

博士論文概要

論文題目

ヒト化マウスにおける
ヒト樹状細胞亜集団の性状・機能の解析
Characterization of properties and
functionality of human dendritic cell
subpopulations in humanized mice

申請者

岩渕	龍太郎
Ryutaro	IWABUCHI

生命医科学専攻 生命分子工学研究

2020年12月

生体には外来の病原体や体内の異常細胞の排除など、生体の恒常性を維持する免疫系が存在する。免疫の誘導には、これらの異物を捕捉し、T細胞が認識できるように提示する細胞が必須である。この中心的役割を担う細胞は樹状細胞と呼ばれ、免疫の司令塔としての役割を果たす。生体内における樹状細胞の性状・機能を明らかにすることは、免疫学の深耕のみならず、感染症ワクチンや新規免疫療法の開発に資する科学的知見を提供する。従来の樹状細胞の研究では、ヒト細胞を用いた実施が困難なことを理由に、生体内での性状・機能の解析の多くがマウスを用いて進められてきた。現在では、表現型や機能、生体内での局在の違いに基づき、多様な樹状細胞亜集団が分類されている。その一方で生物種の違いにより、マウスの樹状細胞の表現型や機能が、ヒトの樹状細胞と一致しない点も報告されている。さらに近年では、ヒトでは存在が確認されている樹状細胞について、マウスでは同一細胞が見出されていない事例も存在する。その最たる例が、DC3と呼ばれる樹状細胞である。ヒトの生体試料を用いた一部の研究により、DC3は炎症や腫瘍免疫、自己免疫疾患に関連する特徴的な樹状細胞であることが断片的に示唆されているが、生体内での分化機構や、分化後の動態など多くのことは不明である。そのため、マウスに代わる、生体内のDC3が解析可能なモデルが必要とされている。

よりヒト生体内に近い条件下で、樹状細胞等の免疫細胞の解析を可能とすべく、新しい解析系や動物モデルが研究開発されつつある。その代表例は、生体内にヒト免疫系を構築したヒト化マウスである。ヒト化マウスは免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植することで構築され、ヒト造血系を解析する *in vivo* モデルとして活用されてきた。しかし、ヒト化マウスモデルはヒトと比べて樹状細胞の分化能が低いという課題が存在する。また DC3 の分化能についても明らかになっていない。本研究では、ヒト樹状細胞の分化向上を目指した新しいヒト化マウスモデルの構築を行い、さらに分化した多様な樹状細胞亜集団の性状・機能を解析することで、ヒト化マウスで DC3 が分化しうるか否か検証した。

第1章では、樹状細胞とヒト化マウスに関する研究について、現状と課題について概説し、最後に本研究の目的と意義を記述した。

第2章では、ヒトサイトカインの導入によりヒト樹状細胞亜集団の分化が向上したヒト化マウスモデルの作製を行った。本研究では、一般的な方法で構築したヒト化マウスに、樹状細胞の分化を促進するために必須のサイトカインの組み合わせと考えられる **FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L)** および **granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)** を導入した。はじめに、マウスの体内にサイトカインを発現させる手段の一つとして知られる流体力学的遺伝子導入法を用い、ヒト化マウスにヒト FLT3L および GM-CSF の誘導を試みた。ヒト化マウスにヒト FLT3L をコードしたプラスミドおよびヒト GM-CSF をコードしたプ

