

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15421

研究課題名（和文）新規単球サブセットを標的とした組織修復機構の解明

研究課題名（英文）Study of tissue repair mechanisms targeting a novel monocyte subset

研究代表者

池田 直輝（Ikeda, Naoki）

東京薬科大学・生命科学部・嘱託助教

研究者番号：90825473

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）：炎症により緊急造血が誘導され、定常時にはほとんど見られない好中球様単球が骨髄で産生される。しかし、それらの機能や分化機構は明らかになっていなかった。研究代表者は、炎症により生じた顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）が好中球特異的前駆細胞（proNeu1）に作用し、好中球様単球を誘導することを明らかにした。さらに、ヒトカウンターパートとして、T細胞増殖抑制作用を示すCXCR1陽性単球を同定した。これらの発見により、炎症時における好中球様単球誘導機構はマウスとヒトで保存されており、同単球が炎症抑制に働く可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染や組織傷害により炎症が誘導されるが、その後の炎症収束機構は不明点が多く残されている。本研究により、好中球様単球を介した炎症抑制機構が明らかになり、炎症収束機構の一端が解明された。さらに、好中球様単球の分化機構も明らかになったことから、本研究結果が、同単球分化誘導による炎症抑制および組織修復促進を目的とした新規治療法開発に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory stimuli cause a state of emergency myelopoiesis leading to neutrophil-like monocyte expansion. However, their function, the committed precursors, or growth factors remain elusive. In this study we find that neutrophil-like monocytes arise from progenitors of neutrophil 1 (proNeu1). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) favors the production of neutrophil-like monocytes through previously unknown CD81+CX3CR1^{lo} monocyte precursors. The human counterpart of neutrophil-like monocytes are discriminated from CD14+CD16⁻ classical monocytes by CXCR1 expression and the capacity to suppress T cell proliferation. Collectively, our findings suggest that the aberrant expansion of neutrophil-like monocytes under inflammatory conditions is a process conserved between mouse and human, which may be beneficial for the resolution of inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：好中球様単球 制御性単球 炎症抑制 組織修復 Ym1 CXCR1

1. 研究開始当初の背景

組織傷害部位に浸潤した単球由来マクロファージは、炎症期には炎症を惹起する一方で、修復期には炎症抑制および組織修復に寄与する。従来、この修復型マクロファージは、炎症期に浸潤した単球由来マクロファージが、局所の状況変化に応じて形質を変えたものと考えられてきた。しかし、修復型マクロファージを可視化できるマーカーが存在しないため、生体内におけるマクロファージの形質転換機構は不明だった。研究代表者は、修復期に見られるマクロファージに Ym1 が過剰発現する知見をもとに、Ym1 発現細胞可視化マウス (Ym1-Venus マウス) を作製し、解析した。その結果、定常時には Ym1 を発現する単球・マクロファージが見られなかった一方で、LPS 投与による敗血症誘導モデルや、DSS 腸炎誘導モデルの回復期に骨髄で Ym1 陽性単球が劇的に増加することを見出した (図 1A)。Ym1 陽性単球の遺伝子発現を解析すると、従来型単球 (Ym1 陰性単球) と比較して、抗炎症性サイトカイン IL-10 や組織保護因子 SLPI を高発現した。さらに DSS 腸炎回復期に Ym1 陽性単球を誘導的に消去すると、体重回復および組織修復が有意に遅延した (図 1B)。これらの解析により、Ym1 陽性単球が炎症抑制および組織修復に寄与することが示され、その機能から同単球を「制御性単球」と命名した。制御性単球の発見により、異なる単球サブセットを介した新たな組織修復機構の存在を世界に先駆けて示した (Ikeda, et al. *Science Immunol*, 2018)。

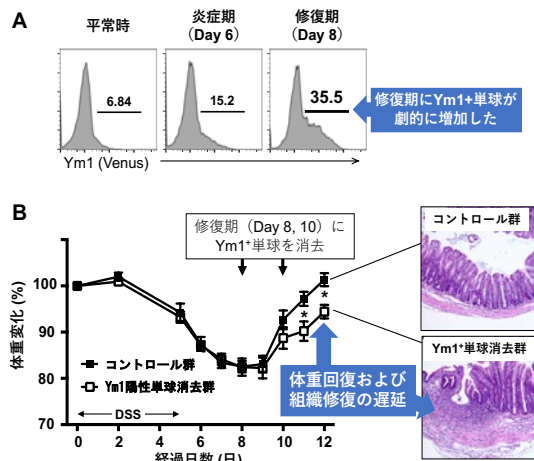


図 1 制御性単球は DSS 腸炎回復期に増加し組織修復に寄与する

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者が同定した制御性単球の解析を継続し、制御性単球の分化機構を明らかにすること、および、ヒトへの応用を見据えて、マウス制御性単球に相当するヒトの単球サブセットを同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

