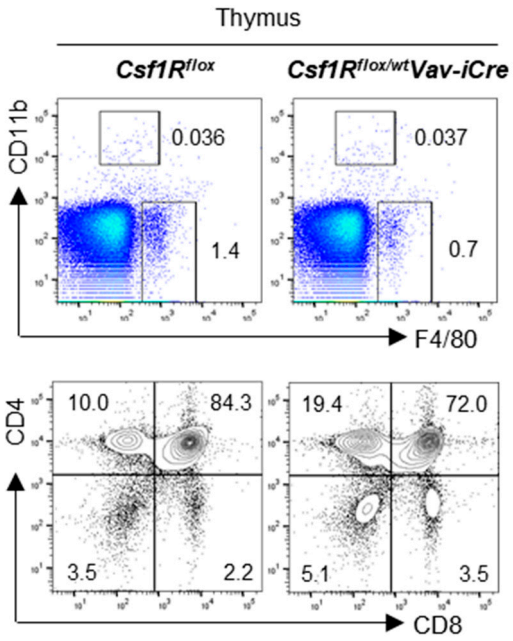
143　免疫老化における胸腺マクロファージの機能解析	金山　剛士

【目的】胸腺はT細胞の成熟と自己・非自己の認識を司る免疫の中心である。胸腺は思春期を境に退縮し、これが免疫老化の一因になっていることが知られている。組織常在性マクロファージは各臓器の恒常性維持に寄与していることが知られているが、胸腺のマクロファージの機能は不明な点が多く残されている。本研究では、胸腺の退縮における組織常在性マクロファージの役割について明らかにすることを目的とする。

【方法】マクロファージの分化に重要なM-CSF受容体を造血細胞特異的に欠損させたマウス（*Csf1r*$^{flox/+}$ *Vav*-Cre)を作製し、胸腺マクロファージの数に影響するか検討した。また、このマウスを老齢期まで維持し、胸腺細胞の数を計測するとともに、胸腺細胞をフローサイトメトリーにより解析した。また、胸腺マクロファージのソースを検討するため、骨髄の造血幹細胞や胎児の肝臓由来マクロファージで同様にM-CSF受容体を欠損する（*Csf1r*$^{flox/+}$ *Flt3*-Cre）マウスを作製し、同様に解析を行った。また、クロドロン酸リポソームを用いた胸腺のマクロファージ除去が胸腺の退縮に影響を与えるのか、フローサイトメトリーにより解析した。

【結果】*Csf1r*$^{flox/flox}$ *Vav*-Creマウスを作製するため、*Csf1r*$^{flox/+}$ *Vav*-Creマウスと*Csf1r*$^{flox/+}$マウスを交配したところ、興味深いことに、*Csf1r*$^{flox/flox}$ *Vav*-Creマウスは誕生しなかった。そこで、*Csf1r*$^{flox/+}$ *Vav*-Creマウスを老齢期まで維持し胸腺細胞の割合を調べたところ、F4/80^{+}CD11^{-}の胸腺マクロファージが減少しており、胸腺細胞の総数が増加していた。T細胞群においても、CD4^{+}CD8^{+}の未熟なT細胞が減少し、CD4^{+}T細胞やCD8^{+}T細胞の画分が増加していた。これに対して、若齢のマウスではこれらの知見は確認されなかった。また、*Csf1r*$^{flox/flox}$ *Flt3*-Creマウスは正常に誕生し、胸腺細胞にも変化は見られなかった。クロドロン酸リポソームを投与すると胸腺のマクロファージも一時的に減少することが確認できたため、クロドロン酸リポソームを投与した野生型マウスにおいて同様に胸腺細胞の解析を行ったが、コントロールリポソーム投与群と比較して有意な差は確認されなかった。

