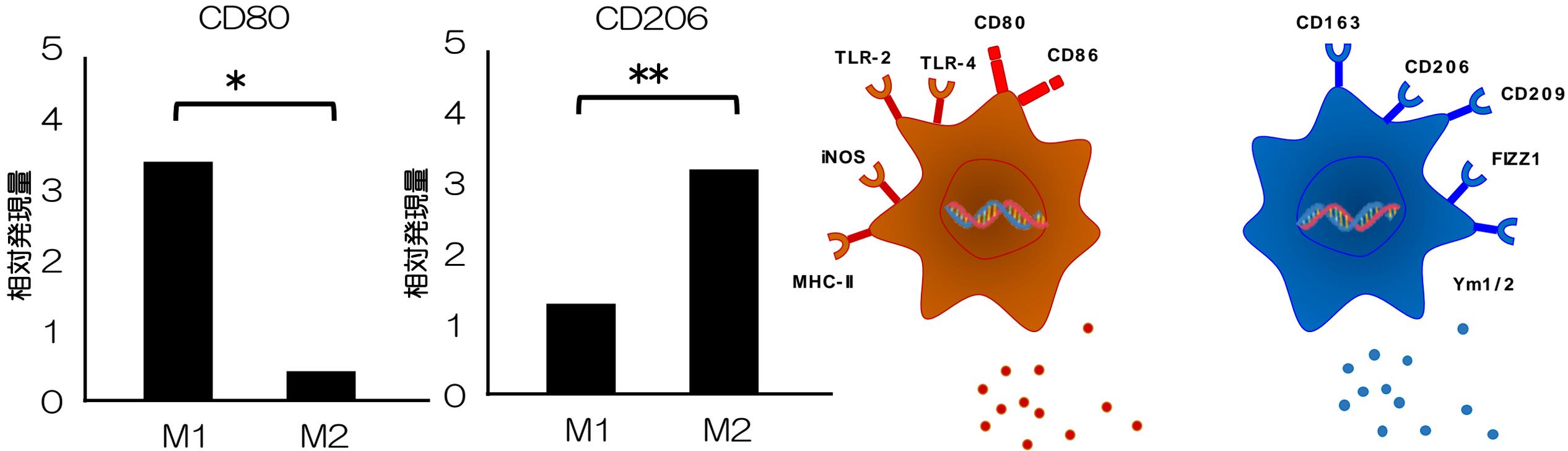


亢炎症性特性

抗炎症性特性

現行技術：M1マクロファージのマーカートと
M2マクロファージのマーカートを組合せる！

例) M1：CD80或いはCD86 M2：CD163或いはCD206



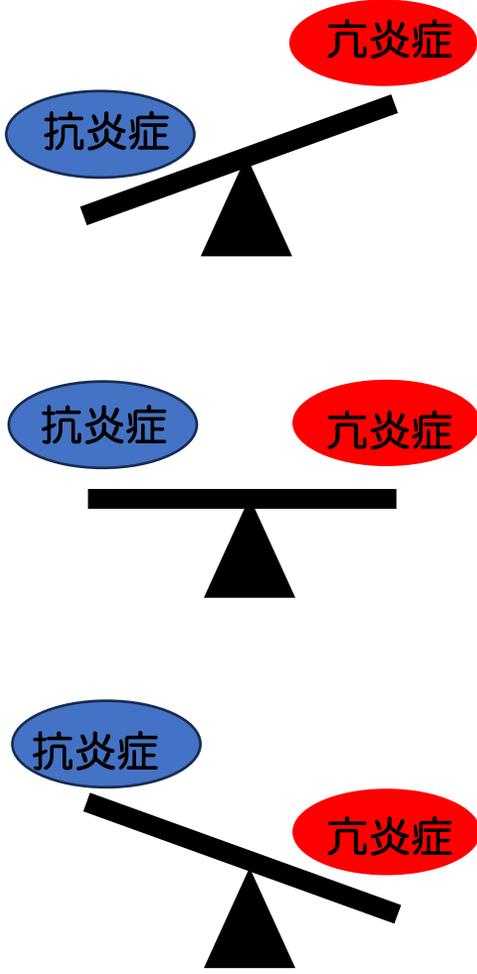
個体の状態のシグナルを受け取る受容体！

個体に指令を出すサイトカイン！

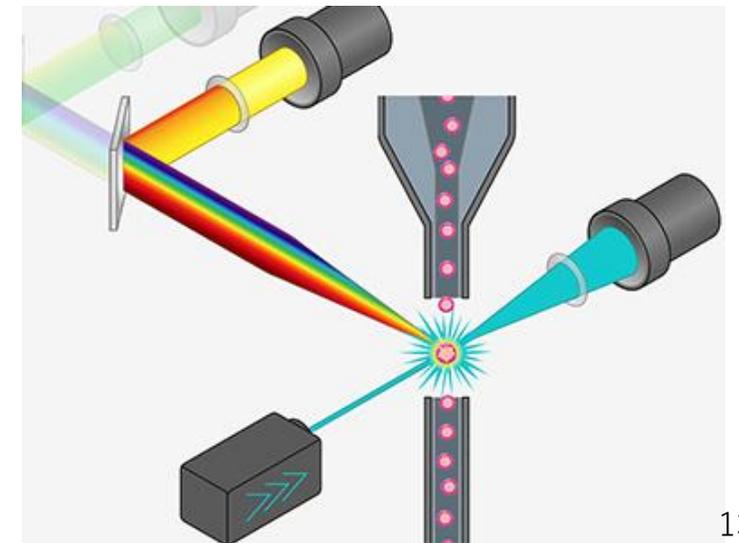
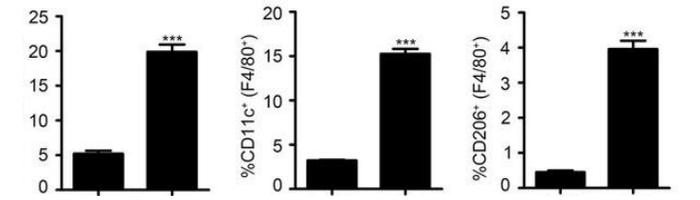
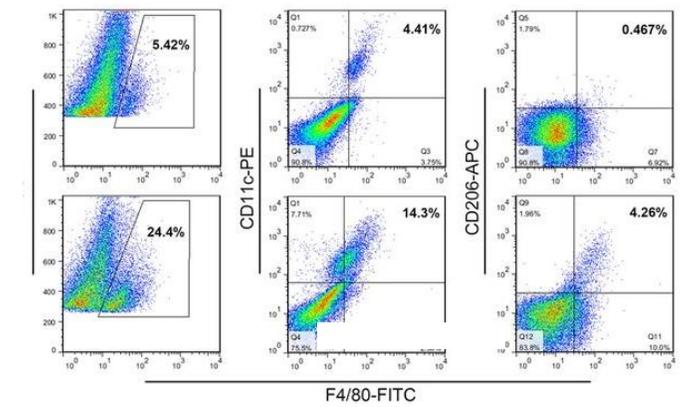
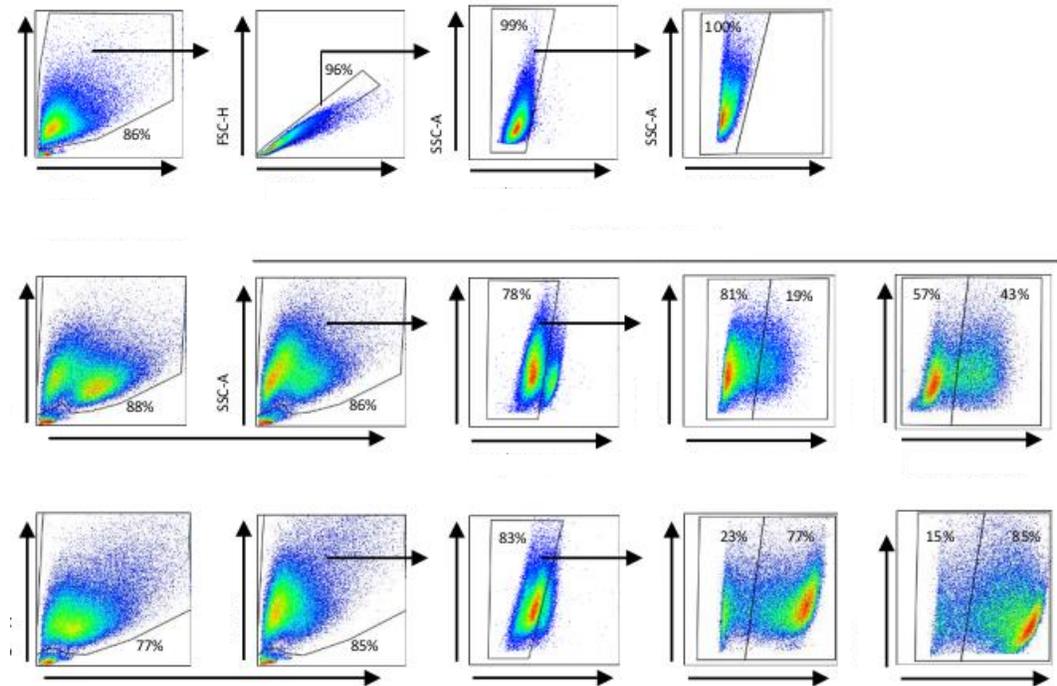
