

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

2021 年 2 月

岩渕 龍太郎

Ryutaro IWABUCHI

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

2021 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 生命分子工学研究

岩渕 龍太郎

Ryutaro IWABUCHI

目次

第 1 章 緒論	1
1.1 はじめに	1
1.2 樹状細胞	1
1.3 ヒト化マウス	3
1.4 ヒト化マウスを用いたヒト樹状細胞研究の課題.....	4
1.5 本研究の目的と意義	5
第 2 章 ヒト化マウスへのサイトカインの導入によるヒト樹状細胞分化誘導の検討.....	6
2.1 緒言	6
2.2 実験方法及び材料	7
2.2.1 ヒト臍帯血からの造血幹細胞の分離.....	7
2.2.2 マウス	7
2.2.3 ヒト化マウスの構築	7
2.2.4 ヒト FLT3L および GM-CSF 発現プラスミドの作製.....	8
2.2.5 流体力学的遺伝子導入法による <i>in vivo</i> transfection	8
2.2.6 血漿中サイトカインの測定	8
2.2.7 細胞の調製.....	10
2.2.8 フローサイトメトリー解析・FACS.....	11
2.2.9 ヒト樹状細胞亜集団の形態学的解析.....	11
2.2.10 ヒト樹状細胞亜集団と他家 T 細胞の混合リンパ球反応の検討	13
2.2.11 統計解析.....	13
2.3. 結果および考察	14
2.3.1 <i>in vivo</i> transfection によるヒト FLT3L および GM-CSF の誘導.....	14
2.3.2 定常状態のヒト化 NOJ マウスにおけるヒト樹状細胞様亜集団の性状解析.....	17
2.3.3 サイトカイン発現後の樹状細胞様亜集団における CD14 陽性細胞の評価.....	21
2.3.4 樹状細胞様亜集団の分化に及ぼすサイトカイン発現効果の評価	24
2.3.5 若齢ヒト化 NOJ マウスを用いた pDC の分化における FLT3L 発現効果の評価 .	29
2.3.6 樹状細胞様亜集団の成熟度に及ぼすサイトカイン発現効果の評価.....	31
2.3.7 分化した樹状細胞様亜集団の機能性の検討.....	34
2.4 結言	37
第 3 章 ヒト FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスを用いたヒト樹状細胞亜集団の解析...38	
3.1 緒言	38
3.2 実験方法及び材料	39

3.2.1	ヒト臍帯血からの造血幹細胞の分離.....	39
3.2.2	マウスおよびヒト化マウスの構築.....	39
3.2.3	流体力学的遺伝子導入法による <i>in vivo</i> transfection.....	39
3.2.4	細胞の調製.....	39
3.2.5	フローサイトメトリー解析・FACS.....	40
3.2.6	<i>in vitro</i> における cDC2 の活性化.....	42
3.2.7	ヒト樹状細胞亜集団と他家ナイーブ CD4 ⁺ T 細胞の混合リンパ球反応の検討 ...	42
3.2.8	SEB 存在下におけるヒト樹状細胞亜集団と自家 CD4 ⁺ T 細胞の共培養実験.....	43
3.2.9	Bulk RNA-Seq.....	43
3.2.10	RNA-Seq データの前処理および解析.....	44
3.2.11	<i>in vivo</i> ICS assay を用いたヒト化 NOJ マウスにおける炎症応答の検出.....	47
3.2.12	統計解析.....	47
3.3	結果・考察.....	48
3.3.1	CD14 の発現に基づく樹状細胞亜集団の再分類.....	48
3.3.2	再分類した亜集団の表現型の解析.....	51
3.3.3	cDC2 における CD14 可塑性の検討.....	56
3.3.4	樹状細胞亜集団の CD4 ⁺ T 細胞との相互間作用能の評価.....	58
3.3.5	抗原存在下における樹状細胞亜集団の CD4 ⁺ T 細胞刺激能の評価.....	63
3.3.7	樹状細胞亜集団の生体内における炎症応答の評価.....	71
3.4	結言.....	76
第 4 章	結論.....	78
	参考文献.....	82
	謝辞.....	93

