

炎症回復期に増加する
新規炎症抑制性単球の同定

研究室 免疫制御学研究室

学位申請者 池田 直輝

目次

	項
第 1 章 背景	2
第 2 章 実験方法および実験試薬	4
第 3 章 結果	
1. 各組織および末梢血における Ym1 発現細胞の同定	12
2. 敗血症回復期における Ym1 ⁺ Ly6C ^{hi} 単球の増加	13
3. Ym1 ⁺ Ly6C ^{hi} 単球の免疫抑制機能	14
4. 腸炎の回復期において Ym1 ⁺ Ly6C ^{hi} 単球は炎症抑制 および組織修復に寄与する	15
5. Ym1 ⁺ Ly6C ^{hi} 単球は単球前駆細胞から分化する	17
6. 図表	19
第 4 章 考察	40
参考文献	43
謝辞	47

第1章 背景

細菌感染や組織傷害が起こると、様々な免疫細胞が局所に浸潤し、急性炎症を誘発する。急性炎症により、微生物や組織傷害の原因が除かれると、速やかに組織修復が行われ、組織の恒常性が維持される。炎症および組織修復の長期化や調節不全は、過剰な線維化や組織の機能不全の原因となるため¹、これらの応答は厳密に制御されている。

免疫細胞の一種であるマクロファージは急性炎症と組織修復の両方に寄与することが知られており²、組織傷害時の治療ターゲットとして注目されている。組織傷害の炎症期では、組織常在マクロファージと炎症部位に浸潤した単球が協調して、サイトカインやケモカインを分泌し、炎症を惹起する。炎症初期にマクロファージを消去すると、これらのサイトカイン産生量が減少し、炎症が大幅に軽減することが報告されている³。一方で、回復期になると、マクロファージは炎症を収束し、platelet derived growth factor (PDGF) や transforming growth factor- β (TGF- β)、vascular endothelial growth factor- α (VEGF- α)などを産生し組織修復に寄与する。回復期にマクロファージを消去すると、組織の修復および再生が遅延することが報告されている⁴。このように炎症期と回復期で、マクロファージの役割は全く異なるが、このマクロファージの形質転換のメカニズムは明らかになっていない。すなわち、炎症型のマクロファージが、局所の状況に応じて回復期にみられる組織修復型のマクロファージに形質を変化させるのか、あるいは骨髄で異なる単球サブセットが分化し、回復期に炎症型に代わってそれらが傷害部位に浸潤するのか、現時点では不明である(図)⁵。

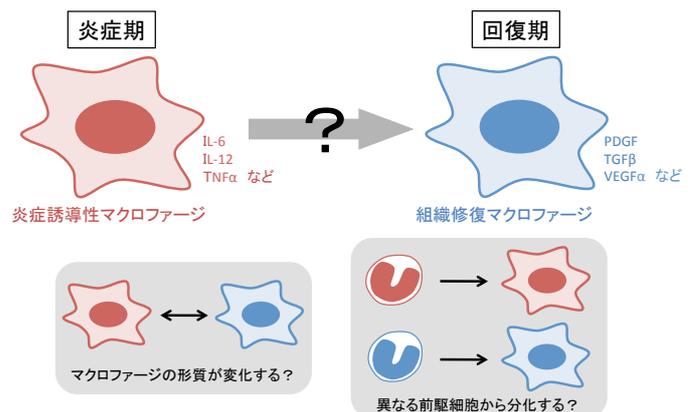


図. 組織傷害により誘導されるマクロファージの形質転換および想定される形質転換機構

マウス骨髄細胞を Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) 存在下で培養すると、骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophage :BMDM) と呼ばれる細胞を誘導することができる。BMDM をさらに異なるサイトカインの組み合わせによって刺激すると、M1 マクロファージ、M2 マクロファージと呼ばれる形質の異なる2つの細胞を誘導することができる⁵⁻⁷。Lipopolysaccharide (LPS) と interferon- γ (IFN- γ) の刺激により誘導される M1 マクロファージは、炎症促進性サイトカイン (interleukin (IL) -6 や tumor necrosis factor α (TNF α) など) や活性酸素の産生により、炎症促進や抗細菌活性、抗腫瘍活性を示す。一方で、IL-4 や IL-10 の刺激により誘導される M2 マクロファージは、抗炎症性サイトカイン (IL-10 や TGF- β など) 産生や組織修復に関連する遺伝子発現を示し、炎症の抑制や組織修復に寄与する。これら2つのマクロファージは *in vitro* で誘導される

細胞であるが、その形質は上記の炎症期、回復期のマクロファージのものと合致することから、マクロファージの形質転換を説明しうるモデルとして広く認められている。一方で、この M1、M2 マクロファージ分類は、生体におけるマクロファージの性質を十分に説明できないことも分かってきた。これまでに、M1 マーカー遺伝子 (IL-6 や TNF α 、nitric oxide synthase 2 (NOS2) など) や M2 マーカー遺伝子 (IL-10 や TGF- β 、Ym1 など) の発現レベルをもとに、組織常在あるいは組織浸潤マクロファージ分類する多くの試みがなされてきた。しかし、ほぼ全てのマクロファージが M1 と M2 を混合した表現型、あるいは M1/M2 どちらにも当てはまらない独特な表現型を示すことが分かってきた⁸。近年になり、マクロファージは環境因子や転写因子の修飾など多段的な段階を経て分化することが明らかになり^{8,9}、*in vivo* でのマクロファージの分化や活性化が *in vitro* の培養系よりもはるかに複雑であることが明らかになりつつある。このような状況のもと、生体内での免疫抑制あるいは組織修復マクロファージを同定するためには、これらに共通して発現するマーカー遺伝子を明らかにする必要があるが、そのような遺伝子は未だ明らかになっていない。

本研究で我々は、M2 マーカーの一つである Ym1 分子の発現を指標とすることで、Ly6C^{hi} 単球に機能の異なる二つの細胞集団存在することを初めて明らかにした。さらに、炎症の回復期において、Ym1 陽性の Ly6C^{hi} 単球が炎症抑制性の表現型を示し、同単球の消去により腸炎の回復が遅延することを明らかにした。これらの結果は、マクロファージの機能が単球の段階から規定されていること、そして Ym1 陽性単球が炎症抑制性のマクロファージの起源になりうることを示唆している。本研究の成果は、Ym1 を指標にすることで *in vivo* において、免疫抑制あるいは組織修復を促進するマクロファージの出現メカニズムを明らかにできる可能性を示している。

第 2 章 実験方法および実験試薬

Ym1-DTR マウスの作製

Ym1 遺伝子を含むゲノムクローンを、BACPAC リソース CHORI から得た。ターゲティングベクターを作製するために、Ym1 遺伝子の転写開始部位に対して -4.0~+5.0 kbp の領域を pBluescript II SK (+) ベクター (Stratagene) にサブクローニングした。次いで、BAC 組換え技術によって、エクソン 1 内の ATG 開始部位を含む 15 bp の断片を、ポリ A 尾部を含むヒト DTR (HB-EGF) cDNA と置換した。相同組換え体の選択を可能にするために、FRT に隣接する Neo カセットをヒト DTR 遺伝子の下流にクローニングした。チミジンキナーゼ遺伝子を 5'アームの上流に挿入し、ランダムな組換え体を排除した。Ym1-DTR マウスを作製するために、B6JN/1 ES 細胞にエレクトロポレーションにより線状化したターゲティングベクターをトランスフェクションした。G-418 およびガンシクロビル耐性クローンを選別し、DIG DNA 標識キットおよび検出キット (Roche) を用いて、ターゲティングベクターの外側に位置する 284 bp DIG 標識 DNA プローブを用いたサザンブロット解析によってスクリーニングを行なった。組み換えの起こった ES 細胞クローンをを用いて、凝集法によりキメラマウスを作製した。ES 細胞の比率が高いキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配させて +/Ym1^{DTR} マウスを作製した。+/Ym1^{DTR} マウスを C57BL/6J マウスに 4 世代以上戻し交配し、野生型 (+/+) およびヘテロ接合型 Ym1-DTR (+/Ym1^{DTR}) の同腹仔を解析に用いた。Genotyping PCR に用いたプライマー配列は表 1 に示す。

Ym1-Venus マウスの作製

Ym1-Venus ターゲティングベクターを作製するために、GeneArt Seamless PLUS Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を使用して、ヒト DTR フラグメントを Venus 遺伝子と置換し、Ym1-DTR ターゲティングベクターを改変した。Ym1-Venus マウスを作製するために、エレクトロポレーションにより B6J ES 細胞にターゲティングベクターをトランスフェクションした。CRISPR-Cas9 システムによるノックイン法を用いて、相同組換え効率を改善した。G-418 およびガンシクロビル耐性クローンを、DIG DNA 標識キットおよび検出キット (Roche) を用いて、ターゲティングベクターの外側に位置する 284 bp DIG 標識 DNA プローブを用いたサザンブロット解析によってスクリーニングした。生殖系列キメラマウスをインジェクション法によって作製した。ES 細胞の比率が高いキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配させて +/Ym1^{Venus} マウスを作製した。+/Ym1^{Venus} マウスを C57BL/6J マウスに 4 世代以上戻し交配し、野生型 (+/+) およびヘテロ接合型 Ym1-Venus (+/Ym1^{Venus}) の同腹仔を解析に用いた。Genotyping PCR に用いたプライマー配列は表 1 に示す。

試薬類

実験に使用した試薬類および購入したメーカーは、それぞれの「方法」もしくは「結果」の項目に示す。マウスに投与した LPS (E.coli, O111:B4, Sigma) は 1x PBS (Wako) で懸濁し、実験に使用した。分離した細胞は、ディフ・クイック (Sysmex) を用いて染色した。染色方法はキット付属のプロトコルに従った。

単球、マクロファージおよび樹状細胞の単離

マウスのリンパ節細胞を調製するため、腋窩リンパ節と膝窩リンパ節を取り出し、10 µg/ml DNase I (Worthington) および 10 µg/ml Collagenase II (Sigma-Aldrich) を添加した HBSS 内で 37°C、30 分間インキュベートした。処理した組織を 70 µm のナイロンメッシュ (AS ONE) に通し、FACS バッファー (1% BSA (Sigma-Aldrich) および 2 mM EDTA (Dojindo) を添加した PBS) で洗浄し、細胞はフローサイトメトリー解析に使用した。

大腸の粘膜固有層からの細胞を調製するため、大腸全体を取り出し、PBS で数回洗浄して糞便を除去してからハサミで縦に切開した。大腸を 2~3 cm の長さで切り、2% FBS および 20 mM EDTA (pH 7.2) を添加した HBSS 内で、37°C、15 分間インキュベートした。その後、組織を PBS で洗浄して EDTA を洗い流してからピンセットで軽くこすり、残りの上皮層を除去した。次に組織を 5 mm 片に細かく刻み、2% FCS、0.5 mg/ml Collagenase I (Wako)、0.5 mg/ml DNase I (Worthington)、1% Dispase (BD) および 10% HEPES (Nacalai) を添加した RPMI 1640 (Wako) 内で 37°C、40 分間インキュベートした。処理した断片を 70 µm Cell Strainer (BD Biosciences) に通し、FACS バッファーで洗浄した後、細胞はフローサイトメトリー解析もしくはセルソーターで単球サブセットを分取した後、遺伝子発現解析に使用した。

肝臓のマクロファージを調製するため、肝臓を Liver Perfusion Medium (Gibco) を用いて 3 ml/分の流速で 8 分間灌流した。次いで、肝臓を 0.5 mg/ml Collagenase IV (Gibco) を添加した基本灌流溶液 (136 mM NaCl、5.4 mM KCl、5 mM CaCl₂、0.5 mM NaH₂PO₃2H₂O、0.42 mM Na₂HPO₃12H₂O、10 mM HEPES (pH 7.5)、5 mM Glucose および 4.2 mM NaHCO₃) を流速 3 ml/分で 8 分間灌流した。灌流した肝臓を non-coated 10 cm dish (Corning) に移し、D-MEM, high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Wako) 内でメスを用いて小片に細断した。ピペッティングにより細胞を 70 µm Cell Strainer に通した。100 g で 2 分間遠心分離した後、上清を新しいチューブに移し、細胞ペレットが見えなくなるまで遠心分離を繰り返した。最終上清を 300 g で 5 分間遠心分離し、沈殿した細胞を 2 ml BD Pharm Lyse Buffer (BD Biosciences) にサスペンドし、室温で 80 秒間インキュベート、次いで FACS バッファーで等張になるように希釈した。遠心分離後、FACS バッファーで洗浄し、細胞はフローサイトメトリー解析に使用した。

脾臓細胞を調製するため、100 U/ml コラゲナーゼ D (Roche) を添加した HBSS で脾臓をフラッシュした。残った皮膜は、400 U/ml コラゲナーゼ D を添加した HBSS 内で 37°C、

45 分間インキュベートした。

肺細胞を調製するため、肺を摘出し、メスで 1 mm の長さの断片に細かく刻み、0.2 U/ml Liberase TL (Roche) および 10 µg/ml DNase I (Worthington) を添加した HBSS 内で、37 °C、25 分間インキュベートした。

骨髄細胞を調製するため、両側の後肢（2 つの脛骨および 2 つの大腿骨）の骨髄を氷冷 FACS バッファーでフラッシュした。ここまでの処理をした脾臓、肺および骨髄細胞を 70 µm ナイロンメッシュまたは 70 µm Cell Strainer に通した。300 g で 5 分間遠心分離し、沈殿した細胞を 2 ml BD Pharm Lyse Buffer に懸濁し、室温で 80 秒間インキュベートした後 FACS バッファーで等張になるように希釈した。遠心分離後、FACS バッファーで洗浄した。細胞はフローサイトメトリー解析に使用したほか、脾臓細胞および骨髄細胞は種々の解析にも使用した。

腹腔細胞を調製するため、マウスの腹腔内に 5 ml FACS バッファーを注入した。30 秒間、手で腹を震盪して細胞を懸濁した後、腹腔細胞懸濁液を 70 µm ナイロンメッシュに通した。遠心分離後、細胞を FACS バッファーで洗浄し、細胞をフローサイトメトリー解析に使用した。

末梢血細胞を調製するため、末梢血を 2 mM EDTA を添加した PBS に回収した。次いで、300 g で 5 分間遠心分離し、沈殿した細胞を 10 ml BD Pharm Lyse Buffer にサスペンドし、室温で 80 秒間インキュベートした。遠心分離後、細胞を FACS バッファーで洗浄し、細胞をフローサイトメトリー解析に使用した。

フローサイトメトリー解析

調製した細胞を 300 g で 5 分間遠心分離した後、Fc ブロッカーを添加し、氷上で 5 分間インキュベートした。次に蛍光標識された抗体を添加し、氷上で遮光して 25 分間インキュベートした。FACS バッファーで洗浄し、死細胞除去のために 1 µg/ml 7-AAD (BioLegend) を添加した FACS バッファーに懸濁して、フローサイトメトリーで解析した。Foxp3 の細胞内染色には FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) を用い、付属のプロトコルに従って染色した。使用した抗体のクローンおよびメーカー名は表 2 に示す。

自動磁気細胞分離装置とセルソーターを用いた細胞の分離

単球および好中球単離のために、マウスから調製した骨髄細胞もしくは脾臓細胞に Fc ブロッカーを添加し、4°C、5 分間インキュベートした。次いで、Lin 抗体 (CD4、CD8、NK1.1、B220 および Ter119) を添加してから 4°C、20 分間インキュベートした。細胞を FACS バッファーで洗浄し、抗ビオチンマイクロビーズ (Miltenyi) を添加してから 4°C、20 分間インキュベートした。FACS バッファーで洗浄後、Lin 陽性細胞を自動磁気細胞分離装置により除いた。Lin 陰性細胞を CD115、Ly6C および Ly6G 抗体で染色し、FACS バ

ッファーで洗浄後、死細胞除去のために 1 µg/ml DAPI (Dojindo) を添加した FACS バッファーにサスペンドし、セルソーター (SH800) で単球あるいは好中球を分離した。

マウスから好中球前駆細胞 (GP) あるいは単球前駆細胞 (MoP) を分離するため、マウス骨髄細胞を Lin 抗体 (CD4、CD8、B220、NK1.1、Ter119、Sca-1、CD11b、Gr-1 および 7/4) を添加し、以降は上記と同様に自動磁気細胞分離装置により Lin 陰性細胞を得た。そして、Lin 陰性細胞を c-Kit、CD16/32、Ly6C および CD115 抗体で染色し、FACS バッファーで洗浄後、死細胞除去のために 1 µg/ml DAPI を添加した FACS バッファーにサスペンドし、セルソーター (SH800) で GP あるいは MoP を分離した。