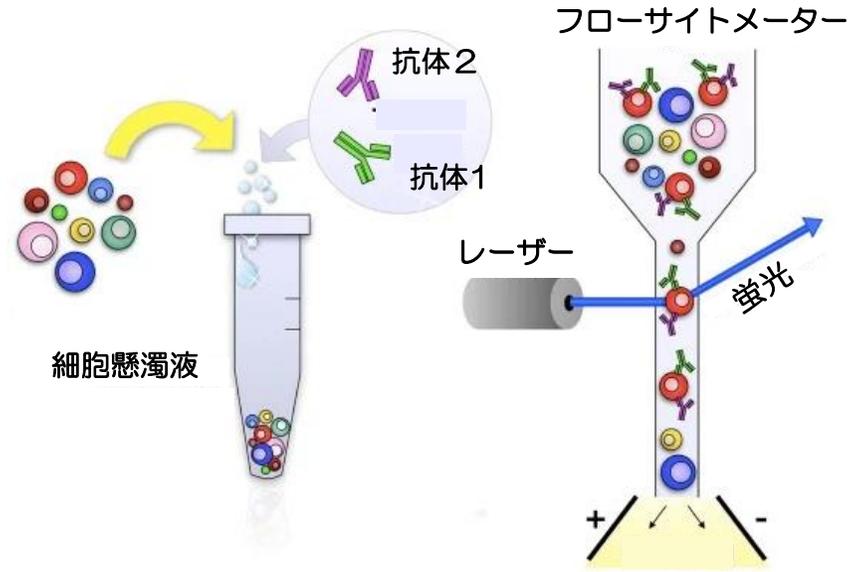
フローサイトメトリー法→ハイスループット

ELISA法→要時間

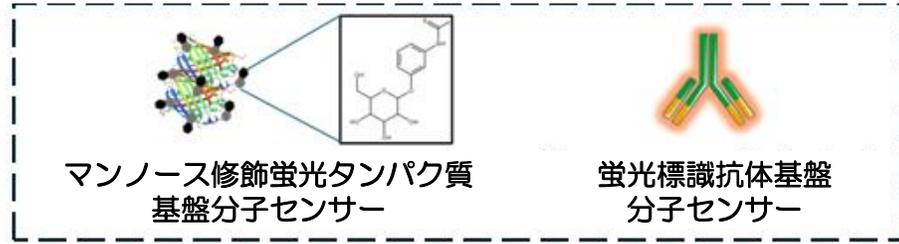
フローサイトメトリー法によるマクロファージ発現マーカー高速解析



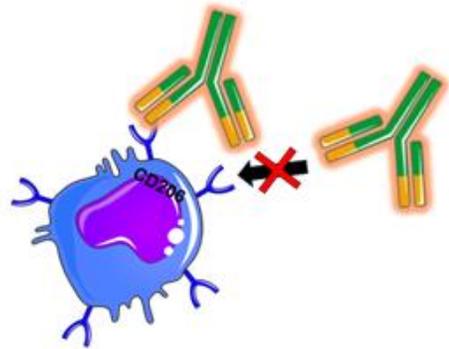
どちらにバランスが偏っても疾病に!



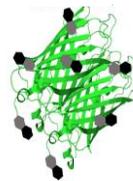
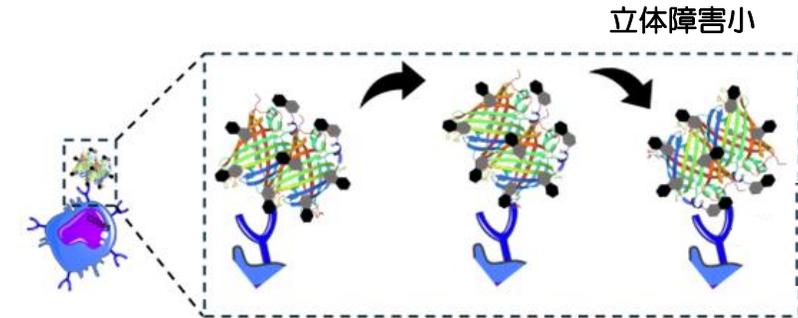
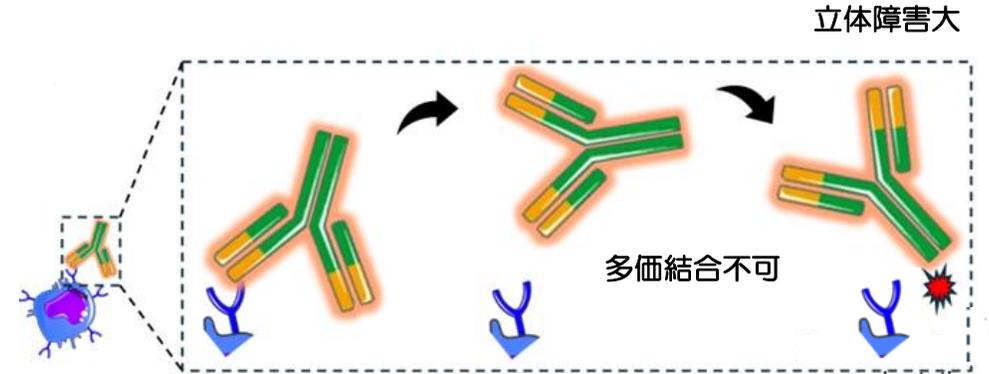
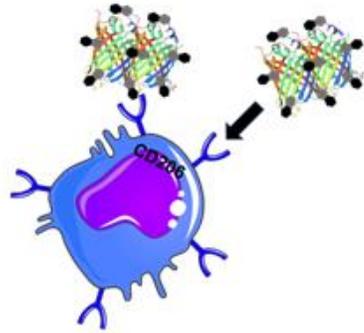
(8) 本技術について



