

## 31. ヒト樹状細胞を大量に生み出す源細胞の同定

樗木 俊聡

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体防御学分野

Key words : 樹状細胞 (DC), 単球, マクロファージ, 顆粒球-単球前駆細胞 (GMP), 共通単球前駆細胞 (cMoP)

### 緒言

単球、マクロファージに樹状細胞 (DC) を加えた細胞群は単核系貪食細胞と呼ばれ、組織恒常性や免疫反応において中心的な役割を担っている。正常組織に常在するマクロファージの大部分は胎生期の前駆細胞に由来するものであるが、腸管、心臓、肺、乳腺、真皮そして骨におけるマクロファージの一部は単球に由来する。さらに、炎症は、組織に浸潤した単球の単球由来マクロファージや樹状細胞への分化を促進し、それらは恒常的生体防御反応や炎症性疾患に関与する。マウス単球は、古典的  $Ly6c^{hi}$  単球と非古典的  $Ly6c^{lo}$  単球に分類される。 $Ly6c^{lo}$  単球は血中のみに存在するが、 $Ly6c^{hi}$  単球は血液ならびに他の組織にも存在し、そこでマクロファージや樹状細胞に分化する。また、ほとんどの  $Ly6c^{lo}$  単球は  $Ly6c^{hi}$  単球に由来すると考えられている。ヒト単球は、古典的  $CD14^+CD16^-$  単球、中間型  $CD14^+CD16^+$  単球、そして非古典的  $CD14^{lo/-}CD16^+$  単球に分類される。機能的解析や遺伝子発現解析によって、ヒト  $CD14^+CD16^-$  単球と  $CD14^{lo/-}CD16^+$  単球のカウンターパートはそれぞれマウス  $Ly6c^{hi}$  単球と  $Ly6c^{lo}$  単球であることが示されている。一方、DC はヒト及びマウスにおいて抗原提示能に優れた従来型 DC (cDC) と大量の I 型インターフェロンを産生する形質細胞様 DC (pDC) に分類される。

単球及び DC は、骨髄 (BM) 中で造血幹細胞 (HSC) から連続的な中間前駆細胞を経て分化する。単球系細胞に限局した分化能を有する共通単球前駆細胞 (cMoP) がマウスにおいて同定されている。我々は、DC だけを大量に生み出す共通 DC 前駆細胞 (CDP) をマウス骨髄で同定し報告してきた。これら cMoP は単球-樹状細胞前駆細胞 (MDP) に由来すると考えられている。一方、ヒトでは、IL-3 受容体 (CD123)、Flt3 (CD135)、そして CD45RA の発現パターンの違いを指標にして、共通ミエロイド前駆細胞 (CMP)、赤芽球系前駆細胞 (MEP)、そして顆粒球-単球前駆細胞 (GMP) が同定されてきた。また最近、ヒト MDP が GMP 分画中に同定された。マウス MDP と同様に、ヒト MDP は単球/マクロファージと DC を生み出すが、この MDP におけるリンパ球への分化能は未だ検証されていない。ヒト GMP や MDP が存在することから、単球/マクロファージのみを産生し、他の血球系への分化能を持たないヒト cMoP や CDP の存在が予想された。

### 方法および結果

#### 1. ヒト cGMP の細分化

cGMP は、 $Lin^-CD34^+CD38^+CD10^-CD123^{lo}CD135^+CD45RA^+$  の細胞として定義されるが、一部 T 細胞分化能をもつ細胞も含まれ、最近では、単球及び DC 系統にコミットした前駆細胞である MDP がこの cGMP 分画中に同定されている。我々は、X, Y の発現パターンによって、ヒト臍帯血 (UCB) 由来 cGMP を  $X^{hi}Y^{hi}$  (R2)、 $X^{hi}Y^{int}$  (R3)、 $X^+Y^-$  (R4) および  $X^-Y^-$  (R5) という 4 つの分画に細分化した (図 1A)。また、 $Lin^-CD34^-CD38^+CD10^-CD123^{lo}CD135^+CD45RA^+$  分画中の  $X^{hi}Y^{hi}$  分画も定義に加えた (R1)。R1 は  $CD34^-$ 、一方 R2 が  $CD34^+$  であったが、それ以外の表現型は同一であった。これらの 5 つの分画 (R1~R5) はヒト BM 中にも確認されたが、ヒト末梢血には検出されなかった (図 1B)。

