

博士論文

単球の異常増殖がサルコイドーシス  
における肉芽腫形成を誘導する

平沼 亮祐

## 目次

	p.
要旨	4
序論	
(1) 肉芽腫	5-7
(2) サルコイドーシス	8-9
(3) 細胞増殖と細胞内代謝の制御分子 mTORC1	10-12
(4) 単球・マクロファージの分化	13-16
材料と方法	17-22
結果	
(1) <i>Tsc2 Csf1r</i> Δマウスの作製とサルコイドーシス様の病態形成の確認	23-27
(2) 組織常在マクロファージと骨髄マクロファージの解析	28-31
(3) 増殖が亢進する単球・マクロファージサブセットの同定	32-35
(4) 肉芽腫形成を誘導する単球 iMO の同定	36-40
(5) CD14- iMO と単球前駆細胞における増殖の解析	41-45
(6) 肉芽腫を構成するマクロファージ gMA の同定	46-50
(7) gMA の遺伝子発現解析	51-56

(8) ヒトサルコイドーシスマクロファージと gMA の遺伝子発現比較	57-59
考察	60-71
謝辞	72
参考文献	73-81

## 要旨

サルコイドーシスは全身の臓器における異常な肉芽腫形成を特徴とする疾患である。肉芽腫はマクロファージを中心とした免疫細胞によって形成される腫瘍であるが、サルコイドーシスにおいて、どのようにして肉芽腫が形成されるのかはわかっていない。近年報告された Tsc2 のマクロファージ特異的な欠損マウスではサルコイドーシス様の肉芽腫が形成されるが、このマウスにおいてどのマクロファージサブセットが増殖し、肉芽腫を形成するのかは明らかになっていなかった。

我々は、マクロファージ特異的 Tsc2 欠損マウスで肉芽腫が形成された肺、肝臓、さらに脾臓と骨髄における単球・マクロファージを解析し、定常時骨髄にのみ局在する未成熟な単球(immature monocyte: iMO)が末梢組織にも浸潤することを明らかにした。また、iMO は骨髄だけでなく脾臓においても異常に増殖し、脾臓の iMO を野生型マウスに移植することで肉芽腫が形成された。さらに、肉芽腫が形成された組織において FACS 解析により、FSC<sup>hi</sup> SSC<sup>hi</sup> を特徴とする巨大マクロファージ(giant macrophage: gMA)を検出した。この gMA は、定常時存在するマクロファージでは発現せず、肉芽腫を構成するマクロファージに発現する SLAMF7 を発現していた。また、ヒトサルコイドーシスの病変部位の scRNAseq 解析において、gMA に類似した遺伝子発現を示すマクロファージが存在した。したがって、サルコイドーシスにおいて iMO の末梢への動員と gMA の分化が病態形成に重要である可能性が示された。

## 序論

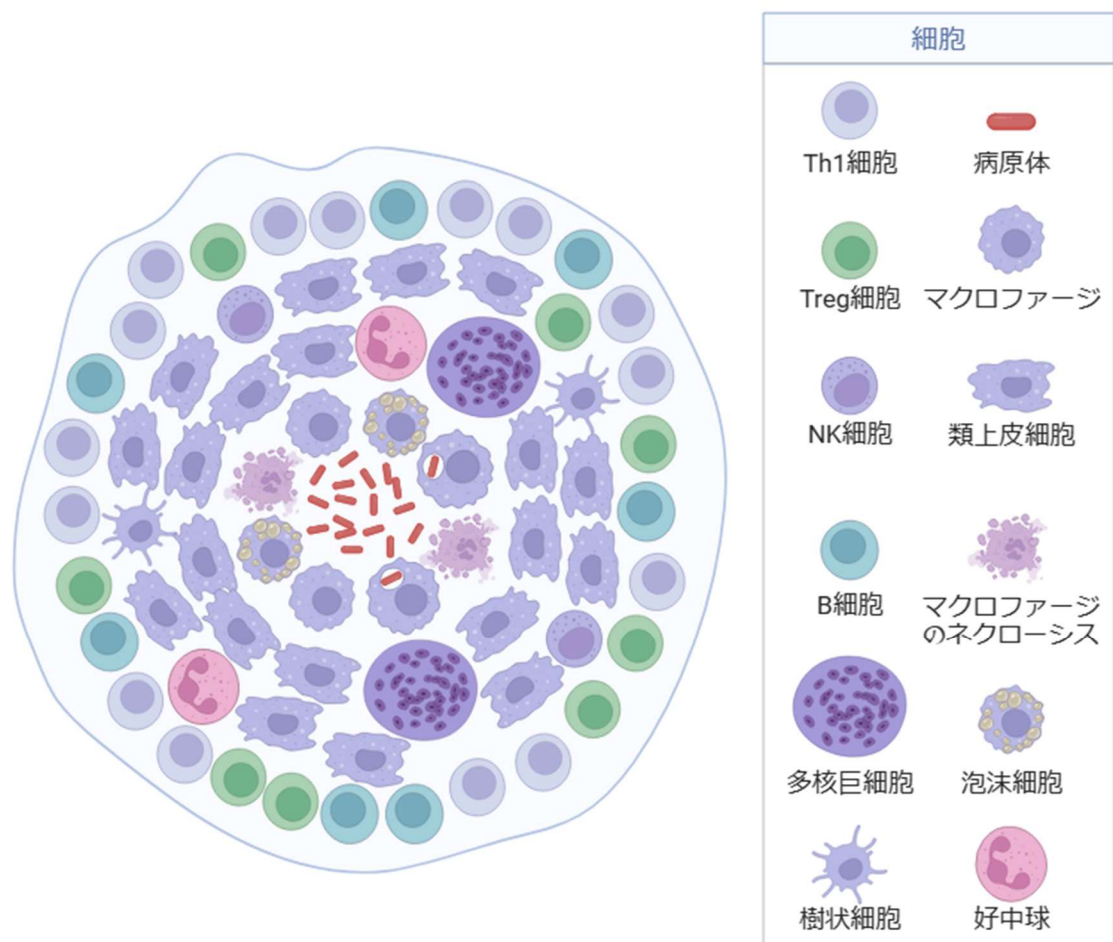
### (1) 肉芽腫

肉芽腫はマクロファージを中心として、免疫細胞によって形成される腫瘤、結節を指す<sup>1</sup> (図 1)。肉芽腫は通常、結核や住血吸虫などの病原体に対する防御応答として形成される<sup>2,3</sup>。これらの病原体に共通する特徴は、貪食細胞による食作用や分解を免れることである。マクロファージをはじめとした貪食細胞は、組織中に侵入した病原体や異物を貪食・分解することで、組織内の恒常性を保っている<sup>4</sup>。しかし、結核菌は貪食細胞による分解に抵抗性があり、貪食されてもなお細胞内で増殖し続ける<sup>5</sup>。また、住血吸虫が宿主に産み付ける卵は貪食細胞よりも大きく、物理的に貪食を免れる<sup>6</sup>。こうしたマクロファージによる貪食・分解を免れた病原体に対して、マクロファージはその病原体を封じ込めるために肉芽腫を形成する。また、肉芽腫形成を誘導するのは病原体だけではない。縫合糸などの医療器具、舗装道路のシリカなどの「異物」が組織に侵入することも、肉芽腫形成の原因となる<sup>7,8</sup>。したがって、肉芽腫は、非自己成分が継続的に存在するときに形成されると考えられるが、肉芽腫形成の分子機序は不明である。

サルコイドーシス、クローン病、ブラウ症候群などの疾患においては、感染に関係なく肉芽腫が形成される<sup>9,10</sup>。ブラウ症候群は常染色体顕性の遺伝性疾患であり、細菌の細胞壁成分を認識する病原体センサー Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2)が原因遺伝子であることが分かっている<sup>11</sup>。サルコイドーシスやクローン病で

は、遺伝要因と環境要因が複合して発症する。サルコイドーシスについては、抗原提示を司る HLA クラス II の遺伝子多型が発症に関連することが報告されている<sup>12</sup>。環境要因としては、皮膚常在菌として知られるアクネ菌の関与が報告されている<sup>13</sup>。クローン病については、オートファジーに関わる ATG16L1 やブラウ症候群の原因遺伝子である NOD2 の遺伝子多型と発症の関連が報告されている<sup>14</sup>。環境要因としては腸内細菌叢の関連が報告されており<sup>15</sup>、近年では食事の欧米化による腸内細菌叢の変化が症例数の増加と関わっていることが報告されている<sup>16</sup>。しかしながら、いずれの疾患においても肉芽腫が異常に形成されるメカニズムは詳しく明らかになっていない。

肉芽腫はその病理像によって定義されるが、肉芽腫と他の慢性炎症を隔てる特徴は成熟したマクロファージが密に集積していることである<sup>1</sup>。集積したマクロファージは高い貪食能、あるいは殺菌作用を示唆するように、細胞質が大きく、オルガネラが発達した形態的特徴が見られる<sup>1</sup>。隣接したマクロファージの細胞膜同士が密に結合した類上皮細胞<sup>17</sup>、細胞内に脂質を蓄積した泡沫細胞<sup>18</sup>、細胞同士が融合した多核巨細胞<sup>19</sup>、といった様々な形態を取ったマクロファージが肉芽腫を形成する。また結核菌の感染時には、感染したマクロファージのネクローシスによって肉芽腫の中心がチーズ様に壊死する(乾酪壊死)<sup>20</sup>(図 1)。このように肉芽腫の中心において、マクロファージは多様な応答を示すが、その応答を引き起こすようなシグナルについては明らかになっていない。



Created with BioRender.com"

図 1. 肉芽腫の構造

肉芽腫の構造の模式図。原因となる病原体を核として、マクロファージが中心に集積し細胞塊を形成する。周りにはB細胞やT細胞、好中球や樹状細胞が集まる。マクロファージは類上皮細胞、泡沫細胞、多角巨細胞といった様々な形態に分化し、病原体に感染したマクロファージではネクロシスが起こる。

## (2) サルコイドーシス

サルコイドーシスは肺、皮膚を主とし、眼、神経、心臓、腎臓、骨、消化管などのほとんどの全身臓器における乾酪壊死を伴わない肉芽腫形成を特徴とする疾患である<sup>21</sup>。特に肺、心臓、眼、神経における肉芽腫形成は各臓器の機能不全を招き、患者の予後に大きく影響する。一方で、多くの患者が治療を受けなくとも回復するなど、病状が患者によって多様で予測されづらい。サルコイドーシスの現在の治療法は副腎皮質ステロイド、あるいはメトトレキサートなどの免疫抑制剤の投与による対症療法であるが、再発症例や難治症例も多い<sup>22</sup>。発病機序を標的とした新たな治療法や、病状を予測できるバイオマーカーの探索が求められている。

サルコイドーシスの発症には性別、年齢、民族、季節、地理などの多くの要因が影響する。何らかの微生物、あるいは無機質な異物や何らかの環境因子が、遺伝的に応答しやすい素因を持つ個体に影響することでサルコイドーシスが発症すると考えられている。既述のように、HLA クラス II の遺伝子多型はサルコイドーシスの発症に関与する。サルコイドーシスにおいて形成される肉芽腫は、マクロファージと活性化した CD4 陽性ヘルパー T 細胞によって形成されることが分かっており、マクロファージの抗原提示によるヘルパー T 細胞の活性化が病態形成に関わっていると考えられている<sup>23</sup>。

病態形成の原因となる何らかの抗原に対して、最初に応答すると予想されるのはマクロファージであるが、マクロファージにおけるどのような応答がサルコイドーシスの病



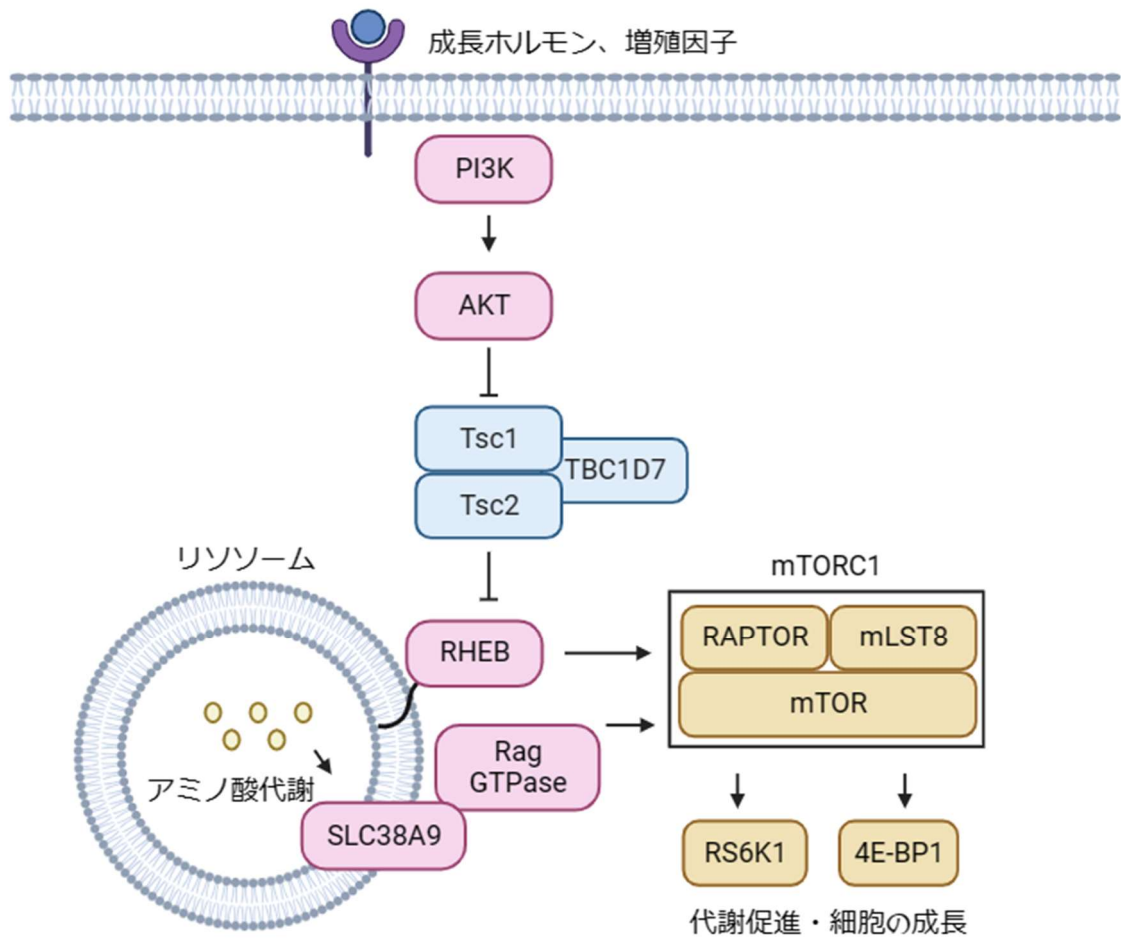
態形成を誘導するのかは分かっていない。しかし、近年マクロファージにおける mTORC1 の活性化が、肉芽腫形成に重要であることが報告された。mTORC1 の働きを抑制する Tsc2 をマクロファージ特異的に欠損した *Tsc2<sup>fl/fl</sup> Lyz2-Cre* マウスは、肺や肝臓にサルコイドーシス様の肉芽腫が形成される<sup>24</sup>。ヒトサルコイドーシスの病変部に局在するマクロファージにおいても mTORC1 の活性化が報告されており、マクロファージによる病態形成において mTORC1 の活性化が重要であることが示唆されている。しかし、マクロファージにおける mTORC1 の活性化が、どのような分子機序で肉芽腫形成に関わるのかは依然として不明である。モデルマウスにおいては、mTORC1 の活性化によるマクロファージの増殖の亢進が報告されているが、組織中に様々なマクロファージサブセットが存在する中で、どのサブセットが増殖し、どのサブセットが肉芽腫を形成しているのかは明らかになっていない。

### (3) 細胞内代謝と細胞増殖の制御分子 mTORC1

Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)は細胞内の栄養状態や、様々な受容体型チロシンキナーゼからのシグナルを統合し、細胞増殖や細胞内代謝を制御する栄養シグナルのハブである<sup>25</sup>。mTOR は regulatory-associated protein of mTOR (Raptor)、Mammalian LST8 (mLST8)と複合体(mTORC1)を形成し、細胞増殖、細胞内代謝を制御する<sup>26,27</sup>(図2)。mTORC1 はリソソーム膜状にアンカーされた GTP 結合型タンパク質 Ras homolog enriched in brain (Rheb)によって活性化される<sup>28</sup>。また Ras related GTP binding (Rag) GTPase は、mTORC1 を活性化の場であるリソソーム膜近傍へ係留する<sup>29,30</sup>。Rag GTPase はリソソーム膜状のアミノ酸トランスポーターSolute Carrier Family 38 Member 9 (SLC38A9)によって活性化される<sup>31</sup>。よって、mTORC1 の活性化はリソソーム内のアミノ酸代謝によって制御される。また、Tuberous sclerosis 1 (TSC1)、Tuberous sclerosis 2 (TSC2)、TBC 1 domain family member 7 (TBC1D7)の3つのサブユニットによって形成される Tsc 複合体は、Rheb の GTP を加水分解することで mTORC1 の働きを抑制する<sup>32-34</sup>。Tsc 複合体は、phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K)の下流で活性化する protein kinase B (PKB/Akt)によってリン酸化を受け、抑制される<sup>35</sup>。PI3K はインスリン受容体などのホルモン受容体や増殖因子受容体の下流で活性化されるため、様々なホルモン、増殖因子を細胞が受容することで mTORC1 が活性化する。mTORC1 は活性化されると ribosomal protein S6 kinase (RS6K)と eukaryotic

translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1)をリン酸化する。これによりタンパク質の翻訳が促進され、糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝が亢進することで、細胞の成長を促進する(図 2)。

mTORC1 の活性化は単球・マクロファージの分化に重要な役割を果たす<sup>36</sup>。Cre-ERT2 で Raptor を欠損させたマウスでは単球の分化が障害される。単球前駆細胞が分化できずに、より早期の分化段階である顆粒球-単球前駆細胞の蓄積が生じる。また一方で、Mx-Cre によって Tsc2 を欠損させ、mTORC1 過剰活性化を誘導したマウスでは、顆粒球-単球前駆細胞が顕著に増加し、成熟した単球も増加する。よって、mTORC1 の活性化は単球の分化を正に制御していると考えられる。しかしながら、mTORC1 の活性化によって肉芽腫形成が引き起こされる際、その形成組織におけるマクロファージ、あるいは骨髄における単球の産生がどのように変化するのかは分かっていない。



Created with BioRender.com"

図 2. mTORC1 の活性化制御機構

mTORC1 はリソソーム膜状にアンカーされている Rheb によって活性化される。アミノ酸トランスポーターSLC38a9 によって RagGTPase が活性化すると、mTORC1 を活性化の場であるリソソームにリクルートする。Rheb は Tsc 複合体による抑制を受けており、この抑制は PI3K/Akt からのシグナルによって不活性化される。成長ホルモンや増殖因子を細胞が受け取ることで、PI3K/Akt が活性化し、mTORC1 が活性化する。mTORC1 が活性化すると下流の RS6K と 4E-BP1 をリン酸化し、細胞内代謝の促進、細胞の成長を引き起こす。