定量的 RT-PCR (qRT-PCR) および RNA シーケンスに用いる total RNA の抽出

セルソーターで単離した細胞から RNeasy Mini (あるいは Micro) Kit (QIAGEN) または TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific) を用いて、キットに付属したプロトコルに従って total RNA を抽出した。qRT-PCR 用のサンプルは、ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて、抽出した total RNA を cDNA に逆転写した。qRT-PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて合成した cDNA に対して行った。発現レベルを 18s リボソーム RNA (rRNA) に対して標準化した。qRT-PCR に用いたプライマーは表 3 に示す。

RNA シーケンス (RNA-seq)

SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep Kit for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies) を用いて、40 ng の total RNA から RNA-seq 分析のための DNA ライブラリーを調製した。配列決定は HiSeq 1500 HiSeq 1500 sequencer (Illumina) を用いて行い、50-bp single-end read mode で行った。読み込んだデータの FPKM (fragments per kilo base of exon per million reads) 値を利用してデータ解析を行った。

In vitro の単球刺激実験

LPS 投与 48 時間後の Ym1-Venus マウスの骨髄からセルソーターで分取した単球を、1 µg/ml LPS (E.coli, O111:B4, Sigma) で 24 時間刺激した。培養上清中の IL-6、IL-12、TNFα、IL-10 濃度を ELISA MAX Standard kit (BioLegend) により定量した。操作は付属のプロトコルに従った。Ym1 濃度は我々が作成した ELISA によって定量した。

抗 Ym1 モノクローナル抗体の作製

293T 細胞に Ym1-FLAG (Ym1 タンパクの 3'末端に FLAG ペプチドを合成した) 発現ベクターをリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。培養上清中の Ym1-FLAG タンパクを ANTI-FLAG M1 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) と FLAG Peptides (Sigma-Aldrich) を用いて精製した。精製した Ym1-FLAG タンパクをアルメニアハムスターの足底に免疫した。初回免疫時には TiterMax Gold (TiterMax) も投与した。PEG1500 (Roche) を用いて、リンパ節細胞を NSO^{bcl2} ミエローマ細胞と細胞融合させた。ハイブリドーマ細胞を、10% FBS、HAT (Sigma-Aldrich) および 1% BM-Condimed (Roche) を添加した DMEM で選択した。ハイブリドーマの培養上清を ELISA でスクリーニングし、Ym1-FLAG タンパクを特異的に検出する抗体産生ハイブリドーマを選択した。

Ym1 ELISA の樹立

PBS で希釈した 10 µg/ml ハムスター抗 Ym1 抗体(我々の実験室で作製したクローン、10G10-1) を 96 ウェルプレート (Greiner) に添加し、4°Cで一晩コーティングした。ブロッキングバッファー (5% Skim milk (Megmilk Snow Brand) および 0.2% Tween (Wako) を添加した PBS) で 1 時間ブロッキングした後、ブロッキングバッファーで 10 倍に希釈した単球培養上清を各ウェルに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。次いで、ブロッキングバッファーで希釈した 2.5 µg/ml ビオチン化ハムスター抗 Ym1 抗体 (我々の実験室で作製したクローン、7D4) を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。続いて HRP-ストレプトアビジンを添加し、室温で 30 分間インキュベートした。最後に、基質溶液 (TMB Microwell Peroxidase Substrate System、KPL) を各ウェルに添加して 30 分間室温で 30 分間インキュベートした。2 M H₂SO₄ で反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (BioRad) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

DSS 誘導腸炎モデル

マウスに 2.0% DSS (MW 36000-50000、MP Biomedicals) を 5 日間自由飲水により投与し、その後普通水に戻して飼育した。体重は DSS の投与開始後、毎日あるいは数日おきに測定した。Ym1-DTR マウスを用いた実験では、DSS の投与開始 8 および 10 日後に 25 µg/kg となるように DT (Calbiochem) を腹腔内投与した。また、野生型マウスに抗体を投与する実験では、抗 Ly6G 抗体 (クローン 1A8、Bio X Cell) あるいはラット IgG2A アイソタイプコントロール抗体 (クローン 54447、R&D systems) を DSS の投与開始 8 および 10 日目に腹腔内投与した。

好中球前駆細胞（GP）および単球前駆細胞（MoP）の *in vitro* 培養実験

野生型あるいは Ym1-Venus マウスの骨髄から分離した GP あるいは MoP を 10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Wako）および 10 mM HEPES（Nacalai）を添加した D-MEM, high glucose に懸濁し、96 穴プレートに 3000 cells/well で播種した。培養時には 10% M-CSF（CMG14-12 culture medium）、50 ng/ml rG-CSF（Chugai）、20 ng/ml Recombinant Mouse GM-CSF（BioLegend）あるいは 10 ng/ml Murine IL-3（Pepro Tech）を単独もしくは混合して添加した。72 時間培養した後、フローサイトメトリーで表面マーカー発現および細胞数を解析した。

統計処理

データは、Prism（GraphPad Software）を用いて分散分析（ANOVA）または T 検定により統計処理した。p < 0.05 の値を有意とみなした。

表 1 Genotyping PCR に用いたプライマー配列

標的配列	プライマー配列 (5'→3')	
WT (Ym1-Venus / DTR)	Fwd	TAAGTTTTTCATATCCTCCCATCTATTTCC
	Rev	TGGATTTGAATCTGTATGTAAGTAGAGCAC
Targeted (Ym1-Venus)	Fwd	TAAGTTTTTCATATCCTCCCATCTATTTCC
	Rev	TTCTGCTGGTAGTGGTCGGC
Targeted (Ym1-DTR)	Fwd	TAAGTTTTTCATATCCTCCCATCTATTTCC
	Rev	ACAGATGACAGCACCCACAGC

表 2 定量的 RT-PCR に用いたプライマー配列

標的遺伝子	プライマー配列 (5'→3')
<i>I8s rRNA</i>	Fwd CGGACAGGATTGACAGATTG Rev CAAATCGCTCCACCAACTAA
<i>Ym1</i>	Fwd AAAGACAAGAACAACACTGAGCTAAAAACTC Rev GAATCTGATAACTGACTGAATGAATATC
<i>Ltf</i>	Fwd CTGTGCCCTGTGTATTGGTG Rev ATGCAACATTTCTGCCTTC
<i>Mmp9</i>	Fwd CTTCCCCAAAGACCTGAAAAC Rev CTGCTTCTCTCCCATCATCTG
<i>Retnlg</i>	Fwd GGAAGTTCTTGCCAATCGAG Rev TGCCTGAAGCCGTGATACTA
<i>Marco</i>	Fwd CTGCTTCTCTCCCATCATCTG Rev GGAAGTTCTTGCCAATCGAG
<i>Ccr2</i>	Fwd ATCCACGGCATACTATCAACATC Rev CAAGGCTCACCATCATCGTAG
<i>Il6</i>	Fwd CTGGAGTACCATAGCTACC Rev CTGTTAGGAGAGCATTGGA
<i>Il10</i>	Fwd CCAAGCCTTATCGGAAATGA Rev TTTTCACAGGGGAGAAATCG
<i>Nod2</i>	Fwd CGACATCTCCCACAGAGTTGTAATCC Rev GGCACCTGAAGTTGACATTTTGC
<i>Nos2</i>	Fwd GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA Rev GTGGACGGGTTCGATGTCAC
<i>Slpi</i>	Fwd CTTGCTCTGGGGATCCTG Rev GGCTCCGATTTTGATAGCAT
<i>Tlr2</i>	Fwd GCTGGAGGACTCCTAGGCT Rev GTCAGAAGGAAACAGTCCGC
<i>Mpo</i>	Fwd TTAGGAAGCTACGTGATGGTG Rev AAGATGTTGTTCTTCGACACG
<i>Ctsg</i>	Fwd CCCGAGAGAAAGGAAGTCTG Rev TGAAGCTCTGGATTTTGGTG
<i>Lyz</i>	Fwd GACTCCTCCTGCTTTCTGTAC Rev TGAGCTAAACACACCCAGTCAG

表 3 フローサイトメトリー解析に用いた抗体および試薬

標的マーカー	クローン名	メーカー
CD16/32	2.4G2	BD Biosciences
CD45.1	A20	BD Biosciences
CD62L	MEL-14	BD Biosciences
MHCII	AF6-120.1	BD Biosciences
SiglecF	E50-2440	BD Biosciences
B220	RA3-6B2	Biolegend
CD106 (VCAM-1)	429 (MVCAM.A)	Biolegend
CD115	AFS98	Biolegend
CD117 (c-Kit)	2B8	Biolegend
CD11b	M1/70	Biolegend
CD11c	N418	Biolegend
CD135 (Flt3)	A2F10	Biolegend
CD16/32	93	Biolegend
CD19	6D5	Biolegend
CD274 (PD-L1)	10F.9G2	Biolegend
CD3	145-2C11	Biolegend
CD34	HM34	Biolegend
CD4	GK1.5	Biolegend
CD45.2	104	Biolegend
CD64	X54-5/7.1	Biolegend
CD8	53-6.7	Biolegend
CD88 (C5aR)	20/70	Biolegend
F4/80	BM8	Biolegend
Foxp3	150D	Biolegend
Gr-1	RB6-8C5	Biolegend
Ly6C	HK1.4	Biolegend
Ly6G	1A8	Biolegend
MHCII	M5/114.15.2	Biolegend
NK1.1	PK136	Biolegend
Rat IgG2a, κ	RTK2758	Biolegend
Rat IgG2b, κ	RTK4530	Biolegend
Sca-1	D7	Biolegend
SA-PerCP/Cy5.5		Biolegend
Ter119	TER-119	Biolegend
CD204	REA148	Miltenyi Biotec
Ly6B.2 (7/4)	REA115	Miltenyi Biotec
REA Control	REA293	Miltenyi Biotec
CCR2	475301	R&D systems
CXCR2	242216	R&D systems
CD169	M7	当研究室で作製した

第3章 結果

1. 各組織および末梢血における Ym1 発現細胞の同定

Ym1 は骨髄系の細胞に発現することが知られており、一般に免疫抑制性の表現型を示す M2 マクロファージのマーカーとして用いられる。ところが、生体内における Ym1 発現細胞および、それらの細胞における Ym1 発現の制御機構は明らかになっていない。そこで我々は、生体内で Ym1 発現細胞を可視化するために、Ym1 遺伝子座に蛍光タンパク質の一つである Venus の遺伝子(cDNA)を導入したマウス (Ym1-Venus マウス) を作製した (図 1a、b)。まず始めに、この Ym1-Venus マウスを用いて、各組織マクロファージおよび樹状細胞における Ym1-Venus 発現細胞を解析した。その結果、図 1c に示すようにリンパ節、脾臓、大腸、肝臓、腹腔に常在する組織マクロファージは Ym1-Venus 陰性であることが分かった。一方で、肺の組織マクロファージには Ym1-Venus 発現がみられた。肺の組織マクロファージは肺泡マクロファージ (CD11c⁺CD64⁺) と間質マクロファージ (CD11b⁺MHCII⁺) に大別されるが、前者のみが Ym1-Venus 陽性だった。肺泡マクロファージに Ym1 が発現することはすでに知られており¹⁰、既報と一致した結果であった。続いて、末梢血細胞における Ym1-Venus 陽性細胞の有無を解析した。Ym1 が好中球に発現することはすでに報告されているが^{11,12}、これらの既報と一致して Ly6G⁺の好中球は Ym1-Venus 陽性だった (図 1d、e)。さらに、脾臓 (図 1f) および骨髄 (図 2a) の好中球でも Ym1-Venus 発現がみられた。骨髄において、好中球は c-Kit⁺Ly6G⁻の好中球前駆細胞から分化するが、その分化・成熟が進むにつれて、c-Kit 発現が減少し、Ly6G 発現が増加する¹³。Ym1-Venus マウスの骨髄において、好中球分化段階ごとの Ym1-Venus 発現を解析したところ、図 2b に示すように成熟好中球 (図 2b、第 5 分画) のみならず、未熟好中球 (図 2b、第 2-4 分画) においても Ym1-Venus 発現がみられた。Ym1 mRNA 発現を定量的 RT-PCR により解析したところ、未熟好中球のほうが成熟好中球よりも Ym1 mRNA 発現が高いことが分かった (図 2c)。このことから、Ym1 は好中球分化の初期段階から発現することが示された。我々はさらに、末梢血、脾臓および骨髄の好酸球、リンパ球 (T、B 細胞) および NK 細胞の Ym1-Venus 発現を解析したが、これらの細胞は全て Ym1-Venus 陰性だった (図 1d、e、f、2a)。

我々は末梢血において、好中球以外にも CD115⁺Ly6C^{hi}単球の一部 (5%) が Ym1-Venus 陽性であることを見いだした (図 1d、e)。末梢血の単球は、CD115⁺Ly6C^{hi}と CD115⁺Ly6C^{lo}単球の2つのサブセットにより構成されているが¹⁴、定常状態では CD115⁺Ly6C^{hi} サブセットにのみ、Ym1-Venus 陽性細胞が存在することが分かった。この Ym1-Venus 陽性の CD115⁺Ly6C^{hi}単球は脾臓においてもみられた (図 1f)。

Ym1-Venus 陽性 Ly6C^{hi}単球における Ym1-Venus 発現がどの分化段階からみられるか明らかにするため、骨髄における単球の Ym1-Venus 発現を解析した。始めに、成熟した単

球の Ym1-Venus 発現を解析したところ、末梢血と同様に Ly6C^{hi} 単球の一部 (4%) が Ym1-Venus 陽性だった (図 2a)。最近、Ly6C^{hi} 単球は Flt3 と CD11c の発現を指標に 3 つのサブセットにより構成されることが報告されている¹⁵。この報告に従って Ly6C^{hi} 単球を解析したところ、Flt3⁺CD11c⁻サブセットのみ Ym1-Venus⁺細胞がみられた (図 2d)。Ly6C^{hi} 単球はマクロファージあるいは樹状細胞に分化するが、Flt3⁺CD11c⁻サブセットはマクロファージに分化する細胞集団である¹⁵。さらに我々は、骨髄系前駆細胞における Ym1-Venus 発現を解析した¹⁶。その結果、骨髄系共通前駆細胞 (CMP) および、顆粒球単球前駆細胞 (GMP)、巨核球赤芽球前駆細胞 (MEP) に Ym1-Venus 発現はみられなかった (図 2e)。単球は GMP から単球樹状細胞前駆細胞 (MDP)、単球前駆細胞 (MoP) を経て分化・成熟することが知られている¹⁷。MDP 以降の分化段階における Ym1-Venus 発現を解析したところ、c-Kit 発現の低下した分化終盤の単球から Ym1-Venus が発現することが分かった (図 2f)。

これらの結果から、骨髄では Ym1 は単球前駆細胞には発現せず、分化終盤の Ly6C^{hi} 単球サブセットのごく一部に発現することが明らかになった。

2. 敗血症回復期における Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の増加

Ly6C^{hi} 単球は血中から炎症部位に浸潤し、病原体の排除や組織傷害に伴う炎症の制御に寄与している。我々は定常時の解析に続いて、炎症時の Ly6C^{hi} 単球における Ym1-Venus 発現を経時的に解析した。この目的のために、Ym1-Venus マウスに LPS を静脈投与した。LPS 投与による炎症の惹起は、敗血症モデルとして広く用いられている^{18,19}。炎症性サイトカインである TNF α や IL-6 の血清中濃度は、LPS 投与 2 から 4 時間後にピークに達し、24 時間後には定常時のレベルまで減少する (図 3a) ことから、全身性炎症が急激に惹起され、その後急速に収束に向かうと考えられる。末梢血中の好中球の割合は、LPS 投与 24 時間後に増加 (定常時の 21.4% から 79.4% に増加) し、72 時間後には定常時と同じ割合まで減少した (図 3b)。一方で、Ly6C^{hi} 単球の割合は LPS 投与 24 時間後 (1.53%) には定常時 (1.10%) と変化がなかったが、LPS 投与 48 時間後にはその割合が増加し、末梢血白血球中の 6% を占めた (図 3b)。興味深いことに、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の割合は炎症回復期に劇的に増加した。すなわち、Ly6C^{hi} 単球のうち、Ym1⁺細胞の割合は LPS 投与 24 時間後にはおよそ 10% 程度であったが、炎症の回復期と考えられる 48 時間後にはおよそ 50% まで増加した (図 3b、c)。LPS 投与 72 時間後には Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の割合は 24% まで減少したが、定常状態や炎症の急性期には Ym1-Venus 発現がみられなかった Ly6C^{lo} 単球の一部 (5.18%) にも Ym1-Venus 陽性細胞がみられるようになった。Ly6C^{hi} 単球は末梢において、Ly6C^{lo} 単球になることが報告されていることから^{17,20-23}、LPS 投与 72 時間後における Ym1⁺Ly6C^{lo} 単球の出現は、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球が Ly6C^{lo} 単球になる可能性を示唆している。Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の増加は、LPS 投与 48 時間後の脾臓でも認められた (図 3d)。

