



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Targeted labeling and depletion of alveolar macrophages using VeDTR mouse technology  |
| Author(s)    | 中山, 裕貴  |
| Citation     | 大阪大学, 2025, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/101847">https://hdl.handle.net/11094/101847</a>   |
| rights       |   |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

|   |   |
|---|---|
| 氏 名<br>Name   | 中山 裕貴   |
| 論文題名<br>Title   | Targeted labeling and depletion of alveolar macrophages using VeDTR mouse technology<br>(VeDTRマウス作製技術を用いた肺胞マクロファージ特異的な標識法と枯渇法の開発) |
| <p>論文内容の要旨</p> <p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>肺胞マクロファージ(AM)は肺の恒常性維持に不可欠であり、気道の異物や常在菌のクリアランスに働いている。特に<i>Mycobacterium</i>属の細胞内寄生菌はAMに感染してその細胞内で増殖できることが知られている。しかし、AMを除去した際に<i>Mycobacterium</i>属の菌量が増加するのか減少するのかは結論が出ていなかった。これは既存のAM枯渇法では細胞選択性が低く、好中球や他のマクロファージや樹状細胞も除去されてしまうからである。この問題を解決するため、我々はVeDTR技術を用いてAMを特異的に枯渇させることができるトランスジェニックマウスシステムを作製した。この技術はCre-loxPとFlp-FRTシステムを使用して2種類の任意の遺伝子に紐づいた2つのリコンビナーゼが発現した特定の細胞でのみ蛍光蛋白(Venus)とジフテリア毒素受容体(DTR)を発現可能である。こうして作製したトランスジェニックマウスを利用して<i>Mycobacterium abscessus</i>(<i>M. abs</i>)の急性感染におけるAMの役割、感染時に起こるAM消失の意義、<i>M. abs</i>のGM-CSF吸入療法とAMの関係について明らかにした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>Cx3cr1-Cre DTRマウスはAMを含むマクロファージにおいてYFPとDTRが発現している。<i>Flp</i>に紐づけるAM特異的な2つ目の遺伝子の探索のために、Cx3cr1-Cre DTRマウスにおけるYFP<sup>+</sup>AMとYFP<sup>+</sup>のそれ以外の細胞をRNAシーケンスで遺伝子発現を比較した。その中でも<i>Chil3</i>遺伝子はAMで極めて発現が高く特異性が高かった。そこで我々はCx3cr1-Cre/<i>Chil3</i>-FlpマウスとVeDTRマウスを交配したCx3cr1-Cre/<i>Chil3</i>-Flp/VeDTRマウス(CCDマウス)を作製した。CCDマウスの肺と全身のマクロファージをフローサイトメトリーで確認し、AM特異的にYFP陽性だった。さらに、CCDマウスにジフテリア毒素(DT)投与することでAMが選択的に97%除去された。こうしてAM特異的に標識・枯渇可能なマウスの作製に成功した。</p> <p>続いて事前にPBSまたはDTでAMを除去したCCDマウスに<i>M. abs</i>を感染させたときの菌量を評価した。感染7日目の肺はPBS群と比べてDT群で菌量が9倍増加した。これはAMが<i>M. abs</i>感染に防御的に働いていることを示唆した。</p> <p>AMは感染とともに肺から消失することが知られている。B6WTマウスに<i>M. abs</i>を感染させると感染翌日にはAMは1/10程度に減少したが、<i>Ifngr1</i><sup>-/-</sup>マウスやanti-IFN<math>\gamma</math>抗体投与下ではAM消失が起こりにくかった。<i>M. abs</i>の感染防御にはAMが重要とすでに明らかにしたが、この感染に伴うIFN<math>\gamma</math>依存的なAM消失も感染防御に必要なのかを明らかにすることを試みた。CCDマウスにisotype抗体またはanti-IFN<math>\gamma</math>抗体を投与したうえで感染翌日にPBSまたはDTを投与して感染7日目の<i>M. abs</i>の肺の菌量を比較した。isotype抗体投与群ではPBSとDTに関わらずIFN<math>\gamma</math>依存的なAM消失が起きるためPBS群とDT群で<i>M. abs</i>の菌量に有意差はなかった。一方で、anti-IFN<math>\gamma</math>抗体投与群ではPBS群ではAM消失が起こらないが、DT群では人為的なAM消失を再現できる。その際の菌量はPBS群の方がDT群よりも多かった。これはAMがIFN<math>\gamma</math>依存的に感染後に消失することが<i>M. abs</i>の感染防御に重要と示唆された。</p> <p>また、AMは成長因子のGM-CSFによって自己増殖・活性化する。AMとその消失が<i>M. abs</i>の感染防御に重要であることが明らかになったため、GM-CSFの吸入によって<i>M. abs</i>の感染を抑制できないかを調べた。GM-CSFを経鼻投与した後に<i>M. abs</i>を感染させると菌量が7倍低下した。一方で、DTを事前処理してAMを除去したCCDマウスにGM-CSFを投与しても<i>M. abs</i>の菌量の低下は確認できなかった。これによりGM-CSFがAMに作用して<i>M. abs</i>の菌量低下を引き起こしていることが明らかになった。GM-CSF投与によってCD11b<sup>+</sup>AMの割合が増加し、活性化AMの関与が示唆された。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究により、AMが<i>M. abs</i>感染防御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。特にIFN<math>\gamma</math>依存的なAMの消失が感染防御に関与すること、GM-CSFがAMを活性化して菌量を低下させることを示した。さらに、GM-CSF吸入療法の有効性とAMの関与を明確にし、AMを標的とした治療戦略の可能性を示唆した。今後、GM-CSFで活性化したAMが<i>M. abs</i>をどのように制御するかを解明する必要がある。</p> |   |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|               |     |              |     |
|---------------|-----|--------------|-----|
| (申請者氏名) 中山 裕貴 |     |              |     |
| 論文審査担当者       | (職) | 氏 名          |     |
|               | 主 査 | 大阪大学教授 山本 雅裕 | 署 名 |
|               | 副 査 | 大阪大学教授 荒瀬 尚  | 署 名 |
|               | 副 査 | 大阪大学教授 鈴木 一博 | 署 名 |