略語表

ACK ; ammonium-chloride-potassium	G-CSF ; granulocyte colony-stimulating factor
APC ; allophycocyanin	GM-CSF ; granulocyte macrophage colony-stimulating factor
APC-Cy7 ; allophycocyanin-cyanin 7	GSEA ; gene set enrichment analysis
AF ; Alexa Flour	HBSS ; Hanks' Balance Salt Solution
BFA ; brefeldin A	HEPES ; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
BRG ; C.Cg- <i>Rag2^{tm1Fwa} Il2rg^{tm1Sug}</i>	HLA-DR ; human leukocyte antigen-DR isotype
BSA ; bovine serum albumin	ICS ; intracellular cytokine staining
BV ; Brilliant Violet	IL-2/-3/-4/-6/-15 ; interleukin-2/-3/-4/-6/-15
CBA ; cytometric beads array	IMEM ; Iscove's Modified Dulbecco's Medium
CD ; cluster of differentiation	iMo ; intermediate monocyte
cDC ; conventional dendritic cell	IRF4/8 ; interferon regulatory factor 4/8
cDC1/2 ; conventional dendritic cell type 1/2	IVT ; <i>in vivo</i> transfection
cDNA ; complementary deoxyribonucleic acid	Jak3 ; Janus kinase 3
CDP ; common dendritic cell progenitor	LC ; Langerhans cell
CFSE ; carboxyfluorescein succinimidyl ester	LPS ; lipopolysaccharide
CLEC9A/10A ; C-type lectin 9A/10A	MDM ; monocyte-derived macrophage
CTV ; CellTrace Violet	MHC-I ; major histocompatibility complex type I
cMo ; classical monocyte	MoDC ; monocyte-derived dendritic cell
DN ; double negative	mRNA ; messenger ribonucleic acid
DNA ; deoxyribonucleic acid	ncMo ; non-classical monocyte
ECD ; energy coupled dye	NES ; normalized enrichment score
FACS ; fluorescence-activated cell sorting	NK ; natural killer
FBS ; fetal bovine serum	
FDR ; false discovery rate	
FITC ; fluorescein isothiocyanate	
FLT3L ; FMS-like tyrosine kinase 3 ligand	

nMFI ; normalized mean fluorescence intensity	Prkdc ; protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit
NOD ; non-obese diabetic	RNA ; ribonucleic acid
NOG ; NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>Il2rg</i> ^{tm1Sug}	RNA-Seq ; RNA sequencing
NOJ ; NOD/SCID/Jak3 ^{null}	RPMI ; Roswell Park Memorial Institute Medium
NSG ; NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>Il2rg</i> ^{tm1Wjl}	SCF ; stem cell factor
NSG-SGM3 ; NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>Il2rg</i> ^{tm1Wjl} /Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG) 1Eav/MloySzJ	SCID ; severe combined immunodeficiency
PBS ; phosphate-buffer saline	scRNA-Seq ; single cell RNA-Sequencing
PC ; principal component	SEB ; staphylococcal enterotoxin B
pDC ; plasmacytoid dendritic cell	SMART-Seq2 ; switching mechanism at the 5' end of the RNA transcript sequencing 2
PE ; phycoerythrin	SRA ; Sequence Read Archive
PE-Cy7 ; phycoerythrin-cyanine 7	S100A8/A9 ; S100 calcium-binding protein A8/A9
PerCP ; peridinin-chlorophyll protein	Th1/2/17 ; T helper type 1/2/17
PerCP-Cy5.5 ; peridinin-chlorophyll protein-cyanin 5.5	TLR ; toll-like receptor
PMA ; phorbol 12-myristate 13-acetate	TNF- α ; tumor necrosis factor- α
pre-cDC ; conventional dendritic cell precursor	VST ; variance-stabilizing transformation
	XCR1 ; X-C motif chemokine receptor 1