制御性単球分化経路の解析のため、フローサイトメトリーを用いたスクリーニング解析と機械学習を組み合わせた多次元フローサイトメトリー解析 (InfinityFlow pipeline) および、single cell RNA-sequence (scRNA-seq) 解析を行った。解析データを基に、細胞分化経路や前駆細胞発現マーカーを解析した。分化誘導因子の解析のため、炎症により誘導されるサイトカインを探索し、それらの *in vitro* および *in vivo* における制御性単球分化誘導能をフローサイトメトリーで評価した。

ヒト制御性単球の探索および動態解析のため、マウス制御性単球の知見を基に、ヒト末梢血のフローサイトメトリー解析を実施した。機能解析のため、RNA-sequence 解析による遺伝子発現と T 細胞共培養実験による炎症抑制能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 制御性単球分化経路の解明

定常状態と LPS 投与により炎症を誘導した骨髄細胞を、多次元フローサイトメトリー (InfinityFlow pipeline) と scRNA-seq で解析し、次元削減 (UMAP) と分化経路予測を行った。多次元フローサイトメトリーにより、定常時にはこれまで明らかになってきた単球分化経路と同様に、マクロファージ樹状細胞前駆細胞 (MDP) から単球前駆細胞 (cMoP) を経て分化した (図 2 左)。一方で、炎症時には制御性単球が誘導され、これらの単球は、顆粒球単球前駆細胞 (GMP) から MDP を経ずに分化した。そして、驚くべきことに、これまで好中球特的前駆細胞と考えられていた proNeu1 細胞を経て、本研究により新たに同定した新規制御性単球前駆細胞 (GMP-MoP) から分化すると予測された (図 2 右)。

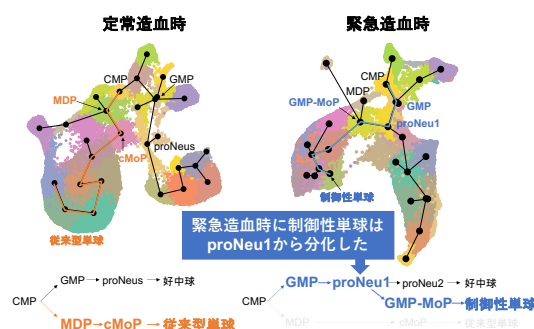


図 2 制御性単球は好中球前駆細胞から分化した

scRNA-seq 解析においても、制御性単球は顆粒球単球前駆細胞 (GMP) から proNeu1 を経て分化した。さらに、proNeu1 と GMP-MoP、cMoP をマウスに移植すると、proNeu1 と GMP-MoP から制御性単球が分化したのに対し、cMoP からは分化しなかった。これらの結果より、制御性

単球は、これまで好中球特異的前駆細胞と考えられていた proNeu1 細胞を経て、本研究により新たに同定した GMP-MoP から分化することが明らかになった。

(2) 制御性単球分化誘導転写因子の解析

制御性単球分化を誘導する転写因子を探索するため、骨髄前駆細胞の RNA-seq 解析を行った。PCA 解析により遺伝子発現を比較すると、GMP-MoP は単球前駆細胞 (MDP, cMoP) と好中球前駆細胞 (GMP, proNeu1, proNeu2) の中間的な発現パターンを示した。転写因子を解析すると、GMP-MoP は単球分化に必須な転写因子である IRF8 と、好中球分化に必須の転写因子である GFI1 を共発現したため、それぞれの転写因子欠損マウスの解析を行った。IRF8 欠損マウスを解析すると、野生型マウスでは LPS 投与により制御性単球が誘導されたのに対し、IRF8 を欠損すると制御性単球が全く誘導されなかった。GFI1 欠損マウスを解析すると、同マウスでは定常状態でも制御性単球が産生されることが明らかになった。これらの解析により、制御性単球分化には IRF8 が必須であり、GFI1 によりその分化が抑制されることが明らかになった。

(3) 制御性単球分化誘導因子の解析

制御性単球分化誘導因子の探索のため、候補因子として、炎症時に血清中で増加するサイトカインを選択し、*in vitro* の制御性単球分化誘導系に添加した。その結果、これまで好中球分化誘導因子として知られていた顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) により proNeu1 細胞から制御性単球が誘導されることが明らかになった。G-CSF をマウスに投与すると、GMP-MoP と制御性単球が劇的に増加した (図 3)。これらの結果から、制御性単球分化誘導因子として G-CSF を同定した。