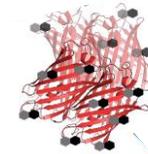
二価の結合部位
立体障害大



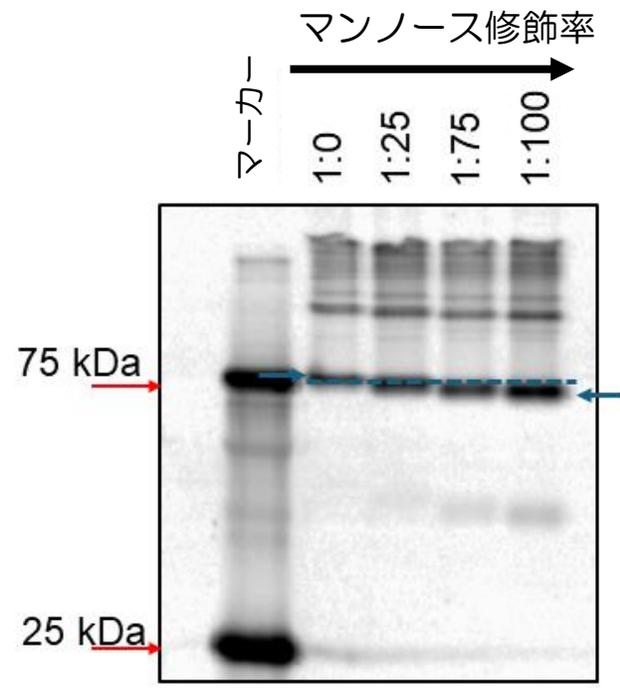
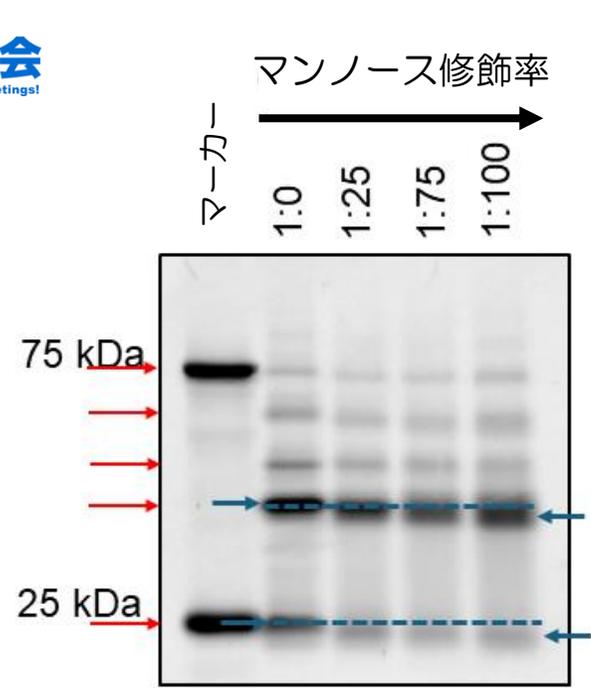
20ヶ所以上の結合部位
多価結合可能
見かけの親和性向上



緑色蛍光タンパク質：二量体



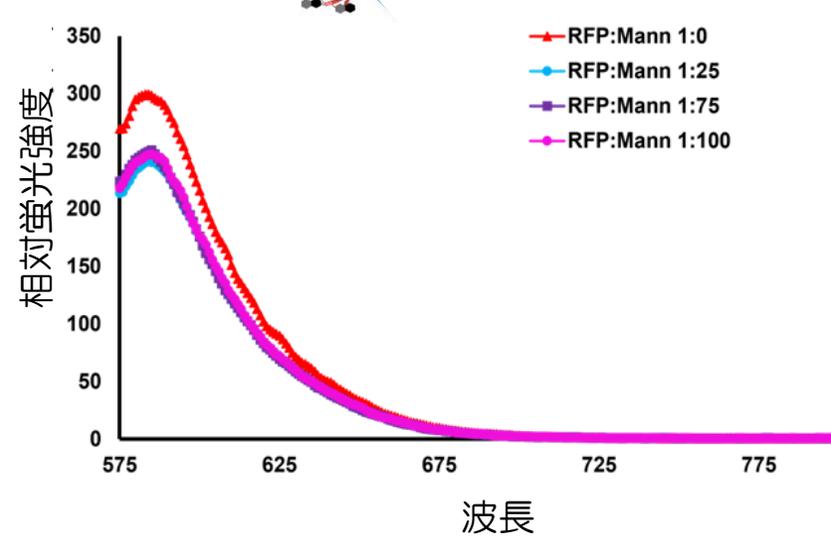
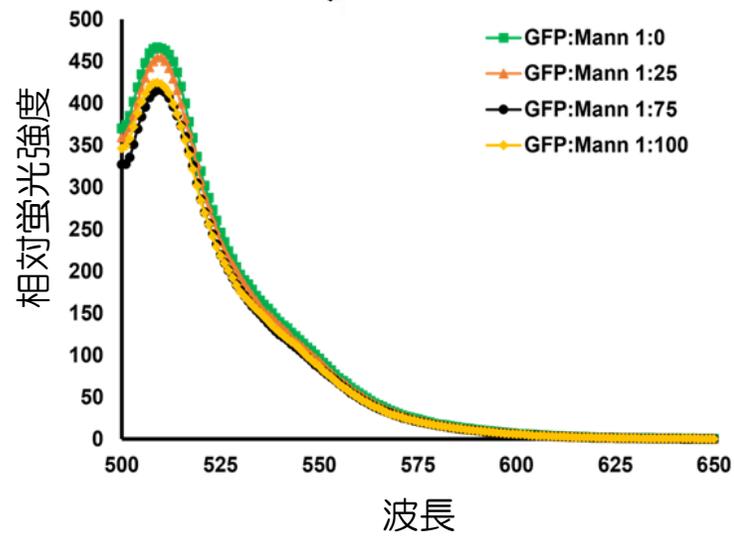
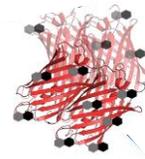
赤色蛍光タンパク質：四量体



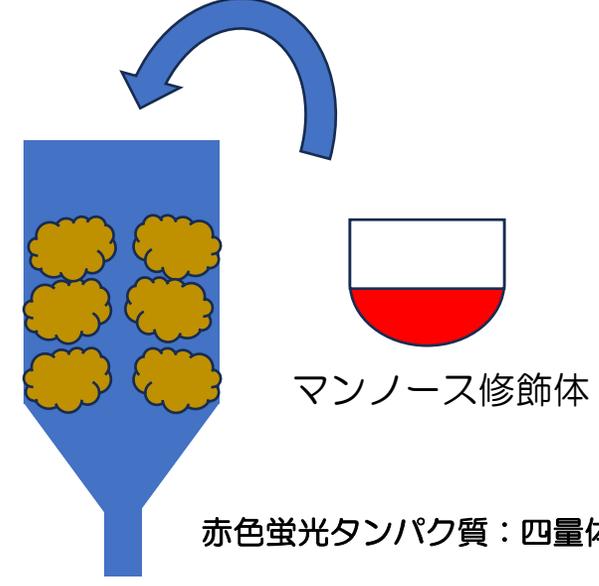
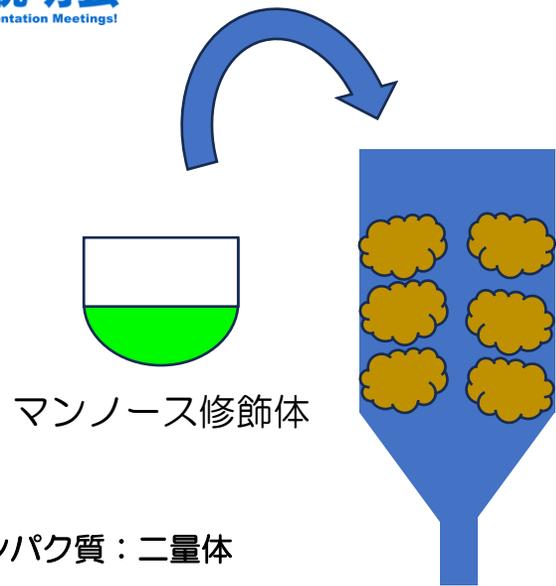
緑色蛍光タンパク質：二量体