#### (4) 単球・マクロファージの分化

組織内に存在するマクロファージは2つの種類のマクロファージに大別される<sup>37</sup>。一つは胎生期に分化する組織常在マクロファージ(Tissue-resident macrophage)である<sup>38</sup>。肺に存在する肺胞マクロファージ、肝臓に存在するクッパー細胞、脳に存在するミクログリア、骨に存在する破骨細胞などが例として挙げられる。これらのマクロファージは、胎生期の発生開始 8.5 日時点で Yolk sac erythro-myeloid progenitors(EMP)から pre-macrophages へと分化し、発生開始 9 日時点で組織へと移行して、組織の発達と共に組織常在マクロファージへと分化する<sup>39,40</sup>。組織マクロファージはいずれも自己増殖能を持ち、骨髄からのマクロファージ供給を必要としない。

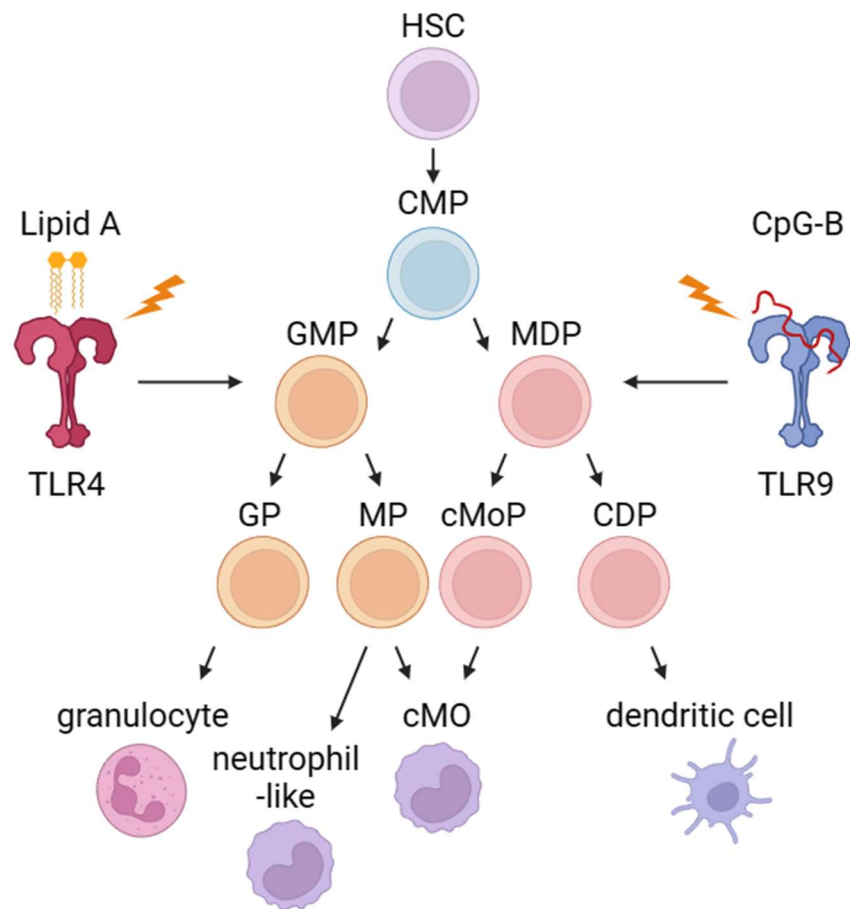
もう一つのマクロファージが骨髄由来マクロファージ(monocyte derived macrophage : mM)であり、骨髄の造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell : HSC)から供給される<sup>41</sup>(図 3)。HSC は、骨髄系共通前駆細胞(Common Myeloid Progenitor : CMP)へと分化したのち、顆粒球-単球前駆細胞(Granulocyte-monocyte progenitor : GMP)と単球-樹状細胞前駆細胞(Monocyte-dendritic cell progenitor : MDP)に分化する<sup>42,43</sup>。GMP は顆粒球前駆細胞(Granulocyte progenitor : GP)と単球前駆細胞(Monocyte progenitor : MP)に分化する<sup>44</sup>。MDP は共通樹状細胞前駆細胞(Common dendritic cell progenitor : CDP)と共通単球前駆細胞(Common monocyte progenitor : cMoP)へと分化する<sup>45,46</sup>。GMP 由来の MP と MDP 由来の cMoP は、いずれも成熟した cMO へと分化する。

cMO は血管へ移行して組織に到達し、組織内で mMMA に分化する<sup>47</sup>。GMP 由来の MP と MDP 由来の cMoP は近年まで区別されていなかったが(近年までは GMP→MDP→cMoP と分化すると考えられていた)、最近では scRNAseq 解析によって異なる遺伝子発現を示すことが分かってきている<sup>42,48</sup>。また、病原体由来の成分を認識して炎症応答を惹起する Toll-like receptor (TLR)ファミリーの活性化が、その種類によって異なる単球の分化を誘導することが報告されている<sup>42</sup>(図 3)。細菌の細胞壁を構成するリポ多糖を認識する TLR4/MD2 のリガンドである Lipid A を投与すると、GMP 由来の単球の分化が亢進する。一方で、細菌に保存されている DNA の非メチル化 CpG モチーフを認識する TLR9 のリガンドである CpG-B を投与すると、MDP による単球の分化が亢進する。また GMP から分化した MP は、好中球様の分子発現を示す制御性単球 (Neutrophil-like monocyte)を産生することが報告されており、異なる分化経路によって産生された単球がそれぞれ異なる機能的な役割を果たすことが分かりつつある<sup>42</sup>。

肉芽腫の形成においては、MDP または cMoP/MP を TLR2 のリガンドや、ウシ型結核菌(BCG)によって刺激することで、多核巨細胞が誘導されることが報告されている<sup>49</sup>。また、前駆細胞のマーカーである CD117 の発現が低く cMoP/MP より後期の分化段階と予想される inducible monocyte progenitor (iMoP)が、マウスへの BCG 投与によって末梢に増加し、多核巨細胞の形成に関わることが報告されている<sup>50</sup>。定常時末梢に存在する単球よりも未成熟な単球が、炎症時に末梢へ動員されることが近年わかってきてお

り<sup>51</sup>、こうした炎症時に見られる造血の変化が肉芽腫形成に重要である可能性が考えられる。これらのことから、サルコイドーシスにおいても、単球の分化異常が生じている可能性が考えられるが、サルコイドーシスにおける単球の分化については詳しく分かっていない。

以上のことから、本研究では、サルコイドーシス様の肉芽腫が形成されるマクロファージ特異的 Tsc2 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、肉芽腫が形成される際にどのような単球・マクロファージが増殖・分化するのかを調べ、サルコイドーシスにおける病態形成の細胞メカニズムを明らかにすることを目的とした。



Created with BioRender.com"

図 3. HSC から cMO への分化

HSC から CMP へ、CMP から GMP と MDP へ、GMP から GP と MP へ、MDP から cMoP と CDP へ、MP と cMoP から cMO へと分化する。また、MP は Neutrophil-like 単球に分化する。GP は Granulocyte、CDP は dendritic cell へと分化する。Lipid A による TLR4 の活性化は GMP 経路の単球の分化を促進し、CpG-B による TLR9 の活性化が MDP 経路の単球の分化を促進する。



## 材料と方法

### マウス

C57BL/6 *Tsc2<sup>fllox</sup>* マウスと C57BL/6 *Csf1r*-Cre Tg マウスは、The Jackson Laboratory から購入されたものを、東京大学医科学研究所山梨先生、東京大学医学系研究科饗庭先生からそれぞれ供与頂いた。マウスは医科学研究所動物センターにおいて、SPF 環境下で飼育した。

### 細胞培養

骨髄マクロファージは、大腿骨、腓骨から単離した細胞を 0.1 µg/ml M-CSF、10%FCS、2mM L-Glutamine(Gibco)、50 µM 2-ME(ナカライテスク)を含む RPMI で 5 日間培養することで誘導した。

### 試薬

EdU は東京化成工業から購入した。RPMI 1640 はナカライテスクから購入した。

以下に使用した抗体を示す。

Biolegend 社のモノクローナル抗マウス CD11b (clone M1/70)、CX3CR1 (clone SA011F11)、F4/80 (clone BM8)、NK1.1 (clone PK136)、Siglec-F (clone S17007L)、FcγRIV (clone 9E9)、Ly6C (clone HK1.4) CD3 (clone 17A2)、CD19 (clone 6D5)、

CD11c (clone N418)、 CD45.2 (clone 104)、 Tim4 (clone F31-5G3)、 CD319 (clone 4G2)、 CD200R (clone OX-110)、 CD200 (clone OX-90)、 CD49e (clone 5H10-27)、 CD51 (clone RMV-7)、 CD22 (clone OX-97)、 Mac-2 (clone M3/38)、 CD14 (clone Sa14-2) 抗体、 CD34 抗体(clone HM34)、 CD16/32 抗体(clone 93)、 CD135 抗体(clone A2/F10)、 Sca-1 抗体(clone D7)

BD Bioscience 社のモノクローナル抗マウス Ly6G (clone 1A8)、CD115 抗体(clone T38-320)、 CD117 (clone 2B8)、 TER-119 抗体(TER-119)、 Grb2 (clone 81/GRB2) 抗体

Invitrogen 社のモノクローナル抗マウス MerTK (clone DS5MMER)抗体

Cell Signaling Technology 社のモノクローナル抗 Tsc2 (clone D93F12) 抗体

The LEGENDScreen Mouse PE Kit は BioLegend 社から購入した。

## 組織染色

マウスの肺、肝臓は 20%ホルマリン緩衝液で一晩振盪して固定した。固定した臓器は

LEICA ASP 200 (Leica Microsystems 社)および LEICA EG 1150 H (Leica

Microsystems 社)を使用してパラフィン包埋した。H & E 染色および抗 F4/80 の免疫

組織化学染色は医科学研究所附属病院の病理検査室に委託した。

抗 Slamf7 および抗 Mertk の免疫組織化学染色の際には、肺、肝臓を Tissue-Tek

embedding medium (Sakura Fine Technical 社)で包埋し、凍結ブロックを作製した。

## 組織の FACS 解析

血液は EDTA 入り 2mL チューブで回収した。脾臓はスライドガラスで破碎した。骨髓は大腿骨、腓骨から 25G の針で栄養培地を噴射して細胞を取り出した。

肺、肝臓は Miltenyi Biotec 社の MACSdisociator with heater および Lung dissociation kit、Liver dissociation kit を使用して破碎し、同社の Debris Removal Solution を用いてデブリの除去を行った。上記方法で得られた細胞から BioLegend 社の RBC Lysis Buffer を用いて赤血球を溶出した。得られた細胞は anti-CD16/32 抗体(clone 95)を含む FACS buffer(2.5% FCS、0.05% NaN<sub>3</sub> PBS)に懸濁して Fc 受容体のブロッキングを 10 分間 4°Cで行い、蛍光標識された抗体を含む FACS buffer に懸濁して 15 分間 4°Cで染色した。染色した細胞を Sony Biotechnology 社の ID7000 Spectral Cell Analyzer で解析を行った。

## ウエスタンブロッティング

骨髓マクロファージをサンプルバッファー(50mM Tris-HCl, 10% Glycerol, 1% SDS, 10% 2-ME)に懸濁し、95°Cで 5 分間熱処理を行ってタンパク質溶液を得た。細胞 1×10<sup>5</sup> 個分のタンパク質溶液を SDS-PAGE で分離し、ウェット式でウエスタンブロッティングを行った。1 次抗体は Toyobo 社の Can get signal solution 1 で希釈し、2 次抗体は同社の Can get signal solution 2 で希釈した。

## 細胞増殖アッセイ

in vitro の増殖アッセイでは、組織から調製した細胞を 10  $\mu$ M EdU の存在下で 1 時間培養し、抗体染色後 BD Bioscience 社の BD Cytofix を用いて 15 分間 4°C で固定を行った。Invitrogen 社の Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit を使用して EdU の取り込みを検出した。細胞の DNA 量は同社の Fx cycle violet を用いて検出した。

in vivo の増殖アッセイでは、PBS に溶解した EdU を 3 mg 分マウスに静脈内投与し、3 時間後に組織を取り出して Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit で EdU の取り込みを検出した。

## セルソーティング

BD Bioscience 社の FACS AriaIII Cell Sorter を用いてセルソーティングを行った。脾臓の cMO および iMO のソーティングは、脾臓細胞を、抗 CD3 (clone 17A2)、抗 CD19 (clone 6D5)、抗 NK1.1 (clone PK136)、抗 Ly6G (clone aA8)、抗 TER-119/erythroid cells (clone Ter-119) 抗体で 10 分間処理し、Miltenyi 社のストレプトアビジンマイクロビーズを用いて 15 分間 4°C で処理後、同社の autoMACS でラベルした細胞を除去した。得られた細胞は CD45.2, F4/80, CD11b, Ly6C, CD16.2, Cx3cr1, NK1.1, Ly6G, Siglec-F と Slamf7 抗体で染色し、CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> Siglec-F<sup>-</sup>

Ly6C<sup>hi</sup> CX3CR1<sup>lo</sup> iMO と CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> Siglec-F<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> CX3CR1<sup>hi</sup> cMO、  
CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> Siglec-F<sup>-</sup> Ly6C<sup>lo</sup> FcγRIV<sup>hi</sup> mMA、CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> Siglec-  
F<sup>-</sup> Ly6C<sup>lo</sup> FcγRIV<sup>hi</sup> SLAMF7<sup>hi</sup> gMA をソーティングした。

## 骨髄移植

6~7 週齢の C57BL/6 野生型マウスを MBR-1520R-4 (Hitachi Power Solutions 社)を用  
いて  $4.75 \times 2$  Gy 放射線照射し、*Tsc2*<sup>fl/fl</sup> マウスと *Tsc2* *Csf1r*Δ マウスの骨髄細胞を  
 $1 \times 10^6$  個静脈注射した。また、*Tsc2* *Csf1r*Δ マウスの iMO および cMO の移植は、セ  
ルソーティングした細胞  $5 \times 10^5$  個を野生型マウスの骨髄細胞  $5 \times 10^5$  個と混合して放  
射線照射した野生型マウスに静脈注射した。

## RNAseq

セルソーティングした細胞の RNA を RNeasy Mini Kits (Qiagen) を用いて精製し  
た。RNA のクオリティーは Agilent Bioanalyzer (Agilent Technology)を用いて計測  
し、RIN 値が 7.0 以上になることを確認した。東京大学医科学研究所山口先生のご協  
力の下、RNA-seq ライブラリーを Ampliseq Transcriptome Mouse Gene Expression  
kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて調製した。ライブラリーは Ion Hi-Q  
sequencing 200 kit と PI chip v3 (Thermo Fisher Scientific)を用いて、1,000,000 リー

ド以上、100bp、シングルエンドでシーケンスを行った。得られたリードから、Torrelant Suite Software の AmpliSeqRNA plug-in v5.2.0.3 (Thermo Fisher Scientific) を用いて FASTQ ファイルを生成した。FASTQ ファイルから Trimmomatic、STAR、RSEM パッケージを用いて発現量を導出し、TCC-GUI ソフトウェアを使って DESeq2 モデルによる発現変動解析を行った。Fold change $>2^{1.5}$  かつ  $P<0.05$  である遺伝子を有意に変動している遺伝子として同定した。ヒートマップは TCC-GUI ソフトウェアを用いて生成した。GSEA による変動しているパスウェイの同定は、GSEA 4.1.0 の MSigDB KEGG 遺伝子セットを用いて行い、 $FDR<0.1$  となるパスウェイを変動しているパスウェイとした。転写因子の活性化予測はウェブツールの EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)における ARCHS4 Coexp を使用した。

### scRNAseq 解析データの再解析

R v4.1.0 の Seurat パッケージを使用して、京都大学中溝先生、梶島先生らが報告したヒトサルコイドーシスの single cell RNA-seq のデータ (GSE234901)を解析した。

### 統計処理

2 群間の有意差検定はスチューデント t 検定により行った。エラーバーは標準誤差とした。

## 結果

### (1) *Tsc2 Csf1r*Δマウスの作製とサルコイドーシス様の病態形成の確認

先行研究では、*Lyz2*-Cre ドライバーを用いて *Tsc2* の欠損を誘導していた。しかし、*Lyz2*-Cre は脾臓のマクロファージで Cre リコンビナーゼの発現効率が 40% となるなど、組織によっては高効率に遺伝子欠損を誘導できない<sup>52</sup>。一方で、*Csf1r*-Cre ドライバーは肝臓、腸管、心臓、腎臓、筋肉などの広範な組織のマクロファージにおいて高効率に遺伝子欠損を誘導できることが分かっている<sup>52</sup>。そこで、単球・マクロファージにおける *Tsc2* を *Csf1r*-Cre ドライバーを用いて欠損させた。*Tsc2*<sup>flx/flx</sup> マウス(以下 *Tsc2* fl/fl マウス)と *Csf1r*-Cre Tg マウスを交配し、*Tsc2*<sup>flx/flx</sup> *Csf1r*-Cre Tg (以下 *Tsc2 Csf1r*Δマウス)を作製した。骨髓からマクロファージを誘導し、ウェスタンブロッティングを行うと、*Tsc2 Csf1r*Δマウスのマクロファージにおける *Tsc2* の欠損が確認できた(図 4)。さらに、8~9 週齢の *Tsc2 Csf1r*Δマウスの肺、肝臓の組織染色を行うと、H&E 染色および抗 F4/80 の免疫組織化学染色により、マクロファージによって形成される細胞塊の形成、すなわち肉芽腫の形成が確認できた(図 5a,b)。これは、先行研究で報告された *Tsc2*<sup>fl/fl</sup> *Lyz2*-Cre (*Tsc2 Lyz2*Δ) マウスにおける病態形成よりも早期であり、実際に 3 カ月齢の *Tsc2 Lyz2*Δマウスの肺、肝臓を H&E 染色すると、*Tsc2 Csf1r*Δマウスよりも弱い細胞浸潤が確認された(図 5c)。よって、*Csf1r*-Cre による高効率な *Tsc2* の欠損が病態を悪化させることが示唆された。また、病変は

肺では気道周囲や血管周囲、肝臓では門脈三つ組みの周囲に形成され、血行性にマクロファージが浸潤している可能性が考えられた。

先行研究において、*Tsc2* *Lyz2*  $\Delta$  マウスにおける病態形成が mTORC1 依存性であることが確認されている。*Tsc2* *Csf1r*  $\Delta$  においても、病態形成が同様に mTORC1 依存性であることを確かめるべく、mTORC1 の阻害剤である Rapamycin を生後 5 週から 4 週間投与し、病態形成が改善されるのかを確認した。Rapamycin の投与によって肺、肝臓における病態形成が改善され、mTORC1 依存性であることが確認できた(図 6)。



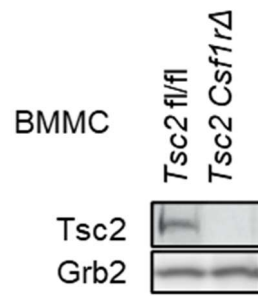


図 4. 骨髄マクロファージにおける Tsc2 の欠損

*Tsc2*fl/fl マウス、*Tsc2 Csf1rΔ*マウスの骨髄から誘導したマクロファージ(BMMC)のウエスタンブロット。Tsc2 および Grb2 をブロットした。