第1章 緒論

1.1 はじめに

生体には体外から侵入した病原体や体内の腫瘍細胞などの異常をきたした細胞を排除することで、生体の恒常性を維持する免疫系が存在する (Iwasaki & Medzhitov, 2015; Maraskovsky et al., 2000)。生物の進化と共に免疫系は発達し、ヒトやマウスなどの哺乳類は自然免疫と獲得免疫の二種類を有している (Ezekowitz & Hoffmann, 1996; Iwasaki & Medzhitov, 2015; Medzhitov & Janeway, 1997)。自然免疫は、マクロファージや好中球による体内に侵入した病原体の貪食や、natural killer (NK) 細胞による病原体感染細胞や腫瘍細胞に対する細胞傷害などにより、迅速かつ非特異的に異物を排除する免疫機構である (Ezekowitz & Hoffmann, 1996; Medzhitov & Janeway, 1997)。一方で獲得免疫は、T 細胞や B 細胞が自然免疫による排除を免れた病原体や感染・腫瘍細胞を特異的に認識し、細胞傷害や抗体産生により排除する強力な免疫機構である (Cyster & Allen, 2019; Iwasaki & Medzhitov, 2015)。

自然免疫から獲得免疫への移行には、これらの異物を捕捉し、T 細胞が認識できるように抗原として提示することが必須である。それを担当するのが抗原提示細胞と呼ばれる、樹状細胞やマクロファージなどの単核貪食細胞である (Banchereau & Steinman, 1998; Schlitzer et al., 2015)。その中でも樹状細胞は、高い抗原提示能および T 細胞刺激能を有していることから、免疫の司令塔としての役割を果たす。そのため、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、基礎免疫学の発展にとどまらず、感染症やがんに対する免疫療法の確立を目指した橋渡し研究においても重要な知見を提供する (Wculek et al., 2020; Zaneti et al., 2019)。

1.2 樹状細胞

現在の樹状細胞研究は、1973 年にマウスの脾臓において樹状突起を持った、マクロファージとは異なる新規の免疫細胞が報告されたことに始まる (Steinman & Cohn, 1973)。その形態的特徴から名付けられた樹状細胞は、1982 年にヒト末梢血でも発見され (Van Voorhis et al., 1982)、さらに 1994 年に *in vitro* おいてヒト末梢血由来の単球から樹状細胞 (monocyte-derived dendritic cell: MoDC) を分化誘導する手法が確立された (Sallusto & Lanzavecchia, 1994)。それ以降、ヒトおよびマウスにおける樹状細胞研究は急速に発展し、生体内の樹状細胞は表現型や機能性の異なるさまざまな亜集団で構成されていることが明らかとなった。

これまでの表現型、トランスクリプトームおよび発生学的観点からの解析により、樹状細胞は、common dendritic cell progenitor (CDP) を共通の前駆細胞とする骨髄系樹状細胞 (conventional dendritic cell: cDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC)、そして、単球を前駆細胞とする MoDC に大別される (Guilliams et al., 2014)。この中で、免疫誘導組織であるリンパ組織で、中心的な役割を果たす樹状細胞が cDC である。cDC はさらに CD8⁺ T 細胞への抗原提示能が高い 1 型 cDC (cDC1) と CD4⁺ T 細胞への抗原提示能が高い 2 型 cDC (cDC2) に分類される (Vu Manh et al., 2015)。その機能の重要性から cDC1 と cDC2 は、ヒトおよびマウスの双方で精力的に研究が進められており、現在に至るまでヒトにおける CD141⁺IRF8⁺cDC1 と CD1c⁺IRF4⁺cDC2 は、マウスにおける CD8⁺IRF8⁺ 樹状細胞と CD11b⁺IRF4⁺ 樹状細胞の同一亜集団であることが明らかとなっている (Breton et al., 2016; Crozat et al., 2010; Schlitzer et al., 2013)。

その一方で生物種の違いによりマウス樹状細胞で得られた知見が、ヒト樹状細胞の生物学的特徴と一致しない点も報告されている。例えば、ヒトとマウス間の cDC で分類に用いられる細胞表面分子は異なり、マウス cDC1 では広く CD8 が用いられてきたが、ヒト cDC1 では CD8 が発現していない (Collin et al., 2013; Villadangos & Shortman, 2010)。近年ではケモカイン受容体 XCR1 がヒト・マウス共通の cDC1 特異的マーカーとして報告されているが (Poulin et al., 2012)、ヒト末梢血の cDC1 の約 30% は XCR1 陰性とする報告もあり、完全なマーカーであるとは言い難い。また、ヒト cDC2 特異的マーカーとして知られる CD1c は、マウス cDC2 ではその発現が報告されていない (Heger et al., 2020)。

