

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02830

研究課題名(和文) マスト細胞による組織マクロファージの分化・機能制御の解明

研究課題名(英文) The development and functional regulation of tissue macrophages by resident mast cells

研究代表者

松江 弘之 (Matsue, Hiroyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10250424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは、貪食機能だけでなく、炎症・免疫・アレルギー反応、組織修復など多くの疾患の病態に関与していること、また、その分化・多機能性があることが明らかにされている。一方、マスト細胞も、アレルギー炎症だけでなく、組織の免疫・炎症・修復などの反応に関与している。本研究において、マウスの組織に常在するマクロファージ前駆細胞(TRMP細胞と命名)を発見し、腹腔や皮膚におけるマスト細胞が、TRMP細胞の分化を介して組織マクロファージの数を制御していることを証明した。その細胞が組織マスト細胞により厳密に制御され、組織マクロファージの分化に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらのマスト細胞とマクロファージの組織における分化を介した関係は、新しく見出した研究成果である。この関係は、上記「研究成果の概要」の冒頭に述べた組織マクロファージとマスト細胞の従来の機能と様々な疾患の病態にかかわっている可能性があり、病態制御の新規の制御点となる可能性がある。その意味で、本研究は、炎症・アレルギーが関与する疾患の新しい治療法の新規作用点となる可能性を秘めており、その基盤を提供する意味で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been known that tissue macrophages are involved not only in the clearance of foreign materials such as microorganisms by phagocytosis, but also in the pathogenic reactions such as inflammation, immunity, allergic reactions, and tissue repairs in many diseases. Tissue-resident mast cells, on the other hand, are involved not only in allergic inflammation as effector cells, but also in responses such as immunity, inflammation, and repair of tissues. In this study, we discovered macrophage progenitor cells (named TRMP cells) that are found in the abdominal cavity and skin of mice, and we proved that tissue-resident mast cells in the abdominal cavity and skin control the numbers of tissue macrophages by promoting the presence of TRMP cells. We revealed that TRMP cells were strictly controlled by tissue mast cells and were important for the development of tissue-resident macrophages.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：マクロファージ マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

組織マクロファージ及びマスト細胞の分化・機能の研究の背景

マクロファージは体内のほとんどあらゆる組織に常在し、組織特異的な表現型と機能を有する。その解剖学的位置から感染症や組織損傷などの外部からの刺激において、炎症・免疫反応、組織修復を誘導、調節する細胞である¹。マクロファージは mononuclear phagocytic system (MPS) に分類され、貪食能と機能類似性から単球、マクロファージ、樹状細胞とそれらの骨髄由来の前駆細胞が含まれるとされた。MPS の分類は、第 1 には発生学的に、第 2 に存在部位、機能、表面マーカーによって分類することが提案されている²。これはシンプルに組織の定常状態と炎症状態でマクロファージを分類している。最近、組織常在マクロファージの多くは胎生造血器由来であり、すべての炎症性マクロファージと一部の組織常在マクロファージは末梢血単球由来であることが解明された³。一方、マスト細胞は全身の結合組織に広く分布し、アレルギーのみならず、組織で様々な炎症、組織修復に関与している細胞である。マスト細胞は胎生期から骨髄由来の前駆細胞が血液循環を経て末梢組織に入り、そこで分化・成熟する。このような背景を鑑みると、感染・アレルギーの場で、組織常在マクロファージの役割は、単球由来のマクロファージと分けて解析する必要がある。我々は、先行研究において組織常在マクロファージ前駆細胞 (tissue-resident macrophage progenitor, TRMP 細胞と表記) を同定した。さらに、マスト細胞が TRMP 細胞を厳密に制御しており、組織常在のマクロファージの数に影響を与えていることを発見した。マスト細胞による TRMP 細胞を介した組織常在マクロファージの分化の詳細は不明である。さらに実際の皮膚疾患の病態へ TRMP 細胞が関与しているかも不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、マスト細胞による TRMP 細胞を介した組織常在マクロファージの分化の詳細を明らかにし、さらに実際の皮膚疾患の病態への関与を解明する。