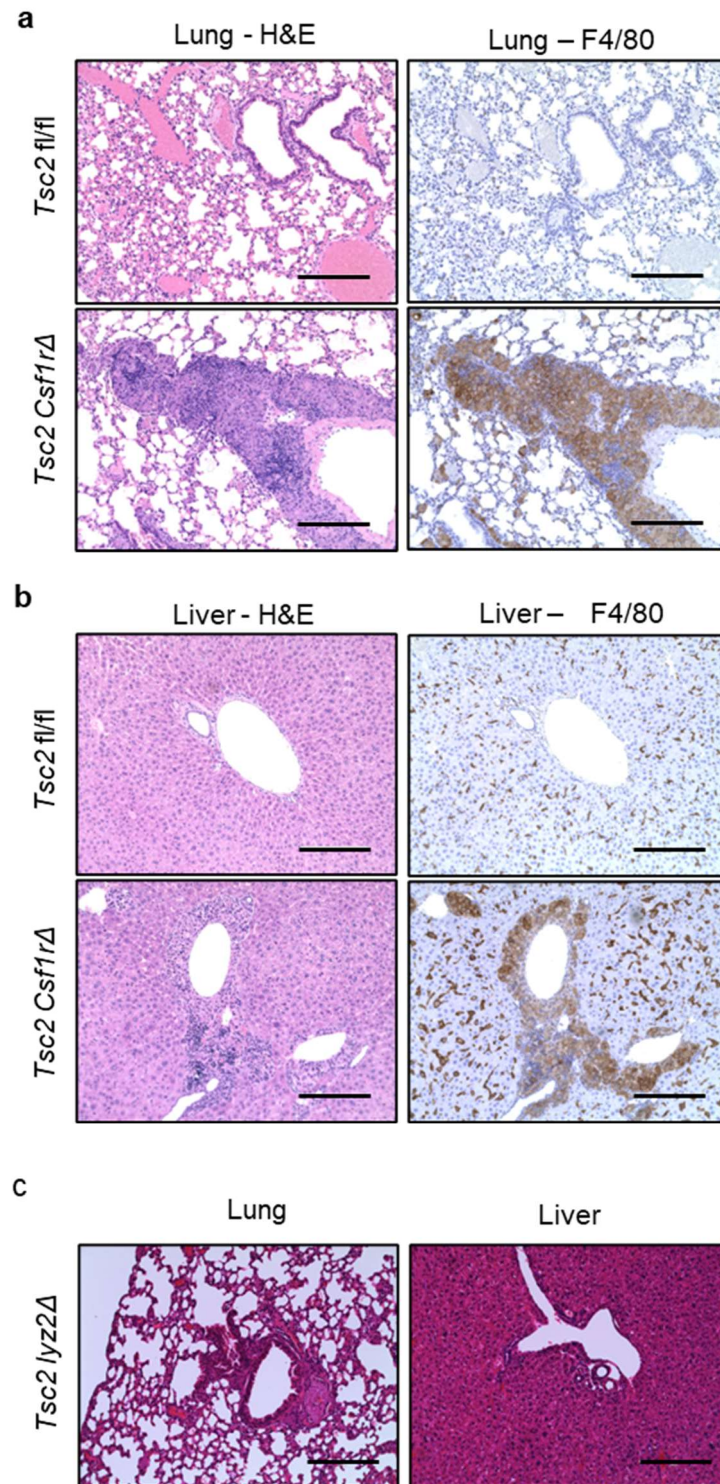


図 5. *Tsc2 Csf1rΔ*マウスにおける肉芽腫の形成

a,b *Tsc2 fl/fl* マウス、*Tsc2 Csf1rΔ*マウスの肺(Lung)、肝臓(Liver)の H&E 染色と抗 F4/80 の免疫組織化学染色。c *Tsc2 Lyz2Δ*マウスの肺、肝臓の H&E 染色。スケールバーは 250 μm を示す。

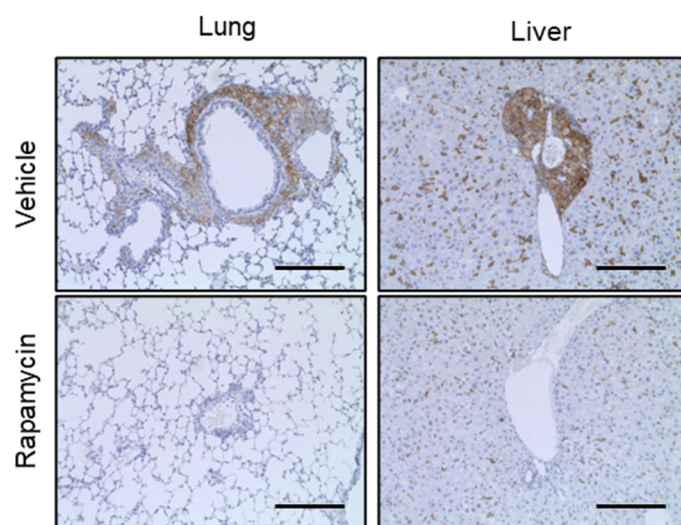


図 6. *Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスへの Rapamycin 投与の病変形成への影響  
 5% DMSO (Vehicle) および 5mg/kg Rapamycin を腹腔内投与した *Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスに  
 おける、肺 (Lung)、肝臓 (Liver) の抗 F4/80 の免疫組織化学染色。スケールバーは 250  
 $\mu$ m を示す。

## (2) 組織常在マクロファージと骨髄マクロファージの解析

次に、増加したマクロファージが、組織常在マクロファージと骨髄マクロファージのどちらであるのかを検討した。肺の組織常在マクロファージである肺胞マクロファージ(alveolar mac)は、FACS 解析では Siglec-F と F4/80 の発現で区別できる<sup>53</sup> (図 7a)。骨髄由来のマクロファージは CD11b 高発現の細胞で、NK 細胞(NK1.1+)、好中球(Ly6G+)、好酸球(Siglec-F+)を除くことで区別できる(図 7a)。 *Tsc2* fl/fl マウスと *Tsc2* *Csf1r* Δマウスの肺におけるマクロファージの割合を調べると、 *Tsc2* *Csf1r* Δマウスでは肺胞マクロファージが減少し、骨髄マクロファージが増加していた(図 7b)。一方、肝臓では組織常在マクロファージであるクッパー細胞(Kupffer)を Tim-4 と F4/80 の発現で区別できる<sup>54</sup> (図 7c)。肝臓においても、 *Tsc2* *Csf1r* Δマウスではクッパー細胞が減少し、骨髄マクロファージが増加していた(図 7d)。さらに骨髄マクロファージの増加は *Tsc2* *Csf1r* Δマウスの脾臓、末梢血、骨髄においても認められ、脾臓における組織常在マクロファージである赤脾髄マクロファージ (red pulp mac)には変化が見られなかった<sup>55</sup>(図 7 e,f,g)。骨髄マクロファージが肉芽腫を形成することを確認するため、放射線照射した野生型マウスに *Tsc2* fl/fl マウスと *Tsc2* *Csf1r* Δマウスの骨髄細胞を移植した。 *Tsc2* *Csf1r* Δマウスの骨髄移植によってのみ肉芽腫形成が再現され、骨髄マクロファージが肉芽腫を形成することが示された (図 8a)。また、 *Tsc2* *Csf1r* Δ

マウスの骨髄を移植したマウスは脾臓の CD11b 陽性の骨髄マクロファージが増加していることが確認できた(図 8b)。

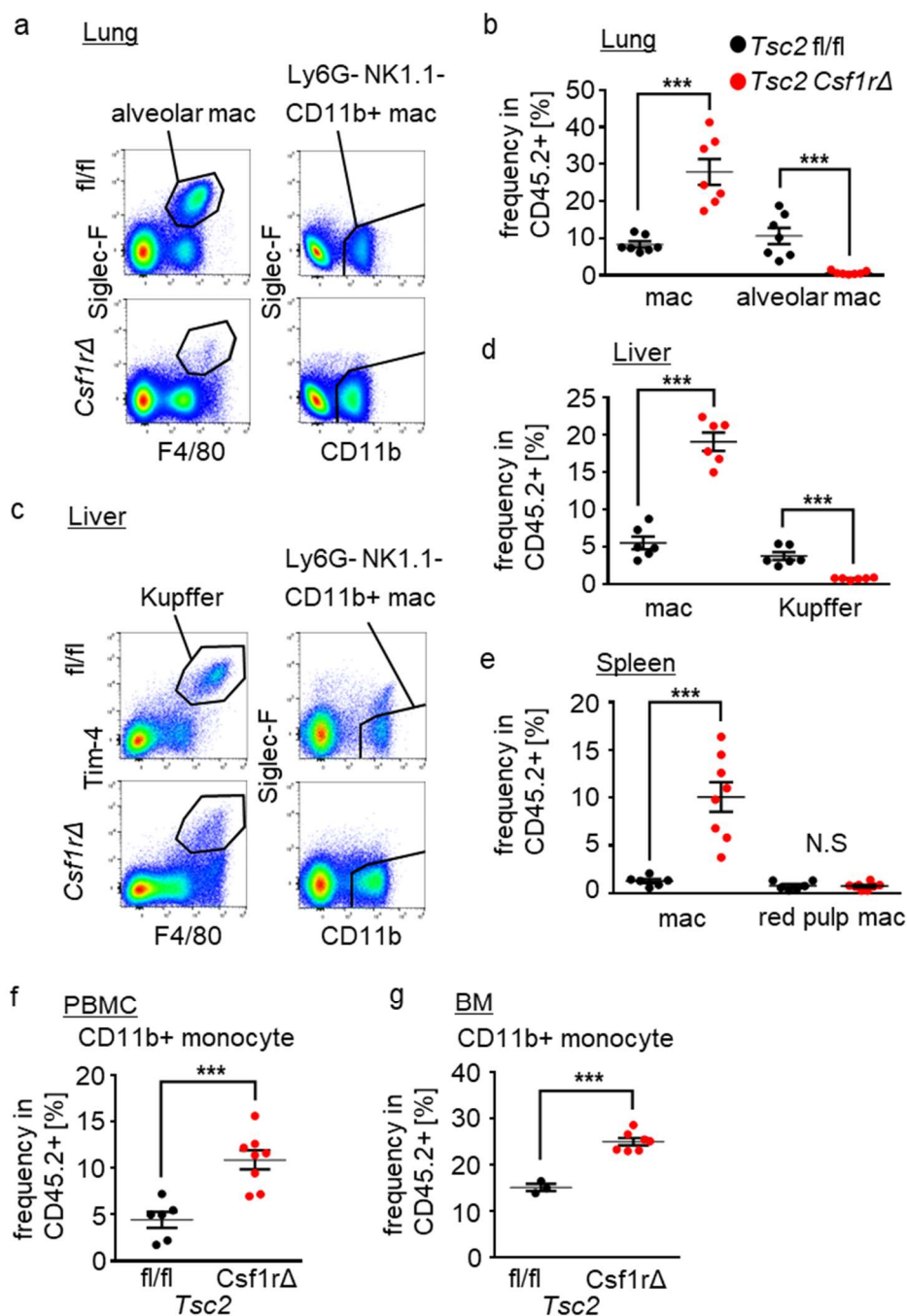


図 7. 組織常在マクロファージの減少と骨髄マクロファージの増加

a,c *Tsc2* fl/fl マウス、*Tsc2* *Csf1r*Δマウスの肺、肝臓の FACS 解析。F4/80 と Siglec-F の展開が肺胞マクロファージ(alveolar mac)を、F4/80 と Tim-4 の展開がクッパー細胞(Kupffer)を、Ly6G- NK1.1-の細胞における CD11b と Siglec-F の展開が骨髄由来単球・マクロファージ(CD11b+ mac)を表す。b,d,e,f,g 肺、肝臓、脾臓、骨髄、末梢血、骨髄における組織常在マクロファージと骨髄由来マクロファージの免疫細胞における割合。

\*\*\* $P < 0.001$



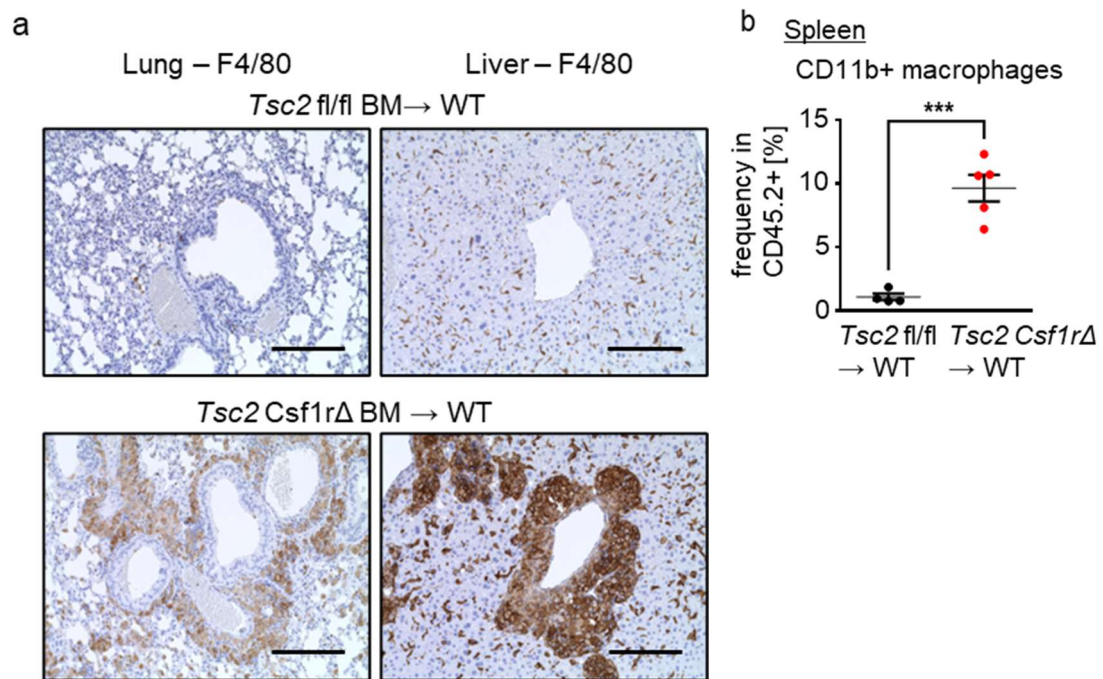


図 8. 骨髄移植による病態の形成

a. *Tsc2* fl/fl マウス、*Tsc2* *Csf1r*Δマウスの骨髄細胞を移植した野生型マウスの肺、肝臓の組織染色。b. *Tsc2* fl/fl マウス、*Tsc2* *Csf1r*Δマウスの骨髄細胞を移植した野生型マウスの脾臓における骨髄由来マクロファージの割合。\*\*\* $P < 0.001$

### (3) 増殖が亢進する単球・マクロファージサブセットの同定

次に、*Tsc2 Csf1r*Δマウスにおいて、骨髓由来の単球・マクロファージがどの分化段階で増加しているのかを調べた。骨髓で増殖する CX3CR1<sup>low</sup> Ly6C<sup>mid</sup> の未成熟な単球 immature monocyte(iMO)、iMO から成熟して Ly6C<sup>high</sup> CX3CR1<sup>high</sup> となり、血中へと移行する classical monocyte(cMO)、cMO が組織に移行して分化し、FcγRIV を発現する Ly6C<sup>lo</sup> FcγRIV<sup>high</sup> の monocyte derived macrophage(mMA)について、骨髓、脾臓、肺、肝臓で解析を行った。定常時 iMO が存在する骨髓においては、*Tsc2 Csf1r*Δマウスで iMO のみが増加し、cMO、mMA の増加は見られなかった(図 9a,b)。一方で、脾臓、肺、肝臓においては、定常時ほとんど存在しない iMO の増加が見られ、さらにそこから分化したと予想される cMO、mMA の増加が見られた(図 9c,d,e)。

これらの単球・マクロファージの増加がどのように引き起こされるのかを調べるため、それぞれのサブセットにおける細胞増殖を定量した。チミジンアナログである EdU の存在下で各組織から調製した細胞を 1 時間培養し、EdU の取り込みと DNA 量から単球・マクロファージの細胞周期を調べた(図 10a)。骨髓、脾臓、肝臓、肺において、S 期の iMO および cMO が増加していることが分かった(図 10b,c,d,e)。一方で、mMA ではどの臓器においても S 期の細胞の増加は見られなかった。また、*Tsc2 fl/fl* マウスでは骨髓において iMO と cMO が顕著に増殖していたが、*Tsc2 Csf1r*Δマ



ウスでは骨髓だけでなく脾臓においても、iMO と cMO が顕著に増殖していた(図 10c)。

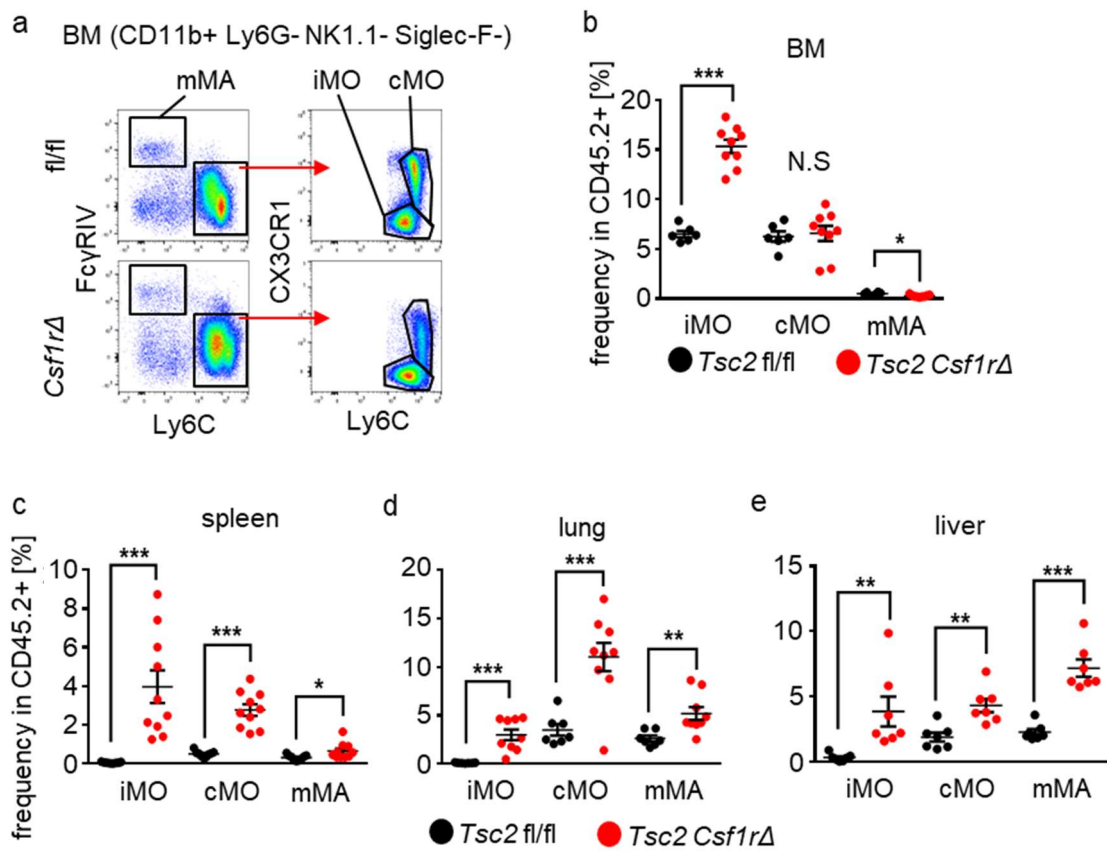


図 9. 組織における単球・マクロファージサブセットの増加

a. 骨髄における CD11b 陽性単球・マクロファージの Ly6C と FcγRIV の展開、それぞれ iMO、cMO、mMA を表す。 b,c,d,e 骨髄、脾臓、肺、肝臓における iMO、cMO、mMA の免疫細胞中の割合。 \*\*\* $P < 0.001$  \*\* $P < 0.01$  \* $P < 0.05$

