

氏名（本籍）	池田 直輝（東京都）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第103号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	炎症回復期に増加する新規炎症抑制性単球の同定
論文審査委員	（主査） 田中 正人 教授 深見 希代子 教授 柳 茂 教授 浅野 謙一 准教授

論文内容の要旨

【背景】

組織傷害においてマクロファージは、急性炎症と組織修復の両方に寄与することが知られている。炎症期には、組織常在マクロファージと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。一方で、回復期になると、マクロファージは炎症の収束と組織修復に寄与する。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1）。

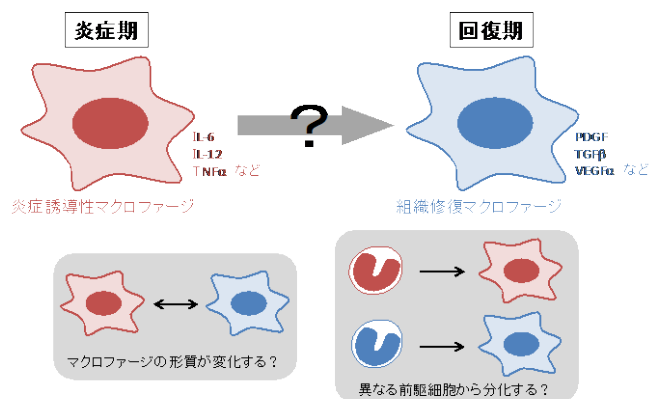


図1. 組織傷害により誘導されるマクロファージの形質転換および想定される形質転換機構

この炎症期、回復期のそれぞれのマクロファージの形質を説明し得るモデルとして、M1/M2 マクロファージ分類が広く知られている。この分類は、

*in vitro*において、骨髄細胞から形質の異なるマクロファージを誘導できるという事実に基づく。M1は炎症期、M2は回復期のマクロファージの形質をよく説明できることから、これまでに、M1 マーカー遺伝子 (interleukin (IL) -6 や tumor necrosis factor α (TNF α) など) や M2 マーカー遺伝子 (Ym1 や arginase 1 (Arg1) など) の発現レベルをもとに、組織常在あるいは浸潤マクロファージを分類す

る多くの試みがなされてきた。しかし、生体内の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し、*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 に着目した。Ym1 発現細胞を可視化するため、Ym1 プロモーター下流に GFP の改変タンパク質である Venus を導入したマウス (Ym1-Venus) を作製し、生体内での免疫抑制性マクロファージの同定を試みた。

【結果】

各組織および末梢血における Ym1 発現細胞の同定

始めに、Ym1-Venus マウスを用いて、各組織マクロファージにおける Ym1-Venus 発現細胞を解析した。その結果、肺マクロファージを除き、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。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、これらの既報と一致して Ly6G⁺の好中球は Ym1-Venus 陽性だった。我々は末梢血において、好中球以外にも Ly6C^{hi} 単球の一部が Ym1-Venus 陽性であることを見いだした。末梢血の単球は、Ly6C^{hi} と Ly6C^{lo} 単球の 2 つのサブセットにより構成されているが、定常状態では Ly6C^{hi} 単球にのみ、Ym1-Venus 陽性細胞が存在することが分かった。

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、Ym1-Venus マウスに lipopolysaccharide (LPS) を投与し、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。その結果、Ly6C^{hi} 単球の割合は LPS 投与 24 時間後には変化がなかったが、LPS 投与 48 時間後にはその割合が増加した。

Ym1⁺Ly6C^{hi} 単球の免疫抑制機能

次に我々は、全身性炎症の回復期に増加する Ym1-Venus 陽性単球の機能を明らかにするために、Ym1-Venus 陽性あるいは陰性単球を分取して、その性質を比較した。それぞれの単球の形態や表面マーカー発現、Ly6C^{lo} 単球への分化能を検討したが、両者の間に差がみられるものはなかった。さらに、それぞれの mRNA 発現を RNA シーケンス (RNA-seq) により解析したところ、Ym1-Venus 陰性単球に比べ、陽性単球でいくつかの好中球顆粒遺伝子の高発現がみられた。

