

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16310

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析を用いた強皮症特異的単球master regulatorの同定

研究課題名（英文）Identification of regulator of SSc specific monocyte using comprehensive genetic analysis

研究代表者

井関 ゆう子（Iseki, Yuko）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50723045

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：末梢血20mlから一度に9つコンディションでマクロファージを誘導したが、十分量のRNAを得ることが困難であった。CSF-1Rのリガンドである、CSF-1及びIL-34を用いた誘導マクロファージについてフローサイトメトリーで表面マーカーの特徴解析を行った。CSF-1を使用した場合とIL-34を使用した場合でCD14、CD80、CD206、CD163の発現に大きな差は認めなかった。M4マクロファージの割合は、健康人に比してSSc患者において有意に高かったが、特定の免疫担当細胞割合との相関や自己抗体、合併症との相関は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、種々の誘導コンディションで誘導したマクロファージのmaster regulatorを特定し、SSc特異的単球/マクロファージを探索することが目的であったが、一定量の血液サンプルから十分量のRNAの抽出が困難であり、CSF-1及びIL-34で誘導したマクロファージの表面マーカーの特徴を評価した。しかし、両方で大きな差は認めなかった。SScにおけるM4単球の割合は有意に高いが、特定の自己抗体や合併症との関連が見出せなかったことから、SSc及び健康人の単球/マクロファージ分画のscRNA-seqが今後SSc特異的単球/マクロファージを同定するために有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It was difficult to obtain sufficient amounts of RNA from 20 ml of peripheral blood at a time using 9 macrophage-inducing conditions. The surface markers CSF-1, and IL-34 induced macrophages were evaluated by flow cytometry. There were no significant differences in the expression of CD14, CD80, CD206, CD163 between CSF-1 macrophages and IL-34 induced macrophages. The percentage of M4 macrophages was significantly higher in SSc patients than in healthy controls, but there was no correlation with percentage of specific immunocompetent cells, autoantibodies, or complications.

研究分野：膠原病

キーワード：monocyte

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

SSc は皮膚および諸臓器の線維化、血管内皮障害、免疫異常を主要 3 病態とする原因不明の膠原病である。SScの病態を形成する細胞の中で、血管内皮障害により誘導され、線維化に関わる細胞としてマクロファージが注目されている。マクロファージは長年M1とM2の2つのフェノタイプがあると考えられてきた (Nature Rev Immunol. 2003;3(1):23-35) が、最近ではM1/M2 polarizationやM1/M2 skewing現象の存在、様々な疾患特異的サブタイプの存在が明らかとなっている。しかし、現段階でSSc特異的単球・マクロファージの同定には至っていない。

上記知見から、CSF-1により誘導されるマクロファージ (M0, M1, M2)、IL-34により誘導されるマクロファージ (M34)、CXCL4により誘導されるマクロファージ (M4)、一部で線維化を促進すると報告のあるIL-17により誘導されるマクロファージ (M17) のin vitroにおける遺伝子発現をRNA-seqで網羅的に解析し、master regulatorを明らかにする。さらに一般公開されているRNA-seqやマイクロアレイデータを加えてmaster regulator 抽出アルゴリズムを構築し、SSc特異的単球・マクロファージのmaster regulatorを同定することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究は、in vitro で誘導された M0、M1、M2、M34、M4、M17 の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析し、各マクロファージにおける master regulator を同定し、SSc 特異的単球・マクロファージにおける master regulator を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

健常人およびSSc患者の末梢血から比重遠心法を用いて末梢血単核球を分離した。magnetic beadsでCD14<sup>+</sup>単球を単離した。1)CSF-1、2)CSF-1 LPS+IFN、3)CSF-1 IL-4+IL-13、4)IL-34、5)IL-34 LPS+IFN、6)IL-34 IL-4+IL-13、7)CXCL-4、8)CXCL4+IFN、9)IL-17の培養条件下でマクロファージへの分化誘導を行い、各誘導の特徴について検討した。

