

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03473

研究課題名(和文) 制御性単球による組織修復機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of tissue repair by immunoregulatory monocytes

研究代表者

田中 正人 (Tanaka, Masato)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：00294059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が同定した制御性単球の組織傷害における分化、動態、機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。その結果、従来型の単球がMDPおよびcMoPから分化するのに対し、制御性単球は、GMPからproNeu1およびGMP-MoPを経て分化することが明らかとなった。さらに、proNeu1からGMP-MoPへの移行段階で、Irf8の発現上昇とGfi1発現低下が起こることが制御性単球の分化に必須であることが明らかとなった。また、G-CSFがGMPあるいはproNeu1からGMP-MoPの分化を誘導することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々が世界に先駆けて同定した制御性単球の分化と役割を明らかにすることにより、現在の免疫学の中心課題の一つである単球およびマクロファージの形質転換の機構の全容解明を目指したものである。本研究成果は、緊急造血時におけるマクロファージの形質転換あるいは可塑性のメカニズムを理解する上でブレークスルーとなることが期待できるとともに、将来的に、炎症制御や組織修復促進を目的とした新たな疾患治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously identified a unique subset of monocytes, namely the immunoregulatory monocytes. These monocytes are produced during emergency myelopoiesis and are responsible for regulation of inflammation and tissue repair. The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms for differentiation and function of immunoregulatory monocytes. As results, we found that the immunoregulatory monocytes are differentiated in bone marrow through GMP-ProNeu1-GMP-MoP pathway, while conventional monocytes are differentiated through MDP-cMoP pathway. We also found that Irf8 and Gfi1 are involved in the regulation of immunoregulatory monocyte differentiation. In vivo and In vitro studies revealed that Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) stimulates not only differentiation of neutrophils, but also immunoregulatory monocyte production.

研究分野：ライフサイエンス/免疫学

キーワード：単球 制御性 マクロファージ 組織障害 修復

1. 研究開始当初の背景

感染や虚血再灌流により組織傷害が起こると、免疫細胞は速やかに傷害部位に集積し、炎症を惹起する。この炎症応答は傷害の原因の排除に有効であるが、さらなる組織傷害をもたらす危険性も有する。したがって、原因が排除された後は、速やかに炎症を収束し、損傷した組織の修復過程に移行する必要がある。単球由来マクロファージは、この2つの局面の病理形成に中心的な役割を担うことが知られている。具体的に、傷害部位に浸潤した単球由来マクロファージは、炎症期には炎症性サイトカインの産生を担う一方で、修復期には、死細胞貪食や炎症制御因子、組織修復因子の産生を介して、炎症の収束と組織修復に寄与する。このことは、炎症期から修復期への移行の過程で、単球由来マクロファージの形質が大きく変化することを意味する。このマクロファージの形質の変化のメカニズムとして、① 炎症期に傷害局所に浸潤した炎症型単球由来マクロファージが、修復期になると局所の環境因子によって組織修復型に形質を変える。② 炎症期と修復期に、骨髄で異なる性質の単球が産生され、それぞれが局所に浸潤して炎症型、組織修復型マクロファージとして働く。の2つの可能性が考えられる。これまでに、それぞれの説を支持する知見が複数報告されているが、1つの単球由来マクロファージの経時的変化を追跡することが技術的に困難なこともあり、形質変化のメカニズムの詳細については未だ結論が出ていない。

我々は、本研究開始前に、細胞死誘導後の組織に集積する単球由来マクロファージの解析を端緒として、組織傷害の修復期の骨髄で増産される、マウス単球の新規サブセット (Ym1⁺Ly6C⁺単球) を同定した (*Science Immunol* 2018)。Ym1 発現細胞を可視化できるマウス (Ym1-Venus マウス) を作製し解析したところ、Ym1⁺Ly6C⁺単球は、健常時には骨髄および末梢血中の Ly6C 陽性単球のわずか5%程度しか存在しない一方で、DSS 誘導腸炎を起こすと、DSS 投与終了後の修復期に急激に増加することが分かった。骨髄でも同様に Ym1⁺Ly6C⁺単球数の増加が見られることから、本細胞は組織傷害の修復期に骨髄で増産されることが分かった。傷害組織に浸潤した Ym1⁺Ly6C⁺単球は、炎症性単球に比べて、炎症制御性サイトカインである *IL-10* の発現が高く、また、炎症の回復や組織修復に重要な *Slpi* 発現が高いことから、炎症抑制および組織修復に関与すると考えられた。実際、Ym1⁺Ly6C⁺単球を誘導的に消去できるマウス (Ym1-DTR マウス) を用いて、腸炎の回復期に Ym1⁺Ly6C⁺単球を消去すると、腸炎の回復が有意に遅延することが分かった。これらの結果から、Ym1⁺Ly6C⁺単球は、修復期に傷害組織に浸潤し、炎症抑制および組織修復に関与することが明らかとなった。本知見は、上述の組織傷害における単球由来マクロファージの形質変化の機構に関する2つの仮説のうち、② を支持し、かつ、修復期の傷害組織—骨髄の連関によって、骨髄での制御性単球産生を促進する機構が存在することを示している。

