

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09950

研究課題名(和文) 組織滞在型マクロファージの起源の探索および人為的作製法の開発

研究課題名(英文) Identification of tissue-resident macrophage progenitors and the development of reprogramming technology to induce the cells

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：成体組織に存在する組織滞在型マクロファージは、胎仔期に存在する胚体外組織である卵黄嚢に由来し、造血幹細胞に依存せず末梢組織で自己複製していることが、近年の研究から明らかとされている。本研究課題では、組織滞在型マクロファージの、卵黄嚢における発生学的起源を探索し、最初期の組織滞在型マクロファージの元となるのは、造血幹細胞が出現する以前に存在し、胎仔型赤血球およびリンパ球・ミエロイド系譜を作り出す造血細胞であることを突き止めた。またマウス線維芽細胞からマクロファージを作る技術の開発を試み、組織滞在型マクロファージの表現型を有する細胞の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体に存在するマクロファージ系譜の多起源性を明らかにするとともに、リンパ球系譜や成体型の赤血球系譜、好中球などの他のミエロイド系譜に先立ち、マクロファージ系譜が発生し、胎仔型赤血球とともに、早期にマクロファージ系譜が全身に播種することを示し、マクロファージ系譜の正常な個体発生への寄与が示唆された。また転写因子によるリプログラミングによって、線維芽細胞からマクロファージを作製できることから、ヒトへと応用できれば、テラーメイドのマクロファージによるドラッグスクリーニングなど、諸々の疾患の治療法の改善へ寄与する可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Tissue-resident macrophages are derived from the yolk sac tissue present during embryonic period. It is known that tissue-resident macrophages self-renew independently from hematopoietic stem cells. However, it was not precisely known which type of hematopoietic cells in the yolk sac give rise to macrophage lineage cells. In this study, our analysis showed that the earliest hematopoietic cells that generate primitive erythroid cells and lympho-myeloid lineage cells are the initial source of macrophage lineage cells in the yolk sac. A technology that allows the development of macrophages from mouse fibroblasts was also developed based on the knowledges obtained from the analysis of yolk sac hematopoiesis.

研究分野：幹細胞生物学 血液学 免疫学 発生学

キーワード：マクロファージ 造血発生 免疫発生 卵黄嚢 細胞分化 リプログラミング マウス

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、成体の末梢組織に存在する組織滞在型マクロファージは、胎生期に存在する胚体外の袋状の組織である卵黄嚢に由来し、造血幹細胞に依存せず、末梢組織で自己複製しているという報告が相次いでなされていた。また、胎生初期の卵黄嚢に存在する、赤血球・ミエロイド系譜前駆細胞（以下、EMP）が、組織滞在型マクロファージの前駆細胞であるという報告も、これらに次いで発表された。EMPは、顆粒球、単球・マクロファージ、および成体と同じ型のヘモグロビンをもち、脱核後、血流にのる成体型赤血球への分化能を有するものの、胎仔へヘモグロビンを発現し、有核のまま血流へ入る胎仔型赤血球や、T、B、NK細胞などのリンパ球系譜へは分化しない造血細胞と定義されている。

しかしながら我々は、研究開始当初すでに、複数種類の造血細胞が初期卵黄嚢に存在していることを明らかにしており（Yamane T, *Front Cell Dev Biol*, 2018 に概説）、実際にどの造血細胞分画が、主に組織滞在型マクロファージへと分化するのか不明であった。

また研究開始当初、卵黄嚢の造血発生機構の研究で得られた知見をもとに、まだ血液系譜へ分化決定を受けていない中胚葉細胞から、新規に造血細胞が形成される過程で、発現上昇の見られる転写因子遺伝子群を単離し、これらの遺伝子群をマウス線維芽細胞へ導入し、汎血球マーカーである CD45 抗原を線維芽細胞上へ誘導できる転写因子遺伝子の組み合わせをスクリーニングし、特定していた。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、①卵黄嚢においてマクロファージ前駆細胞がいつ出現するのか精査し、②組織滞在型マクロファージの卵黄嚢における細胞起源を明らかにすることを最初の目的とした。また、③卵黄嚢に出現したマクロファージ前駆細胞が、実際にどのような組織滞在型マクロファージ系譜へ分化するのか明らかとすることも課題とした。これらの生理的発生過程を対象とした課題とともに、さらに我々の開発したリプログラミング系を用いて、④人為的に組織滞在型マクロファージを誘導する技術を確立することも目標とした。