末梢血および脾臓の解析結果と同様に、LPS 投与 48 時間後の骨髄においても Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の割合が増加し、Ly6C^{hi} 単球のおよそ 40%が Ym1-Venus 陽性だった (図 3e)。また、CD115⁺Ly6C^{hi} 単球の 3 つのサブセットのうち、Flt3⁻CD11c⁻サブセットでのみ Ym1-Venus 陽性細胞がみられた (図 3g)。Ym1-Venus 陽性単球における Ym1 mRNA の高発現は、定量的 RT-PCR によっても確認された (図 3f)。さらに我々は、LPS 投与 48 時間後の骨髄前駆細胞における Ym1-Venus 発現を解析すると、MoP のごく一部 (6%程度) にも Ym1-Venus 陽性細胞がみられ、その割合は c-Kit 発現が下がるにつれて増加した (図 3h)。このことは、炎症時において Ym1 陽性単球が分化の初期段階から生じることを示唆している。

これらの結果より、炎症の回復期において Ym1 を発現する Ly6C^{hi} 単球サブセットが劇的に増加することが明らかとなった。

3. Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の免疫抑制機能

我々は、全身性炎症の回復期に増加する Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の機能を明らかにするために、LPS 投与 48 時間後の Ym1-Venus マウス骨髄から Ym1-Venus 陽性と陰性の Ly6C^{hi} 単球を分取して、その性質を比較した。最初にサイトスピンをした細胞をギムザ染色により形態を比較したところ、どちらも単球の特徴である楕円形の核をもち、明らかな差異はみられなかった (図 4a)。次に、細胞表面マーカーの解析を行った。その結果、Ly6C^{hi} 単球のマーカーである CD62L や CCR2、CD204 はどちらの細胞集団にも発現がみられ、それらの発現強度に差はみられなかった (図 4b)。その他に、Ly6C^{hi} 単球に発現することが知られている CD11b や F4/80、PD-L1、C5aR、Ly6C^{lo} 単球に発現する MHCII、一部のマクロファージに発現する VCAM-1、好中球に発現する Ly6G や CXCR2 も解析したが、どのマーカーも両者の間に差はなかった (図 4b)。上述のように、末梢血中を循環する Ly6C^{hi} 単球は Ly6C^{lo} 単球へと分化することが知られている。そこで、我々は LPS 投与 48 時間後の Ym1-Venus マウス (CD45.2) 骨髄の Ly6C^{hi} 単球から Ym1-Venus 陽性細胞と陰性細胞を分取して、それぞれの単球を CD45.1 コンジェニックマウスに移植した。その後、経時的に末梢血の CD45.2 陽性細胞 (Ym1-Venus マウス由来) の Ly6C 発現をフローサイトメトリーで解析し、Ly6C^{lo} 単球への分化能を検討した。その結果、Ym1-Venus 陽性、陰性細胞ともに移植 48 時間後には Ly6C 発現レベルが低下したことから、どちらの分画も Ly6C 陰性単球への分化能を有することが分かった (図 4c)。これらの結果から、Ym1-Venus 陽性単球と陰性単球は、Ly6C^{hi} 単球に特徴的な表現型を共有している明らかになった。

Ym1-Venus 陽性単球の特徴をさらに明らかにするために、LPS 投与 48 時間後のマウスの骨髄から、Ym1-Venus 陽性と陰性の Ly6C^{hi} 単球を分取し、それぞれの mRNA 発現を RNA シーケンス (RNA-seq) により解析した (図 4d、e、f)。単球・マクロファージ関連遺伝子発現を比較すると、両分画で差はほとんどみられなかった。Ym1 mRNA は Ym1-

Venus 陽性単球で陰性単球より発現が高いことを確認したが、その他の M2 関連遺伝子の発現は、両者の間で差がみられなかった。一方、好中球関連遺伝子の発現を比較すると、Ym1-Venus 陽性単球で matrix metalloproteinase 9 (*Mmp9*) や lactotransferrin (*Ltf*) といった好中球顆粒遺伝子の一部の発現が高く、その他の好中球関連遺伝子である lymphocyte antigen 6 family member G5B (*Ly6g5b*) や resistin like gamma (*Retnlg*) の発現には差がみられないことが分かった。RNA-seq により発現に差がみられた遺伝子に関しては定量的 RT-PCR でも解析し、同様の結果が得られた (図 4g)。これらの結果から、Ym1-Venus 陽性単球は好中球が有する特徴の一部を示すことが明らかになった。

さらに、Ym1-Venus 陽性単球と陰性単球の機能的な差異を検討するため、LPS を投与したマウスの脾臓からそれぞれの単球を分取し、*ex vivo* で再度 LPS 刺激をした。培養上清中のサイトカインを比較すると、図 5a で示すように、Ym1-Venus 陽性単球は陰性単球よりも炎症性サイトカイン (IL-6 や TNF α 、IL-12) 産生能が低く、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生能が高かった。Ym1-Venus 陽性単球は炎症の後期に増加すること、そして抗炎症性のサイトカイン産生能を示すことから、我々は同単球が炎症に対して抑制的な機能を持つのではないかと仮説を立てた。この仮説を証明するために、我々は LPS 処置をしたマウスの骨髄から Ym1-Venus 陽性単球と陰性単球を分取し、それぞれの単球を定常状態の野生型マウスに移植した後、これらのマウスに LPS を投与した。すると、*ex vivo* の結果と相関して、Ym1-Venus 陽性単球を移植することで LPS 投与による IL-6 産生が抑制された (図 5b)。

炎症の後期において、抑制性 T 細胞 (T_{reg}) が増加し、炎症の抑制に寄与することが知られている²⁴。Ym1-Venus 陽性単球が炎症の回復期に増加することから、同単球が T_{reg} の分化誘導に関与する可能性があるのではないかと考えた。その可能性を検討するため、抗 CD3/28 抗体刺激により T 細胞への分化を誘導した脾細胞に、LPS 刺激した Ym1-Venus 陽性あるいは陰性単球の培養上清を添加した。その結果、図 5c で示すように Venus 陽性単球は陰性単球と比べ、有意に T_{reg} への分化を促進することが示唆された。

これらの結果より、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は抗炎症性の表現型を示すことが明らかになった。

4. 腸炎の回復期において Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は炎症抑制および組織修復に寄与する

これまでの解析より、Ym1-Venus 陽性単球が、全身性炎症の回復期に増加することが明らかになったことから、我々は次に、局所炎症における Ym1-Venus 陽性単球の動態解析を行った。マウスへのデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 飲水投与は、急性腸炎でみられる上皮傷害を誘導する。この炎症はリンパ球を欠損したマウスでもみられることから、炎症誘導を主導する細胞は、マクロファージ等の自然免疫細胞と考えられている。また、DSS の飲水投与を中止した時点から、炎症の収束と腸管上皮の再生が起きる。そのため、このモデルでは炎症の急性期と回復期の両方を解析することができる。我々は、Ym1-

Venus マウスに DSS を 5 日間飲水投与し、その後普通水に戻して飼育した。そして、炎症を誘導したマウスの末梢血細胞における Ym1-Venus 発現を経時的に解析した。図 6a、b、c で示されるように、炎症の初期である Day 3 では Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の割合は低いままだった。ところが、DSS 投与を中止して 3 日後にあたる Day 8 では、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の割合が 35%まで増加し、その後の回復期においてその割合は 20%以上を維持していた。これらと相関して、脾臓と骨髄においても炎症の回復期に Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の著明な増加がみられた (図 6d、e)。さらに我々は、炎症部位である大腸の解析を行った (図 6f)。大腸および小腸の粘膜固有層にみられるマクロファージは、Ly6C^{lo}CD64^{hi} マクロファージと、Ly6C^{hi}CD64^{lo} 単球、およびこれらの細胞の中間体である Ly6C^{int}CD64^{int} 細胞の 3 分画に分類される。炎症の回復期の大腸において、Ym1-Venus 陽性細胞は Ly6C^{hi}CD64^{lo} 単球にみられ、Ly6C^{int}CD64^{int} と Ly6C^{lo}CD64^{hi} 分画にはほとんどみられなかった。大腸に浸潤した Ly6C^{hi}CD64^{lo} 単球は Ly6C^{lo}CD64^{hi} マクロファージに分化することが知られており、この結果から、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の Ym1 発現は大腸でマクロファージに分化する過程で徐々に減少すると考えられる。

腸炎を誘導したマウスでは、Ly6C^{hi} 単球が CCR2 依存的に炎症部位に集積するが、炎症部位に集積して初めて、炎症関連遺伝子を発現することが報告されている²⁵。そこで、我々は DSS Day 9 のマウスの大腸から Ym1-Venus 陽性単球と陰性単球を分取し、炎症に関連する遺伝子発現を比較した (図 6g)。その結果、大腸に浸潤した Ym1-Venus 陽性単球は陰性単球に比べ、*Il6* 発現が低く、*Il10* 発現が高いことから、同単球は炎症部位においても炎症抑制性の表現型を示すことが明らかになった。しかしながら、Ym1-Venus 陽性単球では、炎症マーカーや M1 マクロファージマーカーとして知られる *Nos2* の発現も高く、M1 マーカーと M2 マーカーを共発現することも分かった。加えて、Ym1-Venus 陽性単球は炎症の回復や組織修復に重要な *Slpi* 発現が高かった。

Ym1-Venus 陽性単球の増加するタイミングや遺伝子発現パターンから、同単球は炎症時の大腸において炎症の回復や組織修復に重要な機能を担っているのではないかと考えた。このことを証明するため、我々は Ym1 遺伝子座にジフテリア毒素受容体 (DTR) 遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作製した (Ym1-DTR マウス: 図 7a、b)。このマウスではジフテリア毒素 (DT) の投与により、Ym1 陽性細胞が誘導的に消失できると考えられる。実際に、定常状態の Ym1-DTR マウスに DT を投与すると、骨髄において好中球 (図 2a において、約半数が Ym1 陽性) の割合が減少した (図 7c)。すなわち、定常時には好中球は全体の 32%を占めていたが、その割合は DT 投与により徐々に減少し、投与 72 時間後には 12.5%まで減少した。さらに、LPS 投与により Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球を誘導したマウスに DT を投与しその 24 時間後の末梢血を解析すると、Ly6C^{hi} 単球の割合が約半分に減少した (野生型: 4.4%、Ym1-DTR: 2.3%) (図 7d)。この結果は、Ym1-DTR マウスに DT を投与することにより、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球を消失できることを示している。そこで、この

Ym1-DTR マウスに DSS を 5 日間自由飲水により投与し、その後普通水に戻して飼育した。そして、Day 8 および Day 10 (DSS 投与中止 3 および 5 日後) に DT を投与することで回復期に増加する Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球を消去し、同単球の腸炎の回復期における機能を解析した。すると、図 7e で示すように、炎症の回復期に Ym1 陽性細胞を消去することで体重の回復が遅延した。組織学的な所見においても、Ym1 陽性細胞の消去により炎症細胞浸潤の延長と組織修復の遅延が観察された (図 7f)。回復の遅延が好中球の消失によることで起きた可能性を否定するため、同様の条件で腸炎を誘導した野生型マウスに対し、Day 8 および Day 10 に抗 Ly6G 抗体またはコントロール抗体を投与した。その結果、両者の体重変化に差はみられず、このことから好中球の消去は腸炎の回復に影響しないことが分かった (図 7g)。

これらの結果より、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は炎症の局所にもみられ、炎症の回復および組織修復に関与することが示された。

5. Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は単球前駆細胞から分化する

定常時において、好中球は好中球前駆細胞 (GP)、単球は単球前駆細胞 (MoP) から分化することが知られているが²⁶、炎症時における GP あるいは MoP の分化能は明らかになっていない。そこで我々は、LPS 投与により炎症を誘導したマウスに GP あるいは MoP を移植することで、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の前駆細胞を明らかにしようと考えた。初めに、野生型マウス (CD45.2) から分取した GP あるいは MoP を定常状態の CD45.1 コンジェニックマウスに移植したところ、それぞれ Ly6G⁺CD115⁻の好中球、Ly6G⁻CD115⁺の単球に分化することを確認した (図 8a)。次に我々は、Ym1-Venus マウス (CD45.2) から分取した GP あるいは MoP を、LPS を投与した CD45.1 コンジェニックマウスに移植し、その 48 時間後の末梢血細胞を解析した。その結果、図 8b に示すように、GP を移植すると、その 85.4% が Ly6G 陽性の好中球に分化し、CD115 陽性の単球はほとんどみられなかった。一方で MoP を移植すると、好中球には分化せず、その 85.9% が CD115 陽性の単球に分化した。さらに、CD115 陽性単球の 55.6% が Ly6C^{hi} 単球になり、そのうちの 44.5% が Ym1-Venus を発現した。また、Ly6C^{lo} 単球に Ym1-Venus 発現はほとんどみられなかった。このことから、Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は GP ではなく MoP から分化することが明らかになった。さらに我々は、Ym1-Venus 陰性単球が Ym1-Venus 陽性単球にその表現型を変化する可能性を検討した。そのために、定常状態の Ym1-Venus マウスの骨髄から Ly6C^{hi} 単球を分取し、事前に LPS 投与した CD45.1 コンジェニックマウスに移植した。その結果、移植した Ly6C^{hi} 単球の Ym1-Venus 発現は変化せず、このことから Ym1-Venus 陰性単球から陽性単球にはその表現型が変化しないことが示された (図 8c)。

MoP から Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球への分化に必要な刺激を明らかにするため、Ym1-Venus マウスの MoP を様々なサイトカインで刺激し、それらの細胞の Ym1-Venus 発現を解析した

(図 8d)。M-CSF 存在下では、MoP は主に Ly6C^{lo} あるいは Ly6C^{hi} の F4/80⁺ 骨髄系細胞に分化するが、これらの細胞は Ym1-Venus を発現しなかった。一方、GM-CSF 存在下で培養すると、Ly6C^{lo} あるいは Ly6C^{hi} の F4/80⁺ 細胞のみならず Ly6C^{hi}F4/80⁺ 細胞にも分化し、それらの細胞に Ym1-Venus 発現がみられた。GM-CSF と M-CSF 共存下では、より多くの細胞が Ly6C^{hi}F4/80⁺ 細胞に分化し、それらの細胞には Ym1-Venus 発現がみられた。さらに、IL-3 と M-CSF 共存下においても、同様の分化パターンを示した。これらの結果は、GM-CSF/IL-3 シグナルが MoP から炎症抑制性の Ym1 陽性単球への分化に関与することを示唆している。