赤色蛍光タンパク質：四量体



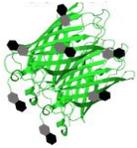
マンノース結合タンパク質固定化カラム結合



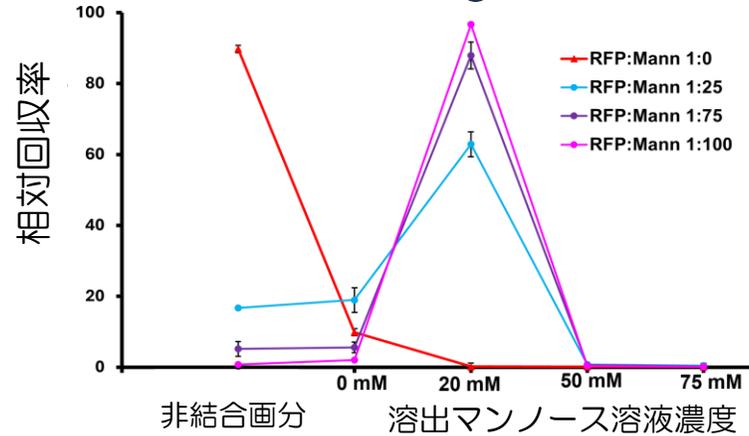
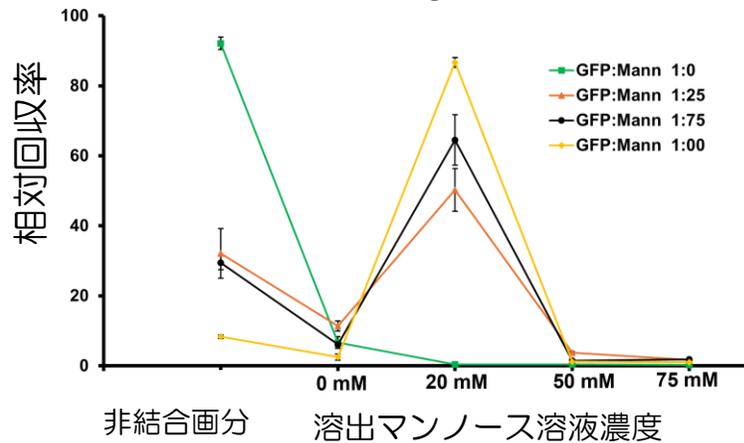
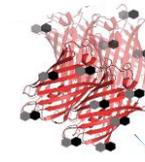
マンノース結合タンパク質
レクチン：コンカナバリンA

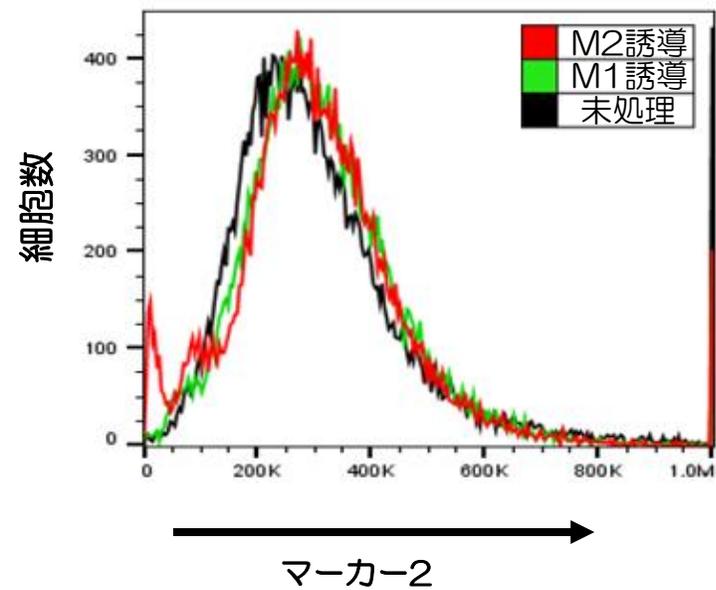
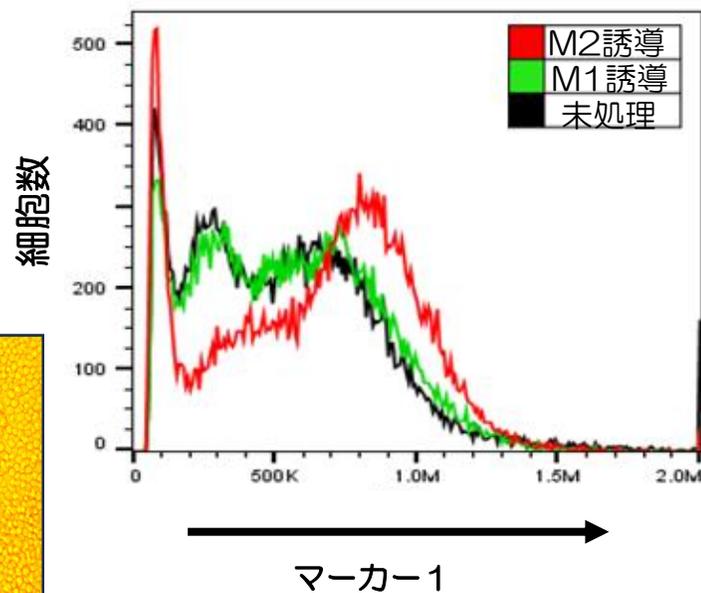
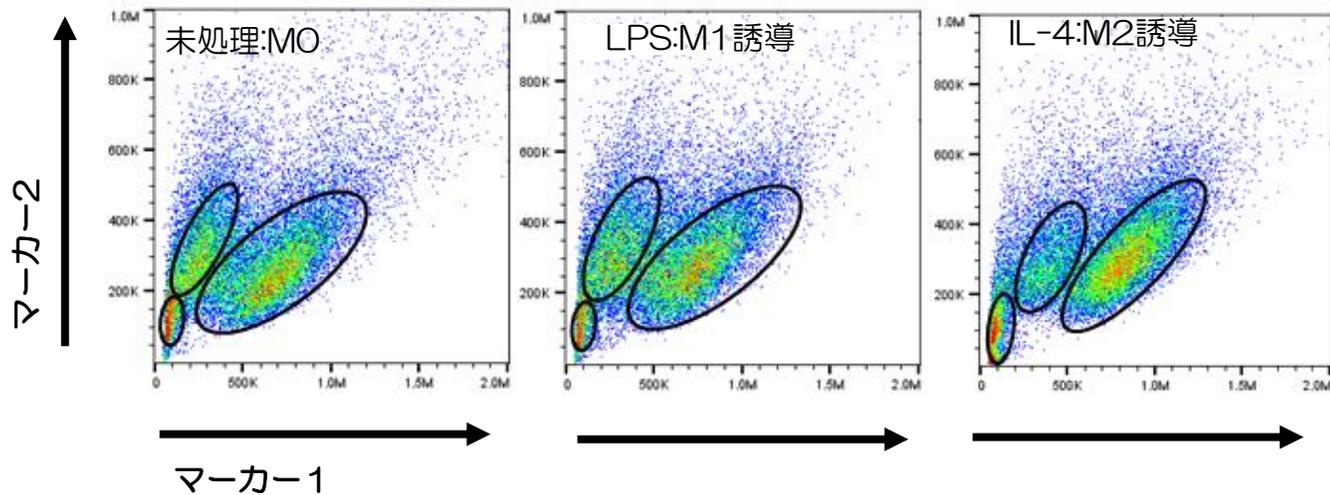
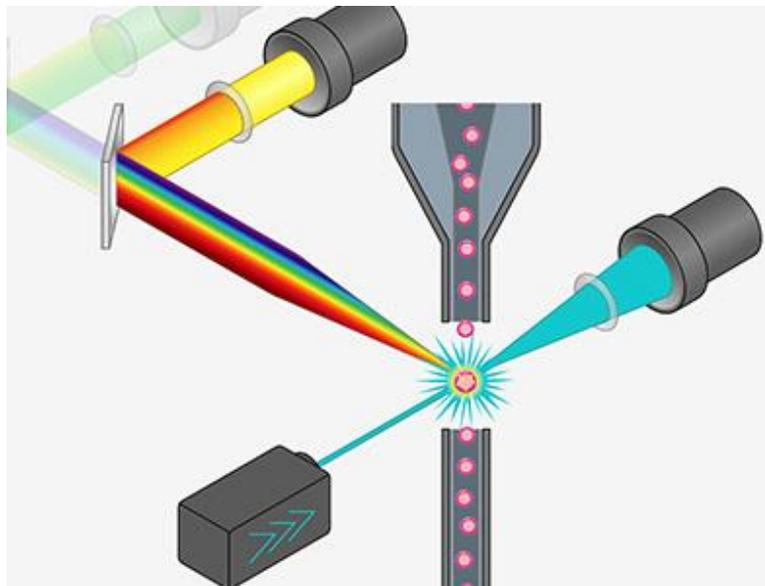


