

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08752

研究課題名(和文) 組織滞在型マクロファージの分化機構および生物学的機能の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the molecular mechanism for the generation of tissue-resident macrophages and their biological functions

研究代表者

山根 利之 (Yamane, Toshiyuki)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30452220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成体に存在する組織常在(滞在型)マクロファージは、胚胎期の胚体外の袋状の組織である卵黄嚢に起源し、体中の末梢組織に播種し、造血幹細胞に依存しない形でその場で自己複製を行い、生体の防御機構、恒常性の維持に関わっている。本研究課題は、この組織常在マクロファージの分化機構と生物学的機能を明らかにすることを目的とした。研究期間を通じて、卵黄嚢において組織常在マクロファージの前駆細胞が形成される過程で働く転写因子制御を明らかにできた。また卵黄嚢の組織常在マクロファージの前駆細胞が、組織常在マクロファージに加え、骨吸収を担う破骨細胞系譜へ寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織常在マクロファージは、細胞破片・死細胞の除去、また病原体の除去など、生体の恒常性維持に深く関わっている。本研究課題では、胚組織に由来する組織常在マクロファージがどのような分化機構によって形成されているのか、またどのような生物学的機能に寄与するのか精査した。組織常在マクロファージは、様々な免疫関連疾患への寄与、病原体への感受性の付与、あるいはがん組織の進展への寄与などに深く関わっており、これらに関連した疾患を理解する上で、あるいは治療を進める上で不可欠となる組織常在マクロファージの基礎的知見を得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Tissue-resident macrophages are derived from the yolk sac tissue present in embryonic stages. Yolk sac macrophage progenitors spread into various tissues of the animal body and differentiate into macrophages, which self-renew through cell division independently of hematopoietic stem cells. This study revealed the molecular mechanisms governing the generation of tissue-resident macrophage progenitors. Additionally, it suggested a relatively higher contribution of yolk sac macrophage progenitors to bone-resorbing osteoclasts compared to post-natal bone marrow-derived macrophage progenitors.

研究分野：幹細胞生物学 血液学 免疫学 発生学

キーワード：組織常在マクロファージ 血液の発生 免疫系の発生 転写制御因子 幹細胞 細胞分化 マクロファージ 転写因子

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、全身のありとあらゆる組織に存在し、死細胞、細胞破片、外来異物の除去、炎症反応の誘起、また免疫寛容に関わっている。研究開始時、末梢組織に常在する

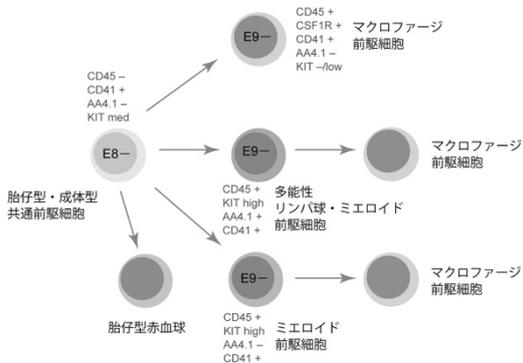


図1 初期卵黄嚢におけるマクロファージ系譜の起源

組織常在マクロファージは、胎生期の袋状の組織である卵黄嚢に由来する造血細胞に起源し、自己増殖しながら、末梢組織の恒常性維持に関わっていることが判明していた。研究代表者は、研究開始当初、組織常在マクロファージの前駆細胞は、マウス胚の胎齢 9 日の卵黄嚢に初めて出現すること、またその由来について、胎仔型赤血球や多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞、ミエロイド前駆細胞と共通の起源(胎仔型・成体型共通前駆細胞)を持つことを概ね明らかにして

いた[図1]。また胎齢 8 日においては、胎仔型・成体型共通前駆細胞が組織常在マクロファージの唯一の供給源となるものの、1 日後の胎齢 9 日においては、胎仔型・成体型共通前駆細胞に加え、多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞、ミエロイド前駆細胞も組織常在マクロファージの供給源となり、複数起源となることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

これら我々の得た知見を背景に、本研究課題においては以下の目的を設定した。

1) 組織常在マクロファージ前駆細胞の分化機構の解明

卵黄嚢において、組織常在マクロファージ前駆細胞がどのようなサイトカインシグナルで、またどのような転写メカニズムで発生してくるのか、解明する。

2) 組織常在マクロファージの生物学的機能の解明

組織常在マクロファージ前駆細胞の分化特性を明らかにするとともに、組織常在マクロファージの機能的転換によって、マウス個体にどのような生理的、病理的变化が生じるか検証する。

3. 研究の方法

1) 組織常在マクロファージ前駆細胞の分化機構の解明

まず、マウス胚の胚胎外(ex vivo)培養系を確立し、この培養系へサイトカインシグナルをブロックする薬剤を添加し、組織常在マクロファージ前駆細胞の形成に関わるサイトカインを特定する。また組織常在マクロファージ前駆細胞の源となる胎仔型・成体型共通前駆細胞をマウス胚より単離し、レトロウイルスベクターを用いて、組織常在マクロファージ前駆細胞や胎仔型・成体型共通前駆細胞で発現している転写因子遺伝子を導入し、in vitro 培養にて組織常在マクロファージ前駆細胞を誘導することで、組織常在マクロファージ前駆細胞の分化に関わる転写制御を特定する。