R1~R5 分画のミエロイド系-赤血球系分化能を評価するため、コロニー形成能 (CFU) を *ex vivo* で解析した (図 1C)。コントロールとして、 $Lin^-CD34^+CD38^-CD45RA^+CD10^+$  の多能リンパ球系前駆細胞 (MLP) と  $Lin^-CD34^+CD38^+CD123^{lo}CD10^-CD135^+CD45RA^-$  の共通ミエロイド系前駆細胞 (CMP) も同様に解析した。その結果、

R3分画とR4分画は、マクロファージ (M)、顆粒球-マクロファージ (GM)、および顆粒球 (G) コロニーを形成した。また、興味深いことに、R2分画とR5分画はMコロニーのみを形成し、R1分画はミエロイド系コロニーをわずかに形成した。以前のcGMPの報告から予想されたように、いずれの分画もEまたはGEMMコロニーを形成しなかった(図1C)。細胞の形態に関しては、R2~R5分画は核が丸く、拡張しており、細胞質の体積が比較的小さいという典型的な前駆細胞の形態を有していた。これらの結果は、cGMPが異なるミエロイド系細胞分化能を有する4つのユニークな亜集団に分画できることを示していた。

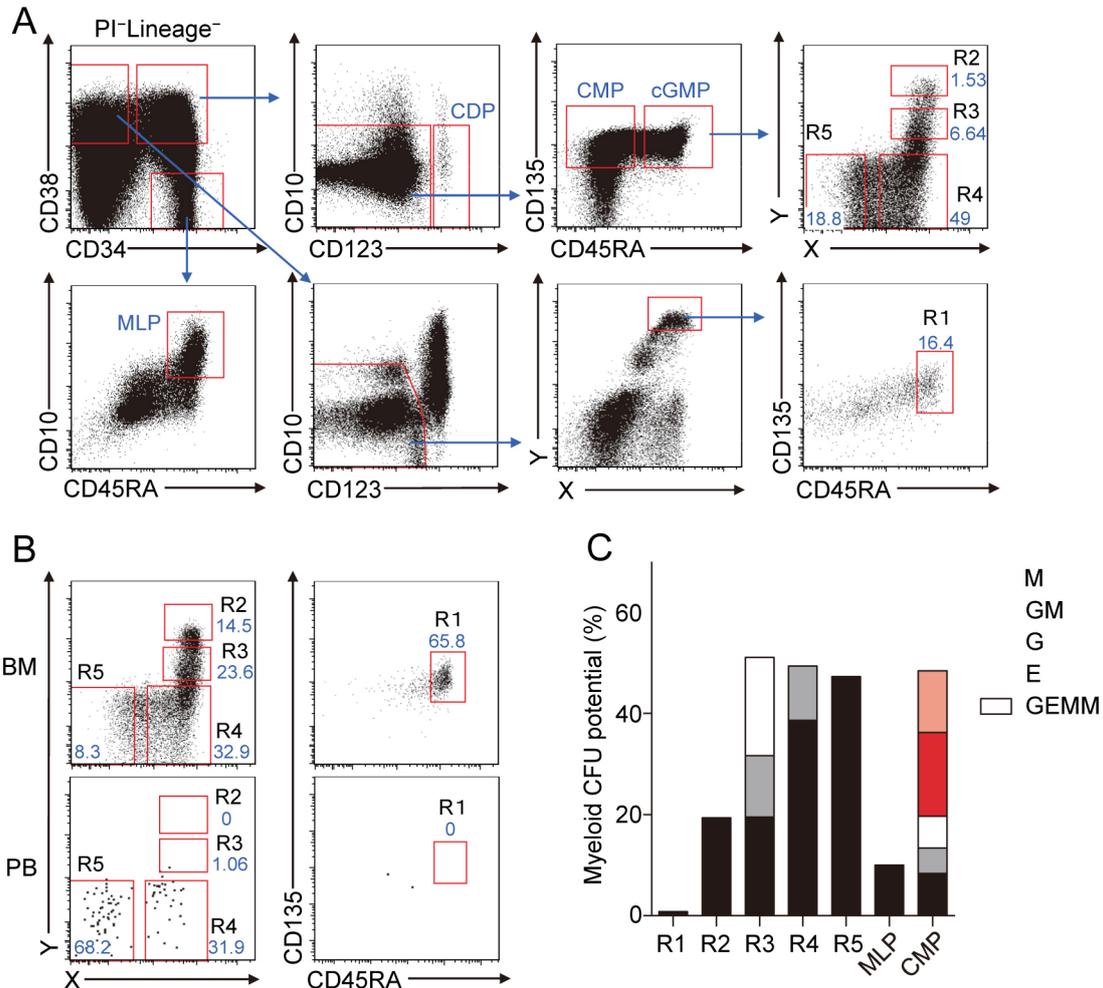


図1. ヒト cGMP の細分化とミエロイドコロニー形成試験

(A) ヒト臍帯血 (UCB) 並びに (B) 骨髄 (BM) 及び末梢血 (PB) からの Lin<sup>-</sup> 単核球を FCM によって解析した。従来の GMP (cGMP)、CMP、及び MLP は、それぞれ CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD123<sup>lo</sup>CD10<sup>-</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD123<sup>lo</sup>CD10<sup>-</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>、および CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>である。GMP を細分化した集団の詳細な表現型は、以下の通り：CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD123<sup>lo</sup>CD10<sup>-</sup>X<sup>hi</sup>Y<sup>hi</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>hi</sup> (R1)、X<sup>hi</sup>Y<sup>hi</sup>GMP (R2)、X<sup>hi</sup>Y<sup>int</sup>GMP (R3)、X<sup>+</sup>Y<sup>-</sup>GMP (R4)、X<sup>-</sup>Y<sup>-</sup>GMP (R5)。