

【要約】

Mast cells control c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> progenitor cells to regulate tissue-resident macrophages

(肥満細胞が c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>前駆細胞を制御し  
組織常在マクロファージを調節する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：松江 弘之 教授)

若林正一郎

## 【序論】

肥満細胞は造血幹細胞由来の細胞であり、末梢組織において結合組織型もしくは粘膜肥満細胞として存在している。肥満細胞の分化には Interleukin-3 (IL-3) と Stem cell factor (SCF) が必要であり、肥満細胞の表面には IL-3 レセプターと SCF のレセプターである c-Kit が発現している。生体内における肥満細胞の機能を解明するために、肥満細胞欠損マウスとして *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスが従来幅広く用いられてきた。この *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスは 1978 年に c-Kit をコードする Kit 遺伝子に変異を持つことが同定され、SCF シグナルの減弱により肥満細胞を欠損させていることが明らかとなった。この *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスは肥満細胞欠損マウスとして用いられてきたが、SCF は造血幹細胞の増殖因子でもあり、そのレセプターである c-Kit は肥満細胞以外にも、様々な造血幹細胞、骨髓前駆細胞に発現している。そのため、*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスは肥満細胞だけでなく、様々な細胞の分化異常を引き起こしてしまうという欠点があった。この欠点を解決するために、近年では *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスという肥満細胞欠損マウスが用いられるようになった。この *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスは肥満細胞に特異的に発現している carboxypeptidase A3 (*Cpa3*) 遺伝子に Cre を挿入し、高発現した Cre が細胞毒性を持つことで肥満細胞を欠損させている。様々な細胞の分化異常を引き起こしてしまう *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと比較して、*Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスはより特異的に肥満細胞欠損させたより良いマウスモデルとして用いられている。しかし、肥満細胞以外の細胞の異常については、脾臓内の好塩基球が減少していることが報告されているが、それ以外の末梢組織における他の骨髓由来細胞については、現在までにほとんど解析が行われていない。

## 【目的】

*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスを並行して解析することで、肥満細胞が末梢組織において骨髓由来細胞を制御するかどうかについて調べることを本研究の目的とした。

## 【方法】

肥満細胞欠損マウス (*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*, *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウス) の腹腔内から腹腔細胞を採取し、flow cytometry を用いて解析した。減少している分画が存在したため、肥満細胞移植により回復するかを確認するために、腹腔内に WT マウスから作成した骨髓由来培養肥満細胞  $2.0 \times 10^6$  個を移植し、10 週間後に腹腔細胞を回収、flow cytometry を用いて解析した。次に、腹腔内への肥満細胞移植により増加した細胞集団が存在したため、表面マーカー、形態学、RNA sequence、サイトカイン刺激による分化能からこの細胞の特性を分析した。皮膚においても、肥満細胞欠損マウスに肥満細胞  $1 \times 10^6$  個を移植し、8 週間後の時点で蛍光免疫染色を行い解析した。

## 【結果】

我々は、まず肥満細胞欠損マウスの腹腔内における骨髓由来細胞の異常の有無について調べた。その方法として、肥満細胞欠損マウスである *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスの腹腔から腹腔細胞を採取し、flow cytometry を用いて WT マウスと比較した。採取した腹腔細胞の中から CD45 陽性細胞をソートし、c-Kit と FcεRI により肥満細胞を、F4/80 と CD11b によって Large Peritoneal Macrophage (LPM)、Small Peritoneal Macrophage (SPM)、好酸球を分け、それぞれの細胞の割合を調べた。WT マウスでは肥満細胞が検出されたが、予想通り肥満細胞欠損マウスである *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスでは肥満細胞は検出されなかった。次にマクロファージと好酸球を見てみると、WT マウスと比較して *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスでは LPM, SPM, 好酸球すべての細胞が減少しており、*Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスでは LPM と SPM が減少していた。以上から、肥満細胞欠損マウスでは腹腔マクロファージが減少しているという結果となった。

ここで我々は腹腔内において肥満細胞が組織常在マクロファージの数を制御しているのではないかと仮説を立てた。これを調べるために、まず WT マウスの大腿骨、脛骨から単離した骨髓細胞を、IL-3 を添加した complete RPMI で培養し、骨髓由来培養肥満細胞 (BMMC) を作成した。肥満細胞の割合が 95%以上となった時点で、肥満細胞欠損マウスの腹腔内に BMMC を移植し、移植 10 週間後に腹腔マクロファージの数が変化するかどうかを flow cytometry で解析した。*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスでは、肥満細胞欠損状態では減少していた LPM が、肥満細胞移植後には WT マウスと同程度にまで回復していた。また、減少していた好酸球も肥満細胞移植により回復していた。次に *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスでは、*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと同様に、LPM が肥満細胞移植後に WT マウスと同程度にまで回復していた。以上の結果から、我々は腹腔内において移植した肥満細胞がマクロファージ前駆細胞を制御しているのではないかと仮定した。