3. 研究の方法

①卵黄嚢におけるマクロファージ前駆細胞の出現時期の精査

単球・マクロファージ系譜に特異的に分化する前駆細胞を探索する目的で、コロニー刺激因子 1（別名：マクロファージコロニー刺激因子）受容体（CSF1R、別名：M-CSFR、FMS）に対する蛍光標識モノクロー抗体 AFS98 によって、卵黄嚢組織を経時的に染色した。また CSF1R プロモーター下に EGFP 蛍光タンパク質遺伝子を発現するトランスジェニックマウス「B6.Cg-Tg(Csf1r-EGFP)1Hume/J」をジャクソンラボラトリーから入手し、EGFP 発現によっても観察を試みた。

②組織滞在型マクロファージの卵黄嚢における細胞起源の探索

上記の方法で同定したマクロファージ前駆細胞が、実際にどの造血細胞から出現するのか、各種造血細胞をセルソーターで単離し、実際に *in vitro* で短期間（24時間）培養を行い、上記の方法で同定したマクロファージ前駆細胞の表現型を有する細胞が、どの造血細胞から出現するのか観察した。

③卵黄嚢に出現したマクロファージ前駆細胞の分化能の精査

マクロファージの起源となる造血細胞を *in vitro* で分化させ、形成されたマクロファージ系譜の表現型を、成体に存在する各種マクロファージの表現型と比較し、卵黄嚢に由来する細胞が、実際どのような種類のマクロファージへ分化するのか精査した。

④人為的組織滞在型マクロファージ誘導技術の開発

マウス線維芽細胞から人為的に作製された CD45 陽性細胞を、培養皿中でマクロファージ系譜への誘導を試み、誘導された細胞の表現型を精査した。

4. 研究成果

①卵黄嚢におけるマクロファージ前駆細胞の出現時期の精査

まず、ジャクソンラボラトリーから入手した Csf1r-EGFP トランスジェニックマウスの EGFP 発現が、成体内における CSF1R タンパク質発現と一致するのか確認を行った。成体マウスの末梢

血を調べた結果、トランスジェニックプロモーター下発現する EGFP は末梢血中の単球を適切に標識したものの、EGFP 発現は、本来 CSF1R 陰性である好中球、一部の B 細胞においても同時に観察され、このトランスジェニックマウスを使用した解析は断念した。

そこで、マウス胚から得た卵黄嚢組織をコラゲネースで単一細胞とし、CSF1R に対する蛍光標識モノクロー抗体 (AFS98) を用いて、卵黄嚢細胞の染色を行った。その結果、胎齢 8 日目の卵黄嚢組織中には、CSF1R 陽性のマクロファージ系譜細胞は認められなかったものの、胎齢 9 日目の卵黄嚢組織には、4% 程度の CSF1R 陽性マクロファージ系譜が認められた。これらの CSF1R 陽性を組織学的に調べたところ、未熟造血細胞の形態を呈していた。さらにフローサイトメトリーによる解析から、これらの細胞が CD41、CD45 両陽性、KIT 弱陽性の細胞であることが判明し、これらの結果から、最初期のマクロファージ前駆細胞は、胎齢 9 日目に卵黄嚢組織に初めて出現することを明らかとできた。

②組織滞在型マクロファージの卵黄嚢における細胞起源の探索

初期卵黄嚢には、複数種類の造血細胞が存在する。これらの造血細胞は、発生中期に造血幹細胞が出現する以前に、一過性の血液細胞産生を担っている。よく知られている胎仔型赤芽球のほか、自己複製能をもたないものの、T、B、NK リンパ球、顆粒球、成体型赤血球、単球・マクロファージのすべてへ分化できる多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞や、顆粒球、成体型赤血球、単球・マクロファージのミエロイド系譜のみに分化するミエロイド前駆細胞が、一次造血の二次造血の中間段階の造血細胞として存在していること、さらに胎仔型赤血球と、