ゲート領域内またはその付近の数値は、各集団の頻度を示している。(C) 各 UCB 集団のミエロイド系細胞コロニー形成能。ソーティングした各前駆細胞 (1×10<sup>2</sup>) を適切なサイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で培養し、10 日後にコロニーをカウントした。各バーは、培養した細胞あたりのコロニーの平均数を表す。M：マクロファージ、GM：顆粒球/マクロファージ、G：顆粒球、E：赤芽球、GEMM：顆粒球/赤芽球/マクロファージ/巨核球。

## 2. ヒト cMoP および真正 GMP の同定

R1~R5分画が異なるミエロイド系細胞分化能を有していたため、*in vitro*培養系を用いて、顆粒球、単球およびDCのサブセットへの分化能を検討した。UCBからソーティングした各分画を、Fms様チロシンキナーゼ受容体3リガンド (Flt3L)、トロンボポエチン (TPO) および幹細胞因子 (SCF) (以下、FTS) の存在下で2日間 (R1)、4日間

(R2)、または10日間(R3~R5)培養した。R3分画とR4分画は *in vitro* コロニー形成解析(図1C)の結果と一致して顆粒球への分化能を示したが、R1、R2、およびR5は顆粒球への分化能を示さなかった(図2A、B)。重要なことに、R1~R3分画は、古典的なCD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>単球、中間的なCD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球、および非古典的なCD14<sup>lo/-</sup>CD16<sup>+</sup>単球などの単球サブセットを生み出したが、如何なるDCサブセット分化能も示さなかった(図2A、B)。対照的に、R4およびR5分画はすべてのDCサブセットへ分化したことから、R4とR5分画がcGMPにおけるDCの主要な源であることが示唆された。

次に我々はR1~R5分画のリンパ球系分化能を調べた。T細胞への分化能を評価するため、T細胞分化に不可欠なNotchリガンドであるデルタ様リガンド4(Dll4)を発現しているTst4ストローマ細胞上において、Flt3LとIL-7の存在下で各分画を培養した。B-NK細胞分化能は、Tst4ストローマ細胞上において、SCF、TPO、IL-2およびIL-7の存在下で評価した。コントロールとして、各々MLPあるいはB-NK前駆細胞を用いた(図2C)。注目すべきことに、R1~R3分画はT及びB-NK細胞分化能を全く示さなかったが、R4およびR5分画は多くのT及びB-NK細胞が出現した。

これらの表現型と分化能解析結果に基づき、我々は、R1が最近定義されたプレ単球と同じプレ単球分画、R2がcMoP、そして、R3が真のGMP(以下rGMP)であると結論した。DC分化能はR4/R5に局限していたが、残念ながらDCだけに分化する前駆細胞(CDP)を絞り込むことはできなかった。