我々は、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、Ym1 陽性単球と陰性単球を LPS で刺激し、培養上清中のサイトカインを定量した。その結果、Ym1-Venus 陽性単球は陰性単球に比べて、炎症性サイトカインである IL-6 や IL-12 の産生が低く、抗炎症性サイトカインである

IL-10 の産生が高かった。続いて、*in vivo*における機能を解析するため、それぞれの単球を定常状態のマウスに移植した後、LPS を投与した。その結果、*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。炎症の回復期には制御性 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。そこで我々は、Ym1-Venus 陽性単球と陰性単球の T_{reg} の分化誘導能を検討した。その結果、Ym1-Venus 陽性単球は T_{reg} の分化を促進することが分かった。これらの知見から、Ym1+Ly6C^{hi} 単球は炎症抑制性の機能を示すことが明らかになった。

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

我々は、組織傷害時の Ly6C^{hi} 単球における Ym1-Venus 発現を検討するため、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導腸炎モデルマウスの解析を行った。このモデルでは、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ため、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。腸炎誘導マウスの末梢血における Ym1-Venus 陽性単球の割合を経時的に解析すると、炎症の初期である Day 3 ではその割合は低いままだった。ところが、DSS 投与を中止して 3 日後の Day 8 では、Ym1-Venus 陽性単球の割合が 35%まで増加し、その後 Day 12 までその割合は 20%以上を維持していた。この Ym1-Venus 陽性単球は、大腸の炎症局所に浸潤することが確認された。この浸潤 Ym1-Venus 陽性単球は、Ym1-Venus 陰性単球と比べて IL-6 発現が低く IL-10 発現が高かった。加えて、Ym1-Venus 陽性単球は炎症の回復や組織修復に重要な secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) 発現が高かった。これらの結果から、DSS 腸炎の回復期に Ym1-Venus 陽性単球が増加し、大腸において抗炎症型の形質を示すことが分かった。

同単球が、炎症時の大腸において炎症の収束や組織修復に関与しているか検討する目的で、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 (Ym1-DTR マウス) を作製した。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される。Ym1-DTR マウスに DSS 腸炎を誘導し、回復期 (Day 8 および Day 10) に Ym1 陽性細胞を消去すると、野生型マウスと比べ、腸炎の回復が遅延した。炎症回復期の好中球も Ym1 陽性であるが、抗 Ly6G 抗体による好中球の消去は腸炎の回復に影響しなかった。これらの知見から、Ym1+Ly6C^{hi} 単球は、炎症の収束や組織修復に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

Ym1+Ly6C^{hi} 単球は単球前駆細胞から分化する

次に我々は、炎症時に増加する Ym1-Venus 陽性単球の分化経路の解析を行った。これまでに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。LPS を投与したマウスに Ym1-Venus マウス由来の GP または MoP を移植し、それらの分化能および Ym1-Venus 発現を解析した。その結果、Ly6C 陽性単球は MoP から分化し、その 44%が Ym1-Venus を発現することが分かった。さらに、我々は Ym1-Venus 陰性単球が Ym1-Venus 陽性に分化する可能性を考え、Ym1-Venus 陰性単球を LPS 投与マウスに移植したが、Ym1-Venus 陽性単球は出現しなかった。これらの結果から、Ym1-Venus 陽性単球は MoP から分化し、Ym1-Venus 陰性単球からは分化

しないことが明らかになった。

さらに、MoP から Ym1-Venus 陽性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。その結果、M-CSF 単独で培養した際には、Ym1-Venus 発現はみられなかった。一方、GM-CSF と M-CSF および IL-3 と M-CSF 共存下において、Ym1 陽性細胞が出現した。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。

