

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670238

研究課題名(和文)造血前駆細胞による貪食とその免疫学的意義の解明

研究課題名(英文)Effect of clodronate-encapsulated liposome administration on mononuclear phagocyte progenitors

研究代表者

田村 智彦(TAMURA, Tomohiko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50285144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：単球・マクロファージや樹状細胞は生体防御や組織恒常性維持に重要な単核貪食細胞(Mph)である。本研究で我々は、Mph除去剤クロドロナートリポソーム(CLL)をマウスに投与すると単球に加えてMph前駆細胞も消失することを発見した。これら前駆細胞は蛍光標識リポソームを取り込まなかったことから、間接的な作用の存在が考えられた。解析を進めると、CLL投与によってMphの分化増殖に関わるサイトカイン産生が増加しており、前駆細胞はこれに反応・分化した結果枯渇しているらしいことがわかった。以上の結果から、Mph前駆細胞はサイトカインを介して末梢の細胞数を感知・反応し、Mph系を保っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Monocytes/macrophages and dendritic cells are mononuclear phagocytes (Mph), which are important for host defense against pathogens and tissue homeostasis. In this study, we unexpectedly found that the administration of clodronate-encapsulated liposomes (CLL) causes depletion of not only monocytes/macrophages but also Mph progenitors. These progenitors, however, did not incorporate fluorescent-labeled liposomes, suggesting that the disappearance of the progenitors was caused by an indirect effect of CLL injection. We found that the level of a cytokine important for Mph growth and differentiation was significantly elevated in the blood of CLL-injected mice. This promoted the differentiation of Mph progenitors, causing their transient depletion. These results suggest that Mph progenitors sense and respond to the decrease in mature Mph counts via the cytokine to maintain the Mph system.

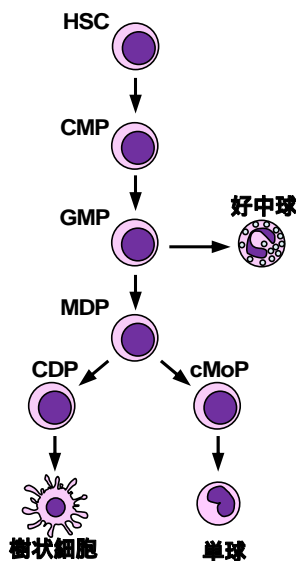
研究分野：血液学、免疫学、分子生物学

キーワード：単核貪食細胞 貪食 前駆細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における単核貪食細胞は主に単球・マクロファージと樹状細胞から成り、病原体・異物・アポトーシス細胞等の貪食や抗原の提示を行うことで生体防御や組織恒常性維持に必須の役割を担っている。単核貪食細胞群は成体においては基本的に骨髄の造血幹細胞(HSC)に由来し、HSCは分化可能な系譜を限定しながら骨髄系共通前駆細胞(CMP)、顆粒球-単球前駆細胞(GMP)を経て単核貪食細胞群の前駆細胞である単球-樹状細胞前駆細胞(Monocyte-DC progenitor; MDP)に至る。MDPは単球共通前駆細胞(Common monocyte progenitor; cMoP)を経て単球(血中から組織に移行するとマクロファージ)へ、あるいは共通樹状細胞前駆細胞(Common DC progenitors; CDP)を経て種々の樹状細胞へ分化する[Guilliams et al. *Nat Rev Immunol* 14, 571(2014); Geissmann et al. *Science* 327, 656(2010)など、図1]。

図1. 単球と樹状細胞の分化経路



分化した単球・マクロファージや非活性化状態の樹状細胞の貪食機能に関しては数多くの知見が得られているが、意外にも造血の過程においてこの細胞系譜がどの分化段階から貪食能を獲得するのかは不明であった。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで単球・マクロファージや樹状細胞の分化機構の研究を進めてきた[Tamura et al. *Immunity* 13,155(2000)・*Blood* 102,4547 (2003)・*J Immunol* 174,2573(2005)・*Blood* 106,1938(2005)・*Annu Rev Immunol* 26,535(2008); Yamamoto et al. *PLoS One* 6,e25812(2011); Kurotaki et al. *Blood* 121,1839(2013)・*Nat Commun* 5, 4978(2014)など]。その研究の過程で貪食細胞除去剤であるクロドロネートリポソームを投与し単球を除去しようとしたところ、驚くべきことに単球・マクロファージのみならず単核貪食細胞の前駆細胞も消失することを見出した。

本研究では私たちの意外な予備実験結果に基づき、単球や樹状細胞の前駆細胞が生体内で貪食能を有する可能性を検証し、その免疫学的意義を解明することを当初の目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

C57BL/6J オスマウス(8週齢から12週齢)にクロドロネートリポソームを200 μ L尾静脈投与し、経時的に骨髄、脾臓、リンパ節に存在する前駆細胞及び成熟免疫細胞の数をフローサイトメトリーにより測定した。またクロドロネートを含まないリポソームをDiOを用いて蛍光標識し、それをマウスに投与することで様々な細胞におけるリポソームの取り込みを評価した。さらにリポソーム投与後に末梢血を採取し血清中のサイトカイン濃度をELISAにより測定した。なお本研究の動物実験は横浜市立大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに従っていた。