緑色蛍光タンパク質：二量体

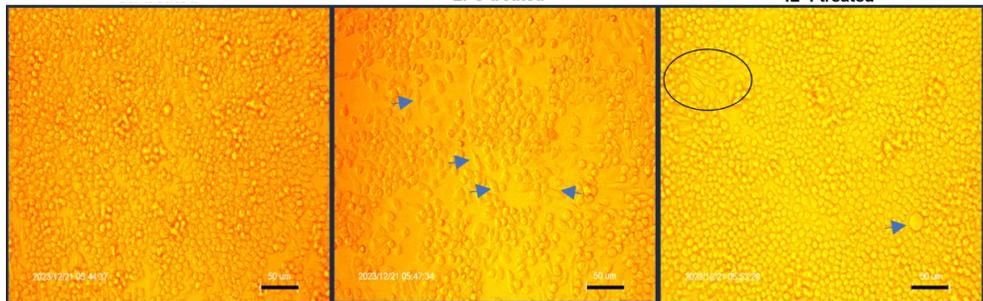


赤色蛍光タンパク質：四量体





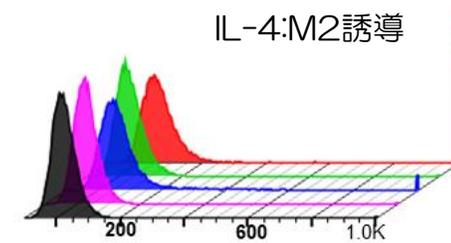
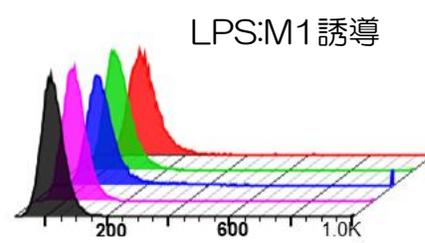
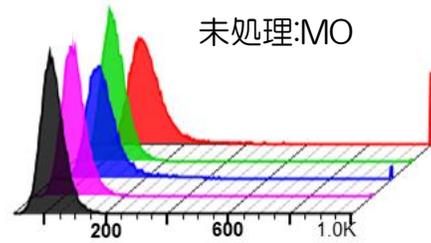
未処理:MO LPS:M1誘導 IL-4:M2誘導



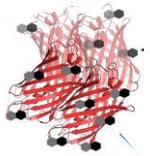


緑色蛍光タンパク質：二量体

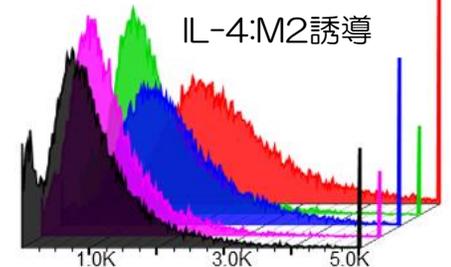
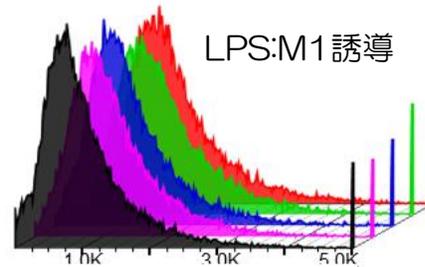
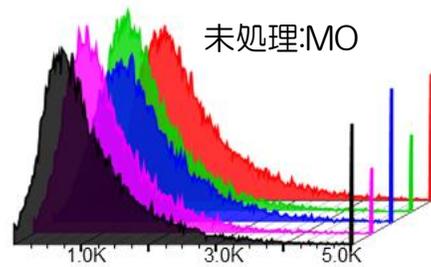
黒	未結合
紫	1:25, 0.2 μ M
青	1:25, 2 μ M
緑	1:100, 0.2 μ M
赤	1:100, 2 μ M



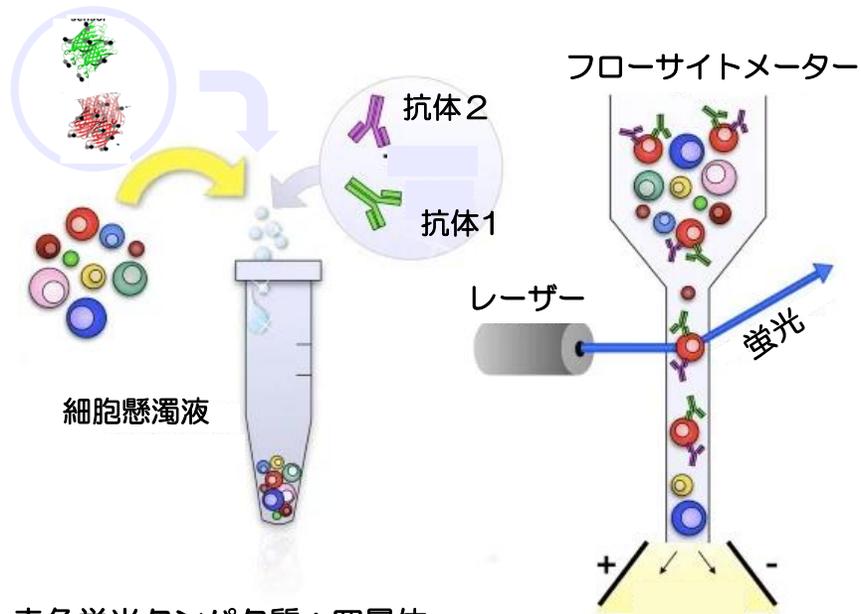
緑色蛍光強度



赤色蛍光タンパク質：四量体

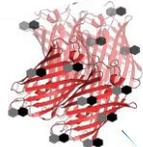
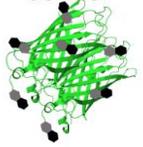