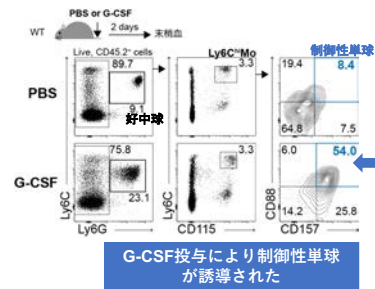


図3 制御性単球は G-CSF により誘導された

(4) ヒト CXCR1 陽性単球の発見

マウス制御性単球が一部の好中球マーカーを発現することに着目し、ヒト好中球マーカーを探索し、それらを指標に単球を解析した。はじめに、ヒト好中球マーカーを FACS スクリーニングにより解析すると、6 種類の候補マーカーを同定した。そして、単球における好中球マーカー発現を解析すると、新規単球サブセット CXCR1 陽性 CD14 陽性単球 (CXCR1 陽性単球) を同定した。

RNA-sequence 解析により、CXCR1 陽性単球の遺伝子発現を網羅的に解析すると、CXCR1 陰性従来型単球に比べ、好中球遺伝子を高発現すること、炎症性サイトカインを低発現した。さらに、T 細胞と単球の共培養実験を行うと、CXCR1 陰性単球が T 細胞増殖に影響しなかったのに対し、CXCR1 陽性単球は細胞数依存的に T 細胞増殖を抑制した (図 4)。

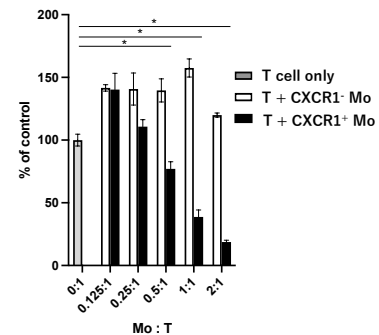


図4 ヒト CXCR1 陽性単球は T 細胞増殖を抑制した

(5) ヒト CXCR1 陽性制御性単球の動態解析

当初の予定に加え、ヒト制御性単球の分化誘導因子および炎症時の動態解析も行った。分化誘導因子解析のため、マウス制御性単球分化誘導因子として同定した G-CSF 投与前後の末梢血 CXCR1 陽性単球を解析すると、G-CSF 投与後にその割合が劇的に増加した。炎症時の動態解析のため、肝臓がん患者の肝動脈化学塞栓術 (TACE) 治療前後の末梢血 CXCR1 陽性単球を解析した。その結果、TACE 後に CXCR1 陽性単球が増加し (図 5A)、その割合は炎症マーカー (好中球数および CRP 濃度) と正に相関した (図 5B)。

これらの CXCR1 陽性単球の解析結果から、1) CXCR1 陽性単球がマウス制御性単球と同様に一部好中球マーカーを発現すること、2) 免疫抑制型の形質を示すこと、3) G-CSF により誘導されること、4) 炎症により誘導されることから、同単球をヒト制御性単球として結論付けた。

上述 (1) ~ (5) の成果は 2023 年に Cell Reports に掲載された (Ikeda, et al. Cell Reports 2023)。

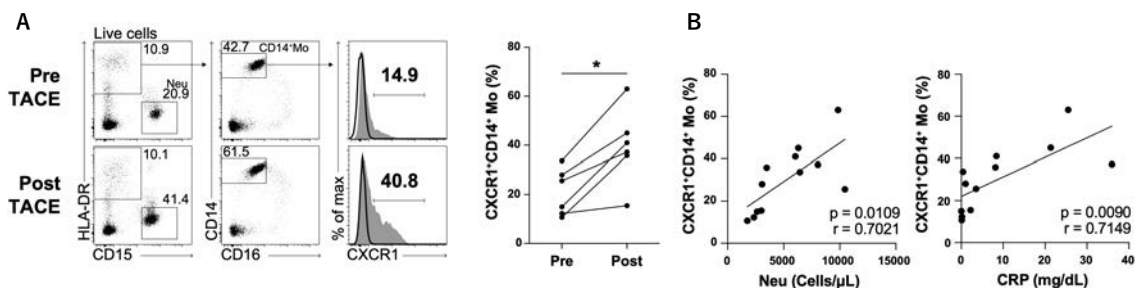


図5 ヒト CXCR1 陽性単球は炎症に伴い増加した

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 1件）

1. 著者名 Ikeda Naoki et al.	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 -

〔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 池田直輝
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 池田直輝
2. 発表標題 Identification of differentiation pathway for neutrophil-like monocytes during emergency hematopoiesis
3. 学会等名 第51回日本免疫学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------