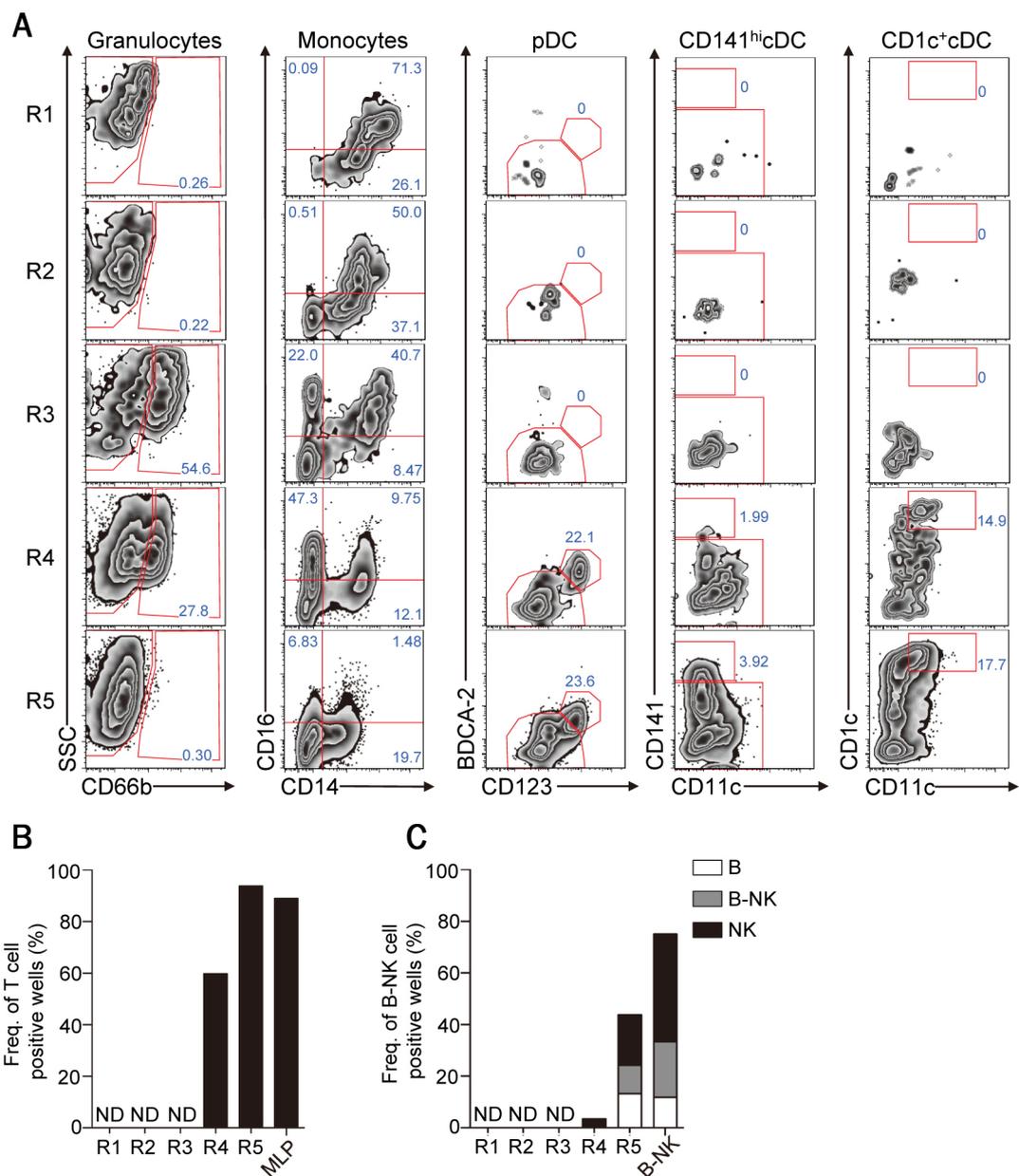


図2. ヒト cGMP 亜集団のミエロイド系及びリンパ系細胞への分化能

前駆細胞 (R1~R5) の定義は図1と同じ。(A, B) *ex vivo* における前駆細胞からの単球および DC の分化。細胞 ( $1 \times 10^3$ ) を Flt3L (50 ng/mL)、TPO (50 ng/mL)、および SCF (100 ng/mL) の存在下 (FTS 条件) で 2 日間 (R1)、4 日間 (R2) または 8 日間 (R3~R5) 培養し、顆粒球 (CD66b<sup>+</sup>)、単球 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> および CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>)、pDC (CD123<sup>+</sup>BDCA-2<sup>+</sup>) および cDC (CD141<sup>hi</sup>CD11c<sup>-</sup> および CD1c<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) について分析した (A)。CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> 単球は CD14<sup>+</sup> mono と標記し、一方、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> および CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> 単球は CD16<sup>+</sup> mono と標記している。少なくとも 3 回の独立した実験を行った。ゲート領域内またはその上の数字は、各画分の割合を示している。(B, C) ソーティングした部分集団の *ex vivo* における T 細胞 (B) と B および NK 細胞 (C) への分化。