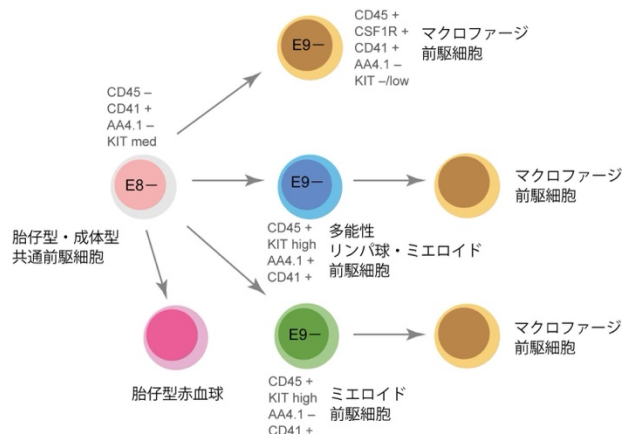


図 1 初期卵黄嚢におけるマクロファージ系譜の起源

上述の多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞や、顆粒球、成体型赤血球、単球・マクロファージのすべてへ分化できる多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞や、顆粒球、成体型赤血球、単球・マクロファージのミエロイド系譜のみに分化するミエロイド前駆細胞が、一次造血の二次造血の中間段階の造血細胞として存在していること、さらに胎仔型赤血球と、上述の多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞とミエロイド前駆細胞を産生する胎仔型・成体型共通前駆細胞が存在していることを、我々はこれまでの研究から明らかにしている。

しかしながら、多能性リンパ球・ミエロイド前駆細胞とミエロイド前駆細胞は、

胎齢 9 日目に以降にのみ存在すること、また上述のマクロファージ前駆細胞は、すでに胎齢 9 日目には観察されることから、これら 2 種の造血細胞では、最初期のマクロファージ前駆細胞を説明できない。従って、我々は、胎齢 8 日目には既に卵黄嚢に存在している胎仔型・成体型共通前駆細胞が、最初期のマクロファージ前駆細胞の供給源ではないかと予想した。実際に、胎齢 8 日目の胎仔型・成体型共通前駆細胞を単離し、24 時間、培養下においたところ、CD41、CD45 両陽性、KIT 弱陽性のマクロファージ前駆細胞が形成された。このことから、胎齢 8 日目の胎仔型・成体型共通前駆細胞が、マクロファージ前駆細胞の卵黄嚢における第一波を形成していることを明らかとできた。

また 1 日後の胎齢 9 日目には、上述の 3 種すべての造血細胞が、マクロファージ前駆細胞を、24 時間以内に形成した。このことから、胎齢 9 日目には、マクロファージ系譜は多起源となっていることが明らかとなった。これまで、ミエロイド前駆細胞と同等と考えられる EMP が卵黄嚢由来マクロファージを形成していると考えられてきたが、我々の解析から、最初期のマクロファージは、胎仔型・成体型共通前駆細胞に由来し、したがって胎仔型赤芽球と同起源であることが示された (図 1)。

③卵黄嚢に出現したマクロファージ前駆細胞の分化能の精査

胎仔型・成体型共通前駆細胞から出現するマクロファージの性質を調べるため、卵黄嚢から単離した胎仔型・成体型共通前駆細胞を、培養中で GM-CSF、M-CSF を添加し、マクロファージ系譜へ誘導を行うと、F4/80 強陽性、MHC クラス II 陰性の、腹腔や胸腔などの体腔に存在する組織滞在型マクロファージと相同の表現型をもつマクロファージが誘導された。一方、成体骨髄由来の単球から形成される、F4/80 陰性、MHC クラス II 強陽性の単球由来マクロファージと相同の細胞は誘導されなかった。10 種類のマクロファージ系譜マーカーを組みあわせた t-SNE 解析でも同様の結果が得られたことから、卵黄嚢の胎仔型・成体型共通前駆細胞は、少なくとも体腔の組織滞在型マクロファージの供給源となっていることが強く示唆された。興味深いことに、胎仔型・成体型共通前駆細胞は、骨吸収を担う破骨細胞へも分化することが確認できた。その他、胎仔由来マクロファージ系譜には、マイクログリア、肺胞マクロファージ等知られており、他の胎生期由来マクロファージへの寄与は、今後の検証課題となる。

