

称号及び氏名	博士(獣医学)	鶴谷 真悠
学位授与の日付	2022年3月31日	
論文名	肺組織在住マクロファージの培養・増殖法の開発と増殖させた肺マクロファージの性状解析	
論文審査委員	主査	小川 和重
	副査	森山 光章
	副査	松林 誠
	副査	谷田 任司

論文要旨

緒言

マクロファージ ($M\phi$) は、炎症時に動員される骨髄の単球から分化する $M\phi$ (動員 $M\phi$) と定常状態で器官に定着している組織在住 $M\phi$ に分類できる。10 年程前まで、組織在住 $M\phi$ は最終分化を遂げた細胞で、細胞分裂を行わず、単球の浸潤により補充されると考えられていた。現在では、組織在住 $M\phi$ の多くは、卵黄囊の食細胞および胎生期の肝臓でつくられた単球から分化した $M\phi$ (胎生 $M\phi$) に由来することが明らかになっている。胎生 $M\phi$ は胎生期に各器官に固有のニッチ (微小環境) に定着し、ニッチからのシグナルを受け取って特異的に分化して組織在住 $M\phi$ になる。胎生 $M\phi$ に由来する組織在住 $M\phi$ の多くは、定着したニッチで自己増殖し、生後もポピュレーションは維持される。一方、腸の間質や真皮などのニッチでは増殖シグナルが認められず、ここに浸潤し一時的に定着した胎生 $M\phi$ 由来の組織在住 $M\phi$ は、生後に骨髄で分化した単球の浸潤により補充され、自己増殖しない。

肺の組織在住 $M\phi$ はその局在性から、肺胞 $M\phi$ ($AM\phi$) と肺間質 $M\phi$ ($pIM\phi$) に分類される。 $AM\phi$ は胎生 $M\phi$ に由来し、肺胞上皮細胞をニッチに自己増殖する $M\phi$ である。 $pIM\phi$ は分化途中の $AM\phi$ あるいは $AM\phi$ のプールであると長い間考えられてきたため、不明な点が多い。骨髄で分化した単球に由来する自己増殖性を示さない細胞なのか、胎生 $M\phi$ に由来し自己増殖性を有する細胞なのか、

決着はついていない。

本研究では、「pIM ϕ は胎生 M ϕ に由来し、培養増殖できる」と考えた。pIM ϕ のニッチとして想定される肺間質細胞と混合培養することで、肺組織在住 M ϕ の継代培養・増殖に成功し、増殖させた M ϕ を pIM ϕ と仮定して単球/M ϕ マーカー分子の発現性状を調べ、AM ϕ 固有のマーカー分子発現を検討した。また、肺 M ϕ とともに増殖した肺間質細胞のニッチとしての性状、増殖させた肺 M ϕ の M1・M2 分極化を検討した。動員 M ϕ で、C57BL/6 マウスは M1 分極化、BALB/c マウスは M2 分極化が強く現れる系統と報告されている。そこで、両系統の成体雄マウス肺から増殖させた M ϕ を用いて M1・M2 分極化性状を比較・検討した。

第 1 章 肺の組織在住マクロファージの継代培養と分離

右心室から HBSS を灌流して単球が含まれる肺の血液を除去後、気道洗浄で AM ϕ を回収するとともに、肺組織から AM ϕ を除去した。肺組織の細胞を分散後、マウス 1 匹当たり 3 枚の 10 cm ϕ ディッシュに播種し、10% FBS 添加 DMEM (DMEM-FBS) で混合培養した。線維芽様細胞と M ϕ が増殖し 2 週間以内にオーバーコンフルエント状態になり重層化した。重層化した細胞を 1:3 の希釈率で継代培養したところ、2 週間以内に再びオーバーコンフルエントに達し、第 1 代の継代で、細胞は主に線維芽様細胞と M ϕ で構成され共培養状態になった。この M ϕ および線維芽様細胞は、初代と同様な増殖性を示して少なくとも 4 代目まで継代できた。以上の結果から、肺の細胞を混合培養すると、M ϕ と線維芽様細胞が増殖し、継代培養できることが明らかになった。「線維芽様細胞がニッチで、ニッチ形成細胞の増殖に伴い M ϕ も増殖する」と想定し、次章で線維芽様細胞を材料にニッチの特性を検討した。