2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、我々が同定した制御性単球の組織傷害における分化、動態、機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、

1. 傷害組織から骨髄に伝達される制御性単球の分化促進機構の解明
2. 骨髄における制御性単球の分化を制御する転写因子の同定
3. 傷害部位における制御性単球の機能分子の同定と形質制御機構の解明

これらの知見を統合することで、組織傷害の局面の移行における単球・マクロファージの形質変化の機構を明らかにするとともに、傷害組織と骨髄の臓器連関の実体を明らかにすることを目指した。本研究は、我々が世界に先駆けて同定した、骨髄で産生される制御性単球の分化と役割を明らかにすることにより、現在の免疫学の中心課題の1つである単球・マクロファージの形質転換の機構の全容を明らかにしようとするものであり、その成果はマクロファージの可塑性および組織傷害の病理を理解する上で、ブレークスルーとなることが期待できる。

3. 研究の方法

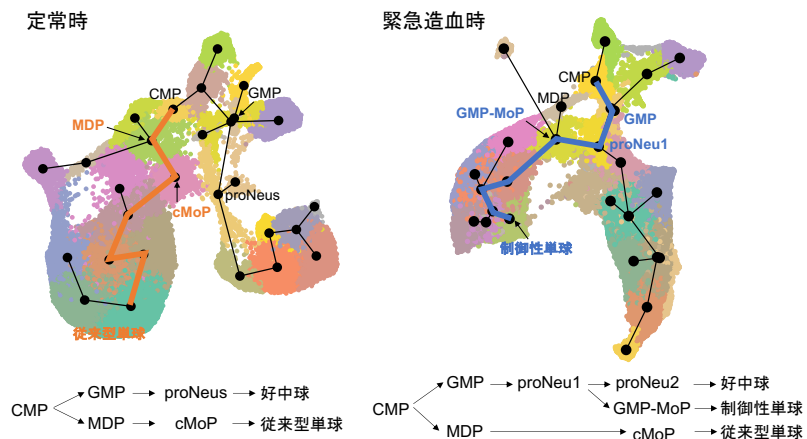
これまでの報告により、定常時の骨髄の Ly6C 陽性単球は、顆粒球単球前駆細胞 (GMP) からマクロファージ・樹状細胞前駆細胞 (MDP)、単球前駆細胞 (cMoP) を経て分化することが知られている。我々は、研究開始時点までに、Yml1-Venus マウスから採取した各種前駆細胞をコンジュニクマウスに adoptive transfer する実験の結果から、Yml1⁺Ly6C⁺単球が、上記の GMP-MDP-cMoP 経路ではなく、MDP を仲介しない GMP からの別経路で分化することを見いだしていた。本研究では、Yml1⁺Ly6C⁺単球の前駆細胞を *in vitro* および *in vivo* の両面で解析することにより、骨髄における制御性単球の分化経路の詳細及び、この経路に関与する転写因子の同定を試みた。*in vitro* では、Yml1-Venus マウスの各種前駆細胞を各因子で刺激して分化能を検討した。*in vivo* では、定常時および炎症時のマウスの骨髄前駆細胞を複数の抗体で染色した上で、フローサイトメトリーで測定し、infinity flow pipeline を用いて分化経路の予測を行った。さらに、予測を検証するために、各種前駆細胞を分取して adoptive transfer により分化能を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄における制御性単球の分化経路

