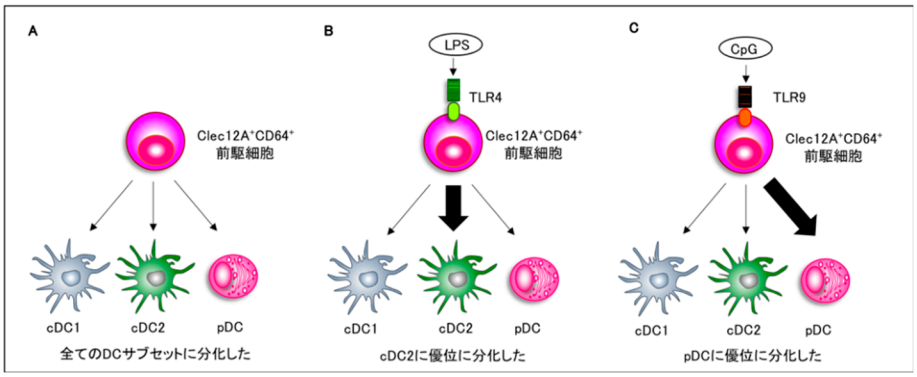
31　ヒト単核貪食前駆細胞の同定と感染時の分化機構の解明	小内　伸幸

【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検討する。

【方法】1. 臍帯血から $Lin^-CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+CLEC12A^+CD64^-$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. $Lin^-CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+CLEC12A^+CD64^-$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. $Lin^-CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+CLEC12A^+CD64^-$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検討する。

【結果】1. $Lin^-CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+CLEC12A^+CD64^-$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、$CD141^+$cDC1 及び $CD1c^+$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. $Lin^-CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+CLEC12A^+CD64^-$分画（以下 $CLEC12A^+CD64^-$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. $CLEC12A^+CD64^-$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



31. ヒト単核貪食前駆細胞の同定と感染時の分化機構の解明

小内　伸幸

金沢医科大学 医学部 免疫学講座

Key words：単核貪食細胞，樹状細胞，前駆細胞，感染

緒　言

単核貪食細胞は単球、マクロファージ及び樹状細胞から構成され、病原性微生物や癌に対する生体防御機構や死細胞や老廃物を除去し生体の恒常性を維持し、更に様々な炎症性疾患の発症、増悪化に寄与している。この為、同細胞の機能や特徴を活かした臨床応用や創薬の標的として期待されている。近年、細胞表面マーカーに対する抗体が充実し、フローサイトメーター・セルソーターの制度・技術進歩、またレポーターマウスを用いた実験からマウス貪食細胞前駆細胞が同定され、分化経路が明らかになっている。こうした中、我々は世界に先駆けて、マウスの骨髄から樹状細胞のみに分化する樹状細胞前駆細胞を発見した［1，2］。一方で、実験材料の制限、*in vitro* 及び *in vivo* における実験システムの不整備からヒト単核貪食細胞の分化機嫌及びその制御機構研究は遅れている。そこで本研究では、ヒト単核貪食細胞の前駆細胞の同定と分化誘導機構の解明を第一の研究目的とする。

我々のグループは、全てのヒトミエロイド系細胞の分化能を評価可能な *in vitro* 培養システムを樹立した。このシステムを用いてヒト臍帯血及び骨髄から単球のみに分化するヒト共通単球前駆細胞と単球／顆粒球に分化する新規前駆細胞を発見した［3］。我々はヒト共通単球前駆細胞を発見する過程で、臍帯血の $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}CD45RA^{+}CD123^{+}$分画中に優れた樹状細胞への分化能を有する亜分画を見出している。そこで、本研究ではこの分画の分化能を検討した。また、ウイルスや細菌など、病原性微生物感染時に免疫細胞が感染・炎症シグナルを感知し、速やかに感染局所に浸潤し、特異的機能を発揮して微生物を排除する。また、末梢組織の成熟免疫細胞ばかりでなく、造血幹細胞や前駆細胞も病原体センサーである Toll 様受容体（Toll like receptor）を発現し、病原性微生物由来のシグナルを受けると分化の方向性が偏り、病原性微生物排除に関与、貢献していることがマウスを用いた実験で報告されている［4，5］。そこで本研究ではヒトにおいても感染時に幹細胞や前駆細胞の分化の方向性に偏りが起きるかどうか検討を行なった。