ラスミドを、単独または同時に *in vivo* transfection (IVT)した結果、対象のサイトカインが IVT 後 3 日目までに誘導されていることを確認した。各サイトカインの発現量は少なくとも IVT 後 10 日目までは検出限界以上を維持しており、また単独誘導群と同時誘導群間での同一サイトカインの濃度に有意差は認められなかった。このことは、本手法による IVT がヒト化マウスにサイトカインを誘導する有効な手法であることを示す。次に、ヒトにおける主要な樹状細胞亜集団である CD141⁺ 骨髄系樹状細胞(cDC1)、CD1c⁺ 骨髄系樹状細胞(cDC2)、CD123⁺ 形質細胞様樹状細胞(pDC)が、本研究のヒト化マウスにおいても分化しうるか、サイトカイン非誘導条件下・誘導条件下のそれぞれのヒト化マウスを用いて検討した。その結果、ヒト末梢血の cDC1、cDC2、pDC それぞれに類似した表現型・形態を示す CD141⁺ 細胞、CD1c⁺ 細胞および CD123⁺ 細胞の分化がサイトカイン非誘導条件下でも認められた。次に、サイトカイン誘導条件下にて同様に検討した結果、FLT3L と GM-CSF の同時誘導が、cDC1 と cDC2 の分化を最も向上させることが認められた。一方で GM-CSF の単独投与は cDC1 と cDC2 の分化を向上させる効果は乏しかった。また興味深いことにこれら骨髄系樹状細胞亜集団の中には、単球・マクロファージの古典的なマーカー分子として知られる CD14 を発現する細胞の存在が認められた。なお、骨髄系樹状細胞とは対照的に、どのサイトカイン誘導条件でも pDC の分化は向上しなかった。次にサイトカインの誘導が各樹状細胞亜集団の成熟化に及ぼす影響を検討した結果、各樹状細胞亜集団の細胞数の変化に関係なく、全ての樹状細胞亜集団における成熟度の上昇が確認された。特に GM-CSF の誘導は全ての樹状細胞亜集団において、T 細胞の活性化に関与する B7 分子の発現を上昇させた。また、FLT3L は GM-CSF の効果をさらに亢進させることが示唆された。以上の結果より、ヒト化マウスへの FLT3L と GM-CSF の誘導は、骨髄系樹状細胞亜集団の分化を向上させることが本研究により示された。

第 3 章では、第 2 章で構築したヒト FLT3L・GM-CSF 誘導ヒト化マウスにおいて、DC3 が分化しうるか検証した。CD14 は単球・マクロファージの古典的なマーカー分子として知られているが、DC3 は樹状細胞の系統でありながら CD14 を発現することが知られている。第 2 章の説明で述べたように、ヒト化マウスでも CD14 を発現する樹状細胞様の亜集団が確認されている。そこで私は、この CD14 陽性細胞が DC3 と同等の亜集団であるか否か検証した。まず、フローサイトメトリ解析においては、CD14 陰性集団 (cDC1 および cDC2) を主な解析対象とした第 2 章とは異なり、第 3 章ではこれらの細胞集団と CD14 陽性集団を厳密に区別する必要があることから、抗体染色の際の標識蛍光色素について最適化を図った。その結果、CD14 陽性細胞は CD1c 陽性細胞分画で存在が認められた。またこの CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、cDC2 の 1/150 程度の希少な細胞集団であるものの、実験に用いたすべてのヒト化マウス個体に存在した。次にこの CD14⁺CD1c⁺ 細胞の表現

型を解析した結果、同じ CD1c 陽性細胞集団の cDC2 とは異なる表現型を示した。また CD14⁺CD1c⁺ 細胞は他の樹状細胞亜集団と同様にナイーブ CD4⁺ T 細胞を刺激し分裂させる機能を示し、抗原提示能を有することが示唆された。さらに CD14⁺CD1c⁺ 細胞は cDC2 よりも有意に CD4⁺ T 細胞を IFN- γ ⁺ Th1 細胞に分極化することが認められた。興味深いことに、CD14⁺CD1c⁺ 細胞のこれらの性状は近年報告されている DC3 と非常に類似していた。次に、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を行った結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は同じヒト化マウス由来の cDC2 や単球とは独立した細胞集団であり、ヒト由来の CD14 を発現する単球関連の骨髄系細胞とも異なる遺伝子発現様式を示していた。また、CD14⁺CD1c⁺ 細胞特異的な転写産物は、DC3 で報告されている特徴的な転写産物を共有していることが認められた。さらに、RNA-Seq 解析の結果から CD14⁺CD1c⁺ 細胞は炎症誘導性の性状を有することが示唆されたため、ヒト化マウスに LPS を投与し、急性炎症を模した環境下における CD14⁺CD1c⁺ 細胞の応答を検証した。その結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は他の細胞集団 (cDC1、cDC2、単球) と比較し、炎症誘導性サイトカインの IL-6 と TNF- α を産生する細胞頻度が最も高かった。この炎症に関連した特徴は、DC3 でも同様に認められている。以上のことから、本研究における CD14⁺CD1c⁺ 細胞はヒトで見られる DC3 と同等の樹状細胞亜集団であることが明らかとなった。