我々の先行研究において、マスト細胞が組織中の常在マクロファージの分化に関与しているという発見は新規概念の提唱を行うもので、極めて独創的である。たとえば、接触皮膚炎、喘息、関節炎、多発性硬化症、感染症などの多くの疾患モデルでは、従来、マスト細胞欠損マウスを用いることで、マスト細胞の重要性が提唱されてきた。しかしマスト細胞欠損マウスにおいては、すでに組織マクロファージとその前駆細胞 (TRMP) に異常があるという我々の新知見は、これまでの、疾患の病態におけるマスト細胞の関与に関するメカニズムを再検討する必要があることを示している。本研究では、マスト細胞の定常状態でのマクロファージの分化・恒常性維持への関与の機序を研究し、さらに病的状態でのマクロファージの分化・病態への関与について研究する。マスト細胞と組織マクロファージ分化を TRMP 細胞の分化を軸に皮膚疾患の病態理解の新基軸を提案することを目的とした。この新基軸は将来的に、免疫・アレルギー性疾患・感染症・がん・生活習慣病などの新規治療標的を探索する基盤となると考えている。

3. 研究の方法

(概要) 我々は造血異常を伴う古典的マスト細胞欠損マウス ($Ki t^{fl-sh/fl-sh}$ マウス) と造血異常を伴わないマスト細胞特異的欠損マウス ($Cpa3^{Cre}$ マウス) の定常状態の腹腔内、真皮内のそれぞれでマクロファージが減少し、マスト細胞再構成実験で両組織にマクロファージが回復することを発見した。本研究では、マスト細胞欠損マウスとその再構成系で検出されるマクロファージ前駆細胞 (c-Kit+CD11b+細胞、すなわち TRMP 細胞) の形態、フェノタイプ、mRNA 発現を解析し、この細胞集団 (TRMP 細胞) の詳細な分化と系統タイピングを施行する。また、*in vitro* における分化シグナルを検討する。皮膚ではマクロファージと樹状細胞に対するマスト細胞の TRMP 細胞を介した影響を検討する。その後、皮膚疾患 (接触皮膚炎モデルなど)、腹膜炎モデルを用いて、マスト細胞の TRMP 細胞を介した組織マクロファージ分化及び病態関与を、マスト細胞欠損マウス、その再構成、マクロファージ除去の実験で検討する。それらの疾患モデルでマスト細胞の、TRMP 細胞の誘導シグナル、組織マクロファージへの分化に影響する分子を阻害するなどの実験系から、疾患の症状を軽減させられるかを検討する。

(1) 定常状態におけるマスト細胞の TRMP 誘導と組織マクロファージの分化に及ぼす影響

ここでは、マスト細胞欠損マウスの腹腔内に、マスト細胞再構成後に出現する TRMP 細胞がどのようなシグナルを介して分化するのか、TRMP 細胞に分化する可能性をもつ細胞集団を同定する。皮膚では、TRMP を介した真皮マクロファージ、真皮樹状細胞、表皮 Langerhans 細胞への影響をマスト細胞欠損及び再構成にて解析する。

c-Kit+CD11b+細胞 (TRMP) の解析

-1 フェノタイプ解析 CD45, c-Kit, FcεR1, CD11b, Sca-1, CD34, CD135 (Flt3) などを FACS で多重染色する。TRMP は Sca-1, CD34, CD135 (Flt3) 陽性で multipotent progenitor cell (MPP) 様マクロファージ前駆細胞のマーカーが陽性であるが、さらに詳しいフェノタイププロフ

アイリングを施行し、前駆細胞の分化段階を明らかにする。-2 形態レベルの解析 c-Kit+CD11b+細胞をサイトスピン後、ギムザ染色し形態的特徴を調べ透過電子顕微鏡でも形態を検討する。

-3 遺伝子発現による系統タイピング TRMP 細胞がどの系統・分化レベルであるかを c-Kit+CD11b+細胞をセルソートして RNA sequencing (RNA-seq) によって遺伝子発現パターンを解析する。さらに、RNA-seq でミエロイド系プロジェニター細胞のどの段階にあるかを他の分離した既存の前駆細胞、マスト細胞、マクロファージと比較し、TRMP の前駆細胞を同定する。-4 分離 TRMP 細胞の *in vitro* 培養 TRMP 細胞を様々な条件で培養し、マクロファージ分化シグナルを同定する。