強い接着性を示す M ϕ の特性を利用し、細菌用ペトリディッシュに接着する M ϕ と接着しない肺線維芽様細胞の分離を行った。M ϕ と線維芽様細胞の共培養細胞をトリプシンで剥離後、細菌用ペトリディッシュに播種し DMEM-FBS で培養した。播種数時間後には、M ϕ はディッシュに接着し、接着できない細胞は細胞塊を形成していた。この細胞塊には線維芽様細胞の他に M ϕ も含まれており、ディッシュに弱く接着する細胞塊も認められた。洗浄により細胞塊を除去後、EDTA を使ってペトリディッシュから M ϕ を剥離し、実験に使用した。10 cm ϕ 組織培養ディッシュあたり 1.5×10^6 個以上の M ϕ を回収できた。また、細胞塊を集め低濃度のトリプシンで細胞を分散後、組織培養ディッシュに播種し、接着細胞を再度トリプシンで短時間処理して先に剥がれてくる線維芽様細胞を回収した。この操作を繰り返して線維芽様細胞を純化し、RT-PCR による発現解析の材料として使用した。さらに、気道洗浄液から AM ϕ を分離し、増殖させた肺 M ϕ との比較対照材料とした。

分離した M ϕ の純度を調べるため、蛍光ビーズ (直径 1 μ m) を培養液に添加

し、ビーズ貪食細胞の割合を算定した。2個以上のビーズを貪食する細胞を M ϕ と見なし算定した結果、両系統で 98%以上がビーズ貪食細胞であった。以上の結果から、M ϕ の強い接着性を利用し、肺 M ϕ を線維芽様細胞から分離する方法は簡便で有効な方法であると評価できた。

第 2 章 増殖させた肺組織在住マクロファージの性状と肺線維芽様細胞のマクロファージニッチとしての特性

最近の研究から、多様な転写因子が組織在住 M ϕ の器官固有の特性を生み出していることが明らかになっている。そこで、共培養により増殖させた肺 M ϕ を材料に、15 種類の転写因子の mRNA 発現を調べ、AM ϕ の発現パターンと比較した。両系統ともに、転写因子の発現パターンは増殖させた肺 M ϕ と AM ϕ で類似していたが、*Pparg* は AM ϕ に、*Smad3* と *Spic* は増殖させた肺 M ϕ に特異的に発現することが明らかとなった。従って、増殖させた肺 M ϕ に *Pparg* を導入すれば、AM ϕ の代用になると考えられた。

組織在住 M ϕ の増殖を誘導する主な因子は CSF1, CSF2, IL34 であることが明らかになっている。また、AM ϕ の増殖は肺胞上皮細胞由来の CSF2 に依存すること、TGF β 1-TGF β R2 の自己分泌機構により AM ϕ の特性が付与されることが報告されている。M ϕ と共に増殖した肺線維芽様細胞を材料に増殖因子などの mRNA の発現を、増殖させた肺 M ϕ と AM ϕ を材料に TGF β 1 と TGF β R2 の発現を検討した。その結果、両系統の肺線維芽様細胞はともに、*Csf1*, *Il34*, *Tgfb1* を明確に発現し、加えて BALB/c では *Csf2* の弱い発現も認められた。また、増殖させた肺 M ϕ と AM ϕ は両系統ともに、*Tgfb1* と *Tgfbr2* を明確に発現していた。以上の結果から、肺線維芽様細胞におけるこれらサイトカインの発現パターンは両系統で類似していること、また、AM ϕ と同様に増殖させた肺 M ϕ にも TGF β 1-TGF β R2 の自己分泌機構が存在する可能性が高いことが明らかとなった。

共培養により増殖させた肺 M ϕ を材料に M ϕ /単球マーカー 15 分子の発現をフローサイトメトリー (FCM) で検討した。発現パターンは両系統間で類似しており、CD11b, CD64, CD206 は強陽性、F4/80 と *Mertk* は陽性、MHC II, Ly6C, *Siglec-F* は陰性であった。

AM ϕ を材料に CD11b と *Siglec-F* の発現を調べた結果、これまでの報告の通り、CD11b 陰性、*Siglec-F* 強陽性であった。また、分離直後の肺の細胞を材料にした発現解析から、pIM ϕ は CD206 陽性および MHC II 陰性/弱陽性で自己増殖性を示す細胞と CD206 陰性および MHC II 強陽性で自己増殖性を示さない細胞 (骨髄の単球由来) に分類できると報告されている。これらの報告と本結果から、培養増殖に成功した肺 M ϕ は AM ϕ ではなく、自己増殖性を示す pIM ϕ である可能性が高いと考えられた。M ϕ ニッチ形成細胞の性状を示す線維芽様細胞に依存した培養増殖法であるため、pIM ϕ の特性が維持されていたと推察しているが、今後、さらに検証する必要がある。