【まとめ・考察】

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、炎症の回復期に Ym1 陽性単球が劇的に増加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 陽性単球が骨髄で単球前駆細胞より分化し、炎症部位で刺激を受けることで炎症抑制性の表現型を示すことが明らかになった。また、腸炎の回復期に同単球が炎症の収束および組織修復に重要な役割を担ってい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 を指標とすることで *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。

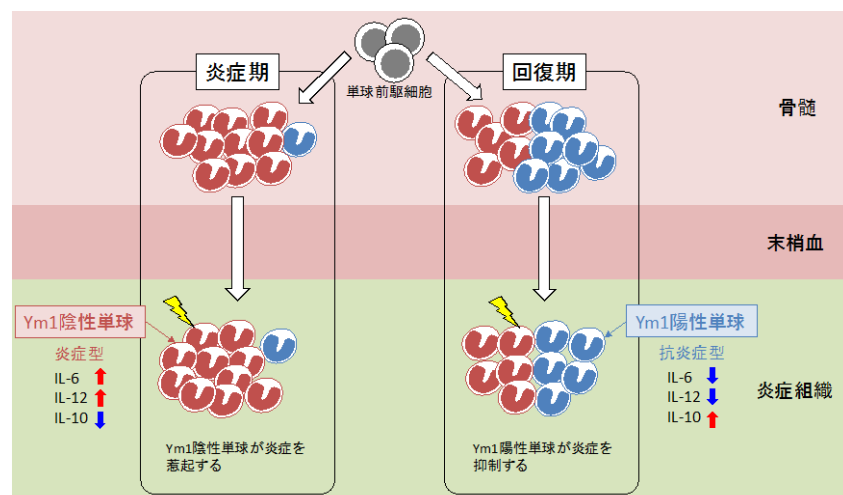


図2. 本研究のまとめ

【研究結果の掲載誌】

審査結果の要旨

生体で感染や組織傷害が起こると、血液中の単球は速やかに傷害部位に集積し、炎症性マクロファージとして炎症の促進を担う。一方で、組織傷害の原因が排除され回復期に入ると、単球およびマクロファージは炎症の収束と組織修復に寄与する。このように、単球およびマクロファージは、組織傷害の時期に応じて正反対の役割を担う。これまで、この組織傷害におけるマクロファージの機能および役割の変化は、同一のマクロファージが、傷害部位の状況に応じて形質を転換させることでなし得ると考えられてきたが、その詳細は明らかになっていなかった。本研究で池田さんは、組織修復型マクロファージのマーカの1つとして知られているYm1分子の遺伝子座に、GFP改変タンパク質の遺伝子を挿入することで、Ym1発現細胞を可視化できるマウス(Ym1-Venusマウス)を作製した。このマウスの解析により、定常時における骨髄および血液中のLy6c陽性単球は、そのほとんどがYm1遺伝子を発現していないことを見いだした。一方で、炎症時のYm1陽性単球の動態を解析したところ、LPS投与により誘導した全身性炎症の回復期に、骨髄でYm1陽性単球サブセットが増産されることが分かった。このYm1陽性単球の形質を調べたところ、Ym1陽性単球は陰性単球に比べて、炎症抑制性の形質を有していることが分かった。さらに、腸炎モデルにおけるYm1陽性単球の動態を調べたところ、腸炎の回復期にYm1陽性単球が劇的に増加すること、および、炎症部位に集積した同細胞が、炎症抑制性の形質を示すことを見いだした。Ym1陽性細胞を誘導的に消去できるマウスを作製し、Ym1陽性細胞非存在下における腸炎の回復過程を解析した結果、同細胞が炎症の収束と組織修復に重要な役割を担っていることが明らかになった。これらの知見は、少なくとも一部の組織修復型マクロファージが、特定の単球サブセットを起源とすることを明確に示しており、組織傷害におけるマクロファージの形質転換を説明する新たな機構の発見として、高く評価できる。

これらの成果および質疑応答は、博士(生命科学)の審査の基準を十分満たしており学位に値すると判断した。