-5 *in vitro* 再構成の検討 Cpa3^{Cre} マウスの腹腔内細胞の血球系前駆細胞の様々な組み合わせのマーカを用い、分画をソーティングし、骨髄由来マスト細胞と共培養する。細胞のフェノタイプを FACS で解析し、TRMP が分化してくるかを検討する。マクロファージへ分化するかも検討する。それぞれの細胞分画はセルソーティング後、RNA-seq で遺伝子発現パターンを解析する。

-6 分化の作用機序の解明 TRMP 細胞は先行研究で CD135 (Flt3) を発現している。樹状細胞への分化には Flt3 が深く関与しているが、TRMP 細胞の分化に関与しているかは不明である。遺伝子発現をデータベースの BioGPS で検索すると Flt3 のリガンド (Flt3 ligand) を高発現しているのはマスト細胞であった。従って、Flt3 ligand が TRMP 細胞分化誘導に関与している可能性を Flt3 ligand 投与実験で検討する。まず腹腔内の Flt3 ligand のレベルを再構成前後で測定する。Cpa3^{Cre} マウスで TRMP 細胞が出現するか、逆に Flt3 中和抗体で抑制されるかを検討する。

-5 の *in vitro* の実験系でも検討する。

皮膚内 マクロファージの分化プロファイルの解析 表皮には Langerhans 細胞、真皮には少なくとも 4 種類の樹状細胞、そして真皮マクロファージの存在が知られている。Langerhans 細胞は最近、胎生期卵黄嚢由来であり、一方、真皮樹状細胞の中には胎生期由来と成人になってから単球由来のものがある。真皮のマクロファージは両者由来で、皮膚に炎症が起こると骨髄から供給されると考えられている⁴。我々は真皮のマスト細胞が TRMP 細胞の誘導を介し真皮常在マクロファージの数に影響を及ぼすことを検討する。皮膚マスト細胞再構成後に増加したそのマクロファージと野生型常在マクロファージの表現型の差異を詳細に検討する。また、上述の腹腔内マクロファージの実験と同様の実験を皮膚でも計画し施行する。

(2) 各種疾患モデルでのその病態に及ぼすマスト細胞の組織 マクロファージ分化の影響

腹腔では、腹膜炎モデル、皮膚では接触皮膚炎と皮膚細菌感染モデルを予定する。

4. 研究成果

2 系統のマスト細胞欠損マウスの腹腔内の細胞で、マスト細胞の表現型を持つ細胞が欠損していることをフローサイトメトリーで確認したのち、その 2 系統のマウス腹腔内において、小型と大型マクロファージが、野生型マウスに比べ統計的有意差をもって減少していたことを見出した。この 2 系統のマスト細胞欠損マウスをそれぞれ野生型マウスから調整した骨髄由来マスト細胞を腹腔内に投与して、10 週後に腹腔内細胞の表現型を解析した (マスト細胞再構成実験)。両系統マウスで大型マクロファージは野生型のレベルまで回復したが、小型マクロファージはそこまでの回復は見られなかった。これらの実験から大型の腹腔内マクロファージはマスト細胞によってその数が制御されていることが分かった。同様の再構成実験をドナーとレシピエント由来を区別するために CD45 の違うコンジェニックマウスを用いて実験した。再構成によって、ドナー由来のマスト細胞が腹腔内で検出されるが、大型マクロファージの前駆細胞と考えられる c-Kit+CD11b+細胞はレシピエント由来であった。このことは、マスト細胞が c-Kit+CD11b+細胞の分化に関与していることを示している。c-Kit+CD11b+細胞の表現型をフローサイトメトリーで調べたところ造血幹細胞 (HSC) のマーカを発現していた。この細胞を tissue-resident macrophage progenitor (TRMP) 細胞を命名した。TRMP 細胞をマウス腹腔からソートして、検討したところトルイジンブルー陽性の少数の顆粒と細胞質は泡沫状を呈していた。すなわちマスト細胞とマクロファージ両方の形態学的特徴を持っていた。透過電子顕微鏡では、TRMP 細胞は少数の高電子密度顆粒と細胞辺縁に多くの小空胞を観察しえた。さらに、豊富なミトコンドリア、リボソーム、小胞体が見られた。これらのことは、腹腔内のマスト細胞や大型マクロファージより、形態学的に未熟であることを示唆していた。次に腹腔内 TRMP 細胞、マスト細胞、大型マクロファージをソートして遺伝子発現を比較した。PCA 主成分解析において、それ 3 種類の細胞群は、骨髄由来の造血幹細胞群、マクロファージ細胞群と明確に異なる群をなしていた。腹腔内 TRMP 細胞、マスト細胞、大型マクロファージ群の中で、TRMP 細胞は、腹腔内マスト細胞とマクロファージの中間に位置していた。RNA 塩基配列決定による詳細な遺伝子発現解析により、TRMP 細胞は、マクロファージ系統とマスト細胞系統の両方の系統の遺伝子が発現していることを明らかにした。これらの結果は qPCR で再確認できた。さらに gene set enrichment analysis (GSEA) によって、TRMP 細胞は二つの分化段階が異なるマクロファージの中間に位置することを明らかにした。これは、TRMP 細胞がマクロファージ前駆細胞としてのポテンシャルを持っていることを示している。

