

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19386

研究課題名(和文)新規単球の分化制御機構と機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms involved in differentiation and functions of a novel subset of monocytes

研究代表者

平位 秀世(Hirai, Hideyo)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：50315933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：単球は、生体防御のみならず、様々な疾患の病態形成においても重要な役割を果たしている。マウスでは、従来からLy6C+単球とLy6C-単球が単球の亜集団として同定されていた。我々は新たにCD135を発現する単球亜集団を発見した。このCD135+単球は、細胞表面抗原の発現や網羅的な遺伝子発現プロファイルに加えて、機能的にも従来型単球と樹状細胞の特徴を併せ持つ。また、共通単球前駆細胞には由来せず、従来型単球とは異なる分化経路をたどり、従来型単球との相互転換も無かった。これらの所見から、CD135+単球は新規の単球亜集団であると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単球は、生体防御においても、炎症やがんをはじめとした様々な病態形成においても重要な役割をしており、その機能の正確な理解は、疾患の病態解明や予防法・治療法の開発において必須の情報である。本研究で同定したCD135+単球は、従来型単球とかなり異なる機能を有しているにも関わらず、これまで同一細胞として取り扱われてきている。CD135+単球の同定によって、各単球亜集団の正確な機能分担についての理解が進むことが期待される。今後、CD135+単球の生理学的意義・ヒトでのカウンターパートの同定などが求められる。

研究成果の概要(英文)：Monocytes play important roles not only in host defense, but also in pathogenesis of various kinds of diseases. In mice, Ly6C+ and Ly6C- monocytes have been identified as distinct monocyte subsets. Here, we discovered a monocyte subset which expresses CD135. CD135+ reveals intermediate features between conventional monocytes and dendritic cells in terms of gene expression and functions. Different from conventional monocytes, CD135+ monocytes derive not from common monocytes progenitors, but directly from macrophage-dendritic cell progenitors. In addition, CD135+ monocytes and conventional monocytes were not interchangeable in vivo at steady state conditions. These findings suggest that CD135+ monocyte is a distinct novel monocyte subpopulation.

研究分野：血液学

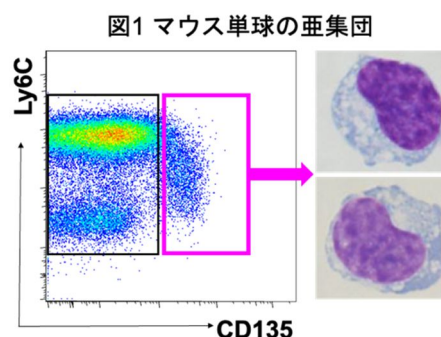
キーワード：単球 生体防御 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単球は、樹状細胞とともに単核貪食細胞に分類されており、生体防御や、様々な疾患の病態形成において重要な役割を担っている。近年、単球が不均一な細胞から構成されており、それぞれが固有の機能を有していることが明らかとなってきた。マウスでは、単球の中に Ly6C⁺の古典的単球と、Ly6C⁻の非古典的単球が存在することが知られていたが、それ以外の亜集団は同定されていなかった。

申請者らは、転写因子 C/EBP β の造血制御における機能を解明する中で、C/EBP β ノックアウトマウスでは、Ly6C⁻単球が特異的に減少していること、この Ly6C⁻単球の減少は、C/EBP β に発現制御されている M-CSF 受容体の発現低下によることを明らかにした (BBRC, 2015、Blood, 2017)。その過程で、CD11b⁺ CD115⁺ 陽性で規定されるマウス単球の解析において、Ly6C に加えて細胞表面マーカーとして CD135 を加えることによって従来の Ly6C⁺単球とも Ly6C⁻単球とも全く異なる新規の CD135 陽性集団が存在することを見出した (図 1)。



2. 研究の目的

前述のように、申請者は予備的研究において、マウスの骨髄・脾臓及び末梢血中の CD11b⁺ CD115⁺細胞中に CD135 を発現する細胞集団、すなわち CD135⁺単球が存在し、従来の単球 (Ly6C⁺/Ly6C⁻単球)は CD135 陰性であることを見出した。本研究では、この新規 CD135⁺単球に焦点を当て、1) CD135⁺単球とその他の単核貪食細胞集団との相違を明らかにすること、2) 新規単球の分化経路及び、その制御機構を理解すること、3) 新規単球の機能や、生理学的意義、さまざまな疾患の病態形成における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規単球の同定

マウスの骨髄・脾臓・末梢血から細胞を分離し、様々な蛍光標識抗体を用いて従来型 Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球、樹状細胞と、これらの前駆細胞であるマクロファージ・樹状細胞前駆細胞 (MDP: macrophage dendritic cell progenitor)、共通単球前駆細胞 (cMoP: common monocyte progenitor)、共通樹状細胞前駆細胞 (CDP: common dendritic cell progenitor)を同定し、下記