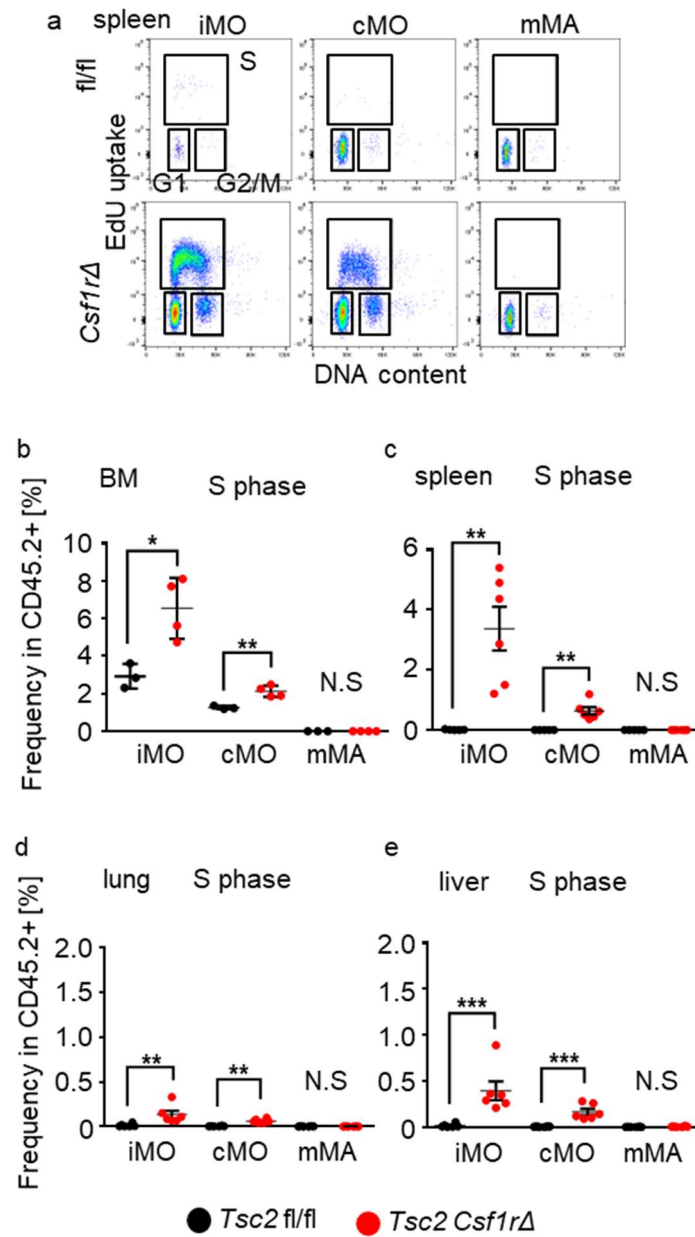


図 10. 単球・マクロファージサブセットにおける細胞増殖の亢進

a. 脾臓における iMO、cMO、mMA の EdU の取り込みと DNA 量の展開。それぞれ G1 期、G2/M 期、S 期を示す。b,c,d,e 骨髄、脾臓、肺、肝臓における S 期の iMO、cMO、mMA の免疫細胞中の割合。\*\*\* $P < 0.001$  \*\* $P < 0.01$  \* $P < 0.05$

#### (4) 肉芽腫形成を誘導する単球 iMO の同定

iMO および cMO において顕著な細胞増殖の亢進が認められたため、これらの細胞が肉芽腫形成を誘導するのかを調べた。*Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスで顕著に増殖が亢進した脾臓の iMO および cMO をセルソーティングし、野生型マウスの骨髄と混合して放射線照射した野生型マウスに移植した(図 11a)。移植したマウスの肺、肝臓の組織染色を行うと、cMO の移植では病態形成が再現できなかったが、iMO の移植では F4/80 陽性の肉芽腫の形成が再現された(図 11b)。したがって、iMO が肉芽腫形成の原因となっていることが示唆された。

iMO の *Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスにおける変化を調べるため、RNAseq により遺伝子発現の変化を解析した。野生型マウスの骨髄の iMO と *Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスの脾臓の iMO を比較すると、*Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスの iMO では 296 個の遺伝子が高く、639 個の遺伝子が低く発現していた(図 12a)。これらの発現変動遺伝子を用いて、GSEA により *Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスの iMO で活性化されているパスウェイを調べると、Myc targets V2、E2F Targets、Mitotic spindle がエンリッチされることが分かった(図 12b)。これらのパスウェイはいずれも細胞増殖の経路であり、遺伝子発現からも *Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスの iMO における細胞増殖の亢進が示された。以上のことから、*Tsc2 Csf1r* $\Delta$ マウスでは iMO における細胞増殖の亢進が、肉芽腫形成の原因となっていることが示唆された。一方で、野生型マウスの iMO においては TNF- $\alpha$  Signaling、Heme metabolism

がエンリッチされていた(図 12b)。 *Tsc2 Csf1r*Δマウスで炎症応答の変化が見られる可能性が生じたため、 *Tsc2 Csf1r*Δマウスの脾臓細胞を TLR4/MD-2 リガンドである Lipid A で刺激して炎症性サイトカインである IL-6 の産生を FACS で調べた(図 13)。

*Tsc2 Csf1r*Δマウスの cMO において IL-6 産生の強い亢進が見られ、一方で mMA においては *Tsc2*fl/flマウスと *Tsc2 Csf1r*Δの両方で IL-6 の産生が見られたものの、亢進は見られなかった。また、iMO では IL-6 の産生は見られなかった。したがって、 *Tsc2 Csf1r*Δマウスでは、強い増殖の亢進が iMO で生じる一方で、炎症誘導能の亢進が cMO において起こることが分かった。

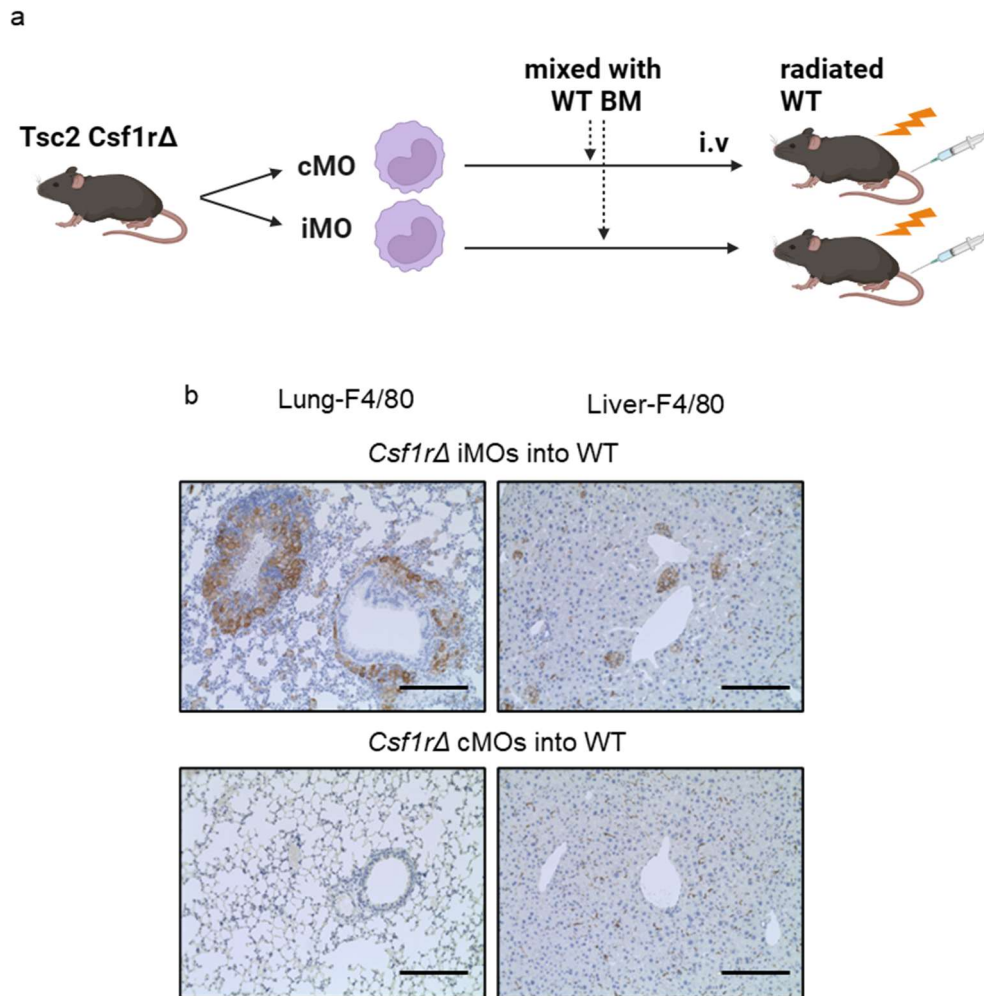


図 11. 単球・マクロファージサブセットにおける細胞増殖の亢進

a. *Tsc2 CsflrΔ*マウスの iMO および cMO の移植実験の模式図。 *Tsc2 CsflrΔ*マウスの iMO と cMO をセルソーティングし、野生型マウスの骨髄細胞と混合して放射線照射した野生型マウスへ移植した。 b. *Tsc2 CsflrΔ*マウスの iMO または cMO を移植した野生型マウスの肺、肝臓の抗 F4/80 の免疫染色。スケールバーは 250  $\mu$ m を示す。

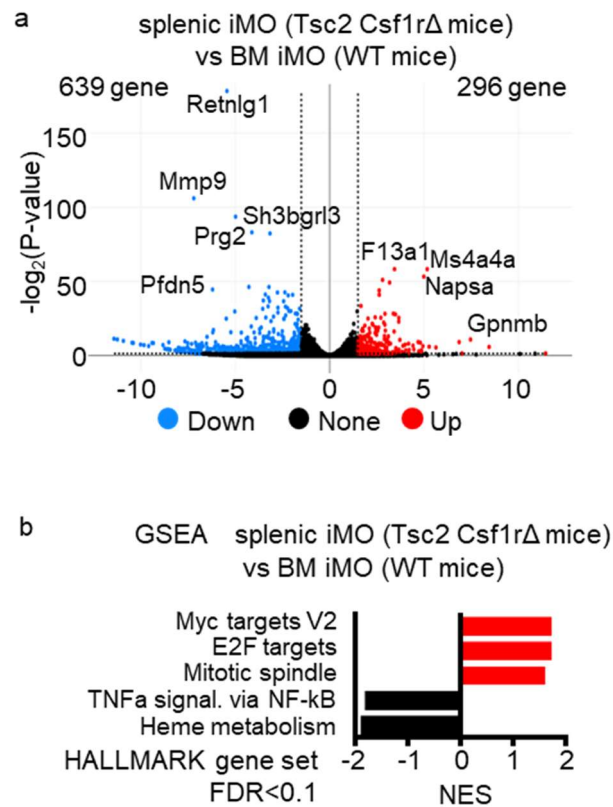


図 12. iMO の遺伝子発現変動解析

a. 野生型マウスの骨髄の iMO と *Tsc2 CsflrΔ* マウスの脾臓の iMO の RNAseq から得られた発現変動遺伝子。2<sup>1.5</sup> 以上または以下に発現が変動しており  $p < 0.05$  の遺伝子がそれぞれ 296 個と 639 個存在した。b. GSEA により同定された HALLMARK 遺伝子セットにおいて  $FDR < 0.1$  となるパスウェイ。 *Tsc2 CsflrΔ* マウスの iMO でエンリッチされているパスウェイを赤、野生型マウスの iMO でエンリッチされているパスウェイを黒で示す。

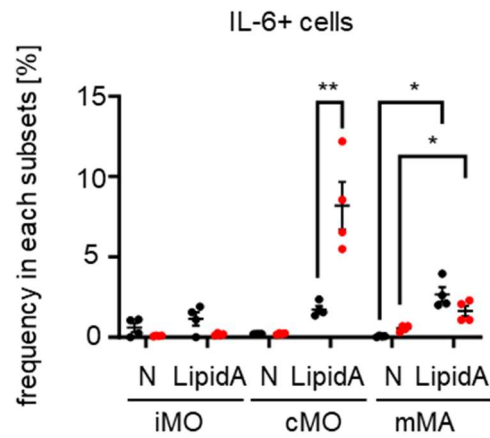


図 13. 脾臓の単球・マクロファージにおけるサイトカイン産生

*Tsc2* fl/fl マウスと *Tsc2* *Csf1r* Δ マウスの脾臓細胞における IL-6 産生細胞の割合。脾臓細胞を Brefeldin A 5μg/mL の存在下および、Lipid A 1μg/mL の存在下で培養後、細胞内の IL-6 を検出した。\*\* $P<0.01$  \* $P<0.05$



#### (5) CD14- iMO と単球前駆細胞における増殖の解析

iMO は *Tsc2 Csf1r*Δマウスの肺や肝臓においても増加が見られたが、脾臓や骨髄の iMO と比較して、増殖が弱かった。我々は iMO の成熟が組織へと移行する間に変化しているのではないかと考え、cMO と iMO を含む画分を単球の分化マーカーである CD14 で染色した。まず、*Tsc2*fl/fl マウスの骨髄では、Ly6C<sup>mid</sup> の iMO は CX3CR1 の発現が一様に低くなるが(図 14a)、CD14 の場合には CD14<sup>+</sup> iMO と CD14<sup>-</sup> iMO が存在した(図 14b,c)。一方で *Tsc2 Csf1r*Δマウスの骨髄や脾臓の iMO は、ほとんどが CD14<sup>-</sup> iMO であり、より未成熟な iMO が増加している可能性が示唆された(図 14b,c)。一方で、肺、肝臓においては、CD14<sup>-</sup> iMO は CX3CR1<sup>lo</sup> で定義される iMO の数よりも少なく、脾臓や骨髄よりも成熟した CD14<sup>+</sup> の iMO となっていることが分かった(図 14b,c)。

*Tsc2 Csf1r*Δマウスの骨髄、脾臓の iMO が野生型マウスの iMO よりも未成熟であったことから、我々は *Tsc2 Csf1r*Δマウスの単球前駆細胞にも目を向けた。BCG 投与によって誘導されることが報告されている iMoP<sup>50</sup>、単球のみに分化する前駆細胞である cMoP/MP、MP より早期の分化段階である GMP、GMP より早期の分化段階である CMP が、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの脾臓で増加していることが分かった(図 15a,b,c、図 16a)。一方で、骨髄においてはこれらの前駆細胞の顕著な増加は認められなかった(図 16b)。さらに、前駆細胞と CD14<sup>-</sup> iMO における細胞増殖の亢進を、CD115 の染色に

常時氷冷を必要とすることから、EdU をマウスに直接投与することで調べた。脾臓では EdU を取り込んだ iMoP、cMoP/MP、GMP、CMP が増加していた。しかし、脾臓内で最も顕著に増殖している未成熟な Myeloid 系細胞は CD14- iMO であった(図 16c)。また、骨髄においても最も顕著に増殖していたのは CD14- iMO であり、前駆細胞における細胞増殖の亢進は cMoP/MP を除いて確認できなかった。以上のことから、*Tsc2 Csf1r*Δマウスでは、単球前駆細胞の段階から細胞増殖の亢進が脾臓において異所性に認められたが、最も顕著に増殖している細胞は CD14- iMO であることが分かった。

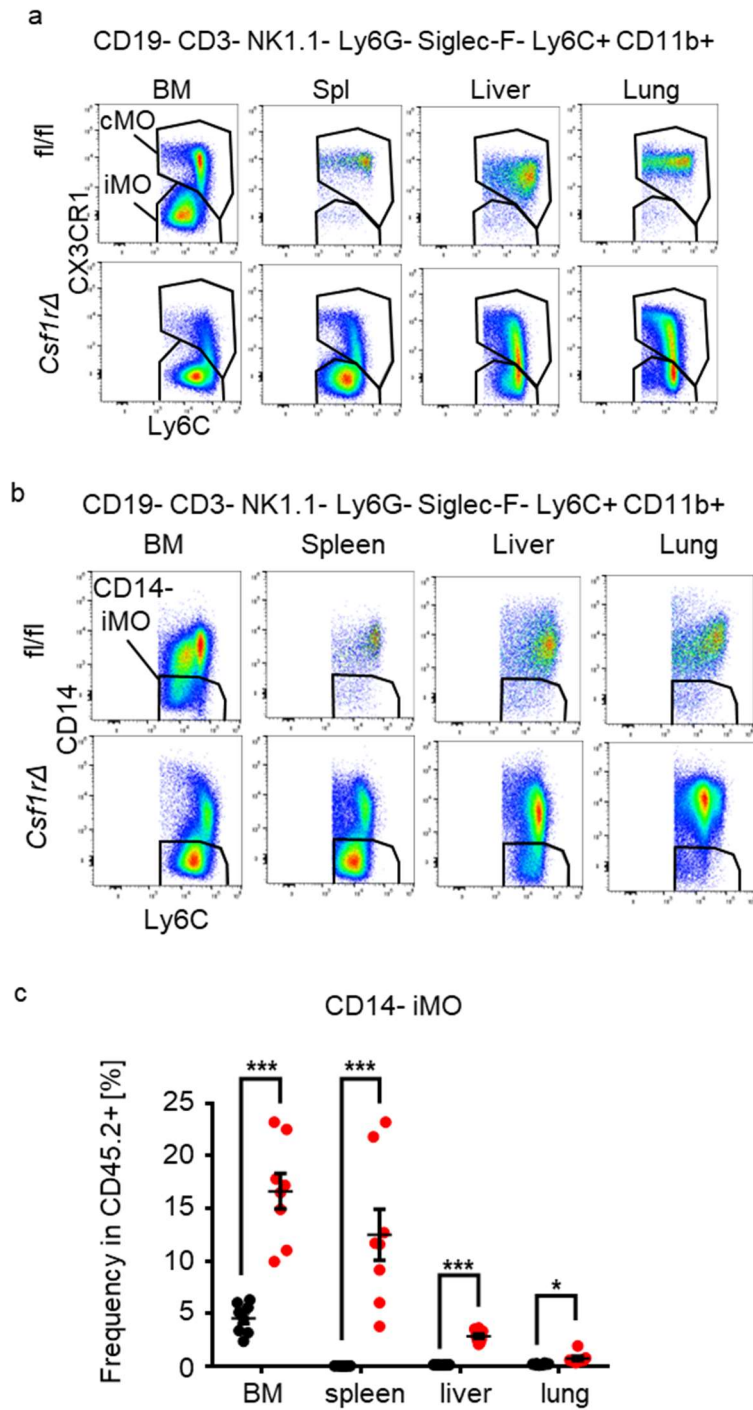


図 12. iMO と cMO の分化マーカーの染色

a,b *Tsc2* fl/fl マウスと *Tsc2* *Csf1r*Δマウスの骨髄、脾臓、肝臓、肺における cMO と iMO の Ly6C と CX3CR1 の展開(a)および Ly6C と CD14 の展開(b)。c, CD14- iMO の免疫細胞中の割合。\*\*\* $P < 0.001$  \* $P < 0.05$