ヒト臍帯血から $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}CD45RA^{+}CD123^{+}CLEC12A^{+}CD64^{-}$細胞を純化し、*ex vivo* における分化能を検討したところ、全ての樹状細胞サブセットへと分化し、また優れた同細胞への分化能を示した。ヒト血液前駆細胞の分化能を評価する実験系として免疫不全マウスを用いたヒト化マウスがある。この実験システムで問題になっている点が、造血系サイトカインのヒトとマウスの公差反応性である。マウス造血系サイトカインをヒトサイトカインに置換した第三世代のヒト化マウスは樹立されているが一般化には至っていない。この問題を解消すべく、ハイドロダイナミック法にてヒトサイトカイン Flt3L、SCF、TPO を免疫不全マウスに過剰発現させ、マウス内においてヒト血液前駆細胞の分化能を評価する実験系を樹立した。このシステムを用いて、我々は同前駆細胞を NOG マウスに移植し、Flt3L、SCF 及び TPO を過剰発現させ、各系列細胞への分化能を検討した。

方　法

1. *Ex vivo* における貪食系列細胞への分化能の検討

我々の研究グループは純化した幹細胞や前駆細胞をサイトカイン Flt3L、SCF 及び TPO 存在下で培養すると全てのヒト貪食細胞（単球、樹状細胞及び顆粒球）を分化誘導可能な培養システムを樹立した。この培養システムを用いて該当する前駆細胞の分化能を検討した。ヒト臍帯血から系列細胞マーカー陰性分画を Cy5 標識された抗体カクテル（CD2、CD3、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD56、CD235b）と抗 Cy5-microbeads と AutoMACSpro を用いて粗精製した。その後、抗 CD34、CD38、CD45RA、CD123、CLEC12A、CD64 抗体で染色後、$Lin^-CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+CLEC12A^+CD64^-$細胞をセルソーターにて純化する。純化後、10%FCS-RPMI（100 unit/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン）及び Flt3L、SCF 及び TPO 存在下で CO_2 インキュベータ内 37℃ 5% CO_2 で 7 日間培養した。培養後、分化してきた細胞を回収し、PBS で洗浄後、MACS buffer（1%FCS 2mM EDTA PSB）に懸濁し、抗 BDCA2、CD123、CD64、CD141、CD1c、CD14、CD16 抗体にて染色した。その後、フローサイトメーターにて解析し、各貪食細胞への分化能を検討した。また純化した前駆細胞をヒト造血系サイトカインを含む Methoculto H-4435 を用いて 1 週間培養し、単球、顆粒球、赤血球系細胞への分化能をコロニーの形態から判定し、検討した。

2. ハイドロダイナミック法による *in vivo* 分化能評価システムの樹立

ヒト *Flt3L*、*SCF* 及び TPO 遺伝子をクローニングし、CMV プロモーターを含む発現ベクターに組み込み、大腸菌を Large scale 培養を行い、発現ベクターを大量に精製した。純化した該当前駆細胞 1×10^4 個を尾静脈注射によって免疫不全マウス（NOG マウス）に移植した。移植後、1 ml の PSB に懸濁した 10 μg の各サイトカインを組み込んだプラスミドベクター急速尾静脈注射した。移植から 1 週間後、脾臓と骨髄を取り出し、脾臓はコラゲナーゼ処理を行い、細胞懸濁液を調整した。その後抗 BDCA2、CD123、CD64、CD141、CD1c、CD14、CD16 抗体にて染色して、フローサイトメーターにて解析し各貪食細胞への分化能を検討した。また導入したサイトカインは ELISA 方にてマウス血清中によって各サイトカインは発現していることを確認している。

3. 定量的 PCR 方法によって

臍帯血から各前駆細胞と形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell：pDC）と従来型樹状細胞 1（conventional dendritic cell 1：cDC1）と cDC2 をそれぞれ純化し、1×10^5 個細胞をプールし−80℃保存した。プールした細胞から RNA mini easy キットを用いて RNA を精製した。精製した RNA 溶液にランダムプライマー（100 ng/ml）と逆転写酵素 SuperScriptII RT-（40 units）を加えて 42℃ 1 時間反応させて cDNA を合成した。cDNA を合成後、各 *TLR* 遺伝子特異的プライマーと SYBER green Master Mix を加えて定量的 PCR を行い、各 TLR の mRNA を検討した。