赤色蛍光強度



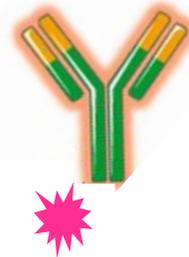
緑色蛍光タンパク質：二量体

赤色蛍光タンパク質：四量体



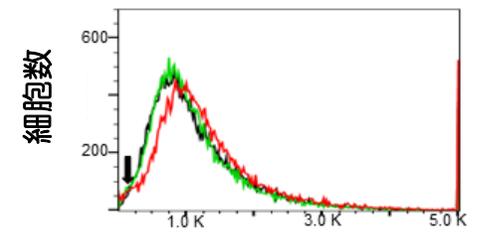
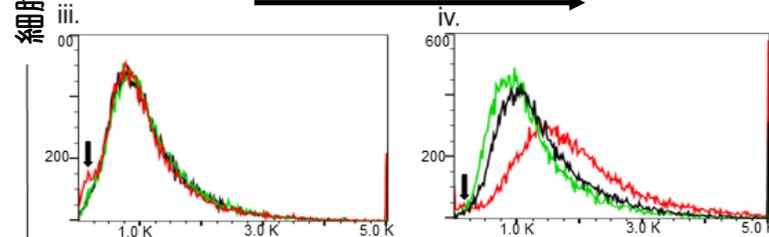
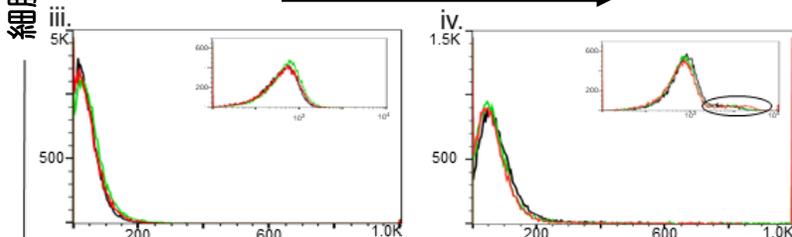
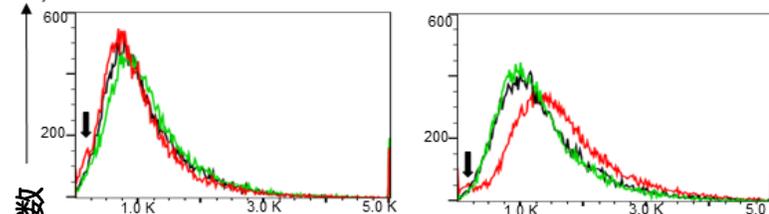
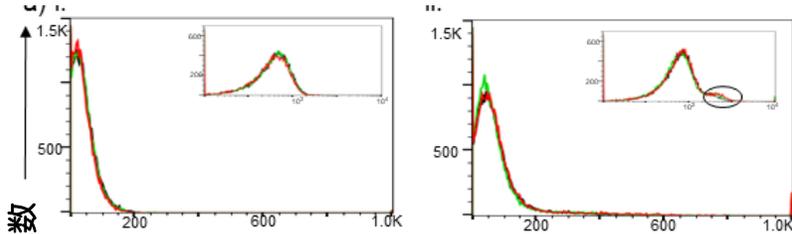
Red	M2誘導
Green	M1誘導
Black	未処理

Red	M2誘導
Green	M1誘導
Black	未処理



蛍光標識抗体

Red	M2誘導
Green	M1誘導
Black	未処理

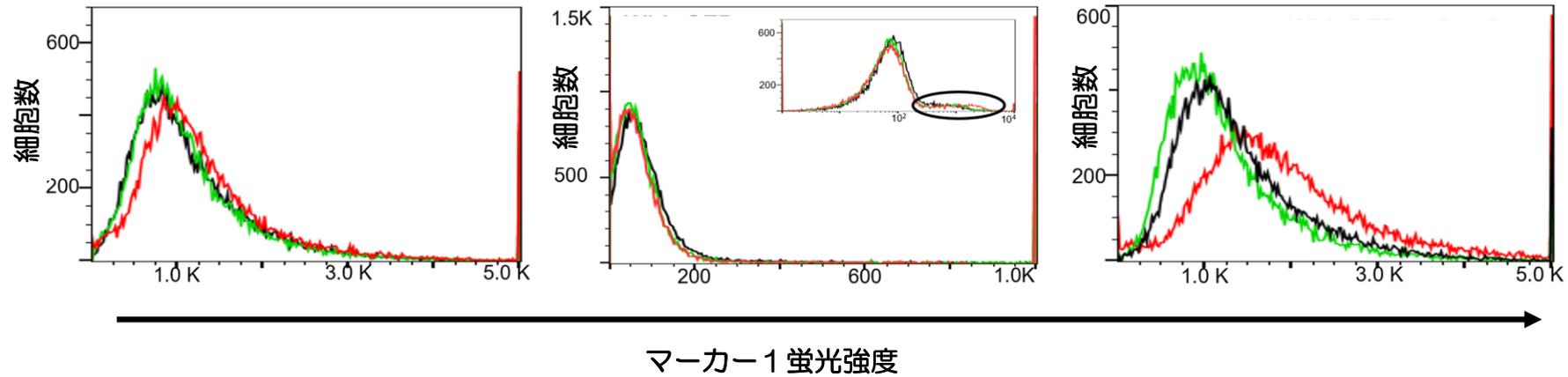
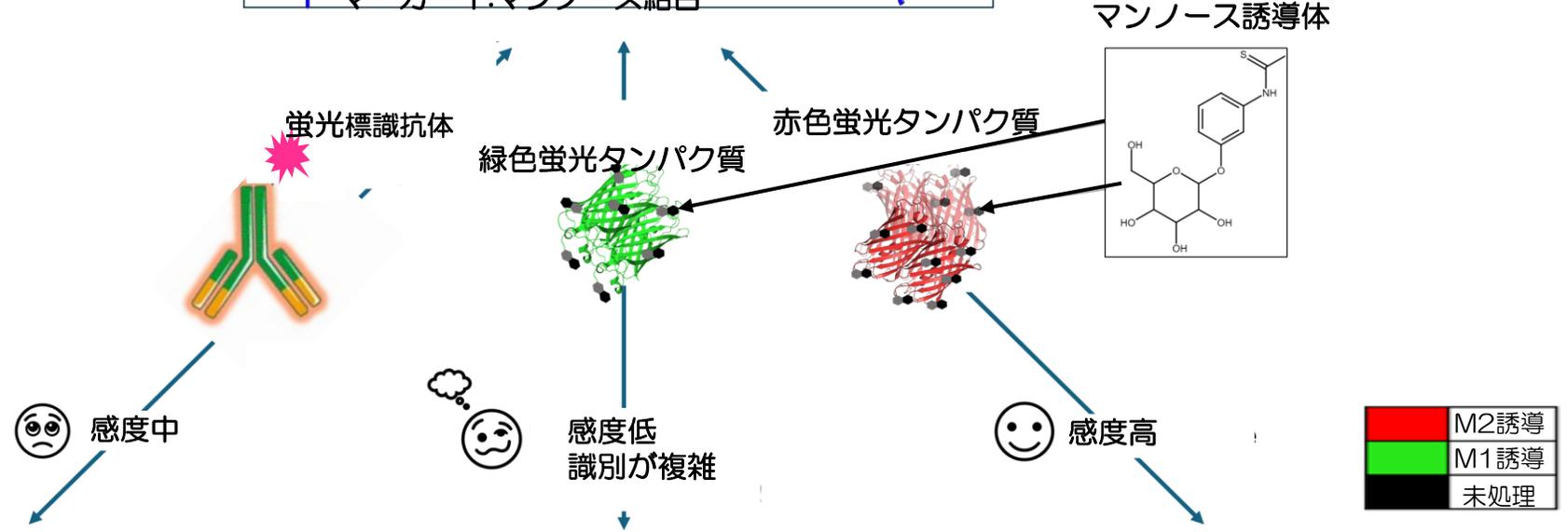
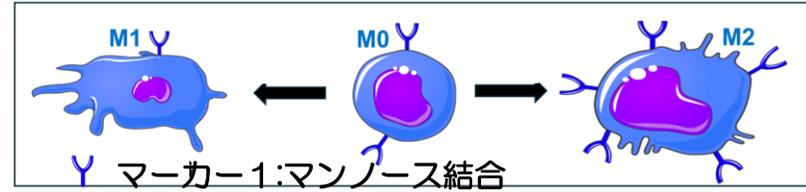