表現型の違いにとどまらず機能的な相違も報告されている。マウスでは CD8⁺ T 細胞への抗原提示能が cDC1 で顕著であることに対し、ヒトでは cDC2 と cDC1 が同等の効率で CD8⁺ T 細胞へ抗原提示し得る (Cohn et al., 2013)。この相違は CD8⁺ T 細胞への抗原提示に係る I 型主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex type I: MHC-I) 経路の遺伝子発現が、マウス cDC1 に比べヒト cDC1 では低いことが反映されていると考えられている (Collin & Bigley, 2018)。

さらにヒトとマウスの樹状細胞の大きな相違点として、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知られている。その最たる例が、DC3 と呼ばれる樹状細胞である (Villani et al., 2017; Villar & Segura, 2020)。DC3 は樹状細胞と単球の性状を併せ持つ、特殊な樹状細胞として近年報告された (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。さらに、腫瘍における浸潤性 T 細胞の存在量

との正の相関や (Bourdely et al., 2020)、自己免疫疾患の病態との関連など (Dutertre et al., 2019)、DC3 は免疫系において正と負の両方に働くことが示唆されているため、現在最も注目されている樹状細胞亜集団である。しかしながら、これらの知見はヒトの生体試料を用いた一部の研究で断片的に示唆された性状であり、DC3 の生体内での分化機構や、分化後の動態など多くのことは明らかになっていない。以上のように、マウス-ヒト間の生物学的特徴の違いが様々な観点で存在することから、ヒト樹状細胞についてのより深い知見が必要といえる。

ヒトの生体試料を用いた樹状細胞研究の多くは、比較的簡便に採取できる末梢血を用いている。しかし末梢血中の樹状細胞は、生体内の樹状細胞の一部であり、免疫応答が起きる組織中の樹状細胞についても知見が必要である。一部の研究では、外科的手術の一環で摘出されたリンパ組織や、美容整形手術で採取された末梢組織における樹状細胞を研究対象としているが、これらの入手には制約がある。また、ヒトへの薬剤や抗原の投与を行った樹状細胞研究も存在するが、倫理的な側面からごく一部の研究しか存在しない。したがって、DC3 を含むヒト樹状細胞の生体内での機能、分化機序、動態の解析や、薬剤の投与や病原体の感染などの実験的介入を伴う研究を行う上では、小動物モデルが必要である。

1.3 ヒト化マウス

従来のマウスの代替モデルとして期待されているモデルが、生体内にヒト免疫系を構築したヒト化マウスである (Shultz et al., 2012)。ヒト化マウスはこれまで、ヒト造血系を解析する *in vivo* モデル、ヒト免疫不全ウイルスやヒト T 細胞白血病ウイルスなどのヒト指向性病原体の感染モデル、ヒト腫瘍の移植によるがん免疫研究のモデルとして活用されてきた (Terahara et al., 2013; Tezuka et al., 2014; M. Wang et al., 2018)。

マウスにおけるヒト免疫系の構築には、異種であるヒト免疫細胞が排除されない環境が必須である。そこで重要となるのがレシピエントマウスの免疫が働かないことであり、1988 年に免疫不全マウスを用いて構築されたヒト化マウスの報告以降、多様な系統の免疫不全マウスが確立されてきた (Rongvaux et al., 2013)。初期のヒト化マウス研究では、DNA 依存性プロテインキナーゼ遺伝子 (*Prkdc*) の変異によりマウス T 細胞と B 細胞が欠失した、重度複合免疫不全を示す *CB17/Icr-Prkdc^{scid}* (SCID) マウス (Bosma et al., 1983) が用いられていた (Mosier et al., 1988)。しかしこのヒト化 SCID マウスは、レシピエントマウスの NK 細胞の存在によりヒト血液細胞の生着が悪い課題があった。その後新た

なレシピエントマウスとして、I 型糖尿病を発症する non-obese diabetic (NOD) マウス (Kikutani & Makino, 1992) と SCID マウスを交配した NOD/SCID マウスが樹立された (Gerling et al., 1992)。NOD/SCID マウスは、SCID マウスの特性に加えマウス NK 細胞の活性が低下しているため、ヒト化 NOD/SCID マウスではヒト化 SCID マウスと比べヒト造血細胞の生着の向上が認められた (Greiner et al., 1995)。しかし依然として、残存するマウスの NK 細胞の応答によりヒト T 細胞の分化が乏しいことや、ヒト造血細胞の生着率も十分とはいえない課題が残っていた。