④人為的組織滞在型マクロファージ誘導技術の開発

我々は、発生過程において、造血細胞が出現する前後で発現上昇の見られる転写因子遺伝子群を抽出し、これらをレトロウイルスベクターへ組み込み、マウス胎仔線維芽細胞へ感染させ、汎血球マーカーである CD45 を線維芽細胞上へ誘導する転写因子遺伝子を探し、複数の転写

因子遺伝子を組み合わせることで、マウス線維芽細胞を CD45 陽性細胞へと変換できる遺伝子の組み合わせ (Hematopoietic cell-Inducing Gene Set: 以下 HIGS) を特定していた。

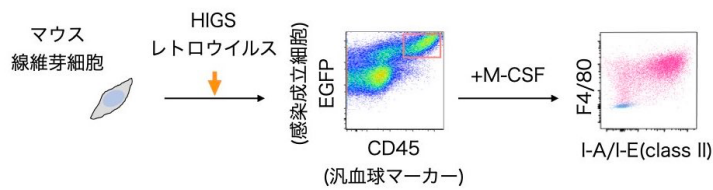


図2 リプログラミングによるマクロファージ作製

この技術で得られた細胞を、卵黄囊前駆細胞と同様に培養を行うことで、成熟マクロファージが優先的に増殖してくることを見出した。この方法で得られたマクロファージを解析したところ、F4/80 強陽性、MHC クラス II 強陽性の活性型マクロファージとともに、一部、体腔に存在する組織滞在型マクロファージ

と相同の F4/80 強陽性、MHC クラス II 陰性細胞も確認できた (図2)。

これらの技術が、ヒトへと応用できれば、テーラーメイドのマクロファージによるドラッグスクリーニングなど、諸々の疾患の治療法の改善へ寄与する可能性もあり、今後、さらに得られた細胞の表現型を精査するとともに、各種の卵黄囊由来マクロファージ系譜の作製技術の開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toshiyuki Yamane	4. 巻 6
2. 論文標題 Mouse yolk sac hematopoiesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2018.00080	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 -
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 -
1. 著者名 Isono K, Takahashi E, Miyoshi I, Tsuneto M, Hikosaka-Kuniishi M, Yamane T, Yamazaki H	4. 巻 100
2. 論文標題 Simultaneous Fluorescent Identification of Odontoblasts and Ameloblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Dent. Res.	6. 最初と最後の頁 532-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520974576	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 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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
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

1. 発表者名 Toshiyuki Yamane
2. 発表標題 Yolk sac progenitors for tissue-resident macrophages
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Yamane, Mari Hikosaka-Kuniishi, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Multiple cell populations generate macrophage progenitors in the early yolk sac
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Doris Narki Tetteh, Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 The role of neural crest-derived cells in thymic regeneration
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Involvement of follicular dendritic cells in each LNs with IgA production
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Yamane, Mari Hikosaka, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Yolk sac progenitors for tissue-resident macrophages
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidetoshi Yamazaki, Mari Hikosaka, Toshiyuki Yamane
2. 発表標題 Depletion of neural crest-derived cells leads to reduction of plasma noradrenalin and alters T lymphopoiesis
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mari Hikosaka, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 An attempt to detect follicular dendritic cells in ectopic lymphoid tissues
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山根利之
2. 発表標題 卵黄囊造血の発生過程およびその分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会 (生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

三重大学大学院医学系研究科幹細胞発生学分野 https://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/
--

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	山崎 英俊 (YAMAZAKI HIDETOSHI) (00283987)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

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