6. 図表

図 1

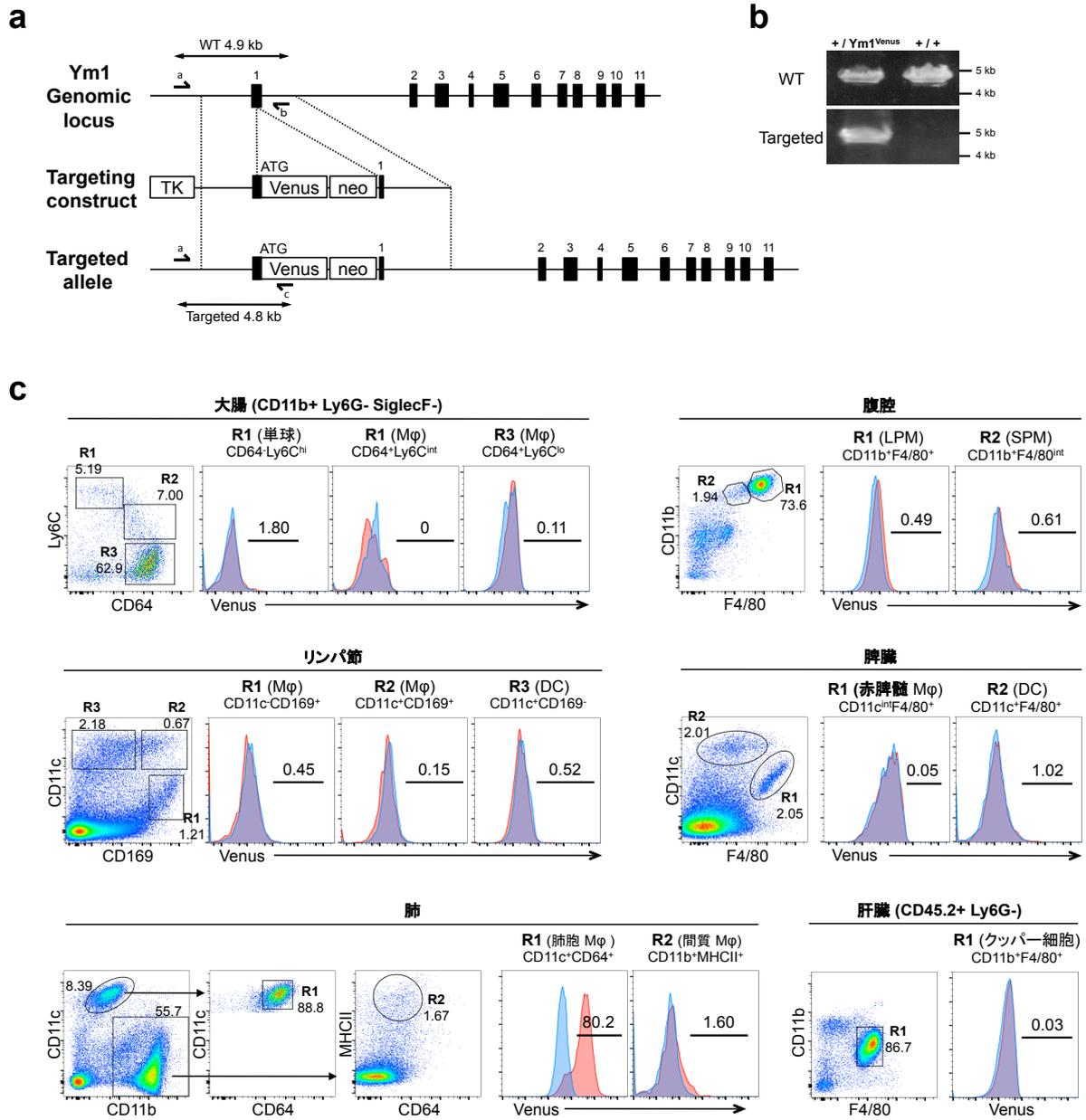
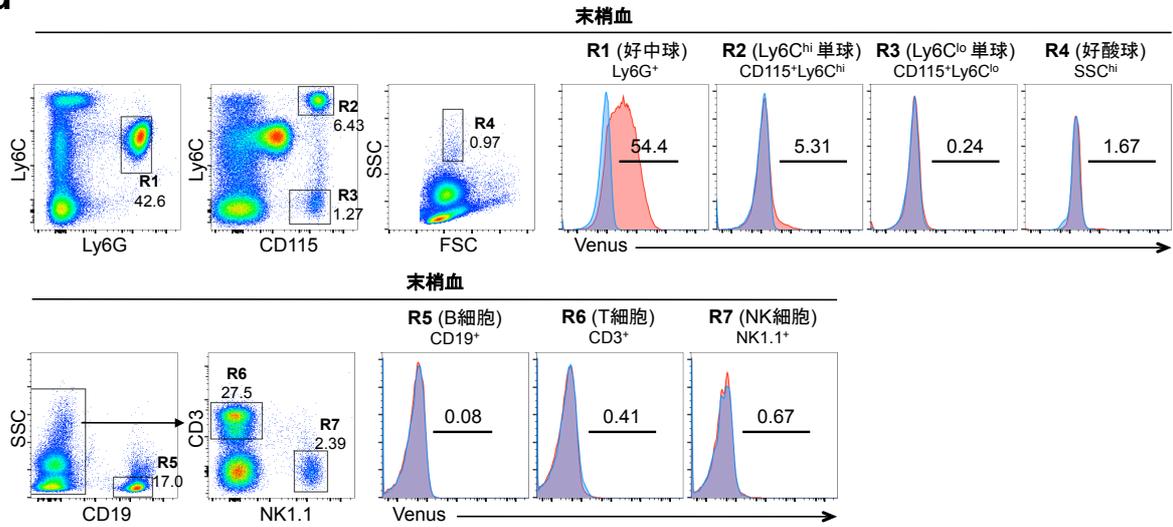
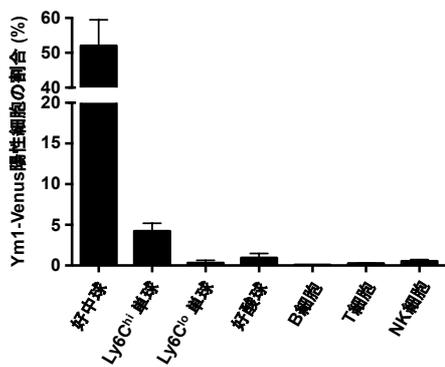


図 1 (続き)

d



e



f

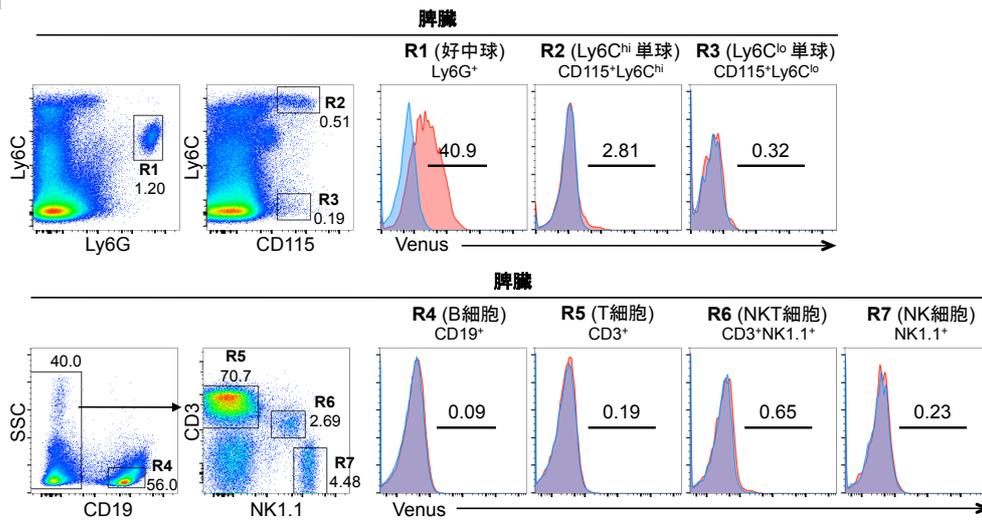


図 1. 末梢血および種々の組織における Ym1 発現細胞の同定

(a) Ym1-Venus ターゲティングコンストラクトの概略図を示す。Ym1 (Chi3l3) 遺伝子のエキソンは黒塗りの四角形で示す。改良型 Venus の cDNA (Venus)、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo)、および HSV-チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子は、白抜きの四角形で示す。遺伝子型判定 (Genotyping) のための PCR に使用したプライマーは、プライマー名 (a、b および c) とともに矢印で示し、予想される PCR 産物は両矢印で示す。

(b) 図に示されたプライマーセットを用いて Ym1-Venus (+/Ym1^{Venus}) マウスおよび野生型 (+/+) マウスの genotyping PCR を行った (野生型配列の検出には a と b、標的配列の検出には a と c のプライマーセットを用いた。)

(c-d) Ym1-Venus マウスおよび野生型マウスの各臓器より、マクロファージおよび樹状細胞を調製した。各細胞集団における Ym1-Venus 発現をフローサイトメトリーにより解析した。各臓器常在マクロファージと樹状細胞 (c)、および末梢血 (d) の白血球のフローサイトメトリー解析結果を示す。Mφ, マクロファージ; LPM, large peritoneal macrophages; SPM, small peritoneal macrophages; DC, 樹状細胞

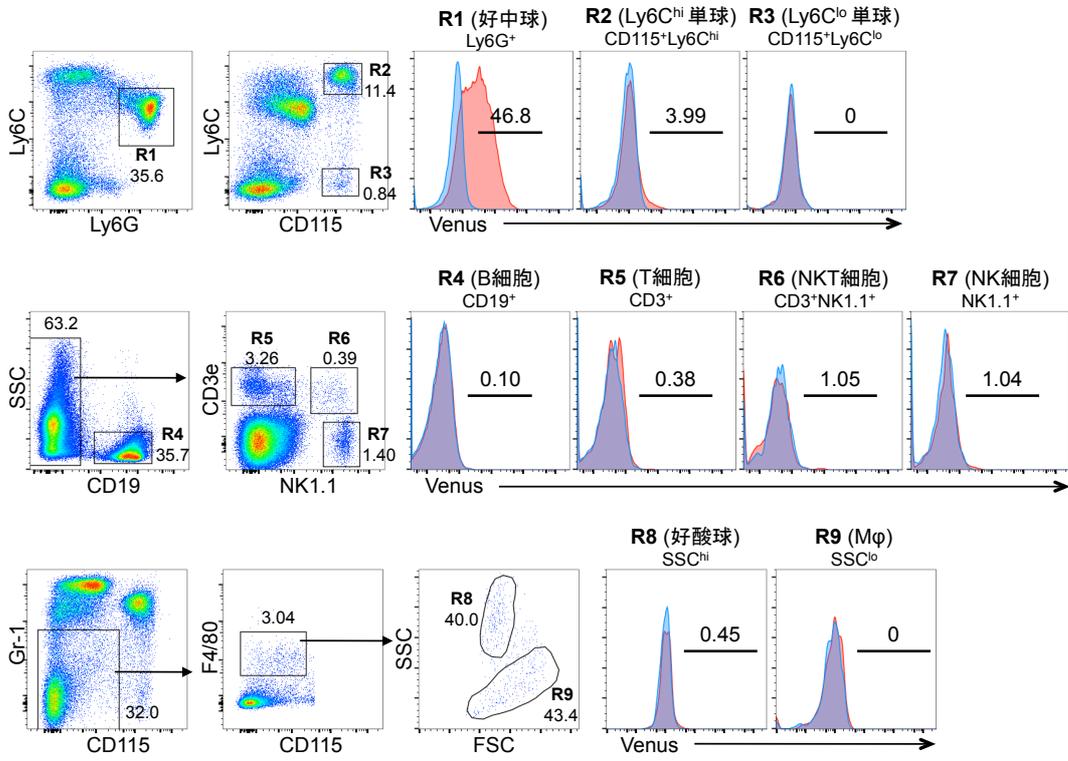
(e) 末梢血細胞における Ym1-Venus 陽性率を示す。エラーバーは SD。n=5

(f) Ym1-Venus マウスおよび野生型マウスの脾臓の白血球のフローサイトメトリー解析結果を示す。

フローサイトメトリー解析結果において、赤色のヒストグラムは Ym1-Venus マウス、青色のヒストグラムは野生型マウスを示す。各組織の左のドットプロットには、各細胞集団のゲーティングとその集団の全体に対する細胞の割合を示す。ヒストグラムの数字は Ym1-Venus マウスにおける Ym-1-Venus 陽性細胞の割合を示す。

图 2

a



b

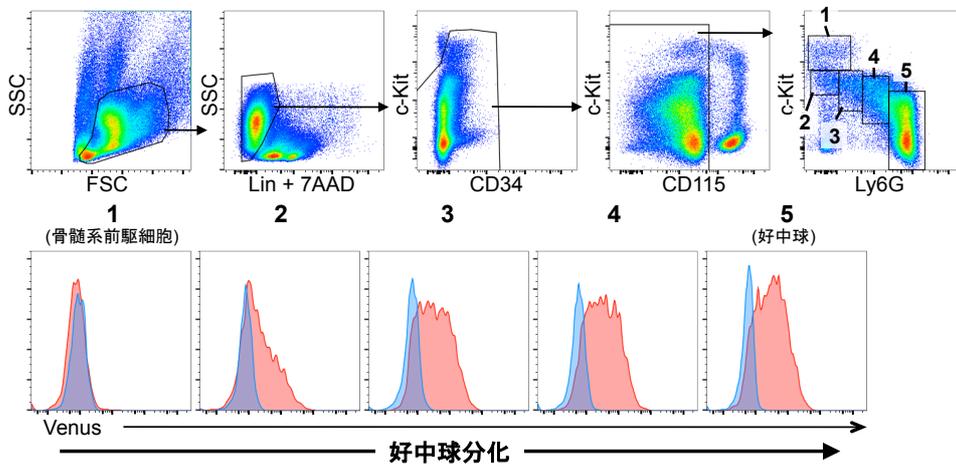


図 2 (続き)

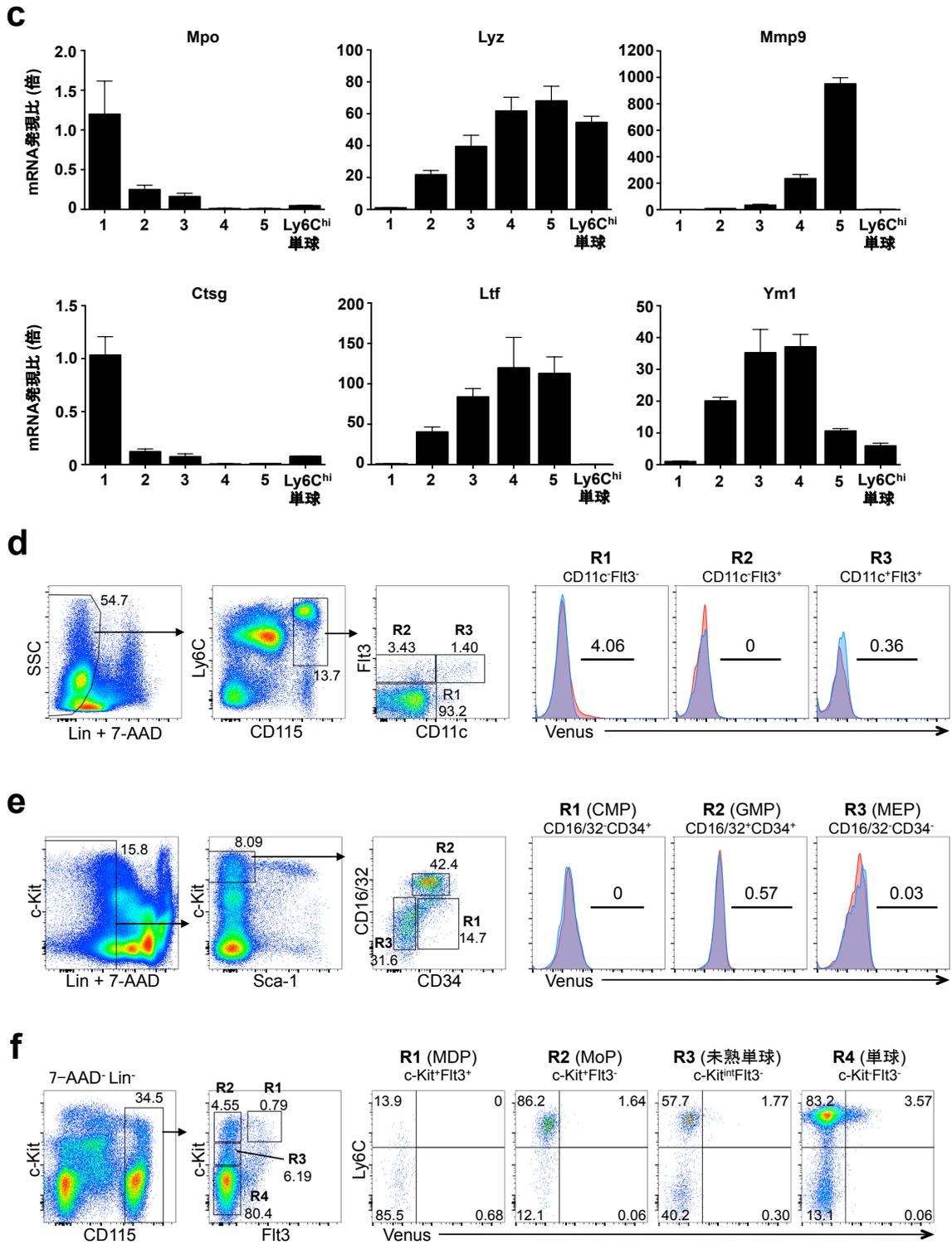


図 2. 骨髄細胞における Ym1 発現解析

(a) 骨髄細胞における Ym1-Venus 発現解析の結果を示す。Ym1-Venus マウスの骨髄細胞を CD115、Ly6C、Ly6G (上)、CD19、CD3、NK1.1 (中)、CD115、F4/80、Gr-1 (下) 抗体で染色し、各細胞集団における Ym1-Venus 発現をフローサイトメトリーにより解析した。Mφ, マクロファージ

