

【目的】樹状細胞、単球及びマクロファージは単核貪食細胞に属し、病原性微生物に対する免疫応答や不純物や死細胞を除去することで生体の恒常性維持に寄与する。近年、細胞表面マーカーの充実、セルソーターの技術進歩によって、マウス単核貪食細胞前駆細胞が発見され、同細胞群の分化経路や分化系譜決定転写因子なども明らかになり、分化制御機構が解明されつつある。我々の研究グループもマウス樹状細胞分化に必須サイトカイン受容体の発現を指標に、樹状細胞サブセットのみに分化する前駆細胞を世界に先駆けて発見し、同細胞の分化経路を明らかにした。一方で、ヒト単核貪食細胞の分化研究は、倫理的な問題からサンプル入手が困難な点、あるいは実験系が十分に確率されていない点などから研究が遅れていた。こうした中、我々の研究グループは前駆細胞を発見するために細胞表面マーカーCLEC12AとCD64を見出し、臍帯血及び骨髄からヒト単球のみに分化する単球前駆細胞を同定した。また、他のグループから樹状細胞前駆細胞及びマクロファージ/樹状細胞前駆細胞を同定したという報告があったが、我々が該当細胞の分化能を検討したところ、他系列細胞への分化能を有していたり、あるいは全ての樹状細胞サブセットへの分化能を有していなかったりすることを確認している。つまりヒト樹状細胞前駆細胞は未同定である。そこで本研究では真のヒト樹状細胞前駆細胞を同定することを目的とする。また、病原性微生物感染時には、感染が引き金になり、造血幹細胞から分化の方向性が変更することが報告されている。そこで、本研究ではヒト単核貪食細胞前駆細胞においても感染シグナルに反応し、分化の方向性の偏りが誘導されるかどうかを検討する。

【方法】1. 臍帯血から  $\text{Lin}^- \text{CD}34^+ \text{CD}38^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{CD}123^+ \text{CLEC}12\text{A}^+ \text{CD}64^-$  分画を純化し、Flt3L、SCF及びTPO存在下で培養し、樹状細胞への分化能を他の分画と比較検討する。2. 同分画を純化し、免疫不全マウス(NOGマウス)に移植し、ヒト *Flt3L*、*SCF*あるいは*TPO*遺伝子を組み込んだ発現ベクターを微静脈から急速に注入して同サイトカイン群を発現させ、*in vivo*における分化能力を検討する。3.  $\text{Lin}^- \text{CD}34^+ \text{CD}38^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{CD}123^+ \text{CLEC}12\text{A}^+ \text{CD}64^-$  分画からRNAを抽出してcDNAを合成し、*TLR*遺伝子発現を検討する。4.  $\text{Lin}^- \text{CD}34^+ \text{CD}38^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{CD}123^+ \text{CLEC}12\text{A}^+ \text{CD}64^-$  分画をTLRリガンドにて刺激後どのような細胞に分化するかどうかを検討する。

【結果】1.  $\text{Lin}^- \text{CD}34^+ \text{CD}38^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{CD}123^+ \text{CLEC}12\text{A}^+ \text{CD}64^-$  分画をFlt3L、SCF及びTPO存在下で培養しフローサイトメーターにて解析したところpDC、CD141<sup>+</sup>cDC1及びCD1c<sup>+</sup>cDC2と全てのヒトDCサブセットへと分化した。また、DCサブセットへの分化能力は他の分画と比較してもっとも優れていた(図A)。2.  $\text{Lin}^- \text{CD}34^+ \text{CD}38^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{CD}123^+ \text{CLEC}12\text{A}^+ \text{CD}64^-$  分画(以下CLEC12A<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup>分画)をNOGマウスに移植後、ハイドロダイナミック法にてFlt3L、SCF及びTPOを過剰発現させたところ、*in vitro*の実験と同様に全てのDCサブセットへと分化した。3. CLEC12A<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup>分画はTLR4とTLR9を発現していた。そこで、同前駆細胞をLPSあるいはCpGにて2時間刺激後、その後の分化能を検討したところ、LPS刺激後はcDC2にCpG刺激後はpDCへと優位に分化した(図B、C)。

定常状態と感染状態におけるヒト樹状細胞サブセットの分化モデル