マーカー1 蛍光強度

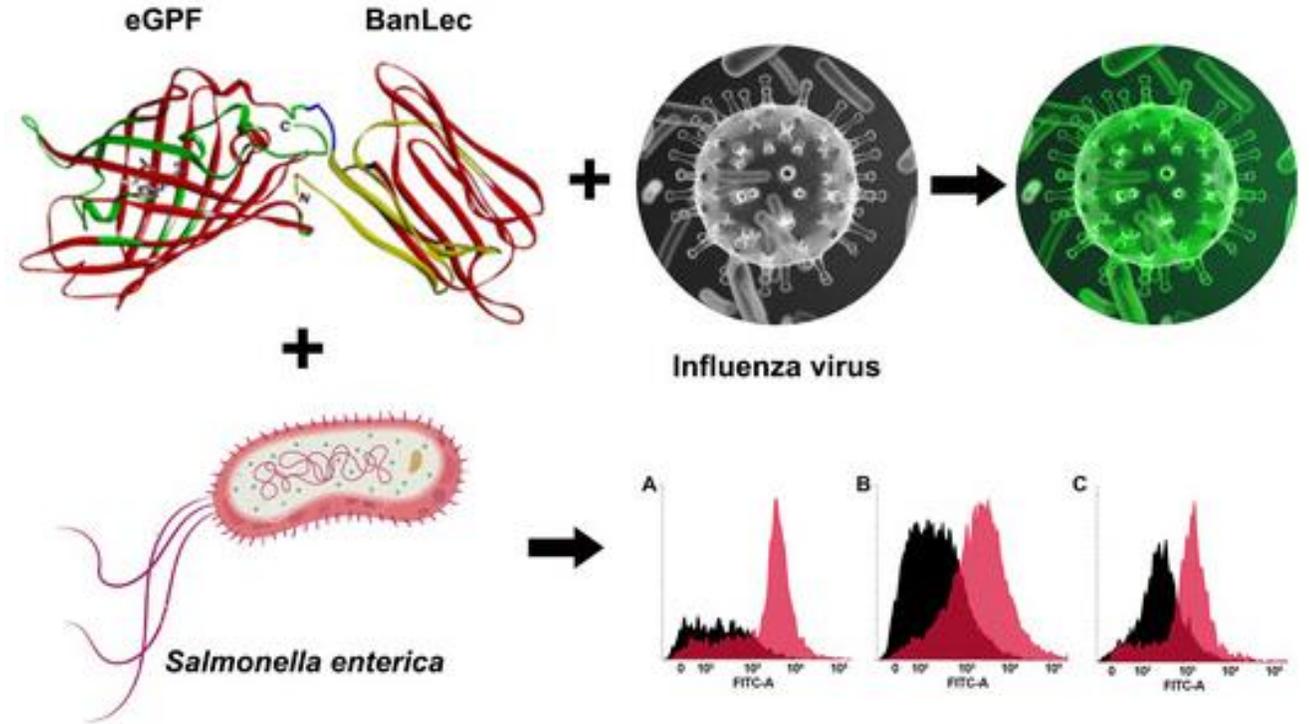
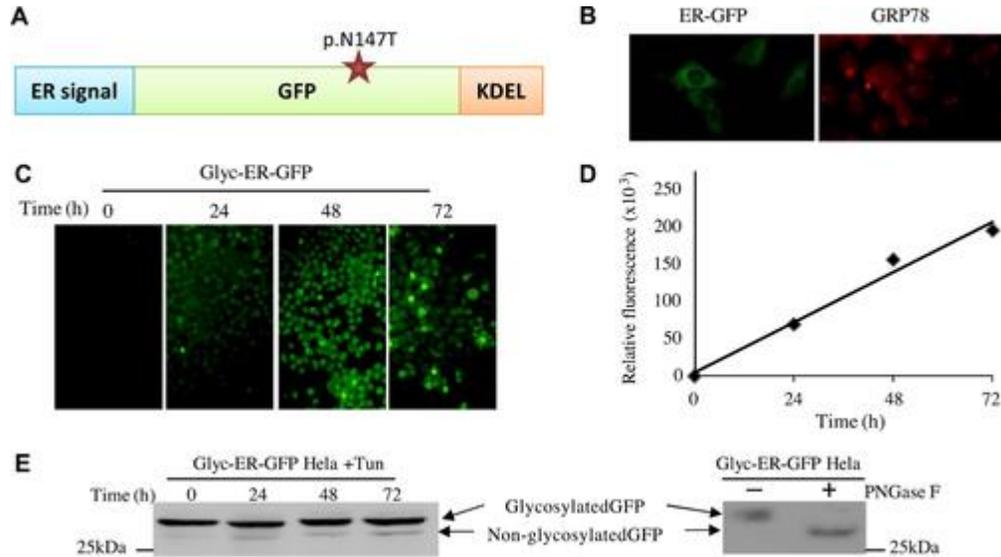
マーカー1 蛍光強度