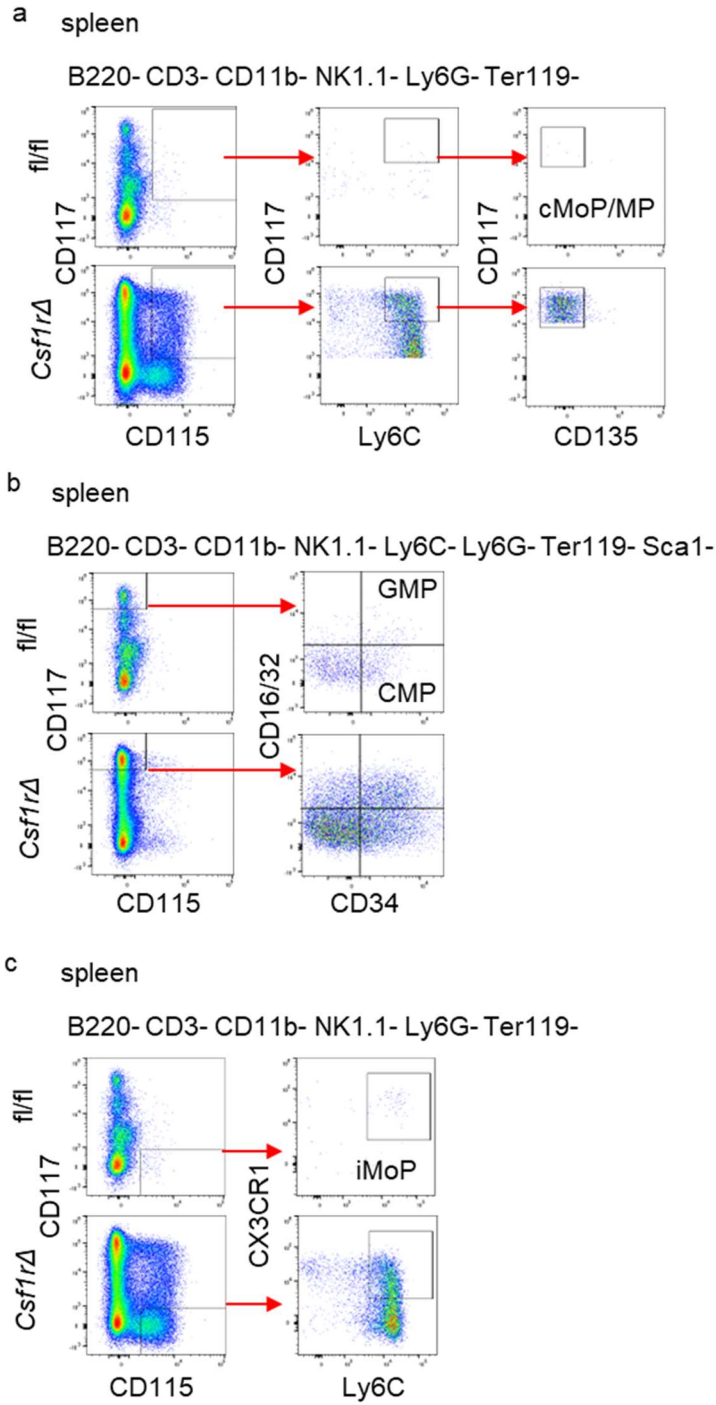


図 15. 脾臓における単球前駆細胞の染色

a, *Tsc2* fl/fl マウスと *Tsc2* *Csf1r*Δマウスの脾臓における cMoP/MP の展開。Lin-の細胞から CD117<sup>hi</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>-</sup>の細胞を展開した。b, 脾臓における GMP、CMP の展開。Lin-の細胞から、CD117<sup>hi</sup>CD34<sup>+</sup> CD16/32<sup>+</sup>の GMP、CD117<sup>hi</sup>CD34<sup>+</sup> CD16/32<sup>-</sup>の CMP を展開した。c, 脾臓における iMoP の展開。Lin-の細胞から、CD117<sup>hi</sup>- CD115<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup>の細胞を展開した。

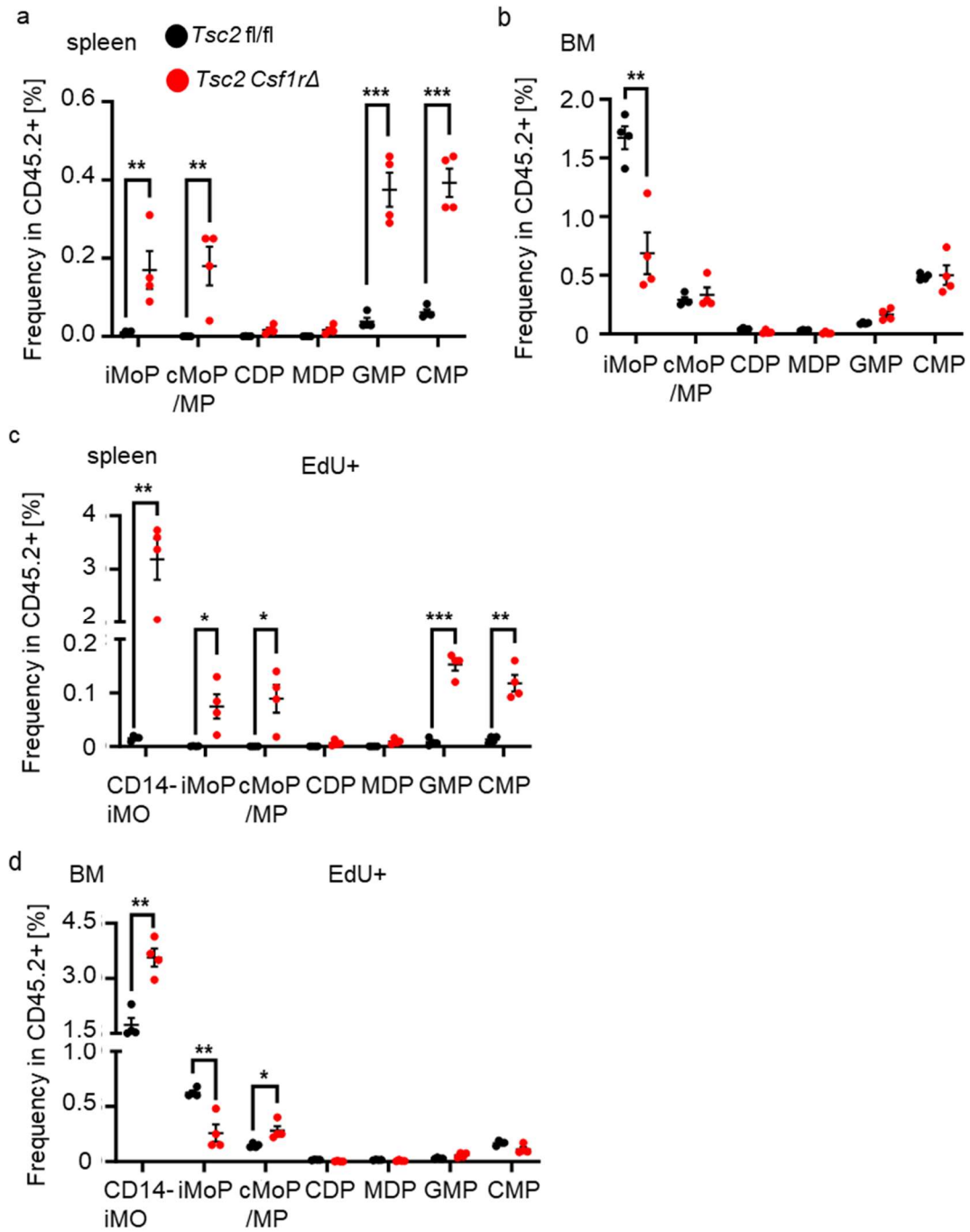


図 16. *Tsc2 Csf1rΔ* マウスにおける前駆細胞の増加と細胞増殖の亢進

a, b *Tsc2 fl/fl* マウスと *Tsc2 Csf1rΔ* マウスの脾臓(a)と骨髄(b)における iMoP、cMoP/MP、CDP、MDP、GMP、CMP の免疫細胞中の割合。c, d 脾臓と骨髄の CD14-iMO、iMoP、cMoP/MP、CDP、MDP、GMP、CMP における EdU+ の細胞の免疫細胞中の割合。\*\*\* $P < 0.001$  \*\* $P < 0.01$  \* $P < 0.05$

#### (6) 肉芽腫を構成するマクロファージ gMA の同定

次に我々は肉芽腫を構成するマクロファージの同定を試みた。序論で述べたように、肉芽腫を構成するマクロファージは細胞質が大きくオルガネラが発達した形態に変化する。我々は、肉芽腫を構成するマクロファージサブセットを FACS 解析によって FSC と SSC がともに高いマクロファージとして検出できるのではないかと考えた。肺組織において、iMO、cMO、mMA の画分を FSC-SSC で展開すると、*Tsc2 Csf1r*Δマウスでは mMA の画分に FSC と SSC が高いマクロファージが存在していることが分かった。我々は、この画分を Giant Macrophage (gMA) と定義し、肉芽腫を形成するマクロファージであるのかどうかを解析した(図 17a)。

まず、gMA が mMA と比較して特異的に発現する分子を探索した。275 種の表面分子を染色する抗体アレイによって、gMA に高発現な分子を同定した。gMA では、貪食に関わる受容体である MerTK、接着に関わる分子である CD49e、SLAMF7、CD51、抑制性シグナルを伝達する受容体とそのリガンドである CD200R、CD200、CD22 が mMA と比較して強く発現していることがわかった(図 17b)。また、mMA では CX3CR1 が発現するが、gMA では CX3CR1 の発現が消失していた(図 17b)。gMA が肉芽腫を構成している細胞であることを確かめるため、同定したマーカーである MerTK と SLAMF7 の免疫組織化学染色を肺と肝臓で行った(図 18a,b)。*Tsc2 Csf1r*Δマウスの病変部を構成マクロファージは MerTK と SLAMF7 を発現することが分かり、gMA が肉芽腫を構

成するマクロファージであることが示唆された。

さらに、同定したマーカーを用いて、それぞれの組織における gMA の割合を調べた。F4/80 陽性のマクロファージの中で、SLAMF7 高発現で FSC<sup>hi</sup> となるマクロファージは肝臓、次いで肺と骨髄、脾臓の順に多く存在することが分かった(図 19)。よって gMA への分化の程度は組織によって異なることが示唆された。

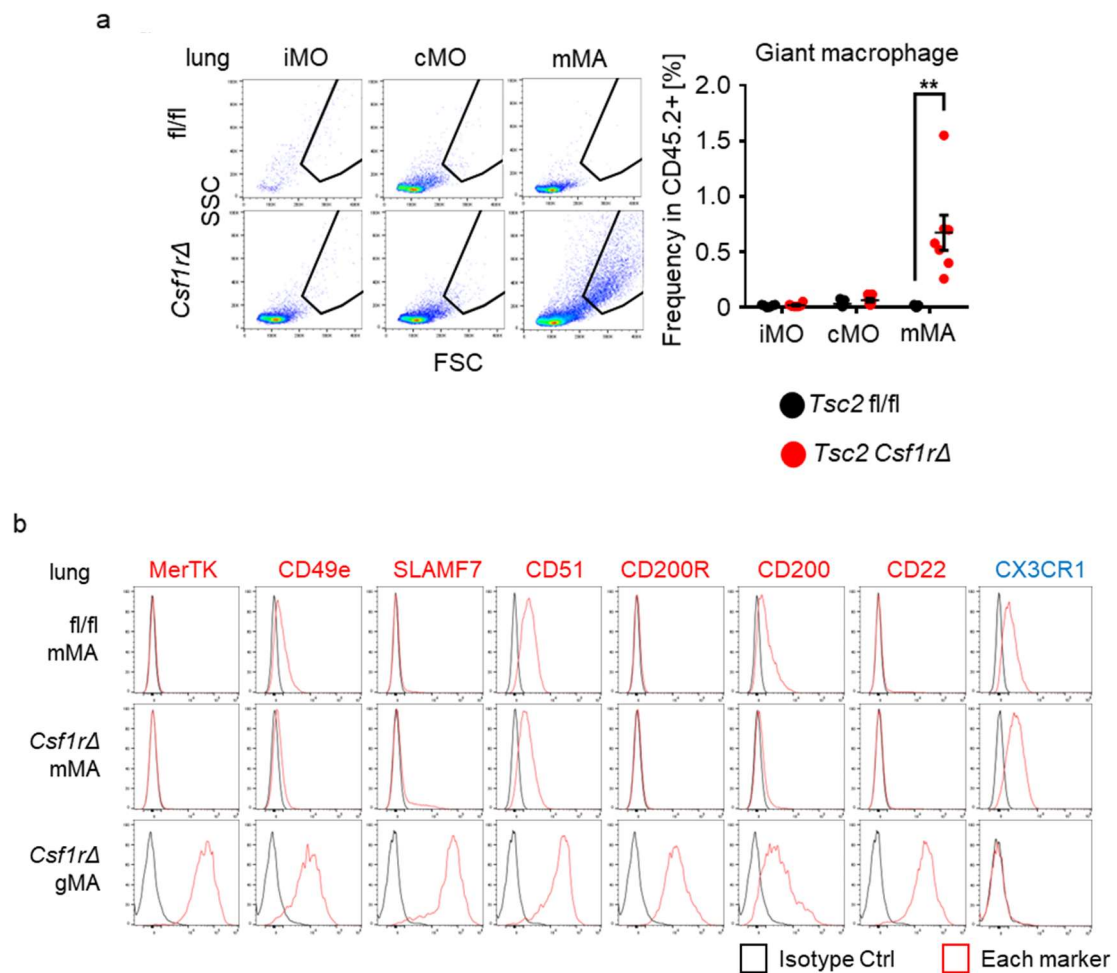


図 17. mMA と異なるマクロファージ gMA の同定

a. *Tsc2* fl/fl マウスと *Tsc2 Csf1rΔ* マウスの iMO、cMO、mMA における FSC と SSC の展開。FSC-SSC<sup>hi</sup> の画分を giant macrophage として、免疫細胞中の割合を定量した。  
 \*\*P<0.01 b. 抗体アレイにより同定された gMA に高発現な分子と(赤字)と mMA に高発現な分子(青字)。黒のヒストグラムはコントロール抗体の染色を、赤のヒストグラムは各マーカーの染色を示す。



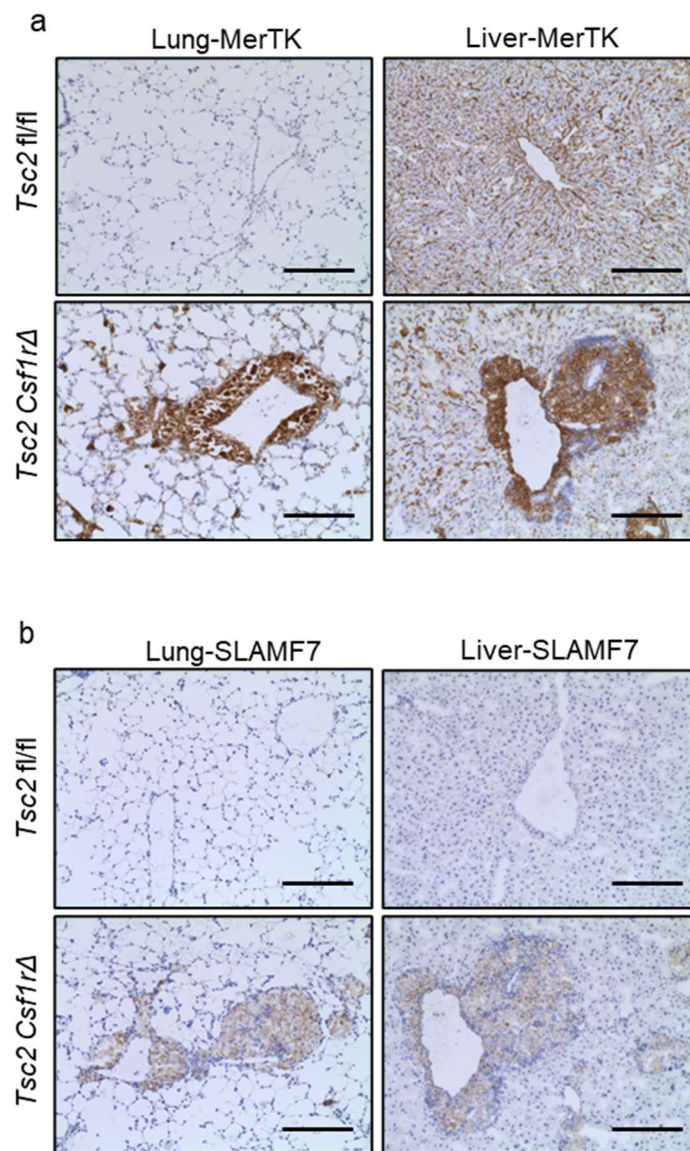


図 18. 肉芽腫病変における gMA マーカーの発現

a,b, *Tsc2*fl/fl マウスと *Tsc2 Csf1rΔ* マウスにおける肺、肝臓の MerTK(a)と SLAMF7(b) の免疫組織化学染色。スケールバーは 250μm を表す。

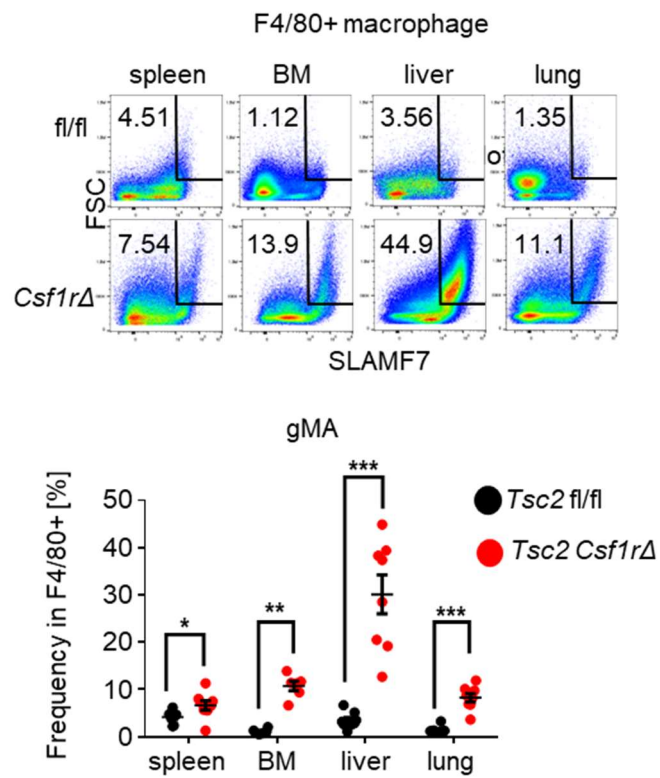


図 19. 組織による gMA の割合の違い

脾臓、骨髄、肝臓、肺の F4/80 陽性マクロファージにおける SLAMF7<sup>hi</sup> FSC<sup>hi</sup> gMA の割合。\*\*\*P<0.001 \*\*P<0.01 \*P<0.05

## (7) gMA の遺伝子発現解析

gMA における遺伝子発現が *Tsc2* *Csflr*Δマウスにおける他の単球・マクロファージと比較してどのように異なるのかを調べるため、gMA が最も増加した肝臓における mMA と gMA、最も増殖の亢進が見られた脾臓の cMO と iMO について RNAseq により遺伝子発現の変化を解析した。階層クラスタリング解析によって、4 者間では cMO と mMA が最も近縁であり、gMA は iMO よりも cMO と mMA に近縁であった(図 20)。そこで gMA と mMA の発現変動解析を行うと、gMA は 1072 個の遺伝子を  $2^{1.5}$  倍以上高く、1728 個の遺伝子を  $2^{1.5}$  倍以上低く発現していた(図 21a)。有意に発現が変動した遺伝子においてエンリッチされているパスウェイを解析すると、KEGG 遺伝子セットにおいて Lysosome のパスウェイが gMA で最もエンリッチされていることがわかった(図 21b)。Lysosome の遺伝子セットの中でも gMA に強く発現していた *Atp6v0d2* は、多核巨細胞の形成に関わることが報告されている<sup>56</sup>。また、心サルコイドーシス病変部の scRNAseq 解析では病変部マクロファージで lysosome パスウェイがエンリッチされることが報告されており<sup>57</sup>、gMA がサルコイドーシスにおいて肉芽腫を形成するマクロファージと同様の細胞である可能性が示唆された。