### 3. ヒト cMoP がもつ単球シグネチャ

cMoP が単球シグネチャを有するか否か（単球分化に適した遺伝子を発現しているか否か）を調べるため、我々は、rGMP、cMoP、プレ単球、cMoP 由来の CD14<sup>+</sup>単球、および末梢血 CD14<sup>+</sup>単球の網羅的遺伝子発現解析を行った。コントロールとして、複数のミエロイド系細胞への分化能を有している CMP を含めた。予想されたように、単球特異的遺伝子の発現レベルは、単球分化に伴い徐々に増加し、前駆細胞の中では、CMP で単球特異的遺伝子の発現レベルが最も低く、rGMP では弱く、cMoP で最も高くなっていった（図 3A）。注目すべきことに、単球の発生に重要な転写因子である PU.1、IRF8、CEBPB、および KLF4 の発現レベルは、cMoP で横ばい状態になっており（図 3B）、単球の遊走に必要なケモカイン受容体である CX3CR1、および CCR2 の発現レベルは、プレ単球、cMoP 由来の CD14<sup>+</sup>単球、および末梢血 CD14<sup>+</sup>単球のステージでさらに増加していた（図 3C）。主成分（PC）分析に基づく各集団の点の位置は、連続的な単球の分化過程に合致しており、我々の *in vitro* および *in vivo* における所見とよく相関していた（図 3D）。

最後に、ヒト血液中の CD14<sup>+</sup>単球において濃縮されていることが知られている遺伝子セットの発現レベル（ヒト単球シグネチャ）を用いて遺伝子セット濃縮解析（GSEA）を行った。ヒト単球シグネチャは、単球に向かう分化の程度と相関して増加（cMoP 由来の単球 > プレ単球 > cMoP > rGMP > CMP）、これは、各前駆細胞の単球分化への運命決定レベルを裏付けていた。これらのデータから、単球に限局した分化能を持つ前駆細胞としての cMoP の妥当性と、rGMP から cMoP そして単球への連続的な分化経路が強く支持された。