現在世界的に普及しているヒト化マウスでは、NOD/SCID マウスの課題である残存 NK 細胞の完全な欠失を実現した、NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} (NOG) マウス (Ito et al., 2002)、NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} (NSG) マウス (Shultz et al., 2005)、NOD.Cg-Rag1^{tm1mom} Il2rg^{tm1Wjl} (NRG) マウス (Pearson et al., 2008)、C.Cg-Rag2^{tm1Fwa} Il2rg^{tm1Sug} (BRG) マウス (Traggiai et al., 2004) などの高度免疫不全マウスがレシピエントマウスとして用いられている。これらの高度免疫不全マウスは、NK 細胞の分化に必要なサイトカイン受容体の共通γ鎖がロックアウトされていることが特徴で、作製したヒト化マウスではヒト造血細胞の高率の生着や、ヒト T 細胞の分化向上が実現した。また、樹状細胞についてもリンパ組織の脾臓および骨髄でヒトと同様の表現型を示した cDC1、cDC2 および pDC の分化が確認された (Tanaka et al., 2012; Traggiai et al., 2004; Watanabe et al., 2009)。しかしながらヒト化マウスでは、これらの樹状細胞の分化能が低いという課題が存在した。

1.4 ヒト化マウスを用いたヒト樹状細胞研究の課題

ヒト化マウスにおける樹状細胞の存在頻度が低い要因の一つに、樹状細胞を含む骨髄系細胞の分化・成熟に関するサイトカインが欠乏していることが挙げられる (Brehm et al., 2013; Manz, 2007)。ヒト化マウスにおけるヒト免疫細胞の分化・維持には、主にマウスサイトカインがヒト免疫細胞のサイトカイン受容体に交差反応することに依存している。しかしながら、マウス-ヒト間で交差反応性を持つサイトカインの種類は限局しており、骨髄系前駆細胞の恒常性や発生に関わるとされる IL-3、IL-6、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) はマウス-ヒト間でのアミノ酸配列の相同性が低いことが知られている (Rongvaux et al., 2013)。現在最もヒトの生体に近い免疫系を構築していると考えられている、ヒト中絶胎児の胸腺および肝臓組織を共移植して構築したヒト化マウス (倫理的な側面から世界的に稀なヒト化マウス) であっても、健常人と比べて血中の cDC2 の頻

度は低いことが報告されている (Li et al., 2019)。このことからヒト化マウス内で産生されるサイトカイン環境では十分な数の樹状細胞の分化は困難である。

この課題を克服するため、ヒト化マウスに対して、樹状細胞の分化に関与するヒトサイトカインを生体内に導入することが試みられてきた。これまで、IL-3、IL-4、IL-15、GM-CSF、stem cell factor (SCF) など多種多様なサイトカインがヒト化マウスに導入されてきたが (Billerbeck et al., 2011; Chen et al., 2012; Rongvaux et al., 2014)、cDC1 および cDC2 の分化の向上には不十分であった。現在は、前駆細胞 CDP から樹状細胞への分化に関わる FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L) を導入することで、cDC1 と cDC2 の顕著な分化誘導が実現されている (Ding et al., 2014; Minoda et al., 2017; Pearson et al., 2018)。しかしながら、これらの研究では、cDC1 と cDC2 以外の骨髄系細胞については十分な検証がなされておらず、DC3 の分化については未だ不明である。未だ生体内の DC3 を解析可能にする動物モデルが存在しない現状では、ヒト化マウスにおける DC3 の分化の実現が望まれており、その検証が必要であるといえる。

1.5 本研究の目的と意義

以上の背景を踏まえ、本研究では、ヒトサイトカインを誘導することで樹状細胞亜集団の分化を向上させたヒト化マウスを構築し、DC3 が分化しうるか明らかにすることを目的とした。