4. *Ex vivo* において TLR リガンドで刺激後、その後の分化能力の検討

純化した前駆細胞を 10%FCS-RPMI 培地に懸濁し、LPS（10 ng/ml）あるいは CpG（10 ng/ml）を加えて、CO_2 インキュベータ内 37℃ 5% CO_2 で 2 時間ほど刺激した。刺激後、直ちに 10 倍量の PBS を加えて洗浄する。これを 2 回繰り返し、その後、10%FCS−RPMI（100 unit/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン）及び Flt3L、SCF 及び TPO 存在下で CO_2 インキュベータ内 37℃ 5% CO_2 で 7 日間培養した。培養後、分化してきた細胞を回収し、PBS で洗浄後、MACS biffer（1% FCS 2 mM EDTA PSB）に懸濁し、抗 BDCA2、CD123、CD64、CD141、CD1c、CD14、CD16 抗体にて染色した。その後、フローサイトメーターにて解析し、各貪食細胞への分化能を検討した。

結果および考察

1. *Ex vivo* における貪食系列細胞への分化能

臍帯血から Lin$^-$CD34$^+$CD38$^+$CD45RA$^+$CD123$^+$CLEC12A$^+$CD64$^-$分画以下（CLEC12A$^+$CD64$^-$）を *ex vivo* において培養したところ、BDCA2$^+$CD123$^+$の形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell : pDC）、CD141$^+$従来型樹状細胞 1（conventional dendritic cell1 : cDC1）及び CD1c$^+$CD11c$^+$cDC2 へと分化した（図 1）。また DC サブセットへの分化能は他の分画よりも CLEC12A$^+$CD64$^-$分画が優れていた（図 1）。また *in vitro* colony 形成実験結果から、単球への分化能を有していた。今後、真の DC 前駆細胞を同定するには新たなマーカーを検索する必要がある。

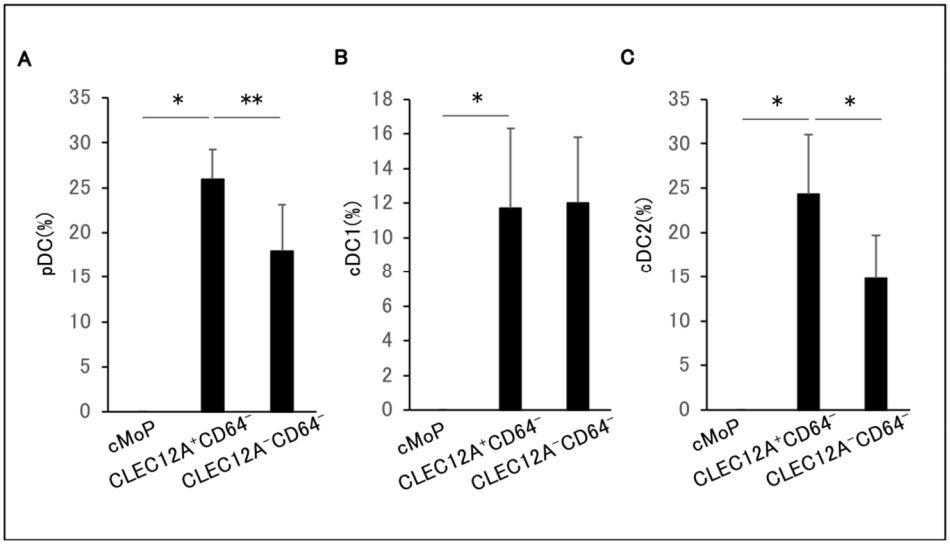


図 1. *ex vivo* における樹状細胞サブセットへの分化能
純化した CLEC12A$^+$CD64$^-$、CLEC12A$^-$CD64$^-$及び cMoP を Flt3L、SCF 及び TPO 存在下で培養し、pDC（A）、cDC1（B）及び cDC2（C）への分化能を検討した。CLEC12A$^+$CD64$^-$分画は全てのヒト DC サブセットへと分化した。T-test、* $P < 0.001$、 ** $P < 0.005$。

2. *In vivo* における分化能の検討

野生型 C57BL/6 マウスにハイドロダイナミック法によってヒト Flt3L、SCF 及び TPO を過剰発現させた後、24 時間後に血清を採取して ELISA 方法に各サイトカイン量を測定したところ、ヒト Flt3L（74 pg/ml）、SCF（43 pg/ml）、TPO（78 pg/ml）と有意に発現し、このシステムが機能していることを確認した。