第 4 章では、研究全体の総括と今後の展望について記載した。本研究では、ヒト化マウスにヒト FLT3L と GM-CSF を誘導し、ヒト骨髄系樹状細胞亜集団の分化を向上させることで、ヒト化マウスで初めて DC3 と同等の樹状細胞亜集団が分化することを明らかにした。これまでの DC3 に関する研究では、*in vitro* で前駆細胞が同定されているものの、生体内での分化機構や、分化後の動態について明らかになっていない。本研究の成果により、これらのことを明らかにする上で、ヒト化マウスモデルが有用なツールになると考えられる。具体的には、まず骨髄中の前駆細胞が DC3 に分化し、組織へと供給されるメカニズムを明らかにすることができると考えられる。また、ヒトの生体試料で発見された DC3 は血液と骨髄由来の DC3 のみであり、2 次リンパ組織での DC3 の分化は不明であった。本研究では脾臓において DC3 の分化を確認できたことから、今後ヒト化マウスモデルを用いた、全身のリンパ組織における DC3 の分化・動態の解明が期待できる。この他にも、DC3 は古典的な樹状細胞と比較して炎症との関連が非常に高い細胞であることが示唆されていることから、炎症環境下での発生・分化のメカニズムの解明も望まれている。したがって、任意の病原体や抗原の投与により誘発される炎症環境下での DC3 の発生・分化のメカニズムは、ヒト化マウスだからこそ明らかにできることだといえる。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 岩渕 龍太郎 印

(2020年 11月 26日現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
【論文】	1. ○ Introduction of Human Flt3-L and GM-CSF into Humanized Mice Enhances the Reconstitution and Maturation of Myeloid Dendritic Cells and the Development of Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ T Cells, <i>Frontiers in immunology</i> , 9, 1042, May. 2018, Iwabuchi, R. , Ikeno, S., Kobayashi-Ishihara, M., Takeyama, H., Ato, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., & Terahara, K.
【講演】	1. 岩渕龍太郎, Characterization of human CD14 ^{low} DC-like cells in lymphoid tissues using a humanized mouse model”, 第48回日本免疫学会学術集会, 静岡, 2019年12月, ポスター 2. Ryutaro Iwabuchi, Investigation of the novel human dendritic cell subpopulation using humanized mice model, 5th Core-to-Core International Symposium 3D Lab-Exchange Program, Okinawa, Japan, Feb. 2019, Poster 3. 岩渕龍太郎, Human GM-CSF and Flt3-L induce reconstitution and maturation of human myeloid dendritic cells in humanized mice, 第46回日本免疫学会学術集会, 宮城, 2017年12月, 口頭/ポスター
【その他 (論文)】	1. Substantial induction of non-apoptotic CD4 T-cell death during the early phase of HIV-1 infection in a humanized mouse model, <i>Microbes and Infection</i> , 2020, Terahara, K., Iwabuchi, R. , Iwaki, R., Takahashi, Y., & Tsunetsugu-Yokota, Y. (in press) 2. A CCR5 ⁺ memory subset within HIV-1-infected primary resting CD4 ⁺ T cells is permissive for replication-competent, latently infected viruses in vitro, <i>BMC research notes</i> , 12(1), 242, Apr. 2019, Terahara, K., Iwabuchi, R. , Hosokawa, M., Nishikawa, Y., Takeyama, H., Takahashi, Y., & Tsunetsugu-Yokota, Y. 3. HIV LTR-Driven Antisense RNA by Itself Has Regulatory Function and May Curtail Virus Reactivation from Latency, <i>Frontiers in microbiology</i> , 9, 1066, May. 2018, Kobayashi-Ishihara, M., Terahara, K., Martinez, J. P., Yamagishi, M., Iwabuchi, R. , Brander, C., Ato, M., Watanabe, T., Meyerhans, A., & Tsunetsugu-Yokota, Y.