Csf1r$^{flox/+}$ *Vav*-Creマウスにおける胸腺マクロファージの減少と成熟T細胞の増加



143. 免疫老化における胸腺マクロファージの機能解析

金山　剛士

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 生体防御学分野

Key words：免疫老化，胸腺，マクロファージ

緒　言

食料供給などの社会基盤の充実や医療技術の発達を背景として、日本人の平均寿命は上昇し、現在は男女ともに 80 歳を上回った。そこで近年、健康に生活できる「健康寿命」を老後まで持続させることが社会的な命題となっている。免疫系は病原体に対して必須の防御機構であるため、老化による免疫系の機能低下を抑制することは大きな意義を持つ。T 細胞は高度な抗原認識能力を有するリンパ球系免疫細胞であり、獲得免疫応答の中枢を担うことから、T 細胞の成熟過程は長く免疫学の中心的課題として研究されてきた。T 細胞の前駆体である共通リンパ球系前駆細胞は骨髄で造血幹細胞から分化したのちに胸腺へと移行し、そこで T 細胞へと分化・成熟する［1］。胸腺において、T 細胞は高度な抗原認識能力と自己抗原の学習を介して自己・非自己の識別能力を獲得し、その後、末梢の二次リンパ組織へと移行する。胸腺は新生児期から幼年期にかけて最も発達し、思春期を境に退縮することで、T 細胞産生の場としての機能を喪失してゆく。これは「免疫老化」の主要な原因の一つとして知られているが、そのメカニズムは十分に解明されていない。胸腺退縮による T 細胞産生能の低下は感染症や癌などに対する抵抗性を減弱させることから［2］、胸腺退縮の機構を明らかにし、その進行を制御することが出来れば健康寿命の延伸にも寄与すると期待される。

マクロファージは主に病原体やアポトーシス細胞を貪食して抗原提示を行う自然免疫細胞である。近年、マクロファージの起源や機能がそのサブセットによって大きく異なっていることが明らかにされており、骨髄単球由来、胎児肝臓由来、卵黄嚢由来に区別され的にいる。それぞれのソースからの組織常在性マクロファージへの分化にはマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）が重要であることが知られている［3］。これら組織常在性のマクロファージは各組織に特化した機能を有し、その組織の恒常性維持などに寄与していることが知られてきた［4］。胸腺にも $CD11b^{+}F4/80^{+}$および $CD11b^{-}F4/80^{+}$の 2 種類のマクロファージが存在することが知られているものの、胸腺におけるマクロファージは樹状細胞や胸腺上皮細胞と比較して研究が進んでおらず、その役割の大部分、特に胸腺の維持における機能は不明である［5］。

本研究では、胸腺に常在するマクロファージが胸腺の退縮にどのような役割を担うのか検討することを目的としている。

方法および結果

1.　胸腺マクロファージ除去法の確立

胸腺に常在するマクロファージの生理学的な役割を検討するため、組織常在性マクロファージの分化に重要な M-CSF 受容体を造血細胞で欠損したマウス（*Csf1r*^{flox} *Vav*-Cre マウス）を *Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスと *Csf1r*$^{flox/flox}$ マウスの交配により作製した。興味深いことに、産仔数は平均で 2～3 匹であり、その全てが *Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスで、*Csf1r*$^{flox/flox}$ *Vav*-Cre マウスは誕生しなかった。同様に、M-CSF 受容体を骨髄造血前駆細胞と胎児肝臓由来細胞の一部で発現する Flt3 の下流で Cre リコンビナーゼが発現するマウス（Flt3-Cre）を *Csf1r*$^{flox/flox}$ マウスと交配させて *Csf1r*$^{flox/flox}$ *Flt3*-Cre マウスを作製した。このマウスは正常にメンデルの法則に準じて誕生した。胸腺のマクロファージに与える影響を検討したところ、*Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスはコントロールマウスと比較して胸腺の $F4/80^{+}CD11b^{-}$マクロファージの割合が減少していた（図 1）。一方、$F4/80^{-}CD11b^{+}$マクロファージの割合に変化は見られなかった。また、