さらに、gMA における遺伝子発現変化の特徴をさらに探るため、gMA における転写因子の活性化の予測を試みた。発現変動遺伝子から活性化している転写因子を予測する検索エンジン Enrichr を用いて解析を行うと、gMA では NRF2、IRF8、SMRT、NCOR、

LXR、MITF、VDR、PPARG が活性化することが予測された(図 22a)。この中で、MITF と LXR は心サルコイドーシスの病変部に局在するマクロファージで活性化することが報告されていることから、MITF と LXR  $\alpha$  のターゲット遺伝子について iMO、cMO、mMA、gMA における遺伝子発現変化をヒートマップにより可視化した。*Gpnmb* や *Gns* など含む多くの MITF のターゲット遺伝子、*Apoe* や *Nr1h3* を含む多くの LXR  $\alpha$  のターゲット遺伝子が他のサブセットと比較して gMA で強く発現していることが分かった(図 22b,c)。GPNMB はサルコイドーシスの多角巨細胞において発現することが報告されており<sup>57</sup>、gMA がサルコイドーシスの病変を形成するマクロファージと同様の細胞である可能性がさらに示唆された。

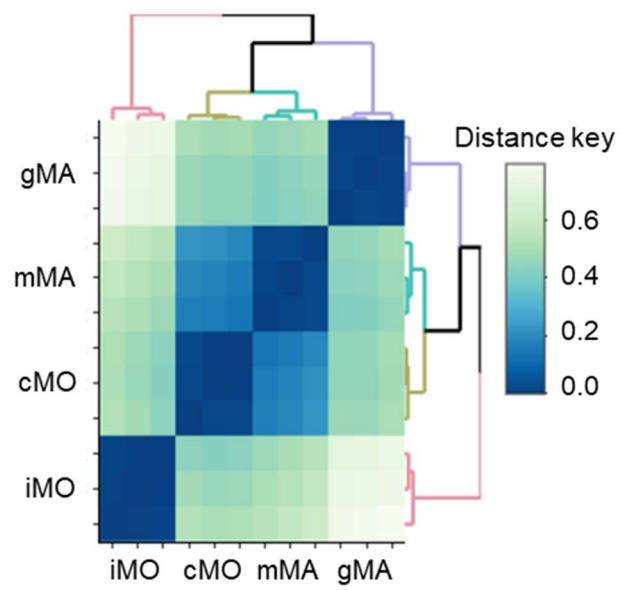


図 20. gMA と他のサブセットの相同性の解析

*Tsc2 Csf1rΔ*マウスの脾臓の iMO と cMO、肝臓の mMA と gMA における階層クラスタリング解析。Distance Key は 1-相関係数を示し、サブセット間の距離を表す。

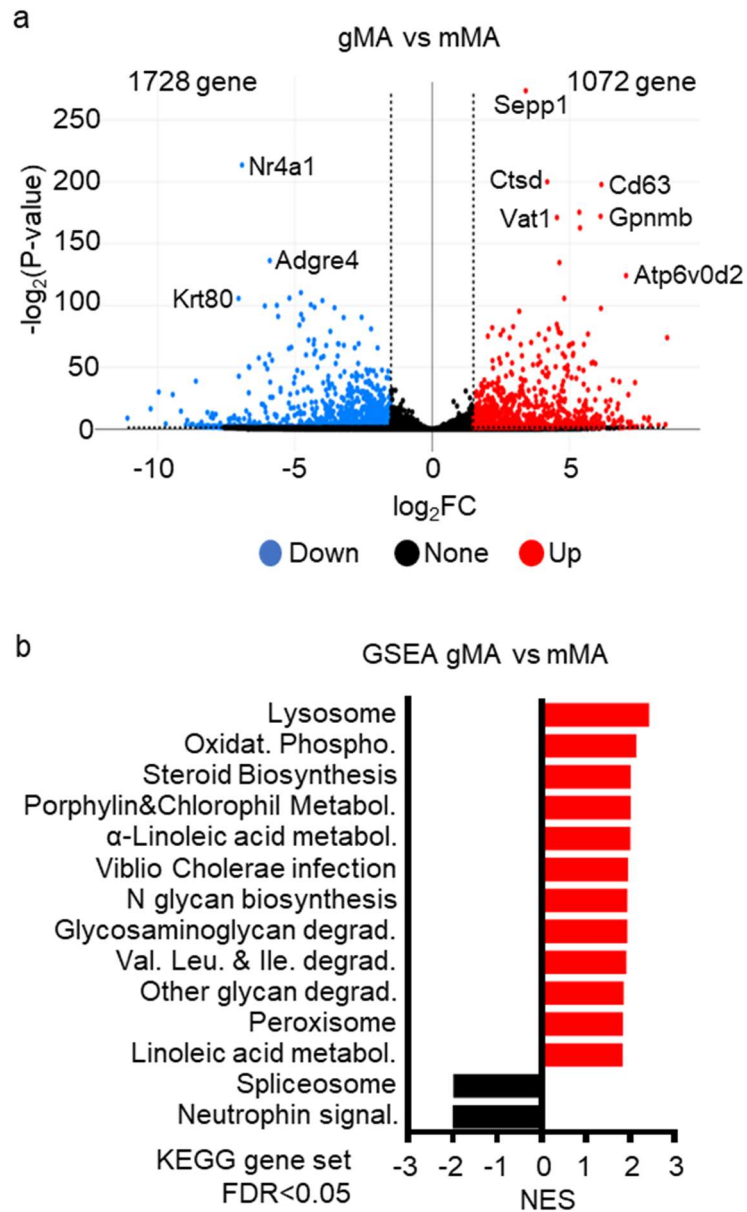
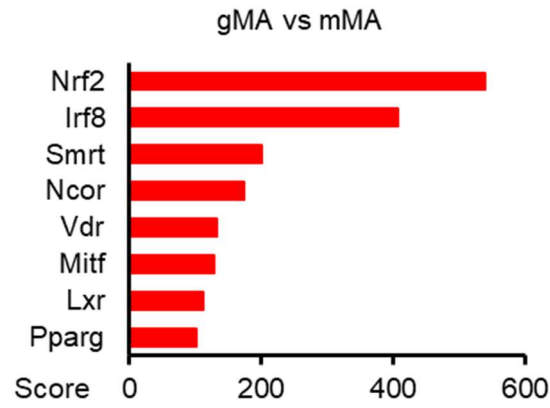


図 21. gMA と mMA の遺伝子発現比較

*Tsc2 Csf1r*Δマウスの gMA と mMA の RNAseq から得られた発現変動解析。2<sup>1.5</sup> 以上または以下発現し、 $p < 0.05$  の遺伝子がそれぞれ 1072 個と 1728 個存在した。b. GSEA により同定された KEGG 遺伝子セットにおいて FDR<0.05 となるパスウェイ。*Tsc2 Csf1r*Δマウスの gMA でエンリッチされているパスウェイを赤、mMA でエンリッチされているパスウェイを黒で示す。

a



b

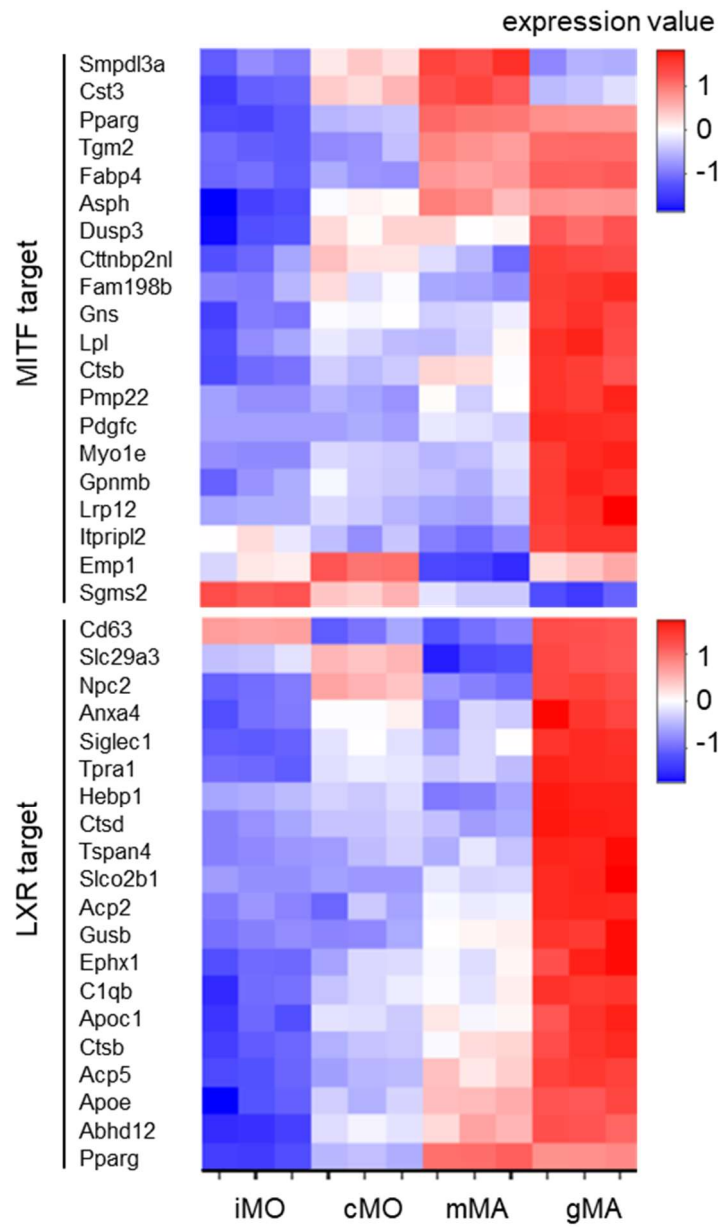


図 22. gMA における心サルコイドーシスマクロファージ様の遺伝子発現変化

a. Enrichr による gMA における転写因子の活性化予測。 b,c, *Tsc2 Csf1r*Δマウスの iMO、cMO、mMA、gMA における MITF のターゲット遺伝子(b)と LXR のターゲット遺伝子(c)の発現量のヒートマップ。



#### (8) ヒトサルコイドーシスマクロファージと gMA の遺伝子発現比較

ヒトサルコイドーシスの病変を形成するマクロファージと gMA を比較するために、まず我々は gMA 特異的な遺伝子群を同定した。脾臓の iMO および cMO、肝臓の mMA と gMA の 4 者間の発現変動解析によって、FDR<0.1 となる発現変動遺伝子として 2025 個の遺伝子を同定し、さらに iMO、cMO、mMA それぞれに対して gMA が  $2^{1.5}$  倍以上発現する遺伝子 432 個を、gMA 特異的な遺伝子(gMA-specific genes)として同定した(図 23a)。同定した遺伝子群を、京都大学梶島先生、中溝先生らとの共同研究により、ヒトサルコイドーシスの皮膚病変の scRNAseq 解析の結果と比較した(GSE234901)。

gMA 特異的な遺伝子群はサルコイドーシスマクロファージのクラスターにおいて、健康マクロファージのクラスターよりも高く発現していた(図 23b,c,d)。また、今回同定したマーカーである SLAMF7 は gMA 特異的な遺伝子群に含まれており、サルコイドーシスマクロファージにおいても高く発現していることが分かった(図 24a)。さらに、gMA における活性化が予測された MITF のターゲット遺伝子である *GPNUMB* や *GNS*、LXR のターゲット遺伝子である *APOE* や *NR1H3* も、サルコイドーシスマクロファージで高く発現することが分かった(図 24b,c)。これらの結果から、*Tsc2* *Csf1r* Δマウスにおける gMA がヒトサルコイドーシスの病変部に局在するマクロファージと同様の細胞であることが強く示唆された。

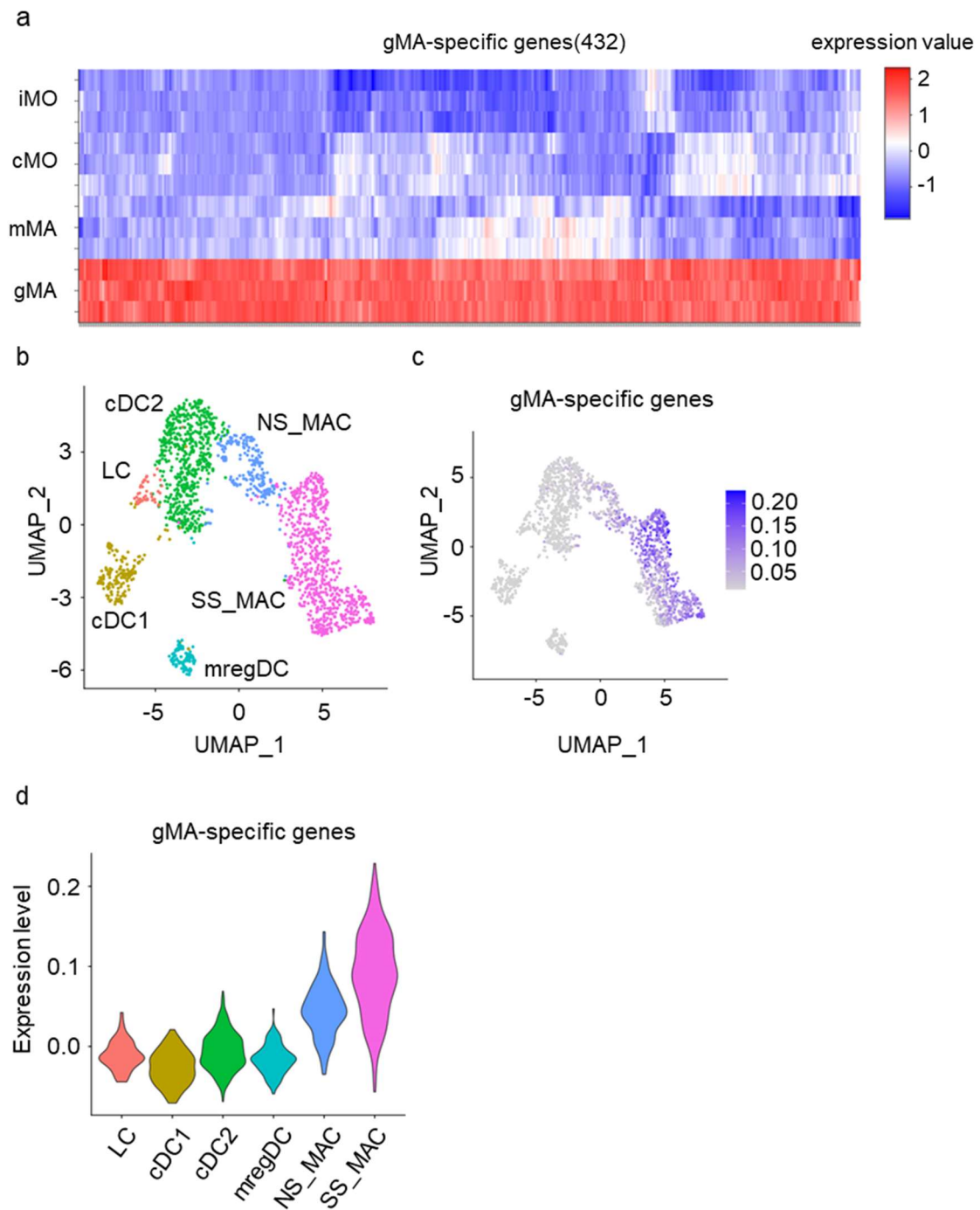


図 23. 組織による gMA の割合の違い

a, iMO、cMO、mMA、gMA の 4 者比較によって同定された gMA specific genes. FDR<0.1 かつ gMA における発現量が  $2^{1.5}$  倍以上の遺伝子 432 個を同定した。b, ヒトサルコイドーシス皮膚病変と健常人皮膚サンプルの scRNAseq 解析の UMAP。樹状細胞とマクロファージのクラスターを示す。NS\_MAC が健常マクロファージ、SS\_MAC がサルコイドーシスのマクロファージを示す。c,d, gMA-specific genes の各細胞における平均発現量の UMAP プロット(c)とバイオリンプロット(d)。

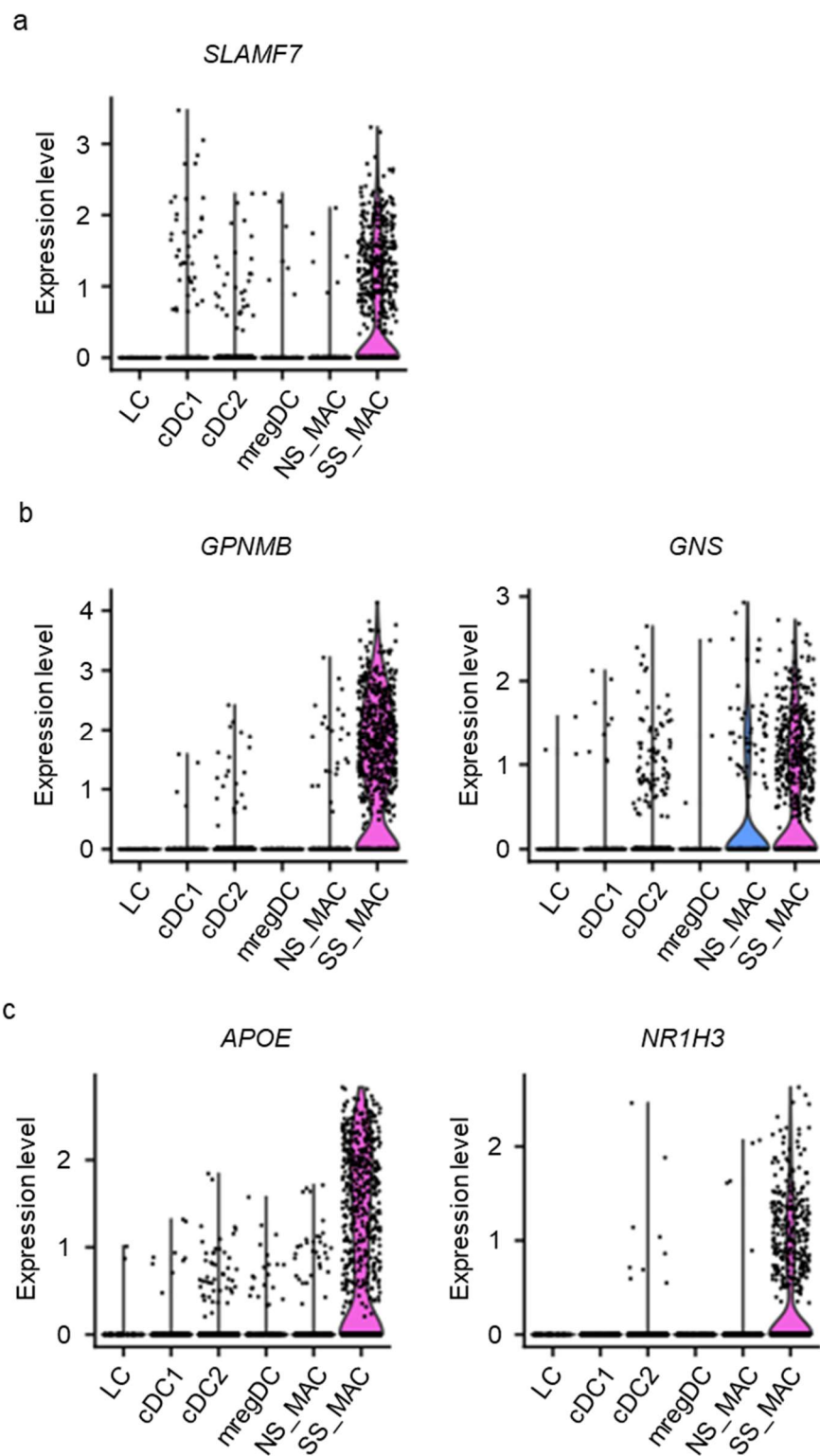


図 24. ヒトサルコイドーシスマクロファージにおける gMA マーカーの発現  
a,b,c ヒトサルコイドーシスの樹状細胞およびマクロファージにおけるそれぞれの遺伝子の発現量のバイオリンプロット。