本研究では、制御性単球の骨髄における分化経路の解明を目指して、最初に制御性単球と炎症性単球 (Yml1 陰性の従来型単球) の細胞表面マーカーの差異を解析した。その結果、制御性単球に特異的に発現する細胞表面マーカーとして、CD88 と CD157 を同定することに成功した。次に、未刺激あるいは LPS 刺激をした Yml1-Venus マウスから骨髄細胞を採取し、CD88 と CD157 を含む 12 種類の骨格マーカーと、約 250 種類のパネル抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。表面タンパク質発現パターンを機械学習させ、UMAP アルゴリズムを用いて次元圧縮し、UMAP プロット上に各種前駆細胞、分化途上ならびに成熟後の単球、好中球のクラスターを示し、同時に、表面発現パターンに基づき、pseudo-time trajectory 解析で分化経路を予測した。この予測により、制御性単球は、通常型炎症性単球の分化経路とは異なる経路で分化する可能性をつきとめた。すなわち、定常状態のマウスで多数を占める Yml1 陰性の従来型単球が MDP→cMoP 経路を介して分化するのに対し、炎症時後期に増産される制御性単球は、GMP から proNeu1 細胞 (これまで好中球にのみ分化すると考えられてきた前駆細胞) を経て、制御性単球に分化すること、さらに、proNeu1 から制御性単球への分化の過程で、新規単球前駆細胞 (GMP-MoP と命名) を経ることが予測された。我々は、この予測の妥当性を検証する目的で、最初に cMoP と GMP-MoP をフローサイトメトリーにより区別することのできる表面マーカーを探索した。その結果、CD81 と CX3CR1 を組み合わせることにより、この2つの前駆細胞を分けることができることを明らかにした (cMoP: CD81⁺, CX3CR1⁺, GMP-MoP: CD81⁺, CX3CR1⁻)。次に我々は、それぞれの前駆細胞を分取してこれを移植することで、上記分化予測モデルを検証したところ、予測と一致して、MDP および cMoP からは、従来型単球 (Yml1 陰性単球) のみ

が分化するのに対し、proNeu1 および GMP-MoP から、制御性単球 (Ym1 陽性単球) が分化することが確認できた。さらに、好中球分化経路の最も下流に位置する前駆細胞である proNeu2 細胞は、制御性単球への分化能を失い、好中球にのみ分化



することも確認した。これらの結果より、GMP からの分化経路には、proNeu1 が分岐点となつて、GMP-MoP から制御性単球への分化経路と、proNeu2 から好中球への分化経路が存在していると結論づけた (図)。解明された制御性単球の分化経路は、同単球が好中球と特徴の一部を共有しているという事実によく合致するものである。

(2) 制御性単球の分化に関する転写因子の解明

制御性単球の分化に関する転写因子を明らかにするために、GMP, MDP, cMoP, GMP-MoP, proNeu1, proNeu2 の各前駆細胞を分取し、RNA sequence により網羅的に遺伝子発現を比較した。その結果、GMP-MoP は、好中球系の前駆細胞と単球系の前駆細胞の中間の遺伝子発現パターンを示すことがわかった。個別の転写因子の発現をみると、GMP-MoP では、単球分化に重要な役割を担う Irf8 の発現が cMoP と同程度に高い一方で、好中球分化に必須であることが報告されている Gfi1 の発現量が、proNeu1 や proNeu2 より低く、cMoP より高いことが明らかになった。次に、これらの転写因子の制御性単球分化への関与を検討するために、Irf8 および Gfi1 の欠損マウスの解析を行ったところ、Irf8 KO マウスでは、制御性単球が存在しないのに対し、Gfi1 KO では、好中球が消失する一方で、制御性単球の著明な増加が見られた。これらの知見より、proNeu1 から GMP-MoP への移行段階で、Irf8 の発現上昇と Gfi1 発現低下が起こることが制御性単球の分化に必須であることが明らかとなった。