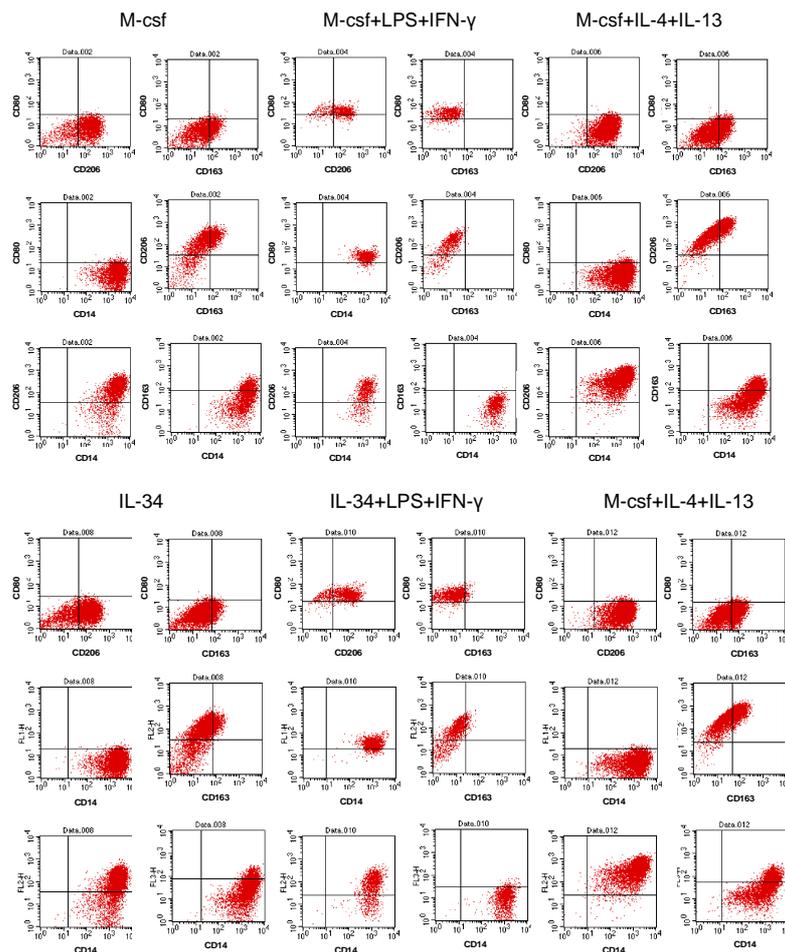
健常人およびSSc患者の末梢血から比重遠心法を用いて末梢血単核球を分離した。マルチカラーフローサイトメトリーにてCD14<sup>+</sup>、Classical、Intermediate、Non classical、M1(CD80<sup>+</sup>、CCR2<sup>+</sup>、TLR4<sup>+</sup>)、M2(CD163<sup>+</sup>、CD206<sup>+</sup>、CD204<sup>+</sup>)、M1+M2(CD163<sup>+</sup>、CD206<sup>+</sup>、CD204<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup>、CCR2<sup>+</sup>、TLR4<sup>+</sup>)、M4(CD163<sup>+</sup>、S100A8<sup>+</sup>、MMP7<sup>+</sup>)単球/マクロファージ分画の解析を行った。

### 4. 研究成果

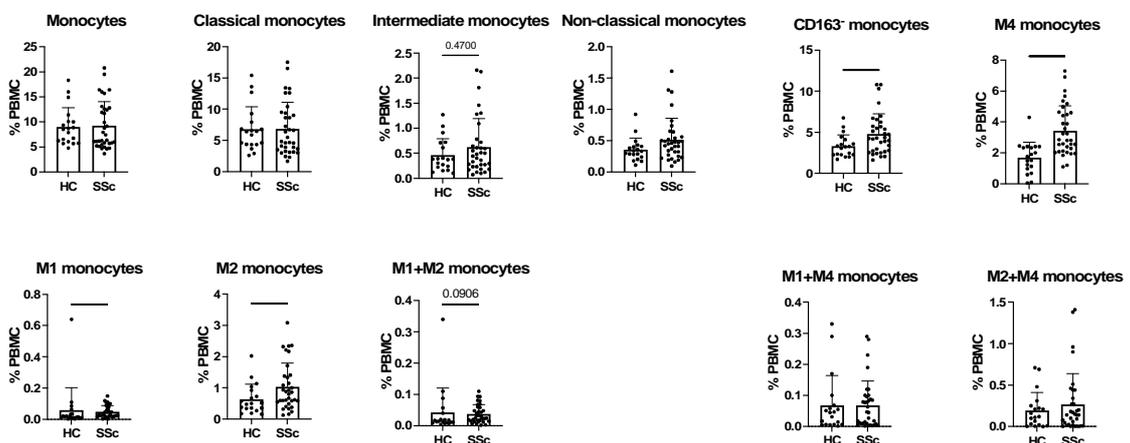
研究計画書に基づいて患者及び健常人より血液 20ml を採取し、比重遠心法を用いて末梢血単核球を分離し、magnetic beads で CD14<sup>+</sup>単球を単離した。その後、1)CSF-1、2)CSF-1 LPS+IFN、3)CSF-1 IL-4+IL-13、4)IL-34、5)IL-34 LPS+IFN、6)IL-34 IL-4+IL-13、7)CXCL-4、8)CXCL4+IFN、9)IL-17 の 9 コンディションで誘導を行った。各種サイトカイン濃度を変更し、最適な濃度を設定したものの、末梢血 20ml から一度に 9 コンディション全ての RNA を得ることが困難であり、RNA-seq の網羅的遺伝子解析を行うことは断念した。