## 論文審査の結果の要旨

肺胞マクロファージ (AM) は肺の恒常性維持に不可欠であり、気道のクリアランスに働いている。しかし、既存の *in vivo* での AM 枯渇法では細胞選択性が低く、好中球や他のマクロファージや樹状細胞も除去されてしまう問題があった。この問題を解決するため、我々は新しいマウス作製技術を用いて AM を特異的に枯渇させることができるトランスジェニックマウス系統を作製した。AM に特異的な 2 つの遺伝子に紐づいた 2 つのリコンビナーゼが発現した特定の細胞でのみ蛍光蛋白とジフテリア毒素受容体を発現させることができる。こうして作製した Cx3cr1-Cre/Chil3-Flp/VeDTR マウス (CCD マウス) は AM でのみ YFP が発現していた。さらに、CCD マウスにジフテリア毒素 (DT) 投与することで AM が選択的に除去された。こうして AM 特異的に標識・枯渇可能なマウスの作製に成功した。

続いて事前に PBS または DT で AM を除去した CCD マウスに *M. abs* を感染させたときの菌量を評価した。感染 7 日目の肺は PBS 群と比べて DT 群で菌量が増加した。これは AM が *M. abs* 感染に防御的に働いていることを示唆した。また、AM の成長因子である GM-CSF を投与すると AM に作用して *M. abs* の菌量低下を引き起こしていることも明らかにした。

本研究により AM が *M. abs* 感染防御に重要な役割を果たすことがわかった。さらに、GM-CSF が AM を活性化して菌量を低下させることを示した。さらに、GM-CSF 吸入療法の有効性と AM の関与を明確にした。以上の研究は AM を標的とした治療戦略の可能性を示唆するものであり、学位に値するものと認める。