次に我々は CD45 のコンジェニック系統を用いて移植実験を行った。まず、CD45.2 陽性 BMMC を CD45.1 陽性 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスに移植し、移植 10 週後に腹腔細胞を解析した。移植に用いた CD45.2 陽性細胞が、移植していない CD45.1 陽性 *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスでは検出されず、移植したマウスで検出されたことから、移植細胞の生着を確認した。移植した細胞はすべて、従来、肥満細胞を同定するマーカーとして用いられてきた c-Kit と FcεRI を発現しており、この細胞集団が移植した BMMC 由来であることを確認した。この移植した細胞集団の中には、c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>肥満細胞と c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>陽性細胞の 2 つの集団が存在していた。この c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>の細胞は定常状態である WT マウスには少数ながら存在し、肥満細胞を移植していない *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスでは検出されなかった。次に CD45.1 陽性 BMMC を CD45.2 陽性 *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスに移植し、腹腔細胞を解析した。移植した CD45.1 陽性

細胞が、レシピエントである CD45.2 陽性 *Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスに生着している確認し、さらに BMMC 由来であることを確認した。*Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスでも同様に、移植前では検出できなかった c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は BMMC の移植により増加したが、*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと異なり、この c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は移植した細胞からではなく、レシピエント側から分化していた。以上の結果から、c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は WT マウスには少数ながら常に存在するが、肥満細胞欠損マウスではほぼ完全に欠損していることがわかった。また、すべてのマウスにおいて、BMMC 移植後に c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞が増加しており、c-Kit を欠損している *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスでは移植した BMMC から、*Cpa3<sup>Cre/+</sup>* マウスではレシピエントからこの c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞が分化していたことから、肥満細胞が c-Kit 依存性に c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞を制御していると考えられた。

過去の論文ではこの c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は未熟なマクロファージ前駆細胞として報告されている。そこで、我々はこの c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞がどのような性質を持つのか、細胞の表面マーカー、形態、遺伝子発現、多分化能があるかどうかについて調べた。まず、BMMC を肥満細胞欠損マウスの腹腔内に移植し、採取した腹腔細胞の CD45, c-Kit, FcεRI, CD11b のすべてが陽性である細胞に Sca-1, CD34, CD135 が発現しているか多重染色を用い flow cytometry で調べた。その結果、この c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は Sca-1, CD34, そして CD135 すべてのマーカーが発現していることが明らかとなった。これを既知の造血幹細胞、前駆細胞の発現パターンに当てはめると、多機能幹細胞 (MPP) に類似していた。この結果から以下、我々はこの c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞を便宜上 MPP-like cell と呼称した。

次に MPP-like cell の形態を調べた。WT マウスの腹腔細胞から MPP-like cell、肥満細胞、LPM, SPM をセルソーターによりソートし、toluidine blue (TB)染色と Giemsa 染色、さらに電子顕微鏡により形態を比較した。肥満細胞は TB 陽性の顆粒を豊富に持つ細胞として観察された。LPM は泡沫状の細胞質を持つ大型の細胞として、SPM は核の大きい小型の細胞として観察された。MPP-like cell は、細胞の大きさは肥満細胞や LPM に近い大きさで、LPM のような泡沫状の細胞質の中に、肥満細胞で見られるような TB 陽性の顆粒が少数ながら存在していた。電子顕微鏡を用いて詳細に観察を行うと、肥満細胞で見られる顆粒よりも濃度の薄いものが MPP-like cell の細胞質内に数個存在し、LPM で見られる細胞質辺縁の空胞が MPP-like cell ではより多く観察できた。さらに MPP-like cell の細胞質を拡大してみると、細胞質内にはリボソーム、粗面小胞体、ミトコンドリアなど蛋白やエネルギー合成に関わる細胞内小器官が、MC や LPM と比較して多く存在していたことから、未熟な細胞であることが示唆された。以上のことから、MPP-like cell は MC や LPM とは異なるものの、両方の細胞の特徴を持った未熟な細胞であると考えられた。

次に MPP-like cell の遺伝子の発現を調べるために RNA sequence を行った。サンプルは

WT マウスの腹腔内から MPP-like cell を、コントロールとして肥満細胞、LPM, 骨髄細胞からマクロファージ前駆細胞である Macrophage/dendritic cell progenitor (MDP), common monocyte progenitor (cMoP)を採取し、これらの細胞の mRNA sequence のデータを基に主成分解析と詳細な遺伝子解析を行った。主成分解析では MPP-like cell は MDP や cMoP といったマクロファージ前駆細胞とは異なる位置に存在していた。また、MPP-like cell は肥満細胞と LPM の中間に位置する独立した細胞集団として観察された。次に RNA sequence でリードが確認された MPP-like cell に発現している遺伝子のうち、マクロファージ、肥満細胞に発現している代表的な遺伝子を抽出したところ、FACS による表面マーカー解析で発現が見られた *Ly-6a* (Sca-1)、*Fcer1a*、*Ilgam* (CD11b)、*Cd34*、*Kit* が強く発現していた。flow cytometry では強陽性であった *Flt3* (CD135)については、遺伝子発現は弱い、肥満細胞よりも発現は強いという結果になった。また、MPP-like cell はマクロファージに特異的な遺伝子と、肥満細胞に特異的な遺伝子の両方を発現していた。以上の遺伝子解析の結果から、MPP-like cell は肥満細胞とマクロファージの両方の遺伝子を発現し、その中間に位置する独立した細胞集団であることが示唆された。