(3) 制御性単球の分化誘導因子の探索

次に、制御性単球の産生促進因子の探索のために、定常状態のマウスに各種サイトカインを投与して、制御性単球の動態を解析した。その結果、単球、マクロファージの分化促進因子として知られている M-CSF の投与は制御性単球の増産を誘導しなかったのに対し、G-CSF や GM-CSF の投与は、制御性単球を増加させることが明らかとなった。さらに、LPS 刺激の際に、これらの因子の中和抗体の制御性単球の産生に対する効果を検討したところ、G-CSF 抗体のみが、有意に制御性単球の産生を抑制することがわかった。さらに、G-CSF の投与により、骨髄における GMP-MoP の割合が増加すること、および、*in vitro* の分化誘導系において、G-CSF が GMP あるいは proNeu1 から GMP-MoP の分化を誘導することも明らかとなった。これらの知見を総合して、G-CSF は、緊急造血時において、好中球の産生と共に制御性単球の産生も促進する作用を有することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ikeda N, Kubota H, Suzuki R, Morita M, Yoshimura A, Osada Y, Kishida K, Kitamura D, Iwata A, Yotsumoto S, Kurotaki D, Nishimura K, Nishiyama A, Tamura T, Kamatani T, Tsunoda T, Murakawa M, Asahina Y, Hayashi Y, Harada Hi, Harada Y, Yokota A, Hirai H, Seki T, Kuwahara M, Yamashita M, Shichino S, Tanaka M, Asano K	4. 巻 42
2. 論文標題 The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112165 ~ 112165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112165	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 Camara Abdouramane, Lavanant Alice C., Abe Jun, Desforges Henri Lee, Alexandre Yannick O., Girardi Erika, Igamberdieva Zinaida, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Hehlhans Thomas, Pfeffer Klaus, Pfeffer Sebastien, Mueller Scott N., Stein Jens V., Mueller Christopher G.	4. 巻 119
2. 論文標題 CD169(+) macrophages in lymph node and spleen critically depend on dual RANK and LTbetaR signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108540119	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 Song Xiaojia, Li Na, Liu Yuan, Wang Zehua, Wang Tixiao, Tan Siyu, Li Chunyang, Qiu Chunhong, Gao Lifan, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Liang Xiaohong, Liu Xinyong, Ma Chunhong	4. 巻 15
2. 論文標題 CD169-positive macrophages enhance abscopal effect of radiofrequency ablation therapy in liver cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101306 ~ 101306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101306	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 Akhmetzyanova Ilseyar, Aaron Tonya, Galbo Phillip, Tikhonova Anastasia, Dolgalev Igor, Tanaka Masato, Aifantis Iannis, Zheng Deyou, Zang Xingxing, Fooksman David	4. 巻 5
2. 論文標題 Tissue-resident macrophages promote early dissemination of multiple myeloma via IL-6 and TNF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3592 ~ 3608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005327	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 Honda Fumika, Tsuboi Hiroto, Ono Yuko, Abe Saori, Takahashi Hiroyuki, Ito Kiyooki, Yamada Kazunori, Kawano Mitsuhiro, Kondo Yuya, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Malissen Marie, Malissen Bernard, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Pathogenic roles and therapeutic potential of the CCL8-CCR8 axis in a murine model of IgG4-related sialadenitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02597-6	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 Tokuhiko Takuto, Ishikawa Akane, Sato Haruka, Takita Shunya, Yoshikawa Ayuri, Anzai Ryoko, Sato Shinichi, Aoyagi Ryohei, Arita Makoto, Shibuya Takumi, Aratani Yasuaki, Shimizu Shigeomi, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.718586	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 Shibuya Takumi, Kamiyama Asami, Sawada Hirotaka, Kikuchi Kenta, Maruyama Mayu, Sawado Rie, Ikeda Naoki, Asano Kenichi, Kurotaki Daisuke, Tamura Tomohiko, Yoneda Atsuko, Imada Keisuke, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.663115	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 Ogawa Kei, Asano Kenichi, Yotsumoto Satoshi, Yamane Tsuyoshi, Arita Makoto, Hayashi Yoshihiro, Harada Hironori, Makino Okamura Chieko, Fukuyama Hidehiro, Kondo Kenji, Yamasoba Tatsuya, Tanaka Masato	4. 巻 109
2. 論文標題 Conversion of neutrophils into atypical Ly6G+SiglecF+ immune cells with neurosupportive potential in olfactory neuroepithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.1HI0620-190RR	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 Uchida Yoshimi, Nishitai Gen, Kikuchi Kenta, Shibuya Takumi, Asano Kenichi, Tanaka Masato	4. 巻 23
2. 論文標題 CD204-positive monocytes and macrophages ameliorate septic shock by suppressing proinflammatory cytokine production in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100791 ~ 100791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100791	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 Jing Weiqiang, Guo Xing, Wang Ganyu, Bi Yuxuan, Han Lihui, Zhu Qingfen, Qiu Chunhong, Tanaka Masato, Zhao Yunxue	4. 巻 78
2. 論文標題 Breast cancer cells promote CD169+ macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106012 ~ 106012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2019.106012	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池田直輝, 岩田彩花, 鎌谷高志, 角田達彦, 林嘉宏, 原田浩徳, 原田結花, 田中正人, 浅野謙一
2. 発表標題 緊急造血における好中球様単球の分化経路の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asano K, Ikeda N, Tanaka M
2. 発表標題 Tissue protection by immunoregulatory monocytes in the recovery phase of inflammation
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda N, Iwata A, Kamatani T, Tsunoda T, Hayashi Y, Harada H, Harada Y, Tanaka M, Asano K
2. 発表標題 Identification of differentiation pathway for neutrophil-like monocytes during emergency hematopoiesis
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 田中正人
2. 発表標題 組織傷害における制御性単球の役割
3. 学会等名 第85回インターフェロン・サイトカイン学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野謙一、池田直輝、田中正人
2. 発表標題 炎症制御性単球による組織修復
3. 学会等名 第48回 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------