

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20772

研究課題名（和文）新規骨髄系マクロファージ様細胞の骨病変への関与

研究課題名（英文）Contributuion of novel myeloid macrophage-like cells to pathology of bone

研究代表者

藤井 貴之（Fujii, Takayuki）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：30911557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：関節炎モデルマウスの関節滑膜および骨において、我々の既報のとおり、2つの亜集団を同定した。それぞれの亜集団について、フローサイトメトリーで分離し、RNAシーケンスを行った。関節炎を起こすと、増加する亜集団と減少する亜集団が存在し、かつ、骨と滑膜においては、表面マーカー発現パターンが同じでも、かなり違った遺伝子発現パターンを示していた。関節炎を惹起した骨と関節炎なしの骨マクロファージの間でも遺伝子発現パターンが異なっていた。骨と滑膜におけるマクロファージは、関節炎において違った働きを有すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ等の病態に関連する骨の破壊は、日常生活の質、社会生活における活動度や、時に生命予後に関連する。マクロファージは炎症を介して、骨破壊に関連することが知られている。関節リウマチモデルマウスの関節滑膜と骨のマクロファージを分析したところ、関節滑膜と骨のマクロファージは遺伝子発現パターンに大きな違いがあることが分かり、関節炎や骨破壊といった種々の障害に個別のアプローチが可能になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We performed flow cytometry and identified two distinct macrophage populations in the synovium and bone in the arthritic joint using SKG mice, as we previously reported in another mouse model. We sorted macrophage populations from bone and synovium separately and conducted RNA sequencing, and found that those macrophage subpopulations had distinct transcriptomic landscapes across cell types and tissues. Even though they share the same surface marker expressions, it was estimated that those macrophage subpopulations had different pathological functions in the pathology of joint arthritis.

研究分野：医学

キーワード：関節リウマチ マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージによる炎症は、様々な病態に関与している。マクロファージには炎症性マクロファージ (M1)、抗炎症性マクロファージ (M2) などのサブセットがあり、マクロファージサブセットのバランスは、自己免疫疾患、創傷治癒、腫瘍免疫などに関与することが知られている。申請者はマウス膝前十字靭帯再建モデルを用いて、創部に浸潤するマクロファージサブセットを単細胞 RNA シーケンスやフローサイトメトリーを用いて解析を行い、2種類のマクロファージ亜集団が浸潤することを報告した (文献 1)。2種のマクロファージサブセットは表面抗原マーカー CD9 と CX3CR1 発現の有無で分けることができ、CD9 陰性 CX3CR1 陽性マクロファージ (以下 CX3CR1⁺ Mph) と、CD9 陽性 CX3CR1 陰性マクロファージ (以下 CD9⁺ Mph) として報告した。CD9⁺ Mph は TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインや CCL3 や CXCL2 などのケモカインを高発現していた。このマクロファージサブセットは単球系細胞のマーカー CCR2 陰性であり、かつ、顆粒球・マクロファージ双方の特徴を有した細胞群であることが分かり、いままで知られていないマクロファージサブセットである可能性を報告した。このマクロファージ亜集団については、我々が初めて報告した亜集団であり、他の病態における関与については知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、いままで知られていなかったマクロファージサブセットの機能を明らかにすることである。骨損傷部位に浸潤するマクロファージサブセットに対する詳細な研究は行われていなかった。我々はこれまでの研究から、骨損傷部位に浸潤するマクロファージに 2種類のサブセットが存在することを同定した。即ち、術後早期に骨損傷部位に浸潤してくる CD9⁺ Mph と遅れて誘導される CX3CR1⁺ Mph である。CX3CR1⁺ Mph の遊走を阻害すると、組織修復が促進することが示された (文献 1)。これまでの報告では、肥満脂肪組織や肝硬変、動脈硬化病変内等に CD9 を高発現するマクロファージサブセットが同定されてきたが、我々の発見した CD9⁺ Mph は顆粒球系の遺伝子プロファイルも有する、全く異なったマクロファージサブセットである。これらのことより、CD9⁺ Mph の由来や分化のメカニズム等は不明であるが、CD9⁺ Mph は「骨損傷」により骨内免疫微小環境に誘導される新たなマクロファージサブセットであると考えられた。本研究の目的は骨損傷が起こる状態において骨内に誘導されると考えられるマクロファージである CD9⁺ Mph について、機能解析を行い、治療ターゲットとなりえるかどうかを検討することである。

3. 研究の方法

新規マクロファージの機能解析に用いたモデルは (1) 関節リウマチモデルと (2) 骨腫瘍モデルである。関節リウマチモデルに関節炎を惹起し、関節内の骨と滑膜を採取し、マルチカラーフローサイトメトリーと RNA シーケンスで解析した。関節リウマチ患者の血中において患者間での差異がないかどうか、マスサイトメーター (CyTOF) および RNA シーケンスを用いて解析した。骨腫瘍モデルマウスでは、腫瘍細胞を注射し、骨腫瘍を形成させ、その周囲の組織を採取して解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 関節炎