そこで、純化した CLEC12A$^+$CD64$^-$細胞 1×10^4 個を尾静脈注射によって NOG マウスに移植し、その後ヒト Flt3L、SCF 及び TPO を過剰発現させ、5 日後の脾臓及び骨髄細胞を回収し、同前駆細胞の娘細胞を解析した。その結果、*ex vivo* の結果と同様に CLEC12A$^+$CD64$^-$細胞は *in vivo* においても pDC、cDC1 及び cDC2 と全てのヒト DC サブセットへと分化した。これら *ex vivo* 及び *in vivo* の実験結果から CLEC12A$^+$CD64$^-$細胞には優れた DC 分化能を有する前駆細胞が含まれていることが明らかになった。

3. CLEC12A$^+$CD64$^-$細胞における TLR 発現の検討

純化した CLEC12A$^+$CD64$^-$細胞、pDC、cDC1 及び cDC21 から RNA を抽出して逆転写反応を行い、cDNA を合成し、定量的 PCR 方法によって TLR4 と TLR9 の mRNA 発現レベルを検討した。この結果、CLEC12A$^+$CD64$^-$細胞は pDC あるいは cDC における発現レベルまでには届かないが有意に TLR4 及び TLR9 を発現していた（図 2）。

4. *Ex vivo* において TLR リガンドで刺激後、その後の分化能力の検討

CLEC12A^{+}CD64^{-}細胞が有意に TLR4 及び TLR9 を発現していることが明らかになった（図 2）。この TLR 発現の免疫学的意義を明らかにする為に、純化した同細胞を *ex vivo* にて LPS あるいは CpG にて 2 時間刺激後、洗浄し、DC サブセットへの分化能を検討した。LPS 刺激後では cDC2 への分化能が増強し、pDC への分化能が有意に低下した。一方、CpG 刺激では pDC への分化能が増強し、cDC1 及び cDC2 への分化能が低下した（図 3）。これらの結果から、CLEC12A^{+}CD64^{-}細胞上に発現する TLR は機能的であり、同リガンド刺激を受けると分化の方向性が変化することが明らかになった。

自然免疫担当細胞である樹状細胞やマクロファージは病原性微生物由来の構成成分 PAMPs（pathogen associated molecular patterns）を認識するパターン認識受容体（PRRs : pattern recognition receptors）を発現している。

これら自然免疫担当細胞は TLR などを介して PAMPs を認識し、活性化して炎症性サイトカインを産生し病原性微生物排除に働く。過去の報告では、マウス造血幹細胞や前駆細胞が TLR を発現し、分化の方向性が変わり病原性微生物排除に働くことが示唆されていた。本研究では我々は優れた樹状細胞分化能を有する CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞を見出した（図 1）。さらにこの前駆細胞が TLR4 あるいは TLR9 を発現していることを確認した（図 2）。そしてグラム陰性菌の細胞壁成分であり TLR4 のリガンドである LPS で刺激すると cDC2 への分化が増強し、pDC への分化能が低下した。cDC2 は強力な抗原提示能力を有し、CD4^{+}T 細胞を活性化する。CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞は TLR4 を発現し、グラム陰性菌の侵入を察知して cDC2 へと効果的に分化することで生体防御に寄与していると考えられる。また同前駆細胞を DNA ウイルスの核酸成分である CpG で刺激すると pDC への分化能が増強し、cDC への分化能が低下した。pDC はウイルス由来の核酸成分を認識し抗ウイルス作用を持つインターフェロンを迅速且つ大量に産生する細胞である。グラム陰性菌の場合と同様に、CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞はウイルス感染を感知して pDC へと効果的に分化することでウイルス排除に寄与していることが示唆された。