次に TRMP 細胞の前駆細胞としてのポテンシャルを確かめるために、TRMP 細胞を腹腔内からソートして集め、*in vitro* で培養した。その際、マスト細胞様細胞とマクロファージ様細胞に分化させるサイトカインの条件を見出した。このことは、TRMP 細胞は、マスト細胞とマクロファ

ージに分化できる前駆細胞であることを示している。

次に皮膚においてマスト細胞が真皮の常在マクロファージの数を制御しているかを検討した。2系統のマスト細胞欠損マウスの耳朶の真皮に野生型マウスから調整した骨髄マスト細胞を注射し、マスト細胞を再構成する実験系を用いて検討した。野生型でマスト細胞が存在し、真皮のマクロファージが存在することを組織染色を用いて確認した。両方のマスト細胞欠損マウスの皮膚では、マスト細胞は存在せず、真皮マクロファージの数の減少が有意差をもってみられた。一方、マスト細胞の再構成実験では、両方のマスト細胞欠損マウスにおいて、マスト細胞と真皮マクロファージがともに野生型同様に数が回復していた。ランゲルハンス細胞は、2系統のマスト細胞欠損マウスのマスト細胞再構成実験の前後で、いずれも野生型と同程度に見られた。したがって、腹腔内で見られる現象が、皮膚でも見られることを証明した。

腹腔内の実験結果の再現性をみる実験を繰り返し施行し、*in vitro*の実験のサイトカインの条件の設定、とくに皮膚での実験の確認に時間を要したが、すべての実験結果は再現性があり、インパクトのある論文として投稿準備をほぼ終了している。(2)各種疾患モデルでのその病態に及ぼすマスト細胞の組織マクロファージ分化の影響については、予備実験を施行中である。

<引用文献>

1. Wynn T, et al. *Nature* 496:445, 2013
2. Guilliams M, et al. *Nat Rev Immunol* 14:571, 2014
3. Gomez-Perdiguero E, et al. *Nat Immunol* 17:2, 2016
4. Malissen B, et al. *Nat Rev Immunol* 14:417, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi M, Wakabayashi S, Nakamura Y, Matsue H, et al.	4. 巻 85
2. 論文標題 Good Ultrastructural Preservation of Human Tissues and Cultured Cells by Glutaraldehyde Fixation, Sandwich Freezing, and Freeze-Substitution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 15-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.85.15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	松岡 悠美 (Matsuoka Yuumi) (10402067)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (14401)	

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	若林 正一郎 (Wakabayashi Seiichiro) (30645627)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究協力者	岩間 厚志 (Iwama Atsushi) (70244126)	東京大学・医学研究所・教授 (12601)	
研究協力者	田村 智彦 (Tamura Tomohiko) (50285144)	横浜市立大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------