2) 組織常在マクロファージの生物学的機能の解明

卵黄嚢から in vitro 培養にてマクロファージを誘導し、まず in vitro その分化能を精査す

る。また卵黄囊由来組織常在マクロファージの成体マウスへの移植系を確立し、遺伝的に改変した組織常在マクロファージを成体マウスへ移植することで、どのような生理的、病理的変化が見られるか検証する。

4. 研究成果

1) 組織常在マクロファージ前駆細胞の分化機構の解明

まず、組織常在マクロファージ前駆細胞の存在しない胎齢 8 日のマウス胚（胎盤のみを除いた胚体と卵黄囊）を単離し、そのまま 2 日間全胚培養を行うことで、組織常在マクロファージ前駆細胞の出現してくる *ex vivo* 培養系を確立できた。この培養系へサイトカインシグナルを阻害するサイトカイン受容体 Fc キメラタンパク質を添加し、組織常在マクロファージ前駆細胞の発生が阻害されるか検証した。これまでにエリスロポエチン、IL-3 について組織常在マクロファージ前駆細胞数に変化が認められているが、サイトカイン受容体 Fc キメラタンパク質以外の阻害方法によっても同様の変化が認められるか、より多面的に検証を進めている。

また胎仔型・成体型共通前駆細胞が組織常在マクロファージ前駆細胞へ分化する過程で Pu. 1 転写因子の遺伝子発現が 25 倍上昇すること、また逆に、Gata1 転写因子の遺伝子発現が 300 分の 1 に減衰することを見出した。胎仔型・成体型共通前駆細胞へ実験的にレトロウイルスを用いて Pu. 1 を強制発現すると、胎仔型赤血球の出現が強く抑制される一方、組織常在マクロファージ前駆細胞の出現が 3 倍以上促進された。逆に、胎仔型・成体型共通前駆細胞へ Gata1 を強制発現すると、組織常在マクロファージ前駆細胞の出現は、ほぼ皆無となった。このことは、Pu. 1 と Gata1 による相互抑制が、胎仔型・成体型共通前駆細胞から組織常在マクロファージ前駆細胞と胎仔型赤血球が出現時に機能していることを強く示唆した。

以前我々は、胎仔型・成体型共通前駆細胞から多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞、ミエロイド前駆細胞が出現する際にも、Pu. 1 と Gata1 による相互抑制が機能していることを発表したが (Yamane et al, J Cell Physiol, 2017)、上述の結果によって、組織常在マクロファージ前駆細胞と多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞は、どのような転写制御の差異によって分化制御がなされているのかという新たな疑問が生じた。この点についても多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞に特異的に発現する転写因子が、組織常在マクロファージ前駆細胞の発生を強く抑制していることを突き止めている。このように組織常在マクロファージ前駆細胞発生時の転写制御については概ね明らかにできた。

2) 組織常在マクロファージの生物学的機能の解明

卵黄囊から誘導したマクロファージが、成体骨髄マクロファージに比べ、効率よく骨吸収を担う破骨細胞へ分化することを、*in vitro* 培養系で明らかとした。

成体における機能解析については、卵黄囊由来マクロファージの移植系をまず整備した。具体的には、成体マウスを CSF1R を阻害する薬剤で前処置しておき、ここへ卵黄囊由来マクロファージを腹腔内移植することで、少なくとも 3 ヶ月程度は成体へ留まるというドナーホスト識別システムを整備した。現在、卵黄囊由来マクロファージへレトロウイルスによる遺伝子導入を行うことで、マクロファージが増多する表現型を有するマウス個体も観察できており、現在、病理解析を多面的に進めている。

3) 研究の統括および今後の展望

組織常在マクロファージの転写因子による分化制御については概ね明らかにできた。本研究課題で確立した *ex vivo* 培養系については、今後さらに卵黄囊造血の機構解明へ活用

していきたい。また、卵黄嚢由来組織常在マクロファージの移植系を確立し、組織常在マクロファージの性状転換による病理変化を認めているので、今後さらに解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito C, Hikosaka-Kuniishi M, Yamazaki H, Yamane T	4. 巻 79
2. 論文標題 Multiple cell populations generate macrophage progenitors in the early yolk sac	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04203-7	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 -

1. 著者名 Hikosaka-Kuniishi M, Yamane T, Isono K, Tetteh DN, Yamazaki H	4. 巻 243
2. 論文標題 Isolation of CD35+ follicular dendritic cells and its role in the differentiation from B cells to IgA+GL7+ cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 53-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2022.02.005	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 -

1. 著者名 Yamane T	4. 巻 21
2. 論文標題 Cellular Basis of Embryonic Hematopoiesis and Its Implications in Prenatal Erythropoiesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 9346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21249346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山根利之
2. 発表標題 マクロファージ系譜の起源の多様性
3. 学会等名 第84回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikosaka-Kuniishi M, Yamane T, Tetteh DN, Yamazaki H
2. 発表標題 The role of isolated CD35+ follicular dendritic cells in the differentiation from B cells to IgA+GL7+ cells
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikosaka-Kuniishi M, Yamane T, Yamazaki H
2. 発表標題 Follicular dendritic cell-mediated enhancement of the differentiation into IgA+GL7+ cells
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>三重大学大学院医学系研究科幹細胞発生学分野ホームページ/研究代表者ページ https://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/yamane.html</p>
--

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

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
---------	---------