(b, c) 好中球の各分化段階における Ym1-Venus 発現 (b) および各種遺伝子の mRNA 発現を示す (c)。

(b) 骨髄細胞を Lin (B220、CD11b、CD3e、Gr-1、NK1.1 および Ter119)、c-Kit、Sca-1、CD16/32 および CD34 抗体で染色した。好中球の分化段階を c-Kit と Ly6G の発現レベルで 5 つの細胞集団に分類し、それぞれの Ym1-Venus 発現を解析した。(c) (b) で示した 1-5 の細胞集団の好中球一次顆粒遺伝子 (*Mpo*、*Ctsg*)、二次顆粒遺伝子 (*Lyz*、*Ltf*)、三次顆粒遺伝子 (*Mmp9*) および *Ym1* 遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により解析し、細胞集団 #1 を基準とした遺伝子発現比を示す。エラーバーは SD。n=3

(d) Ly6C 陽性単球の 3 つのサブセットの Ym1-Venus 発現解析結果を示す。Lin (B220、CD19、CD3、Ly6G、MHCII、NK1.1 および Ter119)。

(e) 骨髄系前駆細胞の Ym1-Venus 発現解析結果を示す。Lin (B220、CD11b、CD3、Gr-1、NK1.1 および Ter119)。CMP, common myeloid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor

(f) 単球前駆細胞の Ym1-Venus 発現解析結果を示す。Lin (B220、CD3、Ly6G、NK1.1 および Ter119)。MDP, macrophage/dendritic cell progenitor; MoP, monocyte progenitor

フローサイトメトリー解析結果において、赤色のヒストグラムは Ym1-Venus マウス、青色のヒストグラムは野生型マウスを示す。ゲートとともに示された数字は、各細胞集団の全体に対する割合、ヒストグラムの数字は Ym1-Venus マウスにおける Ym-1-Venus 陽性細胞の割合を示す。

図 3

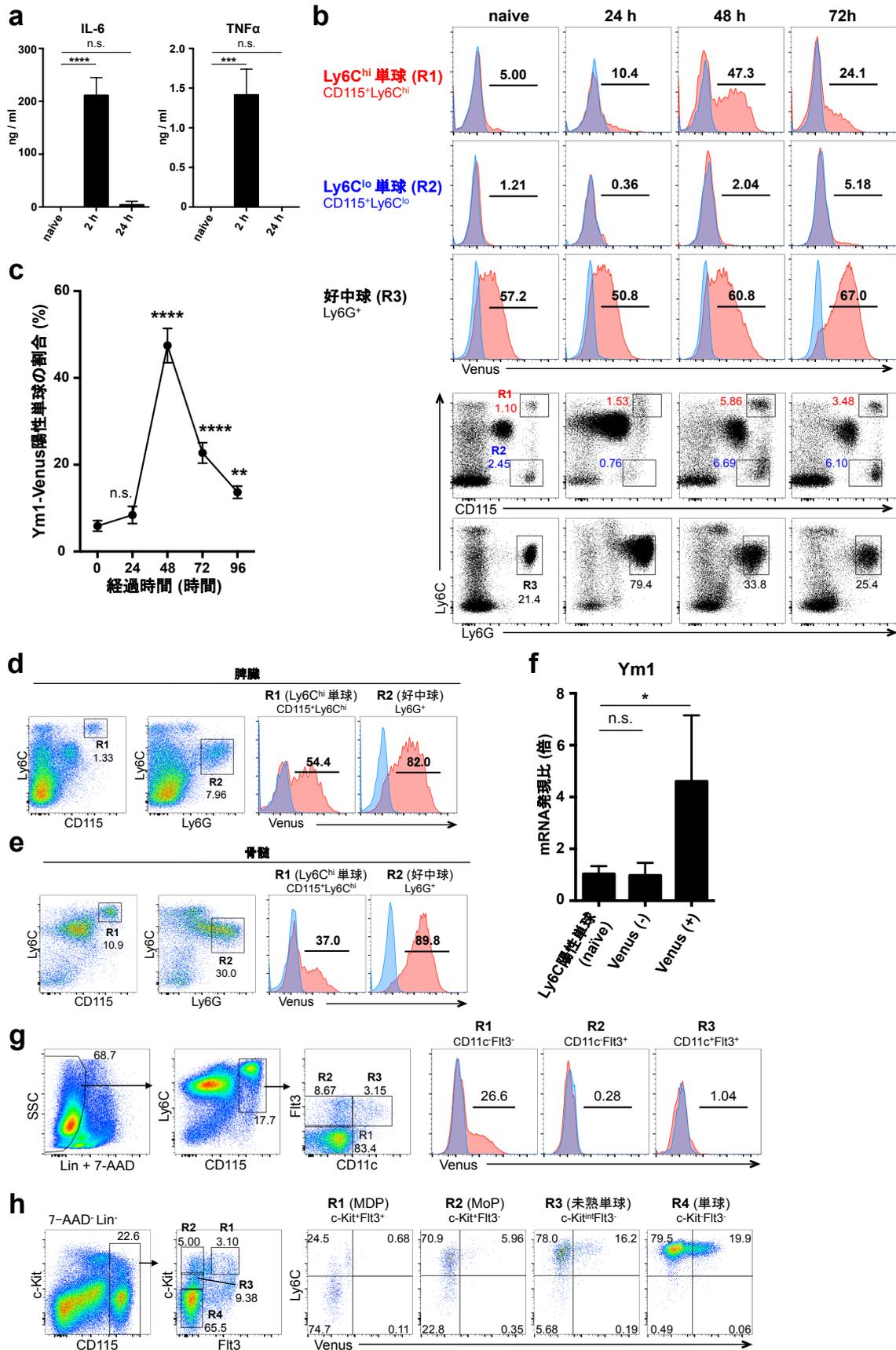


図 3. 敗血症の回復期における Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の増加

(a) 野生型マウスに LPS (50 µg/マウス) を尾静脈投与した後、血清中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。エラーバーは SD。naïve に対する one-way ANOVA 検定を行った。***P<0.001, ****P<0.0001, n.s., not significant, n=3

(b-h) Ym1-Venus マウスに LPS (100 µg/マウス) を尾静脈投与した。

(b, c) 末梢血細胞における Ym1-Venus の発現を LPS 投与前から投与後 (24、48、72 時間後) にかけて経時的に解析した。(b) Ly6C 陽性単球、Ly6C 陰性単球および好中球の Ym1-Venus 発現を示す。(c) Ly6C 陽性単球における Ym1-Venus 陽性率の経時的变化を示す。エラーバーは SD。naïve に対する one-way ANOVA 検定を行った。**P<0.01, ****P<0.0001, n.s., not significant, n=3

(d, e) LPS 投与 48 時間後の脾臓 (d) および骨髄 (e) の Ym1-Venus 発現を示す。

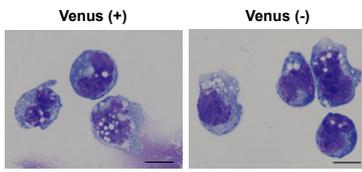
(f) 定常状態 (naïve) および LPS 投与 48 時間後の Ym1-Venus マウスの骨髄から Ly6C 陽性単球の Ym1-Venus 陽性分画 (Venus (+)) と陰性分画 (Venus (-)) をセルソーターにより分取し、それぞれの Ym1 mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。エラーバーは SD。naïve に対する one-way ANOVA 検定を行った。*P<0.05, n.s., not significant, n=3

(g) 骨髄における Ly6C 陽性単球の 3 つのサブセットの Ym1-Venus 発現を示す。Lin (B220、CD19、CD3、Ly6G、MHCII、NK1.1 および Ter119)。

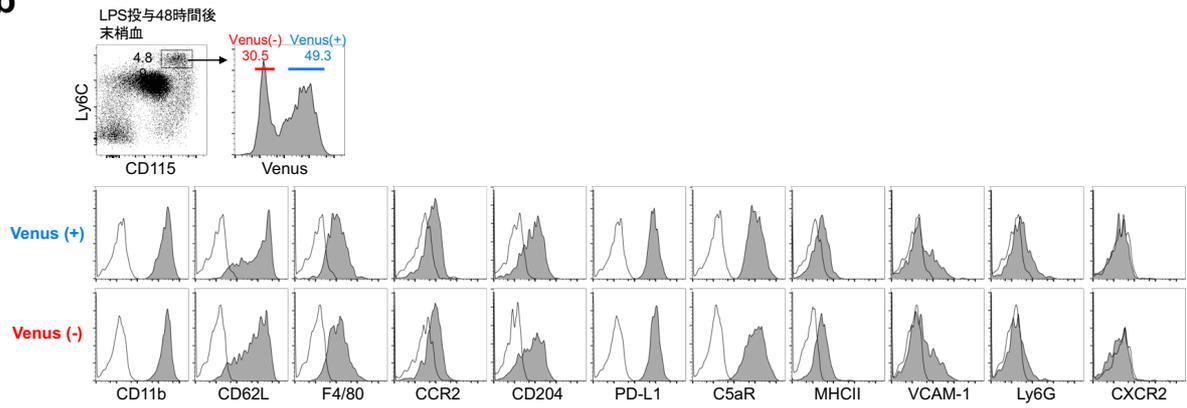
(h) 骨髄における単球前駆細胞の Ym1-Venus 発現を示す。Lin (B220、CD3、Ly6G、NK1.1 および Ter119)。MDP, macrophage/dendritic cell progenitor; MoP, monocyte progenitor
フローサイトメトリー解析において、赤色のヒストグラムは Ym1-Venus マウス、青色のヒストグラムは野生型マウスを示す。ゲートとともに示された数字は全体に対する細胞の割合およびフラクション番号、ヒストグラムの数字は Ym1-Venus マウスにおける Ym1-Venus 陽性細胞の割合を示す。

図 4

a



b



c

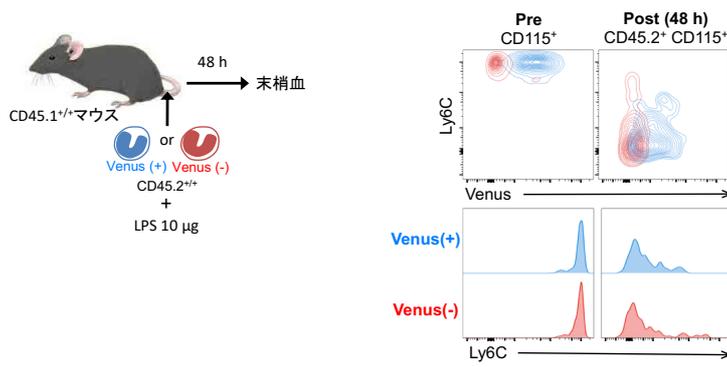


図 4 (続き)

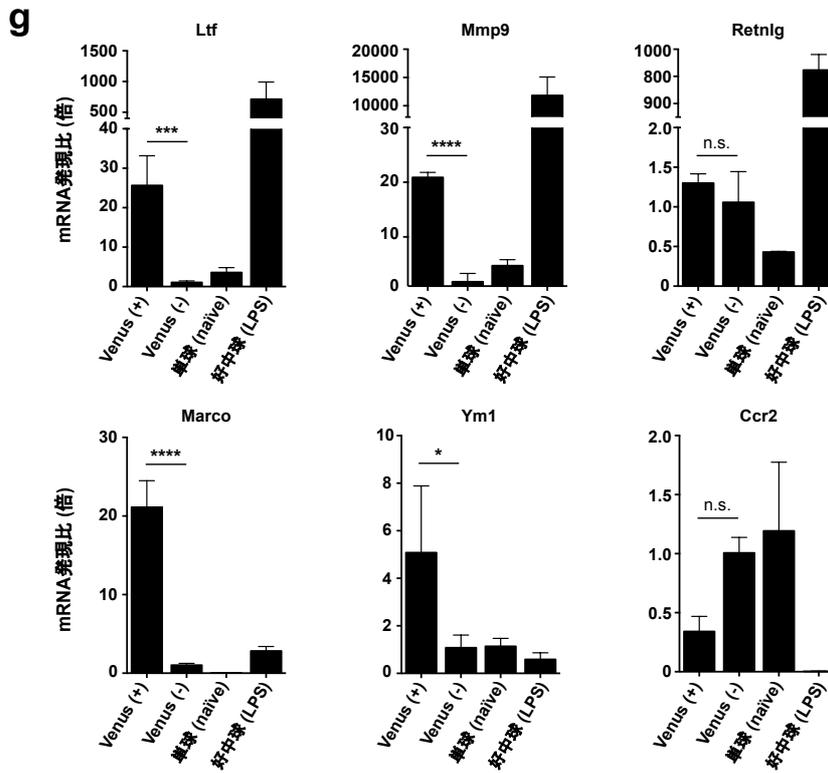
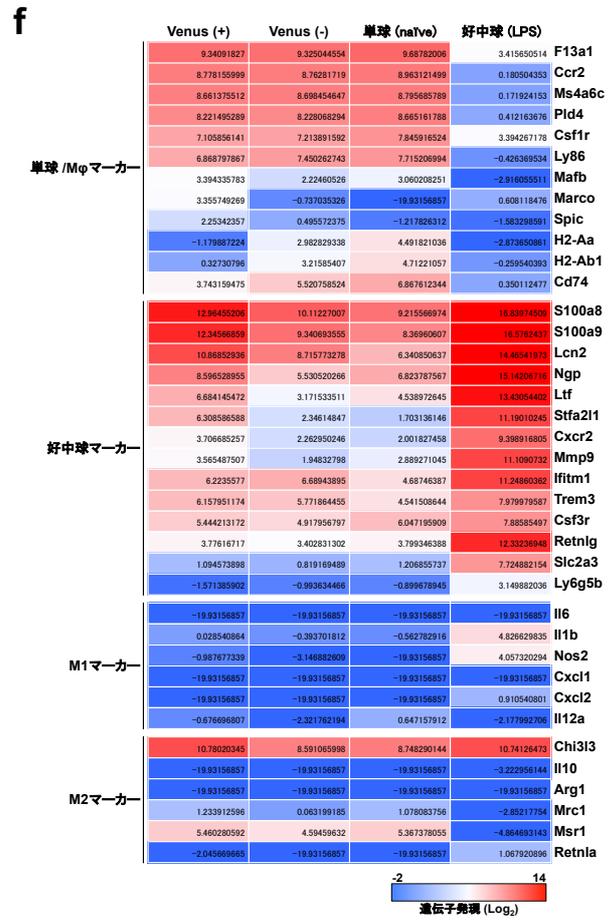
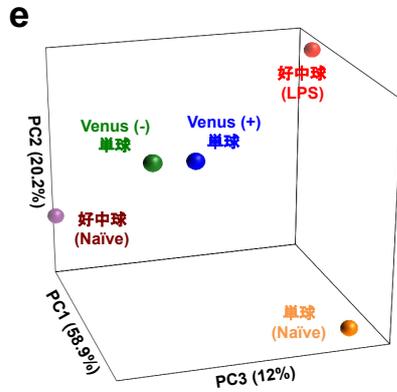
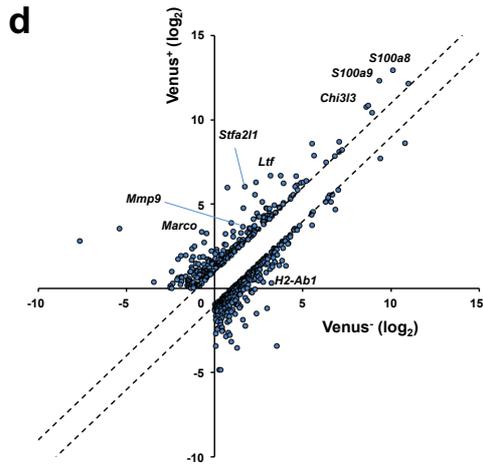


図 4. 敗血症の回復期に出現する Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の表現型および遺伝子発現解析

Ym1-Venus マウスに LPS (100 μ g/マウス) を尾静脈投与し、48 時間後の骨髄細胞および末梢血細胞を解析した。

(a) 骨髄から Ym1-Venus 陽性 (Venus (+)) および陰性単球 (Venus (-)) をセルソーターにより分取し、サイトスピンにより細胞を回収した後、ギムザ染色により形態を観察した。スケールバー、10 μ m。対物レンズ、100 倍。

(b) 末梢血細胞を各種表面マーカーで染色し、それぞれの発現を Ym1-Venus 陽性 (Venus (+)) と陰性単球 (Venus (-)) で比較した。灰色のヒストグラムは各抗体、白抜きのヒストグラムはアイソタイプコントロール抗体による染色強度を示す。