Csf1r$^{flox/flox}$ *Flt3*-Cre マウスは野生型マウスと比較してマクロファージの割合に差は認められなかった。

野生型マウスにおいて胸腺マクロファージを除去するため、クロドロン酸リポソーム（FormMax 社）100 μl を静脈内投与したところ、コントロールリポソーム投与群と比較して F4/80^{+}CD11b^{-}な胸腺マクロファージの割合が約半分に減少した。

2. 胸腺マクロファージ除去の影響評価

Csf1r$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスでは野生型マウスと比較して胸腺の F4/80^{+}CD11b^{-}マクロファージの割合が減少していたため、このマウスを老齢期（6 か月齢以上）まで維持したところ、*Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスでは胸腺細胞の総数が約 1.8 倍に増加していた。また、CD4、あるいは CD8 陽性の成熟 T 細胞や CD4 と CD8 が両方発現する未熟な T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより検討したところ、*Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスでは成熟 T 細胞の割合が増加し、未熟な T 細胞の割合が減少していた（図 2）。6～8 週齢の若齢期のマウスではこれらの違いは確認することが出来なかった。同様に *Csf1r*$^{flox/flox}$ *Flt3*-Cre マウスにおいても細胞数や T 細胞の割合に変化は見られなかった。

4 か月齢の野生型マウスにクロドロン酸リポソームを 4 週間投与し、胸腺細胞に与える影響を検討したところ、コントロールリポソーム投与群と比較して胸腺細胞の数や T 細胞の割合に差は見られなかった。

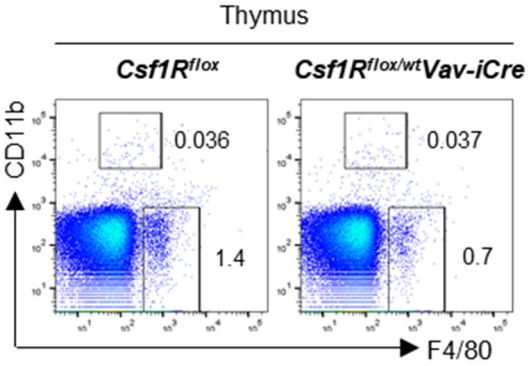


図 1. *Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスにおける胸腺マクロファージの減少
8 週齢の *Csf1r*^{flox}、および *Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスの胸腺に存在する F4/80^{+}CD11b^{-}および F4/80^{-}CD11b^{+}マクロファージの割合をフローサイトメトリーにより解析した。

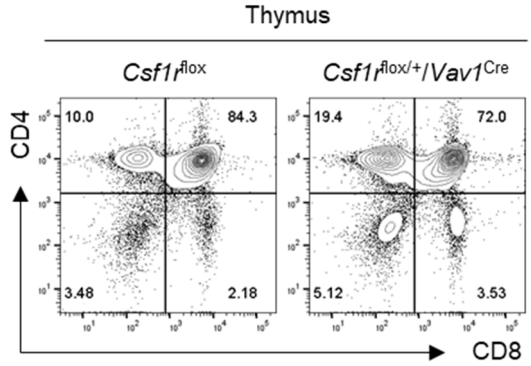


図 2. *Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスにおける胸腺成熟 T 細胞の増加
7 か月齢の *Csf1r*^{flox}、および *Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスの胸腺に存在する T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