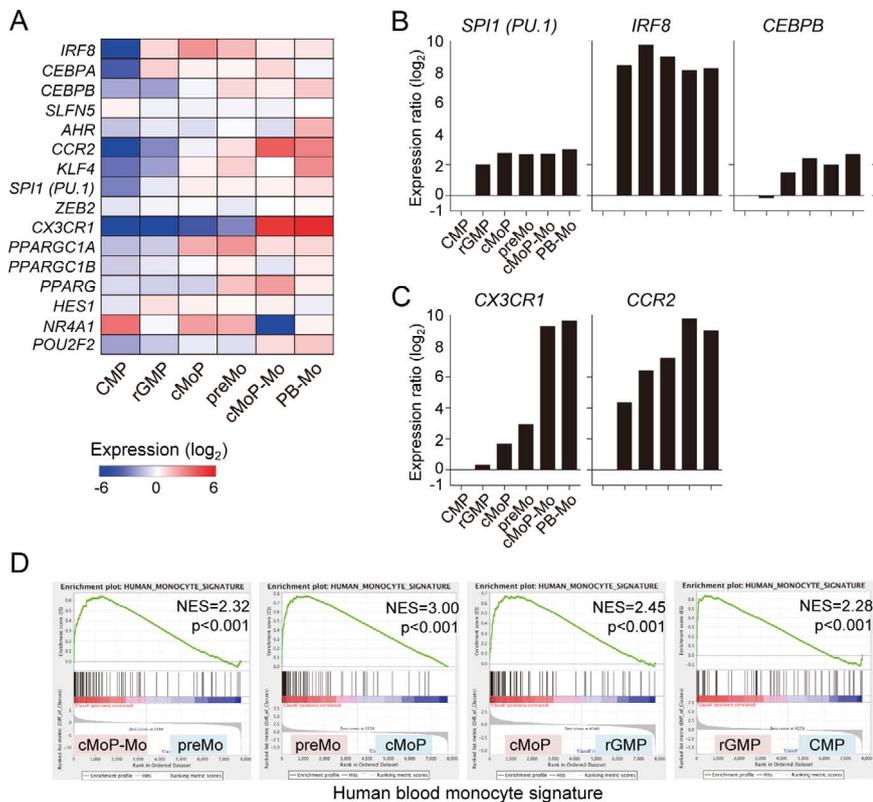


図 3. 各前駆細胞の遺伝子解析

ソーティングにて精製した CMP、rGMP、cMoP、rGMP、プレ単球（preMo）、cMoP 由来 CD14<sup>+</sup>単球（cMoP-Mo）、および PB 単球（PB-Mo）を解析した。（A）表示の細胞における単球特異的遺伝子の RNA 発現のヒートマップ（log<sub>2</sub>）。（B、C）表示の細胞における単球の分化（B）と細胞遊走（C）に関与する転写因子およびケモカイン受容体の相対的 mRNA レベル。データは CMP に相対的。（D）ヒト血液単球シグネチャをヒト血液 CD14<sup>+</sup>単球の上位 200 遺伝子から作製し、遺伝子セット濃縮解析（GSEA）を cMoP 対 rGMP、rGMP 対 CMP、cMoP 対 CMP において濃縮されている遺伝子を比較するために実施した。p：正規 p 値、GES：遺伝子濃縮スコア。データは、プールされた 20 個の試料から取得した。

## 考 察

我々はヒト DC 前駆細胞の同定を目的として本研究を開始した。2つの表面分子 X, Y を指標にヒト cGMP を4つの分画に細分化し解析した結果、予想外に cMoP と真の GMP (rGMP) の同定に成功した。rGMP は顆粒球と単球へと分化し、DC 及びリンパ球へは分化しなかった。また、Y-cGMP 分画のみが DC とリンパ球への分化能を有していた。これらの結果は、DNA マイクロアレイデータを用いた複数の遺伝子の発現分析によって裏付けられた。ヒト及びマウスの cGMP は顆粒球と単球に加えて、DC へも分化する。これらの前駆細胞は、ミエロイド系細胞分化能に加えて、明らかなリンパ球系細胞への分化能を有している。例えば、マウスの cGMP は、リンパ系遺伝子を高レベルに発現し、*in vitro* と *in vivo* で T 細胞及び B 細胞へと分化する。また、ヒト UCB 由来の cGMP も T 細胞に分化する能力を有している。我々は、前駆細胞のリンパ球系分化能を評価するために、最適化された方法である Tst4 ストローマ細胞/DII4 及び Tst4 ストローマ細胞と複数のサイトカインと組み合わせることで培養し、ヒトの rGMP にはリンパ球系細胞への分化能がないことを明らかにした。また、rGMP は DC への分化能はなく、DC 分化能は Y-cGMP 分画 (R4 および R5 分画) に保存されていた。R4 と R5 分画は、単球および DC への分化能に加えて、顆粒球及びリンパ球への分化能も備えていた。R4 および R5 分画が、LMPP や MLP などのような rGMP の上流の前駆細胞に相当するのか、それともヒト CDP を含む不均一な前駆細胞集団であるのか、今後さらなる検討が必要である。また、ヒトの rGMP に相当する前駆細胞が従来のマウス cGMP 中に存在するか否かを確認することも興味深い課題である。単球および単球由来マクロファージが、メタボリック症候群を含む様々な炎症性疾患や腫瘍形成促進に積極的に関与することから、我々の研究成果は、ヒト単球の分化機構という視点からだけでなく、cMoP および単球を標的とした治療や臨床応用の可能性にも光明を投じるものと考えている。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野の川村俊輔及び小内伸幸である。本研究にご支援いただいた上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Kawamura S, Onai N, Kurabayashi K, Sato T, Yotsumoto S, Takenaka K, Akashi K, Ohteki T. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential- a counterpart of mouse cMoPs. Submitted.