(c) 骨髄から Ym1-Venus 陽性 (Venus (+)) および陰性単球 (Venus (-)) (ともに CD45.2 陽性、 4×10^5 cells) をセルソーターにより分取し、直前に LPS (10 μ g/マウス) を投与した CD45.1 コンジェニックマウスに移植した。移植 48 時間後の末梢血細胞を CD45.2、CD115 および Ly6C で染色し、移植した単球における Ly6C 発現を解析した。Pre は移植前のそれぞれの単球における Ly6C 発現を示す。Ym1-Venus 陽性単球は赤色、Ym1-Venus 陰性単球は青色で示す。

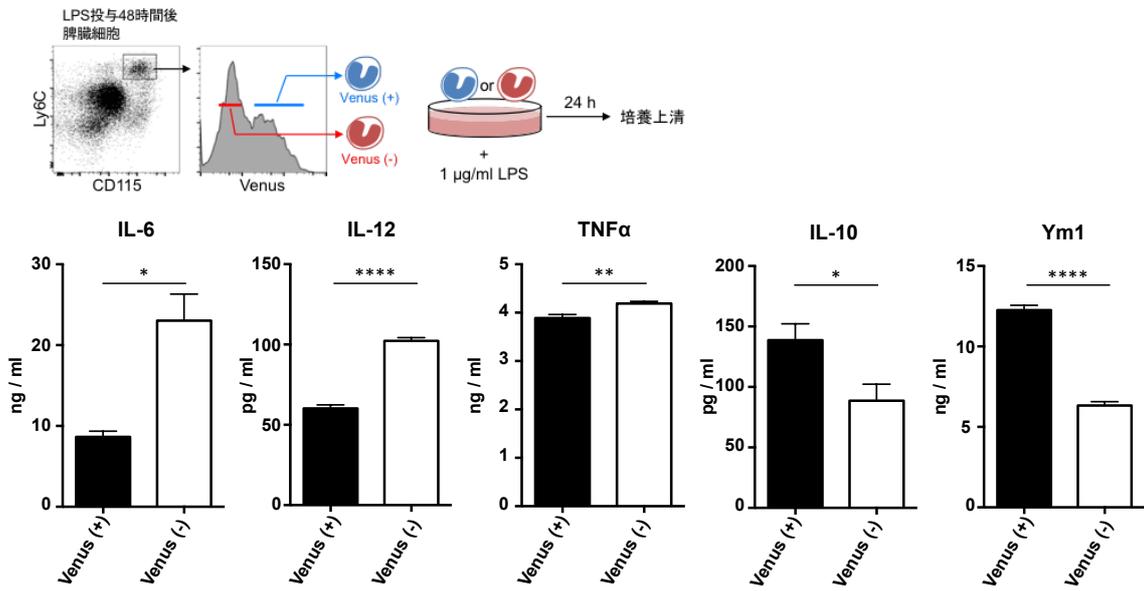
(d-g) 定常状態の Ym1-Venus マウスの骨髄から好中球および Ly6C 陽性単球、LPS 投与を投与した Ym1-Venus マウス骨髄から好中球、Ym1-Venus 陽性 (Venus (+)) および陰性単球 (Venus (-)) をセルソーターにより分取し、それぞれの遺伝子発現を比較した。

(d-f) RNA シーケンスによる網羅的な発現解析結果。(d) Venus (+) と Venus (-) を比較して、2 倍以上差が見られた遺伝子を散布図で示す。(e) 主成分 (PCA) 解析の解析結果を示す。(f) 単球/マクロファージおよび、好中球、M1 マーカー、M2 マーカーにおける代表的な遺伝子の発現をヒートマップで示す。

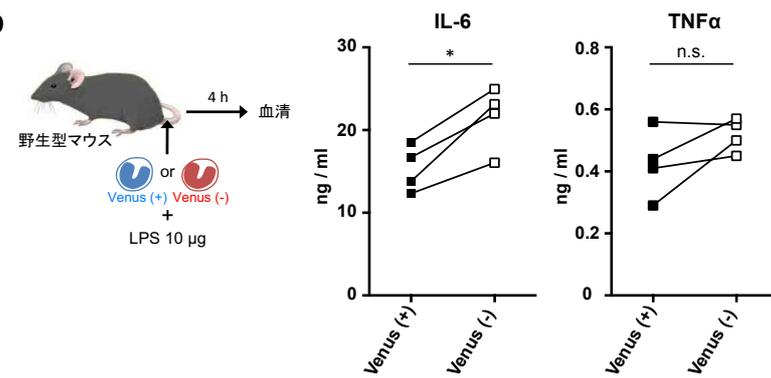
(g) RNA シーケンスで差が見られた遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。Venus (-) を基準とした遺伝子発現比を示す。エラーバーは SD。Venus (+) に対する one-way ANOVA 検定を行った。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, n.s., not significant, n=3

図 5

a



b



c

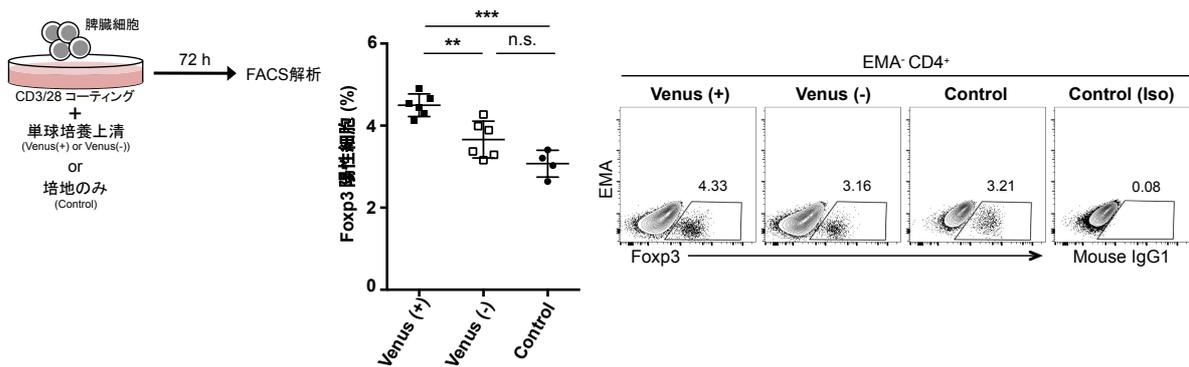


図 5. Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は免疫抑制性の表現型を示す

LPS 投与 (100 µg/マウス) 48 時間後の Ym1-Venus マウスの脾臓 (a) または骨髄 (b, c) から Ym1-Venus 陽性 (Venus (+)) および陰性単球 (Venus (-)) をセルソーターにより分取し、それぞれの機能を比較した。

(a) 脾臓から分取したそれぞれの単球を LPS (1 µg/ml) で 24 時間刺激し、上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法により解析した。エラーバーは SD。Unpaired-T 検定を行った。
*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001, n.s., not significant, n=3

(b) それぞれの単球 (4x10⁵ cells) を、直前に LPS (10 µg/マウス) を投与した野生型マウスに移植し、その 4 時間後に血清を回収した。血清中のサイトカイン濃度を ELISA 法により解析した。

エラーバーは SD。Paired-T 検定を行った。*P<0.05, n.s., not significant, n=4

(c) 骨髄から分取したそれぞれの単球を LPS (1 µg/ml) で 24 時間刺激し、培養上清を回収した。野生型マウスの脾臓細胞にそれぞれの培養上清を添加し、CD3/28 抗体で刺激した。刺激 72 時間後の脾臓細胞を CD4 と Foxp3 抗体で染色し、制御性 T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁺) の割合を解析した。Control は単球培養用の培地を添加したものを示す。EMA⁺CD4⁺細胞に対する制御性 T 細胞の割合をグラフに示す。ドットプロット内の数字は Foxp3 陽性細胞の割合を示す。エラーバーは SD。それぞれの条件に対する one-way ANOVA 検定を行った。
P<0.01, *P<0.001, n.s., not significant, n=4-6

図 6

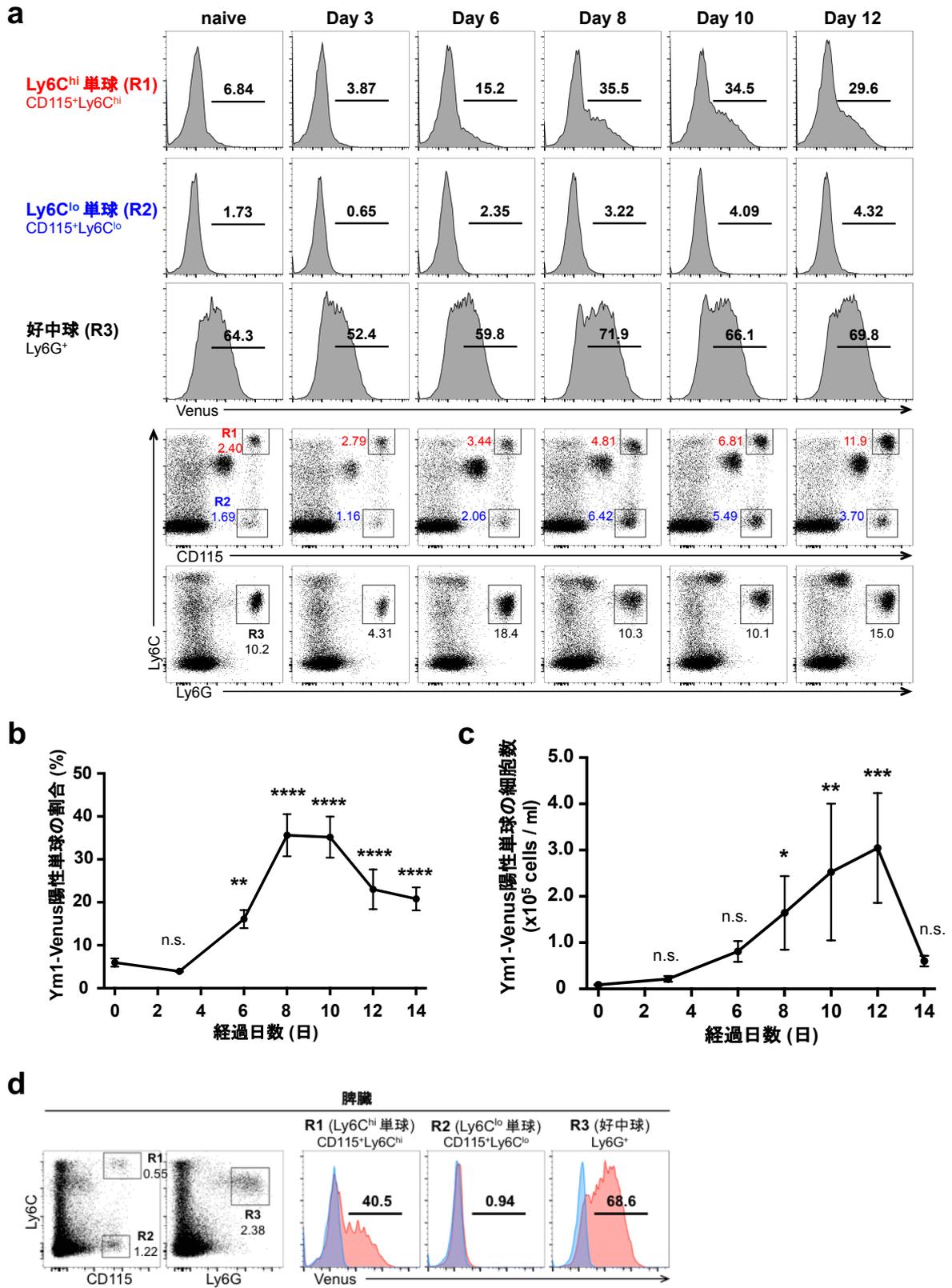


図 6 (続き)

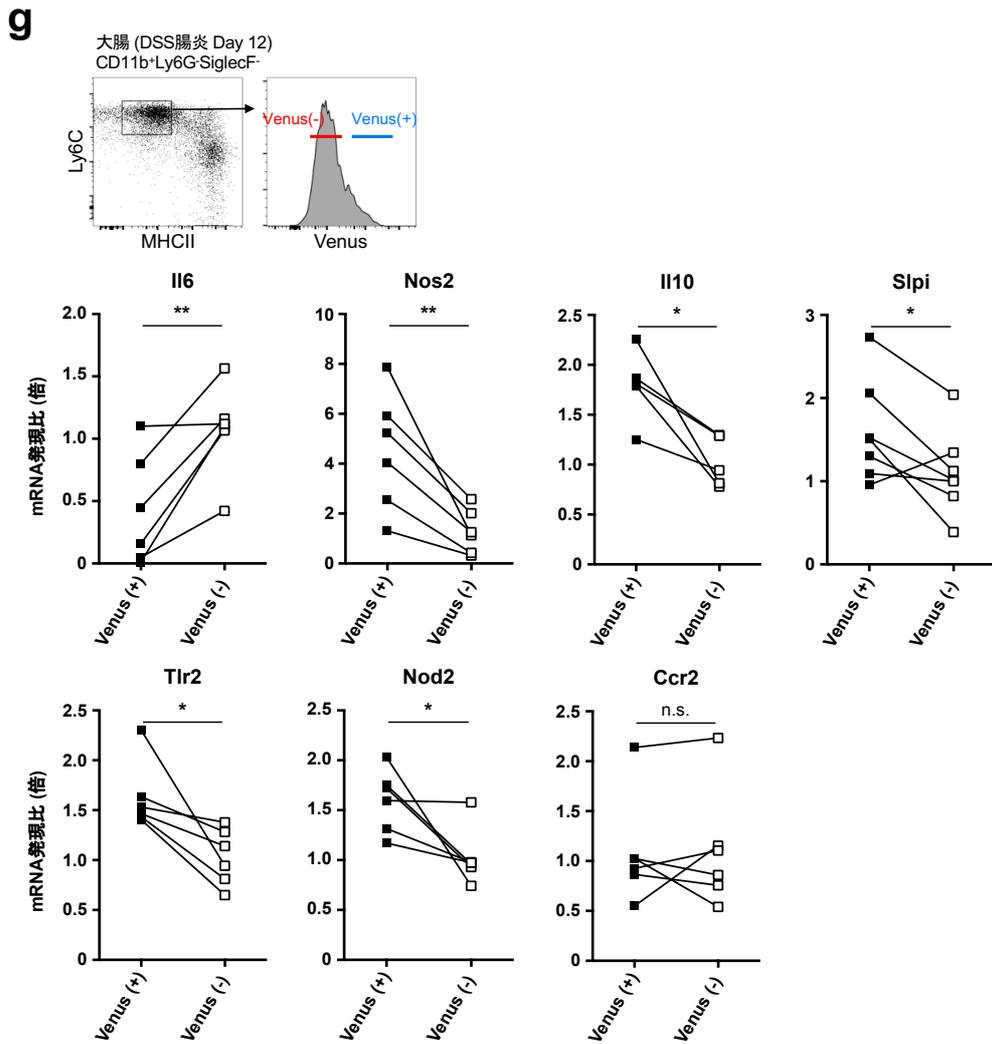
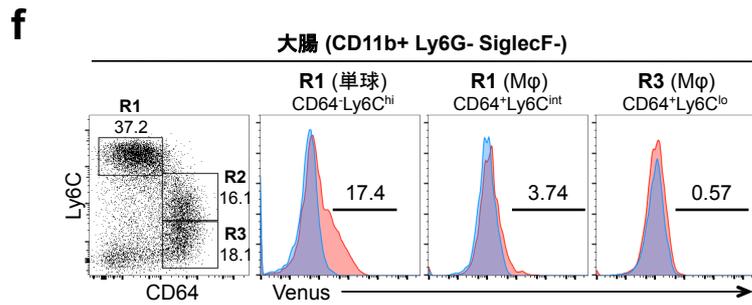
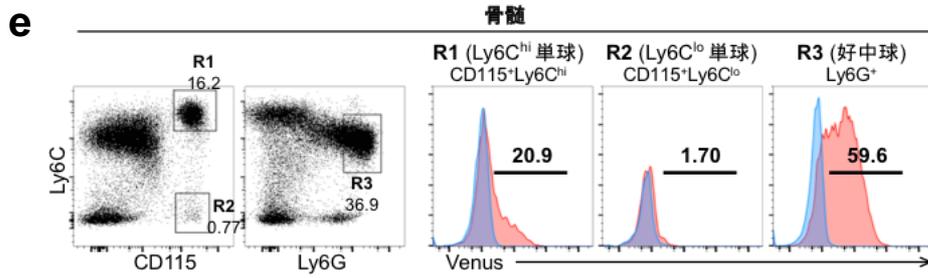