第2章では、これまで検討がなされていない組み合わせのヒトサイトカインを流体力学的遺伝子導入法によりヒト化マウスに強制発現させ、古典的な樹状細胞亜集団およびその他の樹状細胞亜集団の分化が向上するか検討した。そして第3章では、第2章で構築したマウスモデルにおいて DC3 が分化しうるか検証した。

本研究は、ヒト化マウスにおいて DC3 が分化しうるか検証した研究である。すでにヒト化マウスでは cDC1 および cDC2 の存在や性状が明らかにされている。一方で、DC3 はヒトでの分化機構や、分化後の動態など多くのことがまだ明らかになっておらず、そもそもヒト化マウスではその存在すら明らかになっていない。したがって、DC3 が分化したヒト化マウスは、生体内におけるその分化機構や、分化後の動態を明らかにするツールとして非常に有用である。さらには、病原体の感染に対する DC3 の応答を研究する動物モデルとしての活用も期待できる。

第2章 ヒト化マウスへのサイトカインの導入によるヒト樹状細胞分化誘導の検討

本章は、Iwabuchi R, Ikeno S, Kobayashi-Ishihara M, Takeyama H, Ato M, Tsunetsugu-Yokota Y, Terahara K. 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. *Front Immunol* (2018) 9:1042. で報告された内容を使用して構成されている。

2.1 緒言

本研究では、所属研究室で従来から使用されているヒト化 NOD/SCID/Jak3^{null} (NOJ) マウスを使用する (Terahara et al., 2013)。ヒト化 NOJ マウスは世界的に用いられているヒト化 NSG マウスと同等の表現型を示すことが認められている (Okada et al., 2008)。そのため、ヒト化 NSG マウスと同様に、ヒト化 NOJ マウスにおいてもヒト骨髄系細胞の分化・成熟に関与するサイトカインが十分ではないと考えられた。そこで本章では、ヒト化 NOJ マウスにヒトサイトカインを導入することで、ヒトに存在する古典的な樹状細胞やその他の樹状細胞亜集団の分化誘導を試みた。

ヒト化 NOJ マウスに導入するヒトサイトカインは、樹状細胞の発生的観点から選定した。第 1.4 節で述べた通り、FLT3L は骨髄系前駆細胞から樹状細胞に分化する過程で必須のサイトカインとして知られている。また、本研究では cDC1 や cDC2 に限らず、多様な樹状細胞亜集団の分化を実現させるために、FLT3L の他に骨髄系前駆細胞に作用するサイトカインを付加する必要があると考えた。その中で、GM-CSF は単独で樹状細胞の分化を向上させることはないものの、骨髄系前駆細胞の維持に重要であることが知られている (Kingston et al., 2009)。また GM-CSF に加えて、IL-3 や SCF を導入したヒト化マウスでは、樹状細胞や単球、顆粒球など多様な骨髄系細胞の分化が報告されている (Miller et al., 2013; Rongvaux et al., 2014)。そのため、多様な樹状細胞亜集団の分化をヒト化マウスで実現させる上で GM-CSF も必要であると考えた。これらのことから、FLT3L および GM-CSF が樹状細胞亜集団の分化を向上させうる、最小かつ必須のサイトカインであると考えた。本章では、これらの組み合わせにより、ヒト化 NOJ マウスでどのような樹状細胞亜集団が分化誘導されるか検討した。

2.2 実験方法及び材料

2.2.1 ヒト臍帯血からの造血幹細胞の分離

ヒト臍帯血は、インフォームド・コンセントを受けたドナー検体を日本赤十字社関東甲信越臍帯血バンク（東京）と杉浦ウィメンズクリニック（東京）から入手した。その使用については、国立感染症研究所（東京）内の医学研究倫理審査委員会より承認された。初めに、臍帯血を室温で 1220 ×g、30 分間遠心し、血漿と赤血球分画の間にある白血球層を回収した。次に Lymphocyte Separation Medium 1077 (PromoCell, Heidelberg, Germany) 15 ml の上に、等量の PBS (ナカライテスク, 京都) に混合した白血球層 30 ml を積層し、室温で 630 ×g、40 分間遠心した。遠心後、Lymphocyte Separation Medium 1077 の上層にある臍帯血単核球層を回収した。臍帯血単核球は PBS で血小板がなくなるまで洗浄した。次に CD133 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を使用して、臍帯血単核球から造血幹細胞を分離した。分離した造血幹細胞の一部はフローサイトメトリーで解析し、CD34⁺ 細胞の頻度が 90%以上のものを実験に使用した。