第3章 増殖させた BALB/c と C57BL/6 マウスの肺組織在住マクロファージにおける M1/M2 型マクロファージへの分極化性状

BALB/c と C57BL/6 マウスの肺から増殖させた M ϕ を材料に M1・M2 分極化性状を比較・検討した。既存の方法を参照に、肺 M ϕ の培養液に LPS と IFN- γ を添加し M1 型へ、IL4 を添加し M2 型へ分極化誘導し、添加 4 時間と 24 時間後の細胞を対象に、M1 マーカー分子に iNOS、M2 マーカー分子に arginase 1 を用い、発現レベルを FCM で検討した。

非添加対照群および IL4 添加群の肺 M ϕ は両系統ともに iNOS 発現は認められなかった。LPS+IFN- γ 添加群の BALB/c の肺 M ϕ は、添加後 4 時間と 24 時間ともに iNOS 陽性と陰性細胞から構成され、4 時間後には 67.1%、24 時間後には 76.0% が陽性細胞であり、また、陽性細胞における発現レベルは 24 時間後に有意に上昇した。一方、C57BL/6 の肺 M ϕ は、添加後 4 時間で 89.4%、24 時間で 91.6% の細胞が iNOS 陽性細胞で、陽性細胞における発現レベルは 24 時間後に有意に上昇した。両系統間の iNOS 陽性細胞の出現頻度を比較すると 4 時間と 24 時間後ともに C57BL/6 の方が有意に高かった。しかしながら、陽性細胞における iNOS の平均発現強度を両系統間で比較すると 4 時間と 24 時間後ともに有意差は認められなかった。従って、「C57BL/6 は M1 分極化が強く現れる系統」であることを示すこれまでの報告を支持する結果が得られたと考えられた。

一方、両系統の肺 M ϕ は非添加対照群、LPS+IFN- γ 添加群、IL4 添加群の 3 群とも添加 4 時間および 24 時間後において arginase 1 を非常に高いレベルで発現し、M2 分極化誘導による発現上昇は認められなかった。この結果から、増殖させた肺組織在住 M ϕ は、培養条件下で M2 型の特性を示す細胞であると考えられ、前章の FCM の発現解析結果 (M2 マーカー CD206 強陽性、M1 マーカー MHC II 陰性) から、同様の特性が示唆された。

総括

- 肺組織在住 M ϕ の継代培養・分離法の確立に成功した。1:3 の細胞希釈率で、細胞の増殖性を損なうことなく少なくとも 4 代目まで継代できる。計算上、マウス 1 匹から初代培養で 4.5×10^6 個以上、4 代の継代で 1.2×10^8 個以上の肺 M ϕ を得ることが可能になる。
- 確立した方法は、ニッチと想定できる肺線維芽様細胞の増殖に伴った M ϕ の増殖法で、CSF1 により M ϕ は増殖したと考えられる。
- 増殖させた肺 M ϕ は、CD206 陽性/MHC II 陰性で M2 型に分極した気管支周囲に局在する pIM ϕ の性状に合致した。
- 増殖させた C57BL/6 と BALB/c マウスの肺 M ϕ は、両系統ともに LPS+IFN- γ で M1 型に分極した。分極化の程度は C57BL/6 の方が強く、これまでの動員 M ϕ の報告に類似する結果になった。

審査結果の要旨

マクロファージ ($M\phi$) は、炎症時に動員される $M\phi$ (動員 $M\phi$) と器官に定着する組織在住 $M\phi$ に分類される。最近の研究から、組織在住 $M\phi$ の多くは単球の浸潤により補充されるのではなく、胎生期に前駆細胞が浸潤して各器官固有のニッチ (生存適所) に定着・分化し (胎生 $M\phi$)、ニッチのシグナルを受け取って増殖しポピュレーションを維持していることが明らかになった。肺の組織在住 $M\phi$ は局在性から、肺胞 $M\phi$ ($AM\phi$) と肺間質 $M\phi$ ($pIM\phi$) に分類される。 $AM\phi$ は胎生 $M\phi$ に由来し肺胞上皮細胞がニッチとなり増殖する $M\phi$ である。 $pIM\phi$ は分化中の $AM\phi$ あるいは $AM\phi$ のプールと考えられてきたため、不明な点が多い。単球に由来し肺胞中隔に分布する $pIM\phi$ と、増殖性を示し気管支周囲に分布する $pIM\phi$ の存在が報告されているが、詳細な性状は分かっていない。本研究では、「 $pIM\phi$ は胎生 $M\phi$ に由来し、培養増殖できる」と考え、 $pIM\phi$ のニッチと想定される肺間質細胞と混合培養することで肺組織在住 $M\phi$ の増殖に成功し、増殖させた $M\phi$ を $pIM\phi$ と仮定して、 $M\phi$ マーカー分子の発現性状、 $M\phi$ とともに増殖した肺線維芽様細胞のニッチとしての性状を検討した。動員 $M\phi$ において、C57BL/6 マウスは M1 型、BALB/c は M2 型への分極化が強く現れる系統と報告されている点から、両マウスから増殖させた肺組織在住 $M\phi$ を用いて M1・M2 分極化性状を比較・検討した。