考　察

M-CSF の欠損マウスは胎生致死ではないため［6］、*Csf1r*$^{flox/flox}$ *Vav*-Cre マウスが誕生しなかったことは想定外であった。M-CSF 以外のリガンドが M-CSF 受容体を介して、胎生期の発達に重要な働きを担っている可能性が考えられる。また、*Csf1r*$^{flox/WT}$ *Vav*-Cre マウスでは胸腺マクロファージの数が減少したのに対して、*Csf1r*$^{flox/flox}$ *Flt3*-Cre マウスでは減少しなかった。これは、胸腺の CD11b^{-}F4/80^{+}マクロファージが卵黄嚢由来である可能性を示している。さらに、胸腺マクロファージの除去が老齢期の胸腺細胞数を増加させ、成熟 T 細胞の割合も高めたことから、胸腺マクロファージの存在が胸腺の退縮に直接的な役割を担っていることが示唆された。とくに、胸腺の退縮は腫瘍壊死因子や IL-1 などの炎症性サイトカインが加速させることが報告されていることから［7～9］、胸腺マクロファージがこれらの因子のソースとなっている可能性がある。マクロファージは一般的にこれらのサイトカインの産生が盛んな細胞であることから、マクロファージによる恒常的な炎症性因子の産生が胸腺の退縮を引き起こしていると推察できる。一方、転写因子である *NR4A1* の欠損マウスでは胸腺マクロファージを特異的に減少することが報告されているが、このマウスにおいては逆に加齢に伴う胸腺の機能不全が加速する［10］。これは本研究で得られた知見と異なる結果であり、胸腺退縮におけるマクロファージの役割についてはさらなる研究が必要になると考えられる。クロドロン酸リポソームではマクロファージが減少したにも関わらず、胸腺細胞数や T 細胞の割合には変化が見られなかった。この結果はマクロファージの除去期間が短かったためであるかもしれない。今後はさらに長期間の投与によって変化が観察されるか検討を行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究を支援して下さった上原記念生命科学財団へ心より感謝いたします。

文　献

1) Zúñiga-Pflücker JC. T-cell development made simple. Nat Rev Immunol. 2004 Jan;4(1):67-72. PMID: 14704769 DOI: 10.1038/nri1257
2) Palmer DB. The effect of age on thymic function. Front Immunol. 2013 Oct 7;4:316. PMID: 24109481 PMCID: PMC3791471 DOI: 10.3389/fimmu.2013.00316
3) Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. Nat Immunol. 2013 Oct;14(10):986-95. PMID: 24048120 PMCID: PMC4045180 DOI: 10.1038/ni.2705
4) Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. Front Immunol. 2014 Oct 17;5:514. PMID: 25368618 PMCID: PMC4201108 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514
5) Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. Immunol Rev. 2014 Nov;262(1):36-55. PMID: 25319326 PMCID: PMC4231239 DOI: 10.1111/imr.12223
6) Kurotaki D, Kon S, Bae K, Ito K, Matsui Y, Nakayama Y, Kanayama M, Kimura C, Narita Y, Nishimura T, Iwabuchi K, Mack M, van Rooijen N, Sakaguchi S, Uede T, Morimoto J. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. J Immunol. 2011 Feb 15;186(4):2229-37. Epub 2011 Jan 14. PMID: 21239712 DOI: 10.4049/jimmunol.1001345
7) Liepinsh DJ, Kruglov AA, Galimov AR, Shakhov AN, Shebzukhov YV, Kuchmiy AA, Grivennikov SI, Tumanov AV, Drutskaya MS, Feigenbaum L, Kuprash DV, Nedospasov SA. Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus. Eur J Immunol. 2009 Oct;39(10):2906-15. PMID: 19735075 DOI: 10.1002/eji.200839191

8) Gruver AL, Sempowski GD. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J Leukoc Biol. 2008 Oct;84(4):915-23. Epub 2008 May 21. PMID: 18495786 PMCID: PMC2538595 DOI: 10.1189/jlb.0108025

9) Youm YH, Kanneganti TD, Vandanmagsar B, Zhu X, Ravussin A, Adijiang A, Owen JS, Thomas MJ, Francis J, Parks JS, Dixit VD. The Nlrp3 inflammasome promotes age-related thymic demise and immunosenescence. Cell Rep. 2012 Jan 26;1(1):56-68. Epub 2012 Jan 26. PMID: 22832107 PMCID: PMC3883512 DOI: 10.1016/j.celrep.2011.11.005

10) Tacke R, Hilgendorf I, Garner H, Waterborg C, Park K, Nowyhed H, Hanna RN, Wu R, Swirski FK, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor NR4A1 is essential for the development of a novel macrophage subset in the thymus. Sci Rep. 2015 Jun 19;5:10055. PMID: 26091486 PMCID: PMC4473761 DOI: 10.1038/srep10055