自己免疫性関節炎モデルマウスである SKG マウスを用いて研究を行った。SKG マウスにマンナンを用いて関節炎を惹起させ、関節滑膜および骨の単球・マクロファージについてフローサイトメトリーを用いて分析した。関節滑膜および骨において、我々の既報 (文献 1) のとおり、2つの亜集団を同定した (図 1)。それぞれの亜集団について、フローサイトメトリーで分離し、RNA シーケンスを行った。関節炎を起こすと増加する亜集団と減少する亜集団が存在し、かつ、骨と滑膜においては、表面マーカー発現パターンが同じでも、かなり違った遺伝子発現パターンを示していた。関節炎を惹起した骨と関節炎なしの骨マクロファージの間でも遺伝子発現パターンが異なっていたが (滑膜組織は関節炎なしの状態であるとほとんど認められないため、関節炎ありのサンプルのみ解析した。)、 「関節炎の有無」よりも、表面マーカーの違いによる「亜集団間」の遺伝子発現の差のほうが大きいという結果になった。また、組織、すなわち滑膜と骨の間での差が極めて大きく、関節炎骨と滑膜におけるマクロファージは、関節炎において違った働きを有すると考えられた (図 2)。それぞれのマクロファージ亜集団がどのような機能を有しているのか現在、解析を進めている。

これらの結果から、ヒト RA 患者の末梢血においても、特徴的な単球・マクロファージ系細胞が存在するかどうか検討した。CyTOF を用いて検討すると、患者の一部に CCR6 等のケモカインが陽性になる単球を有する患者がいることが判明した (図 3)。現在、RNA シーケンス等を用いて、機能的差異を検討している。

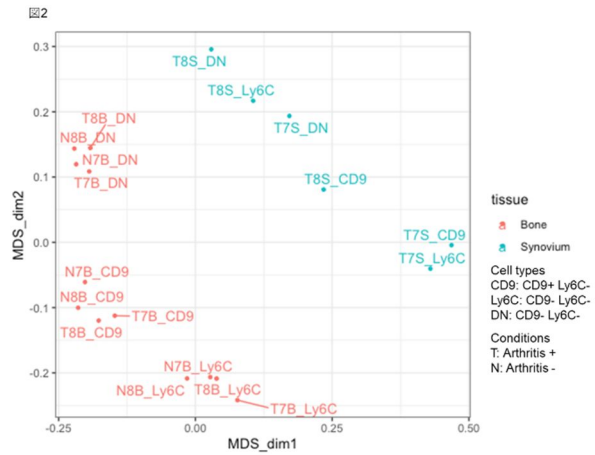
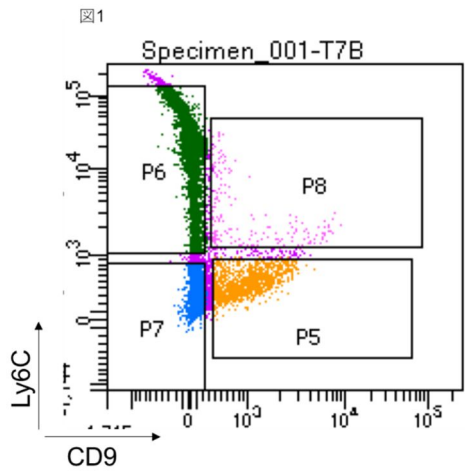
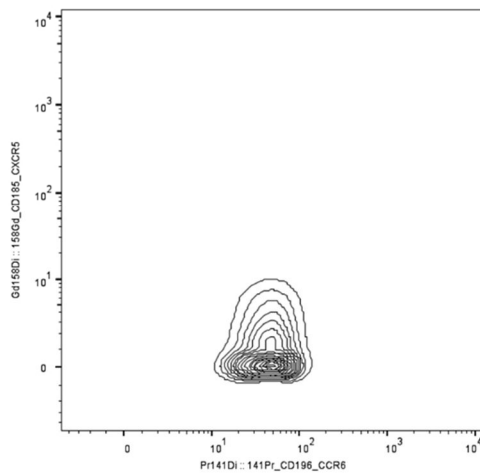
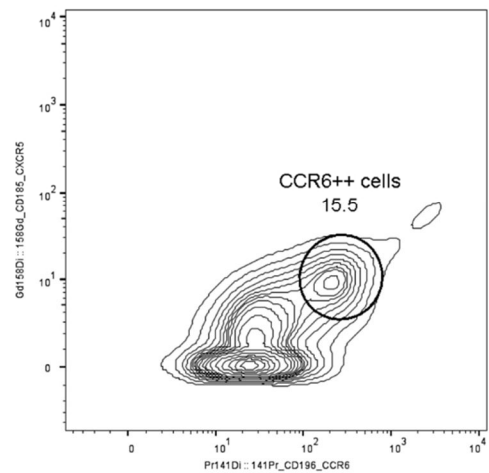


図3 ケモカイン陰性群



ケモカイン陽性群
CCR4,6,7 CXCR3,5+



(2)骨腫瘍

骨腫瘍モデルについては、骨腫瘍形成能のある細胞を購入し、骨腫瘍形成能をみる予備実験から行っているが、実験モデル作成に時間を要し、具体的な研究成果が得られるには至っていない。研究を進めている。

参考文献

1. Fujii, T., Wada, S., Carballo, C.B., Bell, R.D., Morita, W., Nakagawa, Y., Liu, Y., Chen, D., Pannellini, T., Sokhi, U.K., Deng, X.-h., Park-Min, K.H., Rodeo, S.A. and Ivashkiv, L.B. (2022), Distinct Inflammatory Macrophage Populations Sequentially Infiltrate Bone-to-Tendon Interface Tissue After Anterior Cruciate Ligament (ACL) Reconstruction Surgery in Mice. JBMR Plus e10635. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10635>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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