1)CSF-1、2)CSF-1 LPS+IFN、3)CSF-1 IL-4+IL-13、4)IL-34、5)IL-34 LPS+IFN、6)IL-34 IL-4+IL-13 で誘導したマクロファージについてフローサイトメトリーで特徴解析を行った。CSF-1 刺激により CD14、CD206、CD163 の発現を認め、CSF-1 LPS+IFN 誘導では CSF-1 刺激に比して CD80、CD206 の発現が増加し、CD14 及び CD163 の発現が低下した。CSF-1 IL-4+IL-13 誘導では、CSF-1 刺激に比して CD206 の発現が増加し、CD163、CD80 及び CD14 の発現は不変であっ

た。IL-34 刺激では、CSF-1 刺激と同様の結果であった。IL-34 LPS+IFN の誘導では、CSF-1 LPS+IFN 誘導と同様の傾向であり、IL-34 IL-4+IL-13 誘導についても CSF-1 IL-4+IL-13 と同様の発現傾向を示した。以上より CSF-1 と IL-34 により誘導されるマクロファージは同様の発現傾向であった。ただ、CSF-1 により誘導されるマクロファージでは、IL-34 により誘導されるマクロファージに比して CD206 及び CD163 の発現が強い傾向にあった。



健康人および SSc 患者における単球フェノタイプの比較では、CD14<sup>+</sup> Monocyte、Classical Monocyte、Intermediate Monocyte、Non Classical Monocyte、M1+M2 Monocyte の割合は SSc 患者と健康人において有意差を認めなかったが、M1 Monocyte、M2 Monocyte の割合は SSc 患者において有意に高かった。また、CD163<sup>-</sup> Monocyte 及び M4 Monocyte(CD163<sup>-</sup>, S100A8<sup>+</sup>, MMP7<sup>+</sup>)の割合は SSc 患者において有意に高い結果であった。



M4 monocyte と他の免疫担当細胞割合との相関についても評価を行ったが、いずれの免疫担当細胞割合とも相関は認めなかった。自己抗体、合併症との関連についても評価を行ったが、特定の

自己抗体、合併症との関連は認めなかった。M4 Monocyte が SSc 病態に関与している可能性が示唆されたが、特定の自己抗体や合併症との関連を見出せなかったことから、さらなる詳細な検討が必要と考えられた。

SSc の線維化病態には M2 マクロファージが重要な役割を果たしていると言われていたが、近年 M1/M2 両者のマーカーを有するマクロファージが増加しているとの報告 (Ann Rheum Dis.2018;77(12):1842-1845) や線維化特異的マクロファージとして SatM が報告 (Nature. 2017;541(7635):96-101) され、新規マクロファージの検討が重要となっている。健常人及び SSc 患者における単球/マクロファージ分画の scRNA-seq を行うことにより、SSc 特異的単球/マクロファージが明らかとなり、新規治療法につながる可能性が考えられた。

参考文献：

Simon Gordon. Alternative activation of macrophage. Nature Rev Immunol. 2003;3(1):23-35

Stefano Soldano, Amelia Chiara Trombetta, Paola Contini, Veronica Tomatis, et al. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis.2018;77(12):1842-1845

Takashi Satoh, Katsuhiro Nakagawa, Fuminori Sugihara, Ryusuke Kuwahara, et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. Nature. 2017;541(7635):96-101

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大田ゆう子、岡崎有佳、桑名正隆
2. 発表標題 全身性強皮症におけるニンテダニブ投与前後の免疫フェノタイプ解析
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
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
---------	---------