図 6. DSS 誘導腸炎の回復期に Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球が増加する

Ym1-Venus マウスに 2%DSS 水溶液を 5 日間自由飲水により投与し、Ym1-Venus 陽性細胞を解析した。

(a-c) 末梢血細胞における Ym-1-Venus の発現を経時的に解析した。(a) Ly6C 陽性単球、Ly6C 陰性単球および好中球の Ym1-Venus 発現を示す。Ly6C 陽性単球における Ym1-Venus 陽性率 (b) および細胞数 (c) の経時的变化を示す。エラーバーは SD。naïve (Day 0) に対する one-way ANOVA 検定を行った。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, n.s., not significant, n=3

(d-f) DSS 飲水開始 9 日後 (DSS 飲水中止 4 日後) の脾臓 (d)、骨髄 (e) および大腸 (f) の各細胞集団における Ym1-Venus 発現を示す。

フローサイトメトリー解析結果において、赤色のヒストグラムは Ym1-Venus マウス、青色のヒストグラムは野生型マウスを示す。ゲートとともに示された数字は全体に対する細胞集団の割合およびフラクション番号、ヒストグラムの数字は Ym1-Venus マウスにおける Ym-1-Venus 陽性細胞の割合を示す。

(g) DSS 飲水開始 9 日後 (DSS 飲水中止 4 日後) に、大腸に浸潤した単球 (Ly6C^{hi}MHCII⁺) の Ym1-Venus 陽性分画 (Venus (+)) と陰性分画 (Venus (-)) をセルソーターにより分取し、それぞれの遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。エラーバーは SD。Paired-T 検定を行った。*P<0.05, **P<0.01, n.s., not significant, n=6-7

図 7

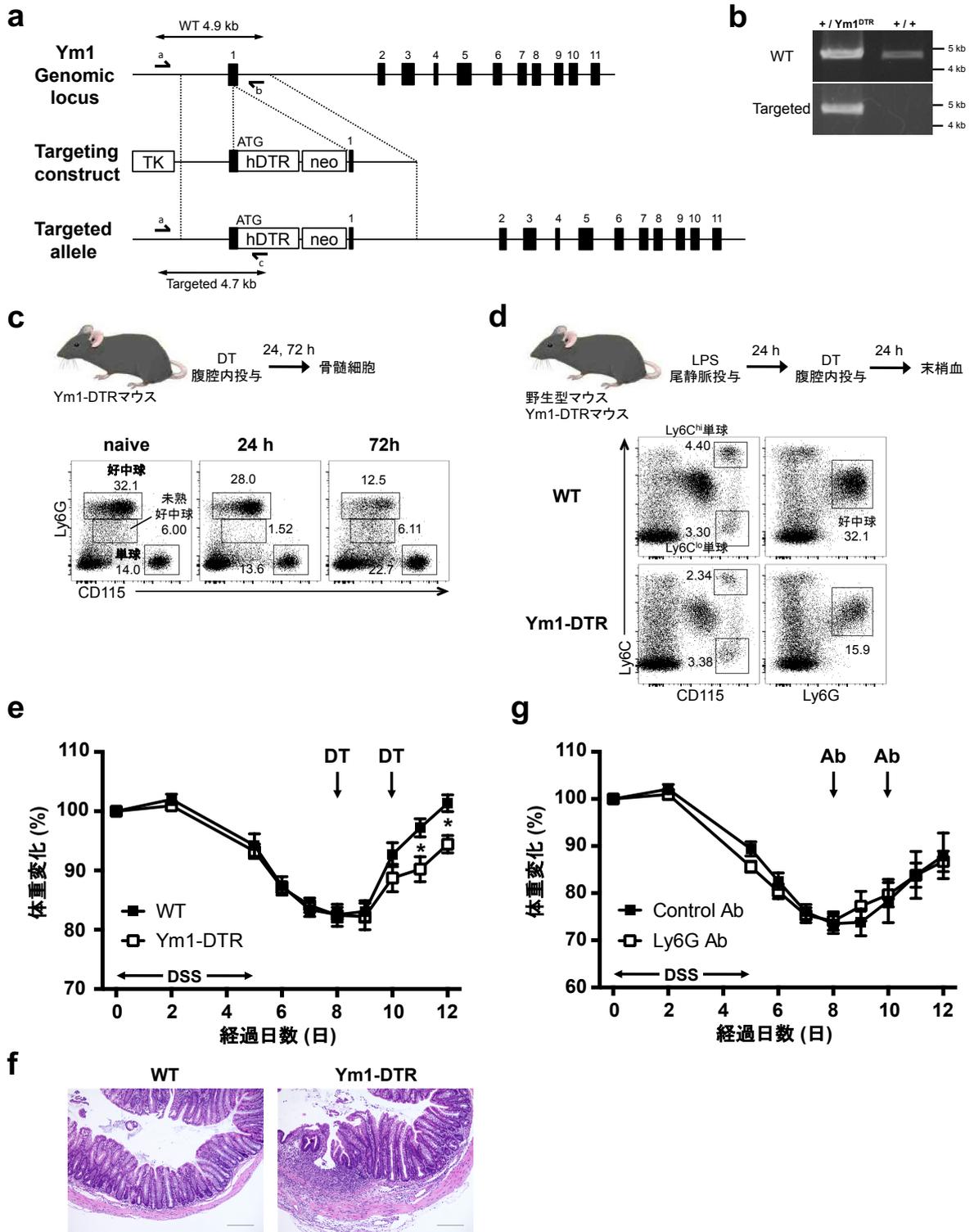


図 7. Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の消失により腸炎の回復が遅延する

(a) Ym1-DTR ターゲティングコンストラクトの概略図を示す。Ym1 (Chi313) 遺伝子のエキソンは黒塗りの四角形で示す。ヒトジフテリア毒素受容体の cDNA (hDTR)、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo)、および HSV-チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子は、白抜きの四角形で示す。Genotyping PCR に使用したプライマーは、プライマー名 (a、b および c) とともに矢印で示し、予想される PCR 産物は両矢印で示す。

(b) 図に示されたプライマーセットを用いて Ym1-DTR (+/Ym1^{DTR}) マウスおよび野生型 (+/+) マウスの genotyping PCR を行った (野生型配列の検出には a と b、標的配列の検出には a と c のプライマーセットを用いた。)

(c) Ym1-DTR マウスにジフテリア毒素 (DT, 25 μ g/kg/マウス) を腹腔内投与し、その 24 および 72 時間後の骨髄細胞における好中球、未熟好中球および単球の割合を解析した。

(d) Ym1-DTR マウスに LPS (100 μ g/マウス) を尾静脈投与し、その 24 時間後に DT (25 μ g/kg/マウス) を腹腔内投与した。さらにその 24 時間後の末梢血細胞における好中球、Ly6C 陽性単球および Ly6C 陰性単球の割合を解析した。

フローサイトメトリー解析結果において、ゲートとともに示された数字は全体に対する細胞の割合を示す。

(e, f) 野生型マウスおよび Ym1-DTR マウスに 2% DSS 水溶液を 5 日間自由飲水により投与し、その体重変化を示す。DSS 飲水開始 8、10 日後に DT (25 μ g/kg/マウス) を腹腔内投与した。エラーバーは SEM。two-way ANOVA 検定を行い、2 群間比較した。

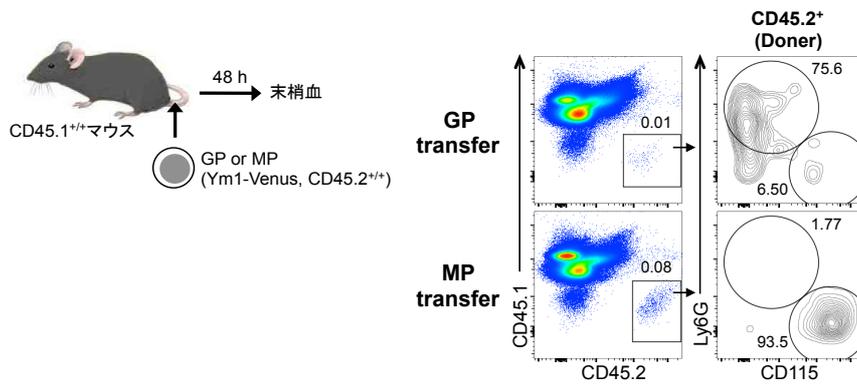
*P<0.05, n=7 (WT) , n=8 (Ym1-DTR)

(f) DSS 飲水開始 12 日後 (DSS 飲水中止 7 日後) の野生型あるいは Ym1-DTR マウスから大腸を摘出し、ホルマリンで固定した。その後パラフィン包埋してから切り出した切片をヘマトキシリン/エオシン染色し、顕微鏡で観察した。スケールバー、200 μ m。対物レンズ、10 倍。

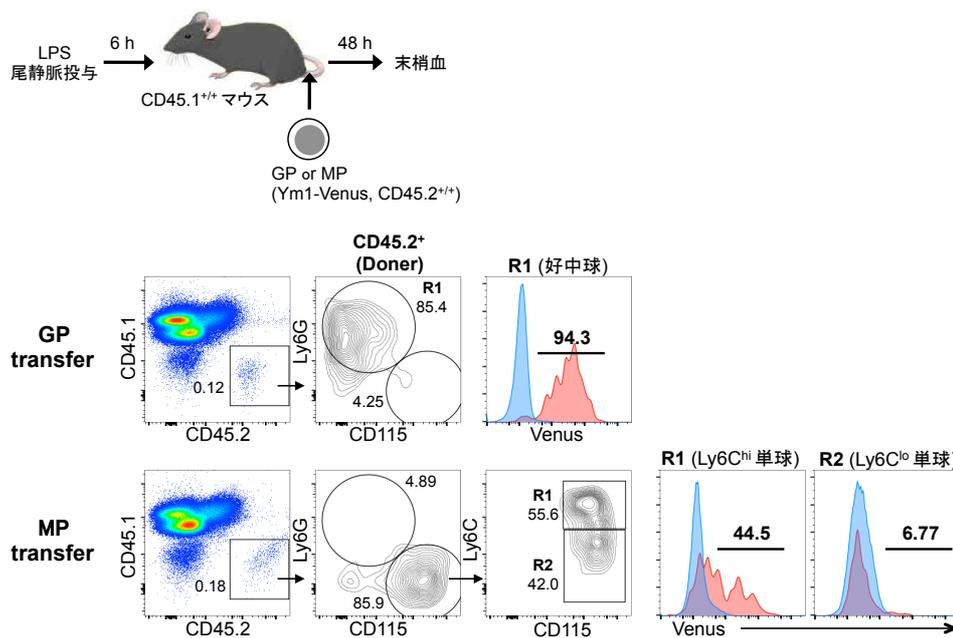
(g) 野生型マウスに 2% DSS 水溶液を 5 日間自由飲水により投与し、その体重変化を示す。DSS 飲水開始 8、10 日後 (DSS 飲水中止 3、5 日後) に Ly6G 抗体あるいはアイソタイプコントロール抗体 (ともに 50 μ g/kg/マウス) を腹腔内投与した。エラーバーは SEM。two-way ANOVA 検定を行い、2 群間比較した。*P<0.05, n=6

図 8

a



b



c

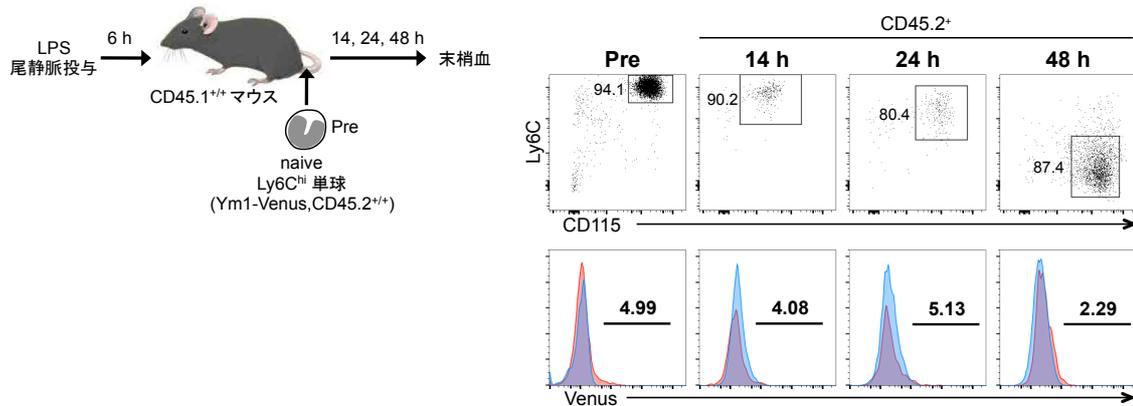
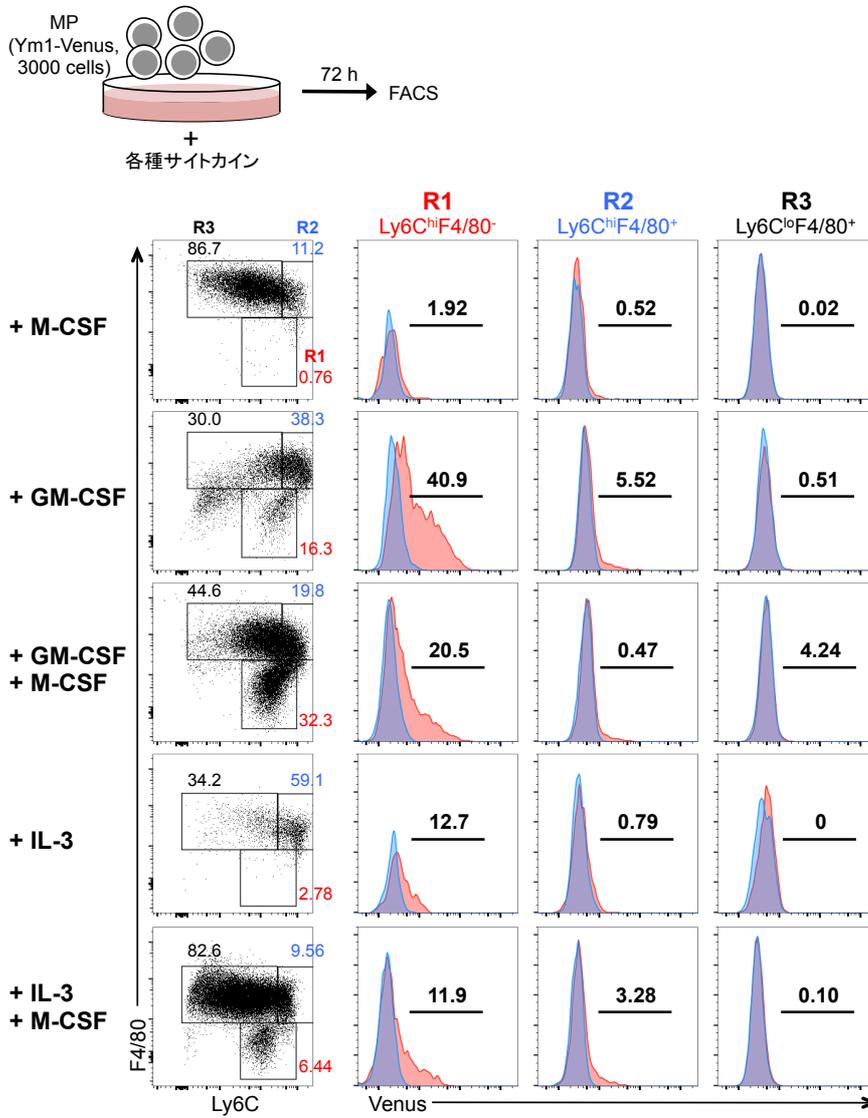


図 8 (続き)

d



e

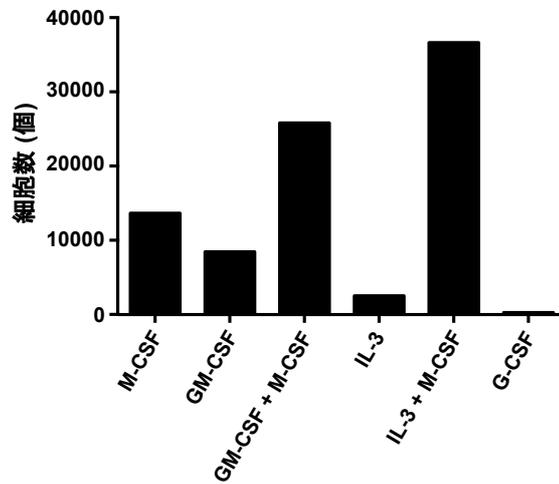


図 8. Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球は単球前駆細胞より分化する

(a, b) 好中球前駆細胞 (GP: Lin⁻c-Kit⁺CD16/32⁺Ly6C⁺CD115⁻, 2x10⁴ cells) および単球前駆細胞 (MoP: Lin⁻c-Kit⁺CD16/32⁺Ly6C⁺CD115⁺, 1x10⁵ cells) を野生型あるいは Ym1-Venus マウス (ともに CD45.2) からセルソーターにより分取し、CD45.1 コンジェニックマウスに移植した。Lin (CD4、CD8、B220、NK1.1、Ter119、Sca-1、CD11b、Gr-1 および 7/4)。