マーカー1 蛍光強度

本技術の総括



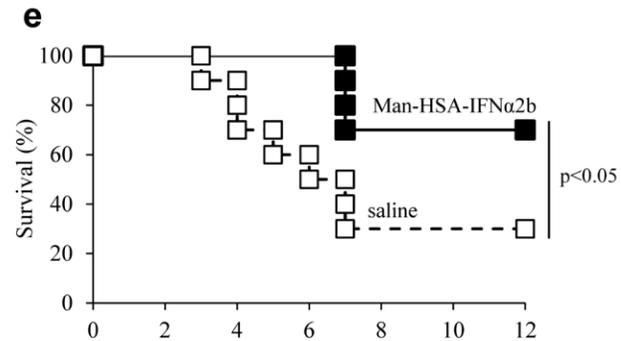
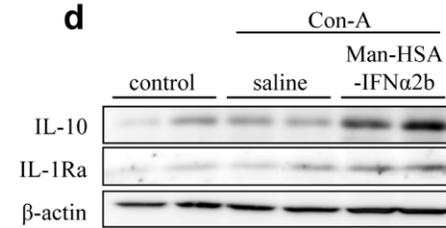
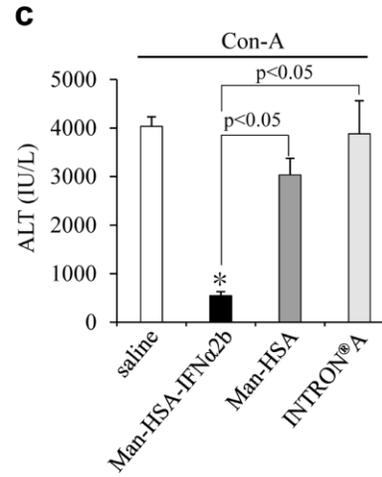
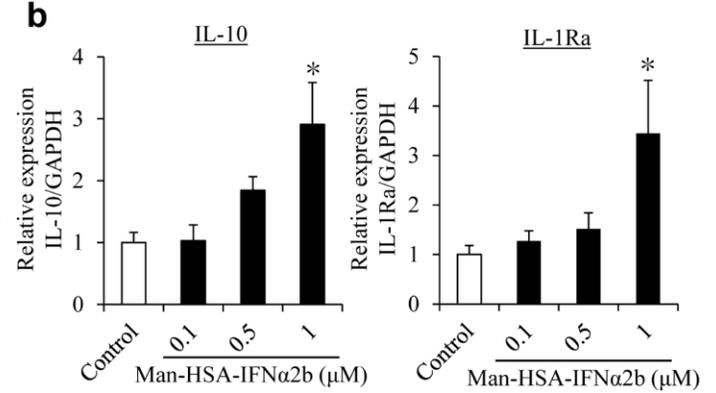
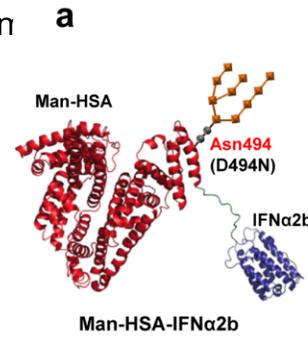
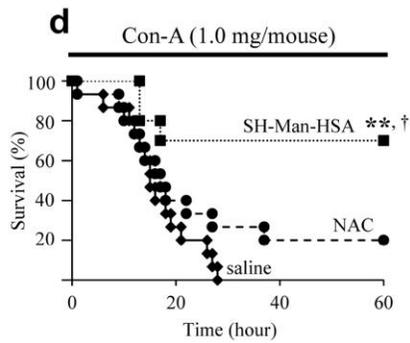
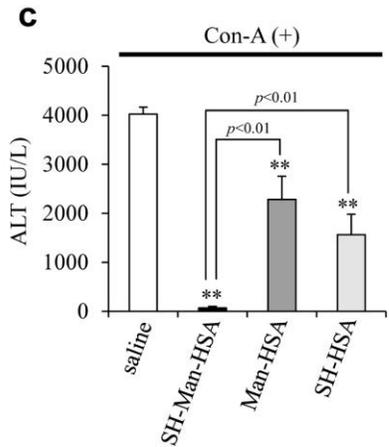
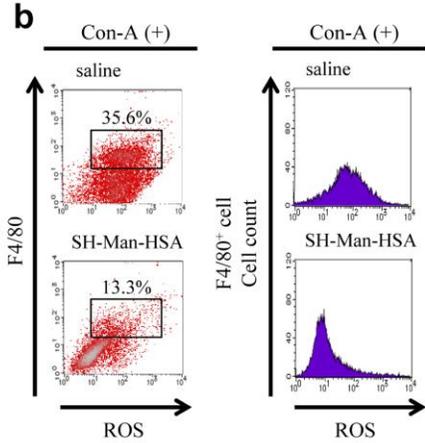
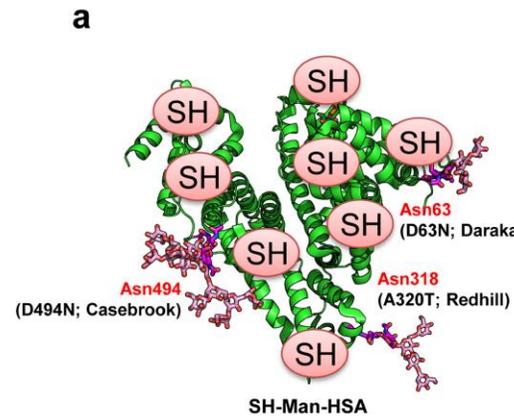
(9) 本技術の類似・競合技術



Losfeld, M.-E., Soncin, F., Ng, B. G., Singec, I., Freeze, H. H.
A sensitive green fluorescent protein biomarker of *N*-glycosylation site occupancy.
FASEB J. 26, 4210–4217 (2012)

Lopandić Z, Dragačević L, Popović D, Andjelković U, Minić R, Gavrović-Jankulović M. BanLec-eGFP Chimera as a Tool for Evaluation of Lectin Binding to High-Mannose Glycans on Microorganisms.
Biomolecules. 11(2) 180 (2021).

マンノース受容体を標的としたアルブミンDDSの開発と医薬への応用：前田仁志
Albumin-based Drug Delivery System Targeting Mannose Receptors and Its Application to Medical Treatments
Hitoshi Maeda
Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharm
Kumamoto University,



新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、複数のバイオマーカーの使用を単一のバイオマーカーで済むことに成功したため、より診断時間が短縮される。
- 従来技術では抗体を利用する点で、保管や取り扱いに注意が必要であったが、本技術で適用する蛍光タンパク質は構造が安定なため、より簡便な保管・作業が可能になった。
- 従来技術では抗体を利用する点で、蛍光標識が必要であったが、本技術で適用する蛍光タンパク質は微生物より取得可能なため、同等の診断コストが1/10程度まで削減されることが期待される。
- 従来技術では抗体を利用する点で、実験動物に依存することが必要であったが、本技術で適用する蛍光タンパク質は微生物より取得可能なため、SDGsの観点にかなっている。
- 従来技術では抗体を利用する点で、標的バイオマーカーが異なると抗体を取得する必要があったが、本技術では蛍光タンパク質を化学修飾する方法のため、標的を変更しやすい。

想定される用途

- 現在の体内炎症状態の診断に用いられている標識抗体を化学修飾蛍光タンパク質に変更すれば、現有の装置、解析システムでそのまま高感度、時短、コスト削減の診断が可能となる。
- 現在のマクロファージの識別診断のみならず、本技術では蛍光タンパク質の化学修飾を変更するだけでガンの診断等、他の疾病の診断に適用することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、培養マクロファージの分極化の識別可能性や機構が一部検証されている。さらなる条件の最適化と様々な蛍光タンパク質の利用可能性の検討により汎用性を広げていく。
- 現在はマクロファージの分極化識別のみを検証しているが、同様の機構で識別可能と考えられる例を複数検証し、診断基盤技術として拡張の可能性を探る（がん、自己免疫疾患など）。
- 今後、実際の疾病モデルにおける採血マクロファージや他の細胞の識別条件の最適化を進め、実用的に適用するための条件設定を行っていく。

企業への期待

- 本技術の診断基盤技術の可能性の検証には時間と費用が必要。
- 本技術の実用的な診断技術の可能性を検証するため、疾病モデル試料の提供が可能な企業との共同研究を希望。
- また、従来のフローサイトメトリー法を利用した診断技術の次世代化を考える企業は本技術の導入が有効と思われる。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は従来の診断に使用していた装置、解析システムを変更することなく、高感度、時短、コスト削減に向けた技術をなっているため引き続きこれらの診断技術を進める企業に貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり企業にとって必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたっての技術指導等も可能。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：マクロファージの分極化を識別するための組成物、
及びマクロファージの分極化を識別する方法
- 出願番号：特願2024-140689
- 出願人：埼玉大学
- 発明者：鈴木美穂、バンダラナヤカ ムディヤンセラゲ ウダリ
カルパナ バンダラナヤカ

産学連携の経歴

- 2014年 旭化成メディカル(株)と共同研究実施
- 2015年-2020年 (株)Cysay(旧クオリーメンホールディングス)と共同研究実施
- 2015年-2017年 DIC(株)と共同研究実施
- 2019年-2023年 (株)ニッピと共同研究実施
- 2020年 JST A-STEPトライアウトに採択
- 2021年 (株) Epsilon Molecular Engineeringと共同研究実施

お問い合わせ先

埼玉大学

研究機構オープンイノベーションセンター

TEL : 048-858-3849

E-mail : ois-info@gr.saitama-u.ac.jp