4. 研究成果

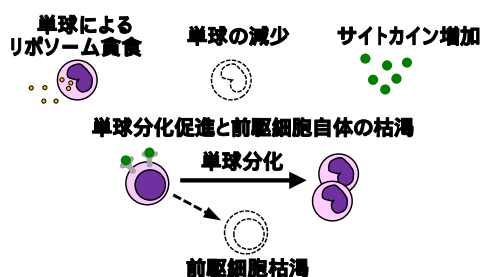
我々はまず予備実験ではまだ解析していなかった前駆細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞さらにリンパ球を含めて様々な免疫細胞集団をクロドロネートリポソーム投与後に包括的に解析した。その結果、まず単球やマクロファージが素早く減少し、その後単核貪食細胞前駆細胞が消失することがわかった。しかしそれより上流の造血幹細胞や前駆細胞では減少は認められなかった。また興味深いことに最近同定された形質細胞様樹状細胞前駆細胞に関しては変化がなかった。

次に蛍光標識したリポソームを調整しマウスに投与することで貪食を可視化した。単球やマクロファージでは強いリポソームの取り込みを検出できたが、予想に反して単核貪食細胞前駆細胞によるリポソームの取り込みはほとんど認められなかった。すなわち貪食能はやはり細胞が十分に分化して初めて獲得する機能であることがわかった。同時にこの結果は、単核貪食細胞前駆細胞はクロドロネートリポソームを貪食して消失したのではなく、別の要因によって減少した可能性が高いことを示すものと考えられた。

そこで我々は、単核貪食細胞前駆細胞は成熟貪食細胞の数を何らかの方法で“感知”し、クロドロネートリポソーム投与によって失われた貪食細胞を補うために素早く貪食細胞

胞へと分化してしまうことで枯渇するという仮説を考えて解析した。その結果、貪食細胞分化に必須なサイトカインの末梢血中における発現がクロドロネートリポソーム投与により単球の減少に反比例して著しく増加することがわかった。また、クロドロネートリポソーム投与後の単核貪食細胞前駆細胞ではそのサイトカインの受容体が早期に細胞表面から失われており、これはサイトカインの結合により受容体の internalization が生じたためであり、細胞が実際にこのサイトカインに応答していることを示すと考えられた。以上の結果から、貪食細胞前駆細胞はそのサイトカインを介して成熟貪食細胞の数を感知・反応し、その数を調整することが示唆された(図2)。

図2. クロドロネートリポソーム投与による単核貪食細胞前駆細胞消失のメカニズム



今回明らかとなった貪食細胞産生制御機構は、何らかの原因で貪食細胞が減少した場合や、貪食細胞を大量に要する感染などの際におそらく重要だと考えられる。またこのような「成熟細胞数を前駆細胞が感知する仕組み」は、他の細胞系譜にも共通に用いられている可能性がある。また、そもそも当該サイトカインを産生する細胞が何であり、どのようなシグナルが関わっているのかなど、今後の課題も得られた。

以上、当初の予想とは異なる展開によって、重要かつ発展性のある知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Kurotaki D, Tamura T. Transcriptional and epigenetic regulation of innate immune cell development by the transcription factor IRF8. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, accepted, 査読有.
2. Sasaki S, Kurotaki D, Tamura T. Regulation of basophil and mast cell development by transcription factors. *Allergol Int* 65: 127-134, 2016, 査読有.

DOI: 10.1016/j.alit.2016.01.006.

3. Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sato H, Sasaki I, Koizumi S, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC III, Ozato K, Tamura T. Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. *Blood*, 125 (2): 358-369, 2015, 査読有. DOI: 10.1182/blood-2014-02-557983.
4. Tamura T. Guest editorial: Transcriptional control in myeloid cell development and related diseases. *Int J Hematol* 101: 317-318, 2015, 査読有. DOI: 10.1007/s12185-015-1770-8.
5. Tamura T, Kurotaki D, Koizumi S. Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. *Int J Hematol* 101: 342-351, 2015, 査読有. DOI: 10.1007/s12185-015-1761-9.
6. Kurotaki D, Uede T, Tamura T. Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol Immunol* 59: 55-62, 2015, 査読有. DOI: 10.1111/1348-0421.12228.
7. 佐々木 悠, 黒滝大翼, 田村智彦. 転写因子 IRF8 による好塩基球とマスト細胞の分化制御. *臨床免疫・アレルギー科*, 63 (6): 593-596, 2015, 査読無.
8. 田村智彦, 小泉真一, 黒滝大翼. ミエロイド系細胞の分化と転写因子. *臨床血液*, 56 (10): 1861-1870, 2015, 査読無. DOI: 10.11406/rinketsu.56.1861.
9. Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8 inhibits C/EBP activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat Commun*, 5: 4978, 2014, 査読有. DOI: 10.1038/ncomms5978.
10. 小泉真一, 田村智彦. 転写因子による樹状細胞の分化制御. *臨床免疫・アレルギー科* 62 (5): 510-518, 2014, 査読無.

[学会発表](計 1 件)

1. 佐藤英明, 黒滝大翼, 佐々木 悠, 佐藤 豪, Keiko Ozato, 田村智彦. 樹状細胞と単球はその分化に異なる IRF8 発現量を要する. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2014 年 10 月 31 日

[その他]

研究室ホームページ

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田村 智彦 (TAMURA, Tomohiko)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：50285144

(2)研究分担者

黒滝 大翼 (KUROTAKI, Daisuke)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：10568455

(3)連携研究者

なし