(a) 野生型マウスの GP あるいは MoP を CD45.1 コンジェニックマウスに移植した。移植 48 時間後の末梢血細胞を CD45.1、CD45.2、CD115 および Ly6C で染色し、移植した前駆細胞の分化能を解析した。

(b) CD45.1 コンジェニックマウスに LPS (10 μg/マウス) を尾静脈投与し、その 6 時間後に Ym1-Venus マウスの GP (4x10⁴ cells) あるいは MoP (1.7x10⁵ cells) を移植した。移植 48 時間後の末梢血細胞を CD45.1、CD45.2、CD115 および Ly6C で染色し、移植した前駆細胞の Ym1-Venus 発現を解析した。

(c) CD45.1 コンジェニックマウスに LPS (10 μg/マウス) を尾静脈投与し、その 6 時間後に定常状態の Ym1-Venus マウスの骨髄から分取した Ly6C 陽性単球 (5x10⁵ cells) を移植した。移植 14、24、48 時間後の末梢血細胞を CD45.1、CD45.2、CD115 および Ly6C で染色し、移植した Ly6C 陽性単球の Ym1-Venus 発現を解析した。

(d) 野生型あるいは Ym1-Venus マウスの MoP を 3000 cells/well で、各種サイトカイン存在下で培養した。72 時間培養し、培養細胞を F4/80 および Ly6C で染色し、各フラクションの Ym1-Venus 発現を解析した。72 時間培養後の細胞数を (e) に示す。

フローサイトメトリー解析結果において、赤色のヒストグラムは Ym1-Venus マウス、青色のヒストグラムは野生型マウスを示す。ゲートとともに示された数字は全体に対する細胞の割合およびフラクション番号、ヒストグラムの数字は Ym1-Venus マウスにおける Ym-1-Venus 陽性細胞の割合を示す。

第4章 考察

一般に、組織傷害部位に動員された Ly6C^{hi} 単球は炎症促進性の表現型を示し、炎症の増悪に寄与すると考えられている。例えば、炎症性腸疾患モデルにおいて、ケモカインレセプターの一つである CCR2 を阻害すると、炎症部位への Ly6C^{hi} 単球の浸潤が抑制され、腸炎が改善することが報告されている²⁵。腎臓傷害モデルでは、CCR2 欠損マウスにおいて、組織傷害および線維化が抑制されることが報告されている²⁷。これらの知見は、組織傷害の初期に局所に浸潤する Ly6C^{hi} 単球が炎症誘発性の機能をもつことを明確に示している。一方で近年、単球が炎症の収束や組織修復にも重要な役割を担っていることが報告されている。Lucas らは、皮膚損傷モデルにおいて、マクロファージおよび単球を炎症初期でのみ消去すると、炎症が軽減し癒痕形成が抑制される一方で、回復期限定的にマクロファージおよび単球を消去すると、創傷組織に重度の出血が起こり、再生の停滞が生じることを示した²⁸。また、Grainger らは、*Toxoplasma gondii* 感染により大腸に浸潤した Ly6C^{hi} 単球は、炎症および抗炎症型の両方の表現型を示し、プロスタグランジン E2 を産生することによって好中球の活性化を抑制し得ることを示した²⁹。この *T. gondii* 感染モデルでは、上述の現象とは逆に、CCR2 欠損が好中球による過度の粘膜炎症を誘発することから、炎症部位に浸潤した Ly6C^{hi} 単球が炎症抑制性の機能をもつことが示された。これらの知見から、傷害部位に浸潤した単球は炎症の促進だけでなく、傷害の原因や時間経過によって、炎症の収束および組織修復に寄与すると考えられる。一般に、このような単球の多面的な性質は、同細胞の可塑性に起因するものと考えられている。しかし、実際に組織傷害の炎症期と回復期において、もともと同一の単球が、局所の環境要因に応答して柔軟に性質を変えるのか、あるいは骨髄で機能の異なる複数の単球サブセットが産生され、それらが状況に応じて傷害部位に浸潤するのかは、これまで明らかになっていなかった⁵。

本研究で我々は、Ym1 発現細胞を可視化するマウスを解析することで、Ly6C^{hi} 単球の新規サブセットを同定した。この細胞は、骨髄での単球の分化段階から存在し、Ym1 陰性 Ly6C^{hi} 単球と比較して、より強い免疫抑制能を示した。定常状態では、Ym1 陽性細胞は Ly6C^{hi} 単球のわずか 5% 程度だったが、組織傷害の回復期に劇的に増加し、炎症の収束や組織修復に重要であることが分かった。このことは、骨髄での分化段階で、機能の異なる単球サブセットが生じ、この細胞が組織傷害の回復期に局所に浸潤するという説を強く支持している。

感染等により炎症が起こると、好中球や単球といった骨髄球系細胞に対する需要の高まりに応じて、骨髄では、定常時とは異なる細胞分化や末梢への細胞動員がみられることが知られている³⁰。例えば、種々の細菌感染モデルでは、感染時に血清中の G-CSF 濃度が増加し、これが骨髄に作用することによって好中球産生の増加が起こることが報告されている³¹。さらに、産生された G-CSF は造血幹細胞 (HSC) の骨髄から末梢血中への

動員も誘導する^{32,33}。Petitらは、G-CSFが骨髄におけるstromal cell-derived factor 1 (SDF-1)産生を減少し、CXCR4発現を増加することで、末梢血中へのHSC動員を誘導することを示した³⁴。また、定常時の好中球産生はC/EBP α により制御されるが、*C. albicans*感染モデルでの好中球産生の増加はC/EBP β が制御することが示されている³⁵。一方で、*L. monocytogenes*感染モデルでは、骨髄での単球産生の増加が誘発されることが知られている³⁶。Serbinaらは、この感染モデルにおいてmyeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)欠損マウスでは、骨髄での単球産生が減少することを明らかにし、*L. monocytogenes*感染時の骨髄における単球の増加にはTLRシグナルが重要であることを示した³⁷。これらの知見は、炎症時に局所で産生されたサイトカインや微生物由来因子が骨髄に作用し、血球分化や炎症部位への細胞動員に影響を与えることを示している。本研究で我々は、炎症の急性期ではなく、回復期になってからYm1陽性単球の増加がみられることを明らかにした。このことは、敗血症誘導モデルおよびDSS腸炎モデルの回復期に局所で生じた何らかの因子が、骨髄でのYm1陽性単球への分化を誘導している可能性を示唆している。本研究の*in vitro*での単球前駆細胞実験から、IL-3あるいはGM-CSF添加によりYm1陽性細胞が出現したことから、IL-3/GM-CSFシグナルがYm1陽性細胞への分化を制御することが示唆されたが、生体内での分化誘導因子の同定にはさらなる解析が必要である。

本研究で我々は、炎症の回復期にYm1を発現する免疫制御性の単球が増加することを見いだしたが、その遺伝子発現解析から、同細胞の性質が採取部位により異なることを明らかにした。すなわち、骨髄から分取したYm1陽性単球の遺伝子発現解析では、特徴的なサイトカイン遺伝子の発現はみられなかったが、その細胞を*in vitro*でLPS刺激をした場合や、腸に浸潤したYm1陽性単球では炎症抑制性のサイトカイン発現が見られることが分かった。これらの結果は、骨髄で分化したYm1陽性単球が炎症部位に浸潤し、刺激を受けることで初めて炎症抑制性の表現型を獲得することを示している。Ly6C^{hi}単球は存在する環境因子に応答し、その表現型を変化することが知られている。ZigmondらはDSS腸炎誘導モデルにおいて、炎症部位に浸潤したLy6C^{hi}単球はTLR2やNod2シグナルを介して炎症促進性の表現型を獲得することを示した²⁵。また、Seoらは同炎症モデルにおいて、炎症時の大腸においてLy6C^{hi}単球が腸に浸潤した後に、腸内細菌の刺激を受けることでIL-1 β 産生等の炎症促進型のフェノタイプに変化することを示した³⁸。また、OkabeらおよびGundraらは、は、腹腔局所で産生されるレチノイン酸およびビタミンAが、転写因子の発現を制御する等の作用により、腹腔マクロファージの組織特異的な機能の獲得に寄与することを報告している^{39,40}。これらの報告はいずれも、単球およびマクロファージが、局所の環境因子に応答し、柔軟に表現型を変える能力を有していることを示している。Ym1陽性単球による炎症抑制機構を完全に解明するためには、骨髄における分化機構だけでなく、炎症部位において、最終的に同細胞の表現型を規定する分子機構を

明らかにすることが重要である。

本研究で我々が同定した Ym1 陽性単球と類似の形質を有する細胞として、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSCs) が知られている⁴¹。マウスの MDSCs は CD11b⁺Gr-1⁺細胞として定義され、さらに CD11b⁺Ly6C^{lo}Ly6G⁺の好中球様の表現型を示す G-MDSCs と、CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻の単球様の表現型を示す M-MDSCs の二つに大別される。G-MDSCs は ROS、M-MDSCs は NO を産生し、T 細胞の増殖を抑制することで免疫抑制作用を示す⁴²。MDSCs は担癌マウスや感染モデルマウスでみられ、免疫細胞による癌細胞への攻撃を抑制することで癌細胞の増殖を助けると考えられてきた。そのため、これまで MDSCs は癌の治療ターゲットとして注目されてきたが、マーカーが乏しいことからその研究は難航していた。本研究より、CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻サブセットの中でも CD115⁺Ym1 陽性細胞がより強い免疫抑制能を示すことが明らかになった。これらの知見から、Ym1 陽性単球が癌の新規治療ターゲットとして有用な可能性があり、今後は担癌マウスにおける Ym1 陽性単球の解析も行いたいと考えている。

参考文献

- 1 Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028-1040, doi:10.1038/nm.2807 (2012).
- 2 Wynn, T. A. & Barron, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* **30**, 245-257, doi:10.1055/s-0030-1255354 (2010).
- 3 Duffield, J. S. *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* **115**, 56-65, doi:10.1172/JCI22675 (2005).
- 4 Zhang, M. Z. *et al.* CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest* **122**, 4519-4532, doi:10.1172/JCI60363 (2012).
- 5 Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**, 787-795, doi:10.1172/JCI59643 (2012).
- 6 Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* **164**, 6166-6173 (2000).
- 7 Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14-20, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008 (2014).
- 8 Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J. & Biswas, S. K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* **17**, 34-40, doi:10.1038/ni.3324 (2016).
- 9 Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* **17**, 9-17, doi:10.1038/ni.3320 (2016).
- 10 Stouch, A. N. *et al.* IkappaB kinase activity drives fetal lung macrophage maturation along a non-M1/M2 paradigm. *J Immunol* **193**, 1184-1193, doi:10.4049/jimmunol.1302516 (2014).
- 11 Goren, I., Pfeilschifter, J. & Frank, S. Uptake of neutrophil-derived Ym1 protein distinguishes wound macrophages in the absence of interleukin-4 signaling in murine wound healing. *Am J Pathol* **184**, 3249-3261, doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.011 (2014).
- 12 Harbord, M. *et al.* Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47phox-deficient mice. *J Biol Chem* **277**, 5468-5475, doi:10.1074/jbc.M110635200 (2002).
- 13 Satake, S. *et al.* C/EBPbeta is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced "emergency" granulopoiesis. *J Immunol* **189**, 4546-4555, doi:10.4049/jimmunol.1103007 (2012).
- 14 Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82 (2003).

- 15 Menezes, S. *et al.* The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS⁺ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 1205-1218, doi:10.1016/j.immuni.2016.12.001 (2016).
- 16 Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197, doi:10.1038/35004599 (2000).
- 17 Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* **14**, 821-830, doi:10.1038/ni.2638 (2013).
- 18 Ulevitch, R. J. & Tobias, P. S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**, 437-457, doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.002253 (1995).
- 19 Raetz, C. R. *et al.* Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J* **5**, 2652-2660 (1991).
- 20 Sunderkotter, C. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* **172**, 4410-4417 (2004).
- 21 Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91, doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001 (2013).
- 22 Sugimoto, C. *et al.* Differentiation Kinetics of Blood Monocytes and Dendritic Cells in Macaques: Insights to Understanding Human Myeloid Cell Development. *J Immunol* **195**, 1774-1781, doi:10.4049/jimmunol.1500522 (2015).
- 23 Varol, C. *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 171-180, doi:10.1084/jem.20061011 (2007).
- 24 D'Alessio, F. R. *et al.* CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* **119**, 2898-2913, doi:10.1172/JCI36498 (2009).
- 25 Zigmond, E. *et al.* Ly6C^{hi} monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* **37**, 1076-1090, doi:10.1016/j.immuni.2012.08.026 (2012).
- 26 Yanez, A., Ng, M. Y., Hassanzadeh-Kiabi, N. & Goodridge, H. S. IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood* **125**, 1452-1459, doi:10.1182/blood-2014-09-600833 (2015).
- 27 Kitagawa, K. *et al.* Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* **165**, 237-246, doi:10.1016/S0002-9440(10)63292-0 (2004).
- 28 Lucas, T. *et al.* Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J*

- Immunol* **184**, 3964-3977, doi:10.4049/jimmunol.0903356 (2010).
- 29 Grainger, J. R. *et al.* Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat Med* **19**, 713-721, doi:10.1038/nm.3189 (2013).
- 30 Takizawa, H., Boettcher, S. & Manz, M. G. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood* **119**, 2991-3002, doi:10.1182/blood-2011-12-380113 (2012).
- 31 Gregory, A. D., Hogue, L. A., Ferkol, T. W. & Link, D. C. Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Blood* **109**, 3235-3243, doi:10.1182/blood-2005-01-015081 (2007).
- 32 Cottler-Fox, M. H. *et al.* Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 419-437 (2003).
- 33 Basu, S., Dunn, A. & Ward, A. G-CSF: function and modes of action (Review). *Int J Mol Med* **10**, 3-10 (2002).
- 34 Petit, I. *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* **3**, 687-694, doi:10.1038/ni813 (2002).
- 35 Hirai, H. *et al.* C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* **7**, 732-739, doi:10.1038/ni1354 (2006).
- 36 Pamer, E. G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* **4**, 812-823, doi:10.1038/nri1461 (2004).
- 37 Serbina, N. V., Hohl, T. M., Cherny, M. & Pamer, E. G. Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection. *J Immunol* **183**, 1900-1910, doi:10.4049/jimmunol.0900612 (2009).
- 38 Seo, S. U. *et al.* Distinct Commensals Induce Interleukin-1beta via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury. *Immunity* **42**, 744-755, doi:10.1016/j.immuni.2015.03.004 (2015).
- 39 Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* **157**, 832-844, doi:10.1016/j.cell.2014.04.016 (2014).
- 40 Gundra, U. M. *et al.* Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation. *Nat Immunol* **18**, 642-653, doi:10.1038/ni.3734 (2017).
- 41 Gabrilovich, D. I. *et al.* The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **67**, 425; author reply 426, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3037 (2007).
- 42 Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D. I. Subsets of myeloid-derived

suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **181**, 5791-5802 (2008).

謝辞

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、多くの皆様のご指導ご鞭撻を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

田中正人先生、浅野謙一先生（東京薬科大学 生命科学部 免疫制御学研究室、以下免疫制御学研究室）には、研究を遂行させていただいたのみならず、研究指導や論文の執筆など多岐にわたりご指導ご鞭撻賜りました。

大村谷昌樹先生（兵庫医科大学 医学部 遺伝学）には、本研究に使用した Ym1-Venus マウス、Ym1-DTR マウスを作出して頂きました。

福山英啓先生（理化学研究所 統合生命医科学研究センター 分化制御研究グループ）には、RNA シーケンス解析の実行および技術指導をして頂きました。

西躰元先生（免疫制御学研究室 元助教）には、実験思考や操作に関して多大なるご指導ご鞭撻を賜りました。内田吉美さん（免疫制御学研究室 博士 2 年）には Ym1-Venus マウスの作製に携わって頂きました。池上大貴君、高木諒君（免疫制御学研究室 2016 年度修士卒）の二人は、ともに実験を行い、サポートして頂きました。四元聡志先生をはじめ、免疫制御学研究室の皆様には実験のサポートおよび研究室生活において大変お世話になりました。改めて、全ての皆様に厚く御礼申し上げます。