の項目について検討した

CD135⁺単球特異的な表面抗原の探索

CD135⁺単球の遺伝子発現プロファイルの決定

(2) 新規単球の分化経路の解明

野生型 Ly5.2 マウスから、CD135⁺単球に加えて従来型 Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球、樹状細胞と、これらの前駆細胞であるマクロファージ・樹状細胞前駆細胞 (MDP: macrophage dendritic cell progenitor)、共通単球前駆細胞 (cMoP: common monocyte progenitor)、共通樹状細胞前駆細胞 (CDP: common dendritic cell progenitor)をセルソーターで純化・分離し、非照射の野生型 Ly5.1 マウスの頸骨髄中に注射針を用いて直接輸注し、36~60 時間後に輸注した骨から骨髓細胞を取り出し、フローサイトメーターで、輸注した細胞がどのように分化したかを観察した。

(3) 新規単球の機能解析

野生型マウスから、CD135⁺単球に加えて従来型 Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球、樹状細胞と、この MDP、cMoP、CDP をセルソーターで純化・分離し、試験管内での貪食能・抗原提示能・サイトカイン産生能を評価した。

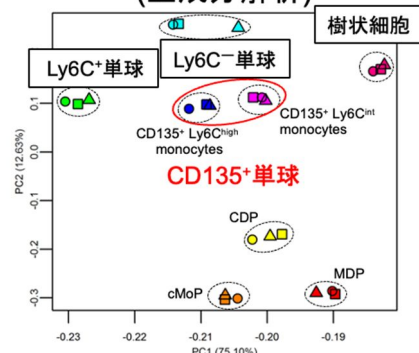
野生型マウスを用いて LPS 刺激モデル(単球増加による生体防御の評価系)、Candida albicans 感染モデル、盲腸結紮穿刺モデル、担癌モデル(メラノーマ細胞株 B16 の皮下移植)を作成し、骨髓・脾臓・末梢血から分離した細胞をフローサイトメーターで解析し、CD135⁺単球の増減を検討する。

4 . 研究成果

申請者は、本研究によって、従来知られているマウスの単球亜集団 Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球のいずれとも全く異なる亜集団として CD135 を発現する新規単球集団 CD135⁺単球を同定した (J Immunol, 2022)。これまでに知られていた従来型の Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球は、CD135 陰性単球の亜集団として再定義されることになる。CD135⁺単球は、その細胞表面に古典的単球とも樹状細胞とも共通する多数の表面蛋白質を発現していた。RNAseq 解析では、CD135⁺単球は、従来型の Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球や樹状細胞及び、それらの前駆細胞の

いずれとも異なる遺伝子発現プロファイルを有することが判明し、独立した細胞集団である事が示唆された (図 2)。機能的には、CD135⁺単球は Ly6C⁺単球に匹敵する貪食能や、樹状細胞と同等の抗原提示能を併せ持つ。従来型の Ly6C⁺及び Ly6C⁻単球は、いずれも cMoP から分化するが、CD135⁺単球は cMoP からは分化せず、分化の階層のさらに上流となる MDP から分化するこ

図2 RNA-seq解析結果
(主成分解析)



とが明らかとなった。上記から、今回発見した単球の中の CD135 陽性分画は、これまでの単球とは全く異なる単核貪食細胞としての性格を有する亜集団であることが判明した。マウスを用いた LPS 刺激や、in vivo 感染モデル、担癌モデルを作成し、単球及びその亜集団の数の変化を観察したところ、これらの刺激では、CD135⁺単球が特異的な変動を呈することは無く、生理的意義や、病態形成における意義については、引き続き検討が必要と考えられた。

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 Kamio Naoka, Yokota Asumi, Tokuda Yuichi, Ogasawara Chie, Nakano Masakazu, Nagao Miki, Tashiro Kei, Maekawa Taira, Onai Nobuyuki, Hirai Hideyo | 4. 巻 209 |
| 2. 論文標題 A Novel CD135+ Subset of Mouse Monocytes with a Distinct Differentiation Pathway and Antigen-Presenting Properties | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Immunology | 6. 最初と最後の頁 498 ~ 509 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100024 | 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Asumi Yokota, Naoka Kamio, Yuichi Tokuda, Chie Ogasawara, Masakazu Nakano, Kei Tashiro, Nobuyuki Onai, and Hideyo Hirai |
| 2. 発表標題 A novel mouse monocyte subset with a distinct differentiation pathway and antigen-presenting properties. |
| 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 Kaori Niwa, Shotaro Iwamoto, Ryo Hanaki, Keishiro Amano, Hidemi Toyoda, Kazuaki Maruyama, Kyoko Imanaka-Yoshida, Masahiro Masuya, Isao Tawara, Hideyo Hirai, Masahiro Hirayama |
| 2. 発表標題 The role of macrophages in acute graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. |
| 3. 学会等名 第45回日本造血免疫細胞療法学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学幹細胞制御学研究室HP
<https://www.ls.toyaku.ac.jp/~stemcell/>

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 | 横田 明日美 (Yokota Asumi) (00571556) | 東京薬科大学・生命科学部・助教 (32659) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|