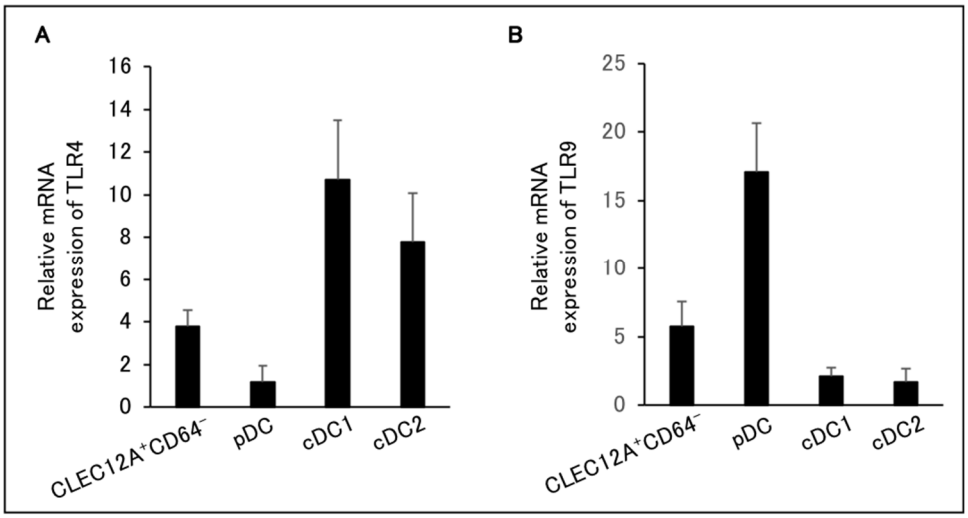


図 2. CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞と DC サブセットにおける TLR4 と TLR9 mRNA 発現

純化した CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞と各 DC サブセット（pDC、cDC1 及び cDC2）から RNA を抽出し、定量的 PCR 方法にて TLR4（A）と TLR9（B）の mRNA 発現を検討した。CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞は有意に TLR4 及び 9 を発現していた。

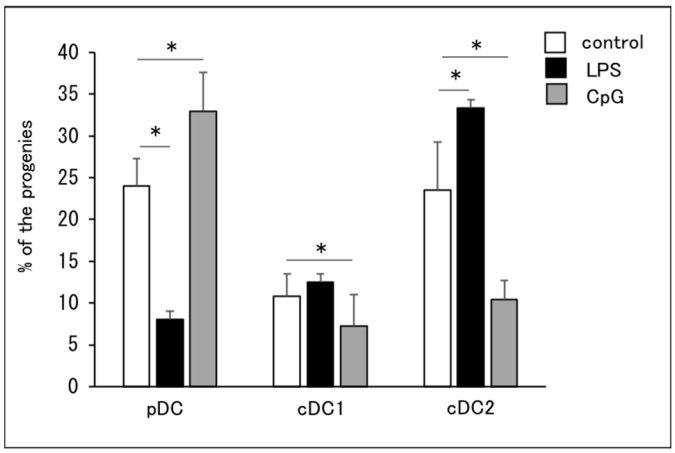


図 3. TLR リガンド刺激後の前駆細胞から DC サブセットへの分化検討
CLEC12A^{+}CD64^{-}前駆細胞を *ex vivo* にて LPS あるいは CpG 刺激後 DC サブセットへの分化能を検討した。LPS 刺激では cDC2 への分化能が増強し、pDC への分化能が減少した。CpG 刺激後では pDC 分化能が増強し、cD1 及び cDC2 への分化能が減少した。T-test、* P < 0.001、**P < 0.005。

謝　辞

本研究は東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野樗木俊聡教授、川村俊輔博士、倉林和隆先生のご協力並びに金沢医科大学医学部免疫学講座和田俊樹博士、松葉慎太郎博士のご協力頂いた。

文　献

1) Onai N, Obata－Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3^{+}M－CSFR^{+} plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. Nat. Immunol. Nov;8(11):1207－16. Epub 2007 Oct 7. doi: 10.1038/ni1518

2) Onai N, Kurabayashi K, Hosoi－Amaike M, Toyama－Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, Ohteki T. A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. Immunity May 23;38(5):943－57. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.006. Epub 2013 Apr 25.

3) Kawamura S, Onai N, Kurabayashi K, Sato T, Miya F, Tsunoda, T, Yotsumoto S, Kuroda S, Takenaka K, Akashi K, Ohteki T. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential : A Counterpart of Mouse cMoPs.. Immunity2017 May 16;46(5):835－848.e4. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.019.

4) Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrun U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. Toll－like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment.Immunity. 2006 Jun;24(6):801－12. doi: 10.1016/j.immuni.2006.04.008

5) Welner RS, Pelayo R, Nagai Y, Garrett KP, Wuest TR, Carr DJ, Borghesi LA, Farrar MA, Kincade PW. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. Blood. 2008 Nov 1;112(9):3753－61. doi: 10.1182/blood－2008－04－151506. Epub 2008 Jun 13.