## 考察

野生型マウスでは、cMoP/MP や未成熟な単球(iMO)は Ly6C<sup>hi</sup> CX3CR1<sup>high</sup> の cMO へと成熟するまで、骨髄内に留められる。一方で *Tsc2 Csf1r*Δマウスでは、脾臓において GMP や cMoP/MP、Ly6C<sup>mid</sup> CX3CR1<sup>low</sup> の iMO が増加し、さらに iMO が病態形成の場である肺や肝臓においても増加していた。*Tsc2 Csf1r*Δマウスの骨髄で増加した iMO が野生型マウスの骨髄に存在する iMO よりも単球の分化マーカーである CD14 を低く発現していたことから、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの末梢で増加している iMO は野生型マウスと比べてより未成熟であると考えられる。*Tsc2 Csf1r*Δマウスの脾臓の iMO を野生型マウスへ移植することで肉芽腫形成が誘導されたことから、iMO は組織に移行して肉芽腫形成の原因になっていると推察される。これらの結果は、単球の分化異常が、iMO の末梢組織への動員を引き起こし、iMO がマクロファージの供給源となって病態形成を誘導することを示唆している。このように骨髄における造血が変化し、末梢に未成熟な細胞が動員される現象は、炎症時により多くの Myeloid 系細胞を末梢に供給するためのシステム(emergency myelopoiesis)として理解されている<sup>58</sup>。一方で、こうした炎症時に誘導されるような造血が定常時においても引き起こされることが、慢性炎症の原因となりうることも報告されている<sup>59</sup>。肉芽腫形成における知見についても、成熟した単球ではなく未成熟な cMoP/MP を BCG で刺激することで、より顕著に多核巨細胞の形成を誘導できることが報告されており<sup>50</sup>、未成熟な単

球が末梢に動員されることが肉芽腫の形成においても重要である可能性が考えられる。本研究により、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの末梢で増加した iMO が肉芽腫形成を誘導することが示され、サルコイドーシスのバックグラウンドにおいても、emergency myelopoiesis が病態形成の原因となりうることが示唆された。ヒトサルコイドーシス患者においても同様な未成熟な単球の増加が起きているのかを、今後検討する必要がある。

ヒトサルコイドーシスの発症に関わる環境要因として、序論で記述したように皮膚常在菌であるアクネ菌が原因の一つとして提唱されている<sup>60</sup>。TLR4 や TLR9 の活性化が emergency myelopoiesis を誘導することから、TLR を活性化しうるアクネ菌もまた、サルコイドーシスにおける造血の変化を引き起こし得る。実際に、マウスモデルにおいて、アクネ菌の投与が TLR2 依存的に肺への細胞浸潤を誘導することが報告されており<sup>61</sup>、また TLR2 リガンドである Pam3csk の投与によって GMP が増加することも報告されている<sup>62</sup>。すなわち、TLR2 の活性化もまた emergency myelopoiesis を誘導すると推察され、サルコイドーシスではアクネ菌による TLR2 の活性化が病態形成に寄与している可能性が考えられる。また、*Tsc2 Csf1r*Δマウスにおいては、こうした造血を変化させる刺激をスキップして mTORC1 が活性化している可能性があるが、腸内細菌由来成分が移行しやすい肝臓で gMA が多いことや<sup>63</sup>、細菌に暴露されやすい肺で病態が形成されていることから、常在菌による刺激がドライバーとなってい

る可能性は否定できない。したがって、今後無菌状態での飼育や抗生剤の投与によって常在菌の関与を調べることも、本研究の解決すべき課題である。

ヒトサルコイドーシスの疾患感受性遺伝子としては HLA-DRB1 が知られており

<sup>64</sup>、サルコイドーシスの発症にリンパ球への抗原提示が重要な役割を果たす可能性があることは序論でも記述した。B 細胞は IL-10 を産生することで、T 細胞は IL-10 を受容して IFN- $\gamma$  を産生することで、それぞれ Emergency myelopoiesis を誘導することが近年報告されており <sup>65,66</sup>、抗原提示によって活性化したリンパ球はサイトカインの産生を介して造血の変化を促進する可能性が挙げられる。実際に、サルコイドーシス病変部に局在する CD4 陽性 T 細胞は、Th1 細胞や Th17 細胞に分化しており、IFN- $\gamma$ 、IL-17 を産生する <sup>67,68</sup>。したがって、HLA-DRB1 における遺伝子多型は、抗原提示によるリンパ球の活性化に影響することで発病に寄与している可能性が考えられる。

ヒトサルコイドーシスの発病に影響する他の因子として、性別や年齢がある。サルコイドーシスは男性と女性で発症しやすい年齢が異なり、男性では 30-50 歳、女性では 50-60 歳で最も発症しやすい <sup>69</sup>。本研究で解析した *Tsc2 Csf1r* $\Delta$  では性差は見られなかった。性差が影響し得る因子をスキップして発症している可能性もあるが、ヒトサルコイドーシスの発症頻度のピークが老齢にあることから、より長い飼育期間で解析した場合には性別や年齢による影響が生じる可能性はある。*Tsc2 Csf1r* $\Delta$  では骨髓由来の血球細胞が関与しない多発性嚢胞腎様の症状によって 10~12 週齢で死亡するた

め、こうした解析ができなかったが、より症状の弱い *Tsc2 Lyz2*Δマウスを用いることで、今後性別や年齢の影響を調べる事が可能である。

*Tsc2 Csf1r*Δマウスの病態形成は *Tsc2 Lyz2*Δマウスよりも早期かつ重篤であった。これは、*Lyz2*-Cre が単球やマクロファージにおける Cre の発現を誘導する一方で、*Csf1r*-Cre がより早期な前駆細胞の段階から Cre の発現を誘導するためであると考えられる<sup>52,70</sup>。実際に、BioGPS で *Lyz2* の発現を調べると、*Lyz2* は CMP や GMP において発現していない。したがって、より早期な段階からの造血の亢進が、病態形成を促進していると考えられる。

*Tsc2 Csf1r*Δマウスへの Rapamycin の投与によって病態が改善したことから、予想された通り、*Tsc2* の欠損による mTORC1 の活性化が病態形成に重要である。しかしながら、今回は 1 カ月間投与したマウスのみを解析したが、Rapamycin の継続的な投与によって、単球・マクロファージがどのように減少していくのかを経時的に解析することも重要である。増加した iMO や cMO が存在している間には gMA は減少しないのか、あるいは gMA への分化もまた抑制され、即座に gMA が減少するのか、そうした動態を解析することで、単球・マクロファージの分化・増殖のどの過程に mTORC1 の活性化が重要であるのかを明らかにすることができる可能性がある。こうした mTORC1 の活性化は実際のヒトサルコイドーシスの病変部でも確認されているが<sup>24</sup>、*Tsc2* 遺伝子や mTORC1 の活性化を直接制御する遺伝子が疾患感受性遺伝子と

して報告された事例はない。一方で、サルコイドーシスのマクロファージで Tsc1 の mRNA 量が減少することが報告されており<sup>24</sup>、mTORC1 が活性化しやすいような状態へとマクロファージが変化していると考えられる。

Tsc2 は結節性硬化症の原因遺伝子である<sup>71</sup>。結節性硬化症は、常染色体顕性の遺伝性疾患であり、全身性に筋腫、脂肪腫、線維腫といった過誤腫が形成されることで、肺、心臓、腎臓などの様々な臓器に機能異常が生じる。また、てんかんや精神発達遅滞などの症状が現れる。一方で、肉芽腫の形成は認められておらず、また血球系細胞が異常に増殖するような症状は報告されていない。結節性硬化症は、Tsc1 や Tsc2 における機能欠損型変異がヘテロに生じることで発症する。*Tsc2<sup>flox/+</sup> Csf1r*-Cre マウスにおいては、肉芽腫形成や単球の異常増殖は確認されていない。結節性硬化症の発病モデルは 2 ヒット仮説が提唱されており<sup>72</sup>、Tsc1 や Tsc2 に 2 つ目の変異が入った細胞が選択的に増殖し、腫瘍を形成すると考えられている。結節性硬化症患者や *Tsc2<sup>flox/+</sup> Csf1r*-Cre マウスにおいてマクロファージの異常な増殖が見られないことから、マクロファージには遺伝子変異が起きにくいような制御機構、あるいは変異が生じた細胞が速やかに排除されるような環境が備わっている可能性が考えられる。

*Tsc2 Csf1r*Δマウスの脾臓では cMoP/MP、GMP、CMP の顕著な増加が見られ、一方で MDP や CDP は増加が見られなかった。CMP や GMP は、細胞表面には CD115 を発現しないが、CMP が MDP に分化すること、GMP が MP に分化するこ



とから、どちらの細胞においても、*Csf1r* 遺伝子の発現が始まっていると考えられる。

実際に、*Csf1r* レポーターマウスを用いて、*Csf1r* 遺伝子が CMP や GMP において発現することが報告されている<sup>70</sup>。一方で、MDP や CDP は CD115 を発現するにも関わらず、脾臓においても骨髓においても増加が認められなかった。すなわち、CMP において mTORC1 が活性化すると、単球の産生経路が GMP を経由した経路へと傾く可能性が考えられる。GMP から産生される cMO が増加すると、neutrophil-like 単球の割合も増加することが報告されているが<sup>42</sup>、実際に *Tsc2 Csf1r*Δマウスでは neutrophil-like 単球が増加することを我々は確認しており、GMP を介した単球の産生が亢進することが強く示唆されている。mTORC1 の活性化によって細胞増殖や細胞内代謝が亢進する一方で、mTORC1 の活性化は mTORC2 や AMPK などのシグナル伝達分子の働きを抑制することが知られている<sup>25,73</sup>。反対に、AMPK が活性化することで、mTORC1 の働きが抑制されることが知られており、両者の活性化はシーソーの関係にある。CMP ではそうした mTOR が制御する細胞内の増殖・代謝のバランスによって GMP と MDP への分化がシーソーの形で制御されている可能性が考えられる。

また、*Tsc2 Csf1r*Δマウスにおいて定常時存在する mMA と異なる gMA が増加したことから、肉芽腫を伴わない炎症時の造血の変化と比較して、*Tsc2 Csf1r*Δにおける造血がどのように異なるのかを今後明らかにする必要がある。

*Tsc2 Csf1r*Δマウスでは、肺胞マクロファージやクッパー細胞などの組織常在マクロファージが減少し、骨髄由来のマクロファージが増加していた。組織常在マクロファージは *Csf1r* 遺伝子を発現し<sup>74</sup>、*Tsc2*が欠損していると予想されるが、減少が見られたことは興味深い。組織常在マクロファージは組織内の恒常性を保つために自己増殖する一方で、組織で炎症が起きると骨髄由来マクロファージが浸潤するためのニッチを空けるために減少することが報告されている<sup>75</sup>。*Tsc2 Csf1r*Δマウスの mMO は炎症応答の増強は見られなかったが、cMO においてはリガンド刺激による炎症応答が亢進していたことから、組織常在マクロファージの様な異なるマクロファージサブセットにおいては、炎症応答が増強し、結果として組織常在マクロファージが減少している可能性は否定できない。

今回我々が行った移植実験では、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの iMO の移植では肉芽腫形成を誘導することができたが、cMO の移植では肉芽腫形成を誘導することができなかった。EdU アッセイの結果から、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの脾臓細胞で増殖期にある iMO は 3%存在する一方で、増殖期にある cMO は 1%に満たない。cMO が肉芽腫形成を誘導できなかったのは、増殖期にある細胞が足りず、肉芽腫を形成するに足るマクロファージを供給できなかったためであると推測される。*Tsc2 Csf1r*Δマウスの肺や肝臓で、骨髄や脾臓から遊走したと考えられる iMO が CD14 を発現してより成熟していたことから、iMO は肺や肝臓に遊走するまでの過程、あるいは組織へ移行すると同時

に cMO へと分化していると推測される。したがって、より多くの細胞を移植することで、cMO によっても肉芽腫形成が誘導できる可能性がある和我々は考えている。

また、脾臓細胞の Lipid A 刺激時のサイトカイン産生の結果から、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの cMO では炎症誘導能が亢進していると考えられる。iMO でサイトカイン産生が見られなかったこと、mMA ではサイトカイン産生が見られたが *Tsc2 Csf1r*Δマウスにおいてそれが亢進していなかったことから、*Tsc2* の欠損が単球・マクロファージにもたらす影響はそのサブセットによって異なると推察される。iMO では強い増殖、cMO では弱い増殖と炎症誘導能が誘導され、そしてマクロファージでは FSC<sup>hi</sup> SSC<sup>hi</sup> の、mMA と異なる分子発現の gMA が分化する。マクロファージはそのサブセットによって、炎症応答と抗炎症応答などの全く異なる役割を果たすことが近年わかりつつあり、代謝の変化やエピジェネティックな変化がそうした流動的な役割に影響していることが報告されている<sup>76</sup>。それぞれのサブセットに *Tsc2* の欠損がもたらす異なる影響は、サブセットごとの異なる栄養状態やクロマチン構造によって引き起こされている可能性が考えられる。

我々の結果から、今回同定した gMA が肉芽腫を構成するマクロファージである可能性が示された。iMO が肉芽腫形成を誘導したことから、肺や肝臓に到達した iMO が cMO に成熟後、おそらく gMA へと分化していると推察される。しかしながら、脾臓で gMA の供給源である iMO が顕著に増加しているにも関わらず、gMA の存在す

る割合は肝臓、肺、骨髄と比べて最も少なかった。また、肝臓の gMA は肺と比較して顕著に増加しており、cMO から gMA の分化には組織特異的なシグナルが大きく影響していると推測される。我々の結果から、gMA では LXR の活性化が予測されており、またヒトサルコイドーシスの肉芽腫病変に存在するマクロファージにおいても LXR の活性化が確認されている<sup>57</sup>。肝臓には、オキシステロールの様な内在性の LXR リガンドが豊富に存在し、クッパー細胞の維持にも関わっている<sup>37</sup>。IL-4 は多角巨細胞の形成を誘導できるサイトカインとして、肉芽腫形成に重要な因子だと考えられているが<sup>77</sup>、マクロファージにおいて IL-4 は mTORC1 を活性化し、オキシステロールの産生を促進することが分かっている<sup>78</sup>。したがって、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの肝臓では、マクロファージにおける mTORC1 の活性化によってオキシステロールの産生と LXR の活性化が亢進し、肉芽腫形成に寄与している可能性が考えられる。

今回 gMA のマーカーとして同定した SLAMF7 は、ヒトサルコイドーシス病変部に局在するマクロファージに発現することがわかった。SLAMF7 を発現するマクロファージは、近年関節リウマチ患者の滑膜においても増加することが scRNAseq によって明らかになっている<sup>79</sup>。関節リウマチにおいては SLAMF7 の発現が炎症を増強していることが報告されており、また SLAMF7 の発現が IFN- $\gamma$  によって誘導されることが分かっている<sup>79</sup>。既述したように IFN- $\gamma$  はヒトサルコイドーシス病変に局在する Th1、Th17 細胞によって産生されており、サルコイドーシスにおいても、IFN- $\gamma$  が病

変部マクロファージの分化に関わる可能性が考えられる。一方で、関節リウマチでは肉芽腫は形成されず、また今回解析した gMA においては炎症性のシグナルがエンリッチされていなかったことから、SLAMF7 を発現するマクロファージはその病態によって異なる役割を果たす可能性が考えられる。

遺伝子発現解析から、gMA では MITF のターゲット遺伝子が高く発現していた。

MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)はリソソーム生合成を促進することで知られ<sup>80</sup>、我々の GSEA において gMA で lysosome 遺伝子セットが最も高くエンリッチされたこととも相関するが、この結果は MITF が mTORC1 によって抑制的に制御される点と一見矛盾する<sup>80</sup>。しかしながら、近年 Tsc1 を欠損したケラチノサイトにおいて、MITF を含む転写因子ファミリーである Mit-TFE ファミリーの活性化が、リソソーム生合成を促進することが報告されている<sup>81</sup>。この報告と同様に、mTORC1 は Mit-TFE ファミリーを抑制する Akt の働きを抑えることで、MITF を活性化しているのではないかと考えられる。活性化された MITF は、多核巨細胞のマーカとして報告されている GPNMB や、マクロファージの融合を誘導することが報告されている Atp6v0d2 の発現を誘導していると予想される<sup>56,57</sup>。MITF の活性化によるこれらの遺伝子の発現が、*Tsc2 Csf1r*Δマウスの肉芽腫の発達に寄与している可能性が考えられる。

MiT-TFE ファミリーは TFEB、TFEC、TFE3、MITF が存在し、マクロファージにおいてはこれまで TFEB、TFEC、TFE3 がリソソームの制御を介して炎症性サイトカインやケモカインの産生、貪食した細菌の分解、オートファジーによるウイルス由来タンパクの分解などに関わることが報告されている<sup>82</sup>。一方で、MITF に関してはサルコイドーシスのマクロファージにおける発現が報告されているものの、マクロファージにおいて MITF がどのような機能を果たしているのかは不明である。MITF は正常細胞の中で肥満細胞において最も高く発現し、MITF が欠損すると肥満細胞は正常に分化しない。肥満細胞は好塩基球-肥満細胞前駆細胞(pre-BMP)から分化する。pre-BMP では MITF が C/EBP $\alpha$ の発現を抑制することで、好塩基球への分化を抑制して肥満細胞への分化を促進する<sup>82</sup>。また、MITF は骨の発達を制御するマクロファージである破骨細胞の発達にも重要であることが報告されているが<sup>83</sup>、分化に関わる分子メカニズムは分かっていない。上述したように MITF のターゲットには多角巨細胞の形成に関わる GPNMB が含まれるが、これは破骨細胞にも発現し、破骨細胞の分化や機能に関わることが報告されている<sup>84</sup>。同様に、MITF が gMA の分化においても重要である可能性が考えられる。

gMA 様の遺伝子発現を示すマクロファージがヒトサルコイドーシスの皮膚病変に存在したことから、ヒトサルコイドーシスにおいても同様に、iMO や cMO から gMA への分化が生じている可能性が考えられる。今回我々が同定した gMA のマーカー

は、gMA を除去するための治療標的となりうる可能性がある。中でも、ヒトサルコイドーシスのマクロファージにおける発現が確認された SLAMF7 は、SLAMF7 を標的とした抗体がすでに多発性骨髄腫の治療薬として承認されている<sup>85</sup>。したがって、この抗体がサルコイドーシスの治療に対しても有効であることが期待できる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻いただいた東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の三宅健介教授に厚く御礼申し上げます。また、研究の進め方において、多大なるご尽力、ご助言を頂いた佐藤亮太助教、福井竜太郎特任准教授、柴田琢磨准教授、感染遺伝学分野の皆様に深く感謝いたします。