さらに前駆細胞としての MPP-like cell の分化能について調べた。WT マウスからソートした MPP-like cell を IL-3 と SCF、もしくは IL-3 のみを入れた培養液で培養し、2 週間後に Giemsa 染色で形態を確認した。培養 2 週間後の MPP-like cell では、どちらの培養液でも孤立していた細胞周囲に分裂したと思われる細胞数の増加が見られ、増殖能を持つと考えられた。両者はほぼ同じ外観を呈していたが、Giemsa 染色を行うと IL-3 と SCF の培養では肥満細胞様の細胞を、IL-3 のみの培養ではマクロファージ様の細胞を認めた。以上の結果から MPP-like cell は肥満細胞にもマクロファージにも分化可能ということが *in vitro* での実験で明らかとなった。以上のことから MPP-like cell は肥満細胞やマクロファージとは異なる、独立した前駆細胞集団であると考えた。

次に我々は、皮膚においても肥満細胞が組織常在マクロファージを制御するかどうか調べた。WT マウスから培養した BMDC を肥満細胞欠損マウスである *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* マウスと *Cpa3<sup>Cre/+</sup>*マウスの片耳に移植し、移植 8 週間後に両耳を採取、蛍光免疫染色を行い肥満細胞、真皮マクロファージの細胞数をカウントした。avidin 陽性細胞を肥満細胞として、CD206 陽性細胞を真皮マクロファージとしてカウントした。その結果、肥満細胞は肥満細胞欠損マウスではほぼ検出されなかったが、肥満細胞移植により WT マウスと同程度まで回復した。真皮マクロファージの細胞数は、肥満細胞欠損マウスでは減少していたが、肥満細胞移植により WT マウスと同程度まで回復していた。以上の結果から、腹腔内と同様に、皮膚においても肥満細胞が組織常在マクロファージを制御することが示唆された。

## 【考察】

現在までに肥満細胞欠損マウスのより良いマウスモデルとして *Cpa3<sup>Cre/+</sup>*マウスが用いられてきたが、*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*マウスだけでなく *Cpa3<sup>Cre/+</sup>*マウスにおいても、組織常在マクロファージの細胞数が減少していることが明らかとなった。減少したマクロファージは肥満細胞移植により WT マウスと同程度にまで回復したことから、末梢組織におけるマクロファージの細胞数の制御に肥満細胞が関わることが示唆された。同時に肥満細胞を移植したマウスの腹腔内において、*c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>*陽性細胞が増加したこと、この細胞集団が定常状態である WT マウスには少数ながら存在し、肥満細胞欠損マウスではほぼ存在しなかったことから、肥満細胞が *c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>*陽性細胞を介してマクロファージの細胞数を制御していることが示唆された。また、*c-Kit* を欠損している *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*マウスでは移植した BMMC から、*Cpa3<sup>Cre/+</sup>*マウスではレシピエントからこの *c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>*細胞が分化していたことから、肥満細胞が *c-Kit* 依存性に *c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>*細胞を制御していると考えられた。

この *c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>*細胞は造血幹細胞の表面マーカーである Sca-1, CD34, CD135 をすべて発現していたことや、電子顕微鏡で蛋白やエネルギー合成に関わる細胞内小器官が肥満細胞やマクロファージと比較して多かったことから、未熟な前駆細胞であることが示唆された。また、この細胞は、形態や遺伝子発現のパターンから肥満細胞とマクロファージの両方の性質を持つが、どちらの細胞とも異なる細胞であることが明らかとなった。さらに、*in vitro* での実験で肥満細胞にもマクロファージにも分化可能であることから、この *c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>*細胞は肥満細胞やマクロファージとは異なる、独立した前駆細胞集団であると考えた。

また、皮膚においても、肥満細胞欠損マウスでは腹腔内と同様に、組織常在マクロファージである真皮マクロファージの細胞数が減少していた。この減少していたマクロファージが、肥満細胞移植により WT マウスと同程度にまで回復したことから、末梢組織において、肥満細胞がマクロファージの細胞数を調節していることが示唆された。

## 【結語】

我々の研究結果から、肥満細胞はマクロファージ前駆細胞である MPP-like cell を *c-Kit* 依存性に制御し、末梢組織におけるマクロファージの数を調節する役割を担っていると考えた。