第 1 章で、肺組織在住 $M\phi$ の培養・増殖法を提示した。気道洗浄により $AM\phi$ を除去した肺を材料に肺細胞の混合培養を行い、 $M\phi$ の増殖能を評価した。線維芽様細胞と $M\phi$ が増殖して共培養状態になり 14 日以内に両細胞は重層化した。この細胞を 1:3 の希釈率で継代すると 14 日以内に重層化し、同様な増殖性で 4 代以上継代できることを明示した。強い接着性を示す $M\phi$ の特性を利用し、細菌用ペトリディッシュに接着する $M\phi$ と接着しない肺線維芽様細胞を分離し、マウス 1 匹当たり継代 1 代目で 1.35×10^7 個以上の $M\phi$ を回収した。確立した肺組織在住 $M\phi$ の増殖・分離法は簡便で、大量の $M\phi$ を研究材料に活用できる有効な方法と評価できた。

第 2 章では、増殖させた肺組織在住 $M\phi$ を材料に、 $M\phi$ マーカー分子発現をフローサイトメトリーで検討した。CD11b, CD64, CD115, CD206, MerTK 陽性 / MHC II, Ly6C, Siglec-F 陰性で、 $AM\phi$ (CD11b 陰性 / Siglec-F 陽性) とは異なり、CD206 陽性 / MHC II 陰性の点から気管支周囲に局在する $pIM\phi$ であると結論づけた。この $pIM\phi$ の亜集団の性状を示す $M\phi$ は *Tgfb1*, *Tgfbr2*, *Smad2* を発現していたことから、組織在住 $M\phi$ の特性を付与する TGF β 1-TGF β R2-Smad2 の自己分泌・シグナル機構の存在が示唆された。また、増殖した肺線維芽様細胞は *Csf1*, *Il34*, *Tgfb1* を発現していた点からも、 $M\phi$ ニッチとしての性状を保

持しており、従って、開発・確立した増殖法は、ニッチとなる肺線維芽様細胞の増殖に依存した pIM ϕ の増殖法であると判断された。

第3章では、BALB/c と C57BL/6 マウスの肺から増殖させた pIM ϕ を材料に分極化性状を比較した。LPS と IFN- γ で M1 型、IL4 で M2 型への分極誘導を行い、添加4時間と24時間後の細胞を対象に、iNOS (M1 マーカー)、arginase 1 (M2 マーカー) の発現レベルをフローサイトメトリーで比較・検討した。非添加対照群および IL4 添加群の pIM ϕ は両系統ともに iNOS 発現は認められず、(1) LPS+IFN- γ 添加群で iNOS 発現が誘導されること、(2) 両系統間の iNOS 陽性細胞の出現頻度は4時間と24時間後ともに C57BL/6 の方が有意に高いこと、(3) 陽性細胞における iNOS の平均発現強度は4時間と24時間後ともに両系統間で有意差は無いことを明示し、これまでの報告 (C57BL/6 は M1 分極化が強く現れる系統) を部分的に支持する結果が得られた。一方、両系統の肺から増殖させた pIM ϕ は、対照群、LPS+IFN- γ 添加群、IL4 添加群の3群とも4時間と24時間後において arginase 1 を非常に高いレベルで発現し、M2 分極化誘導による発現上昇は起こらないことを明示した。増殖させた pIM ϕ は M2 型に強く分極している特性を示す細胞で、前章の結果 (M2 マーカーCD206 陽性、M1 マーカーMHC II 陰性) からも、同様な特性が示唆されている。

本研究では、(1) 肺組織在住 M ϕ の培養・増殖法を開発し、増殖した M ϕ は、(2) M ϕ マーカー分子発現性状から気管支周囲に局在する pIM ϕ の性状と一致し、M2 型に分極していること、(3) C57BL/6 と BALB/c マウスともに LPS+IFN- γ で M1 型に分極化したが、M1 細胞の割合は C57BL/6 の方が高いことを明示した。確立した方法は、ニッチ形成細胞と想定できる肺線維芽様細胞の増殖とともに pIM ϕ を増殖させる方法で、大量の pIM ϕ を研究材料に使用できるため、研究が進んでいない pIM ϕ に関する研究の発展や肺疾患の病態解明への貢献が期待できる。従って、医学・獣医学の発展に貢献すると判断され、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。