*Tsc2<sup>flax/flax</sup>* マウスを供与頂いた東京大学医学系研究科疾患生命工学センター動物資源学部門の饗庭篤教授に深く感謝いたします。

*Csf1r-Cre Tg* マウスをご供与頂いた東京大学医科学研究所腫瘍抑制分野の山梨裕司教授に深く感謝いたします。

RNAseq 解析を行うにあたりご助力頂いた東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野の古川洋一教授、山口貴世志准教授に深く感謝いたします。

scRNAseq 解析データの解析を行うにあたりご助力頂いた京都大学大学院医学研究科皮膚科学の梶島健治教授、先端医療基盤共同研究講座・皮膚科の中溝聡特定講師に深く感謝いたします。

最後に、博士課程 3 年間を含むこれまでの学生生活を支えてくださった両親に、深く感謝いたします。



## 参考文献

1. Pagan, A.J., and Ramakrishnan, L. (2018). The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology*, Vol 36 36, 639-665. 10.1146/annurev-immunol-032712-100022.
2. Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* 12, 352-366. 10.1038/nri3211.
3. Pearce, E.J., and MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology* 2, 499-511. 10.1038/nri843.
4. Mosser, D.M., Hamidzadeh, K., and Goncalves, R. (2021). Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology* 18, 579-587. 10.1038/s41423-020-00541-3.
5. Chandra, P., Grigsby, S.J., and Philips, J.A. (2022). Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology* 20, 750-766. 10.1038/s41579-022-00763-4.
6. McManus, D.P., Dunne, D.W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B.J., and Zhou, X.N. (2018). Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers* 4, 13. 10.1038/s41572-018-0013-8.
7. Tang, L.P., and Eaton, J.W. (1995). INFLAMMATORY RESPONSES TO BIOMATERIALS. *American Journal of Clinical Pathology* 103, 466-471.
8. Grimalt, R., Sala, F., and Alessi, E. (1994). CUTANEOUS SILICA GRANULOMA. *European Journal of Dermatology* 4, 255-256.
9. Iannuzzi, M.C., and Fontana, J.R. (2011). Sarcoidosis Clinical Presentation, Immunopathogenesis, and Therapeutics. *Jama-Journal of the American Medical Association* 305, 391-399. 10.1001/jama.2011.10.
10. Molnár, T., Tiszlavicz, L., Gyulai, C., Nagy, F., and Lonovics, J. (2005). Clinical significance of granuloma in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* 11, 3118-3121. 10.3748/wjg.v11.i20.3118.
11. Henckaerts, L., and Vermeire, S. (2007). *NOD2/CARD15* disease associations other than Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 13, 235-241. 10.1002/ibd.20066.
12. Rivera, N.V., Ronninger, M., Shchetynsky, K., Franke, A., Nöthen, M.M., Müller-Quernheim, J., Schreiber, S., Adrianto, I., Karakaya, B., van Moorsel, C.H.M., et al. (2016). High-Density Genetic Mapping Identifies New Susceptibility Variants in Sarcoidosis Phenotypes and Shows Genomic-driven Phenotypic Differences. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193, 1008-1022.

- 10.1164/rccm.201507-1372OC.
13. Ishige, I., Eishi, Y., Takemura, T., Kobayashi, I., Nakata, K., Tanaka, I., Nagaoka, S., Iwai, K., Watanabe, K., Takizawa, T., and Koike, M. (2005). *Propionibacterium acnes* is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 22, 33-42.
  14. Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603. 10.1038/35079107.
  15. Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119-124. 10.1038/nature11582.
  16. de la Cal, J.A.L., Cantón, C., Hermida, C., Pérez-Miranda, M., and Maté-Jiménez, J. (1999). Estimated incidence of inflammatory bowel disease in Argentina and Panama (1987-1993). *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas* 91, 282-286.
  17. Bouley, D.M., Ghori, N., Mercer, K.L., Falkow, S., and Ramakrishnan, L. (2001). Dynamic nature of host-pathogen interactions in *Mycobacterium marinum* granulomas. *Infection and Immunity* 69, 7820-7831. 10.1128/iai.69.12.7820-7831.2001.
  18. Russell, D.G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., and Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology* 10, 943-948. 10.1038/ni.1781.
  19. Helming, L., and Gordon, S. (2009). Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in Cell Biology* 19, 514-522. 10.1016/j.tcb.2009.07.005.
  20. Amaral, E.P., Costa, D.L., Namasivayam, S., Riteau, N., Kamenyeva, O., Mittereder, L., Mayer-Barber, K.D., Andrade, B.B., and Sher, A. (2019). A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis. *Journal of Experimental Medicine* 216, 556-570. 10.1084/jem.20181776.
  21. Broos, C.E., van Nimwegen, M., Hoogsteden, H.C., Hendriks, R.W., Kool, M., and van den Blink, B. (2013). Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Frontiers in Immunology* 4, 437. 10.3389/fimmu.2013.00437.
  22. James, W.E., and Baughman, R. (2018). Treatment of sarcoidosis: grading the

- evidence. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11, 677-687.  
10.1080/17512433.2018.1486706.
23. Sakthivel, P., and Bruder, D. (2017). Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Current Opinion in Hematology* 24, 59-65.  
10.1097/moh.0000000000000301.
  24. Linke, M., Pham, H.T.T., Katholnig, K., Schnollner, T., Miller, A., Demel, F., Schutz, B., Rosner, M., Kovacic, B., Sukhbaatar, N., et al. (2017). Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. *Nature Immunology* 18, 293-302. 10.1038/ni.3655.
  25. Kim, J., and Guan, K.L. (2019). mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nature Cell Biology* 21, 63-71. 10.1038/s41556-018-0205-1.
  26. Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). MTOR interacts with Raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175. 10.1016/s0092-8674(02)00808-5.
  27. Hara, K., Maruki, Y., Long, X.M., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189. 10.1016/s0092-8674(02)00833-4.
  28. Yang, H.J., Jiang, X.L., Li, B.R., Miller, M., Yang, A., Dhar, A., and Pavletich, N.P. (2017). Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature* 552, 368-+. 10.1038/nature25023.
  29. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology* 10, 935-945. 10.1038/ncb1753.
  30. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* 141, 290-303. 10.1016/j.cell.2010.02.024.
  31. Wyant, G.A., Abu-Remaileh, M., Wolfson, R.L., Chen, W.W., Freinkman, E., Danai, L.V., Heiden, M.G.V., and Sabatini, D.M. (2017). mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell* 171, 642-+. 10.1016/j.cell.2017.09.046.
  32. Inoki, K., Zhu, T.Q., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-590. 10.1016/s0092-

8674(03)00929-2.

33. Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., and Blenis, J. (2022). Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control mTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb (vol 13, pg 1259, 2003). *Current Biology* 32, 733-734. 10.1016/j.cub.2022.01.027.
34. Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J.M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L.O., and Manning, B.D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell* 47, 535-546. 10.1016/j.molcel.2012.06.009.
35. Menon, S., Dibble, C.C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A.J., Takahashi, H., Cantley, L.C., and Manning, B.D. (2014). Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell* 156, 771-785. 10.1016/j.cell.2013.11.049.
36. Lee, P.Y., Sykes, D.B., Ameri, S., Kalaitzidis, D., Charles, J.F., Nelson-Maney, N., Wei, K., Cunin, P., Morris, A., Cardona, A.E., et al. (2017). The metabolic regulator mTORC1 controls terminal myeloid differentiation. *Science Immunology* 2, eaam6641. 10.1126/sciimmunol.aam6641.
37. Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., and Schlitzer, A. (2023). Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nature Reviews Immunology*. 10.1038/s41577-023-00848-y.
38. Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 38, 792-804. 10.1016/j.immuni.2013.04.004.
39. Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., et al. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353, aaf4238. 10.1126/science.aaf4238.
40. Perdiguero, E.G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., De Bruijn, M., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). TISSUE-RESIDENT MACROPHAGES ORIGINATE FROM YOLK SAC-DERIVED ERYTHRO-MYELOID PROGENITORS. *Experimental Hematology* 43, S64-S64. 10.1016/j.exphem.2015.06.130.
41. Williams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Developmental and Functional

- Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595-613.  
10.1016/j.immuni.2018.10.005.
42. Yáñez, A., Coetzee, S., Olsson, A., Muench, D., Berman, B., Hazelett, D., Salomonis, N., Grimes, H.L., and Goodridge, H. (2018). GRANULOCYTE-MONOCYTE PROGENITORS AND MONOCYTE-DENDRITIC CELL PROGENITORS INDEPENDENTLY PRODUCE FUNCTIONALLY DISTINCT MONOCYTES. *Experimental Hematology* **64**, S111-S111.
  43. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197. 10.1038/35004599.
  44. Yáñez, A., Ng, M.Y., Hassanzadeh-Kiabi, N., and Goodridge, H.S. (2015). IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood* **125**, 1452-1459. 10.1182/blood-2014-09-600833.
  45. Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology* **14**, 821-+. 10.1038/ni.2638.
  46. Liu, K., Vitoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K.H., Chu, F.F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science* **324**, 392-397. 10.1126/science.1170540.
  47. Jakubzick, C.V., Randolph, G.J., and Henson, P.M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology* **17**, 349-362. 10.1038/nri.2017.28.
  48. Ikeda, N., Kubota, H., Suzuki, R., Morita, M., Yoshimura, A., Osada, Y., Kishida, K., Kitamura, D., Iwata, A., Yotsumoto, S., et al. (2023). The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis. *Cell Reports* **42**, 112165. 10.1016/j.celrep.2023.112165.
  49. Herrtwich, L., Nanda, I., Evangelou, K., Nikolova, T., Horn, V., Sagar, Erny, D., Stefanowski, J., Rogell, L., Klein, C., et al. (2018). DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas (vol 167, pg 1264, 2016). *Cell* **174**, 1325-1326. 10.1016/j.cell.2018.08.015.
  50. Lössllein, A.K., Lohrmann, F., Scheuermann, L., Gharun, K., Neuber, J., Kolter, J., Forde, A.J., Kleimeyer, C., Poh, Y.Y., Mack, M., et al. (2021). Monocyte progenitors give rise to multinucleated giant cells. *Nature Communications* **12**,

2027. 10.1038/s41467-021-22103-5.
51. Teh, Y.C., Chooi, M.Y., Liu, D.H., Kwok, I., Lai, G.C., Yong, L.A.O., Ng, M., Li, J.L.Y., Tan, Y.R., Evrard, M., et al. (2022). Transitional premonocytes emerge in the periphery for host defense against bacterial infections. *Science Advances* 8, eabj4641. 10.1126/sciadv.abj4641.
  52. Shi, J.Y., Hua, L., Harmer, D., Li, P.S., and Ren, G.W. (2018). Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Macrophages: Methods and Protocols* 1784, 263-275. 10.1007/978-1-4939-7837-3\_24.
  53. Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature Reviews Immunology* 14, 81-93. 10.1038/nri3600.
  54. Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *Journal of Immunology* 193, 344-353. 10.4049/jimmunol.1400574.
  55. Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318-321. 10.1038/nature07472.
  56. Hong, J., Sanjoba, C., Fujii, W., Yamagishi, J., and Goto, Y. (2022). *Leishmania* infection-induced multinucleated giant cell formation *via* upregulation of ATP6V0D2 expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12, 953785. 10.3389/fcimb.2022.953785.
  57. Liu, J., Ma, P., Lai, L.L., Villanueva, A., Koenig, A., Bean, G.R., Bowles, D.E., Glass, C., Watson, M., Lavine, K.J., and Lin, C.Y. (2022). Transcriptional and Immune Landscape of Cardiac Sarcoidosis. *Circulation Research* 131, 654-669. 10.1161/circresaha.121.320449.
  58. Chavakis, T., Mitroulis, I., and Hajishengallis, G. (2019). Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation. *Nature Immunology* 20, 802-811. 10.1038/s41590-019-0402-5.
  59. Nahrendorf, M. (2018). Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nature Medicine* 24, 711-720. 10.1038/s41591-018-0064-0.
  60. Eishi, Y. (2013). Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respiratory investigation* 51, 56-68. 10.1016/j.resinv.2013.01.001.
  61. Gabrilovich, M.I., Walrath, J., van Lunteren, J., Nethery, D., Seifu, M., Kern, J.A., Harding, C.V., Tuscano, L., Lee, H., Williams, S.D., et al. (2013).

- Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clinical and Experimental Immunology* 173, 512-522. 10.1111/cei.12138.
62. Herman, A.C., Monlish, D.A., Romine, M.P., Bhatt, S.T., Zippel, S., and Schuettelpelz, L.G. (2016). Systemic TLR2 agonist exposure regulates hematopoietic stem cells via cell-autonomous and cell-non-autonomous mechanisms. *Blood Cancer Journal* 6, e437. 10.1038/bcj.2016.45.
  63. Adolph, T.E., Grander, C., Moschen, A.R., and Tilg, H. (2018). Liver-Microbiome Axis in Health and Disease. *Trends in Immunology* 39, 712-723. 10.1016/j.it.2018.05.002.
  64. Grunewald, J., Grutters, J.C., Arkema, E.V., Saketkoo, L.A., Moller, D.R., and Müller-Quernheim, J. (2019). Sarcoidosis. *Nature Reviews Disease Primers* 5, 45. 10.1038/s41572-019-0096-x.
  65. Kanayama, M., Izumi, Y., Akiyama, M., Hayashi, T., Atarashi, K., Roers, A., Sato, T., and Ohteki, T. (2023). Myeloid-like B cells boost emergency myelopoiesis through IL-10 production during infection. *Journal of Experimental Medicine* 220, e20221221. 10.1084/jem.20221221.
  66. Cardoso, A., Martins, A.C., Maceiras, A.R., Liu, W., Castro, I., Castro, A.G., Bandeira, A., Di Santo, J.P., Cumano, A., Li, Y., et al. (2021). Interleukin-10 induces interferon- $\gamma$ -dependent emergency myelopoiesis. *Cell Reports* 37, 109887. 10.1016/j.celrep.2021.109887.
  67. Facco, M., Cabrelle, A., Teramo, A., Olivieri, V., Gnoato, M., Teolato, S., Ave, E., Gattazzo, C., Fadini, G.P., Calabrese, F., et al. (2011). Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* 66, 144-150. 10.1136/thx.2010.140319.
  68. Ramstein, J., Broos, C.E., Simpson, L.J., Ansel, K.M., Sun, S.A., Ho, M.E., Woodruff, P.G., Bhakta, N.R., Christian, L., Nguyen, C.P., et al. (2016). IFN- $\gamma$ -Producing T-Helper 17.1 Cells Are Increased in Sarcoidosis and Are More Prevalent than T-Helper Type 1 Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193, 1281-1291. 10.1164/rccm.201507-1499OC.
  69. Grunewald, J., Grutters, J.C., Arkema, E.V., Saketkoo, L.A., Moller, D.R., and Müller-Quernheim, J. (2019). Sarcoidosis (vol 5, 45, 2019). *Nature Reviews Disease Primers* 5. 10.1038/s41572-019-0107-y.
  70. Grabert, K., Sehgal, A., Irvine, K.M., Wollscheid-Lengeling, E., Ozdemir, D.D., Stables, J., Luke, G.A., Ryan, M.D., Adamson, A., Humphreys, N.E., et al. (2020). A Transgenic Line That Reports CSF1R Protein Expression Provides a Definitive Marker for the Mouse Mononuclear Phagocyte System. *Journal of*

- Immunology 205, 3154-+. 10.4049/jimmunol.2000835.
71. Henske, E.P., Jóźwiak, S., Kingswood, J.C., Sampson, J.R., and Thiele, E.A. (2016). Tuberous sclerosis complex. *Nature Reviews Disease Primers* 2, 16035. 10.1038/nrdp.2016.35.
  72. Tyburczy, M.E., Wang, J.A., Li, S.W., Thangapazham, R., Chekaluk, Y., Moss, J., Kwiatkowski, D.J., and Darling, T.N. (2014). Sun exposure causes somatic second-hit mutations and angiofibroma development in tuberous sclerosis complex. *Human Molecular Genetics* 23, 2023-2029. 10.1093/hmg/ddt597.
  73. Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274-293. 10.1016/j.cell.2012.03.017.
  74. Wu, Y.Y., and Hirschi, K.K. (2021). Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 617879. 10.3389/fcell.2020.617879.
  75. Lazarov, T., Juarez-Carreño, S., Cox, N., and Geissmann, F. (2023). Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. *Nature* 618, 698-707. 10.1038/s41586-023-06002-x.
  76. Chen, S.Y., Yang, J., Wei, Y.Q., and Wei, X.W. (2020). Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. *Cellular & Molecular Immunology* 17, 36-49. 10.1038/s41423-019-0315-0.
  77. Stäger, S., Alexander, J., Carter, K.C., Brombacher, F., and Kaye, P.M. (2003). Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor  $\alpha$  signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infection and Immunity* 71, 4804-4807. 10.1128/iai.71.8.4804-4807.2003.
  78. Kimura, T., Nada, S., Takegahara, N., Okuno, T., Nojima, S., Kang, S.J., Ito, D., Morimoto, K., Hosokawa, T., Hayama, Y., et al. (2017). Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals (vol 7, 13130, 2016). *Nature Communications* 8, 14711. 10.1038/ncomms14711.
  79. Simmons, D.P., Nguyen, H.N., Gomez-Rivas, E., Jeong, Y., Jonsson, A.H., Chen, A.F., Lange, J.K., Dyer, G.S., Blazar, P., Earp, B.E., et al. (2022). SLAMF7 engagement superactivates macrophages in acute and chronic inflammation. *Science Immunology* 7, eabf2846. 10.1126/sciimmunol.abf2846.
  80. Mutvei, A.P., Nagiec, M.J., and Blenis, J. (2023). Balancing lysosome abundance in health and disease. *Nature Cell Biology* 25, 1254-1264. 10.1038/s41556-023-01197-7.
  81. Asrani, K., Murali, S., Lam, B., Na, C.H., Phatak, P., Sood, A., Kaur, H., Khan,



- Z., Noë, M., Anchoori, R.K., et al. (2019). mTORC1 feedback to AKT modulates lysosomal biogenesis through MiT/TFE regulation. *Journal of Clinical Investigation* 129, 5584-5599. 10.1172/jci128287.
82. Kim, S., Song, H.S., Yu, J., and Kim, Y.M. (2021). MiT Family Transcriptional Factors in Immune Cell Functions. *Molecules and Cells* 44, 342-355. 10.14348/molcells.2021.0067.
  83. Steingrimsson, E., Tessarollo, L., Pathak, B., Hou, L., Arnheiter, H., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2002). Mitf and Tfe3, two members of the Mitf-Tfe family of bHLH-Zip transcription factors, have important but functionally redundant roles in osteoclast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4477-4482. 10.1073/pnas.072071099.
  84. Abdelmagid, S.M., Sondag, G.R., Moussa, F.M., Belcher, J.Y., Yu, B., Stinnett, H., Novak, K., Mbimba, T., Khol, M., Hankenson, K.D., et al. (2015). Mutation in Osteoactivin Promotes Receptor Activator of NFκB Ligand (RANKL)-mediated Osteoclast Differentiation and Survival but Inhibits Osteoclast Function. *Journal of Biological Chemistry* 290, 20128-20146. 10.1074/jbc.M114.624270.
  85. Lamb, Y.N. (2018). Elotuzumab: A Review in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Drugs* 78, 1481-1488. 10.1007/s40265-018-0969-4.