2.2.2 マウス

熊本大学エイズ学研究センター 岡田誠治教授によって樹立された NOJ マウスを用いた (Okada et al., 2008)。NOJ マウスは国立感染症研究所の動物施設内の Specific-Pathogen Free 環境下にて維持繁殖され、この使用については国立感染症研究所内の動物実験委員会の承認を受けている。

2.2.3 ヒト化マウスの構築

1.0-1.5×10⁵ 個の造血幹細胞を、20 μl の R-10 培地 (RPMI1640 (富士フイルム和光純薬, 大阪), 10% FBS (ニチレイバイオサイエンス, 東京), 1% GlutaMAX Supplement (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 μg/ml penicillin (ThermoFisher Scientific), 100 μg/ml streptomycin (ThermoFisher Scientific)) に懸濁し、30 ゲージのシリンジを用いて生後 2 日以内の NOJ マウスの肝臓に移植した。第 2.3 節に記載の実験うち、原則すべての実験で移植後 15-17 週齢のヒト化 NOJ マウスを用いた。ただし、第 2.3.5 項 (Fig. 2.9) の実験では移植後 4 週齢のヒト化 NOJ マウスを使用した。

2.2.4 ヒト FLT3L および GM-CSF 発現プラスミドの作製

ヒト FLT3L 遺伝子 (*FLT3LG*; GenBank: NM_001459.3) およびヒト GM-CSF 遺伝子 (*CSF2*; GenBank: NM_000758.3) のオープンリーディングフレームを、pEF-BOS-bsr プラスミド (Hachiya et al., 2001) にそれぞれサブクローニングして、ヒト FLT3L および GM-CSF 発現プラスミドを作製した (Fig. 2.1)。作製したヒト FLT3L および GM-CSF 発現プラスミド、ならびに pEF-BOS-bsr プラスミドで、ECOS Competent *E. coli* DH5 α (ニッポンジーン, 東京) を形質転換させた後、増幅させたものを NucleoBond Xtra Maxi EF (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) を用いて精製した。

2.2.5 流体力学的遺伝子導入法による *in vivo* transfection

ヒト化 NOJ マウスへのヒト FLT3L 遺伝子および GM-CSF 遺伝子は流体力学的遺伝子導入法 (Liu et al., 1999) により、*in vivo* transfection (IVT) した。IVT には、ヒト FLT3L プラスミドもしくはヒト GM-CSF プラスミドを 50 μ g 単独で、もしくは両方を 50 μ g ずつ混合したものを TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus, Madison, WI, USA) (マウス体重 10 g あたり 1 ml、最大 2 ml) に溶解し、27 ゲージのシリンジを用いて尾静脈に 4-7 秒以内に注射した。またコントロール群には 50 μ g の pEF-BOS-bsr プラスミドを用いた。

2.2.6 血漿中サイトカインの測定

ヒト化 NOJ マウス血漿中の FLT3L および GM-CSF を Cytometric Beads Array (CBA) 法 (Jimenez et al., 2005) により定量した。IVT 直前および IVT 後 3、7、10 日目のヒト化 NOJ マウスの尾静脈から 90 μ l の末梢血を部分採血し、抗血液凝固剤の 50 mM EDTA-2Na (ナカライテスク) を含有した 10 μ l の PBS と混合した。この末梢血を室温で 800 \times g、3 分間遠心して血漿を回収した。その後、Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 付属の Assay Diluent で 1-25000 倍の範囲に希釈した。ヒト FLT3L の定量では、ヒト FLT3L の捕捉抗体として、Function Bead Conjugation Buffer Set (BD Biosciences) を用いて Functional Bead A9 (BD Biosciences) を結合させた抗ヒト FLT3L モノクローナル抗体 (40146; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用した。また、ヒト FLT3L 検出抗体としてビオチン化抗ヒト FLT3L ポリクローナル抗体 (R&D Systems) と phycoerythrin (PE) 結合ストレプトアビジン (BioLegend, San Diego, CA, USA) を用いた。ヒト GM-CSF の定量では、市販の Human GM-CSF Flex Set (BD

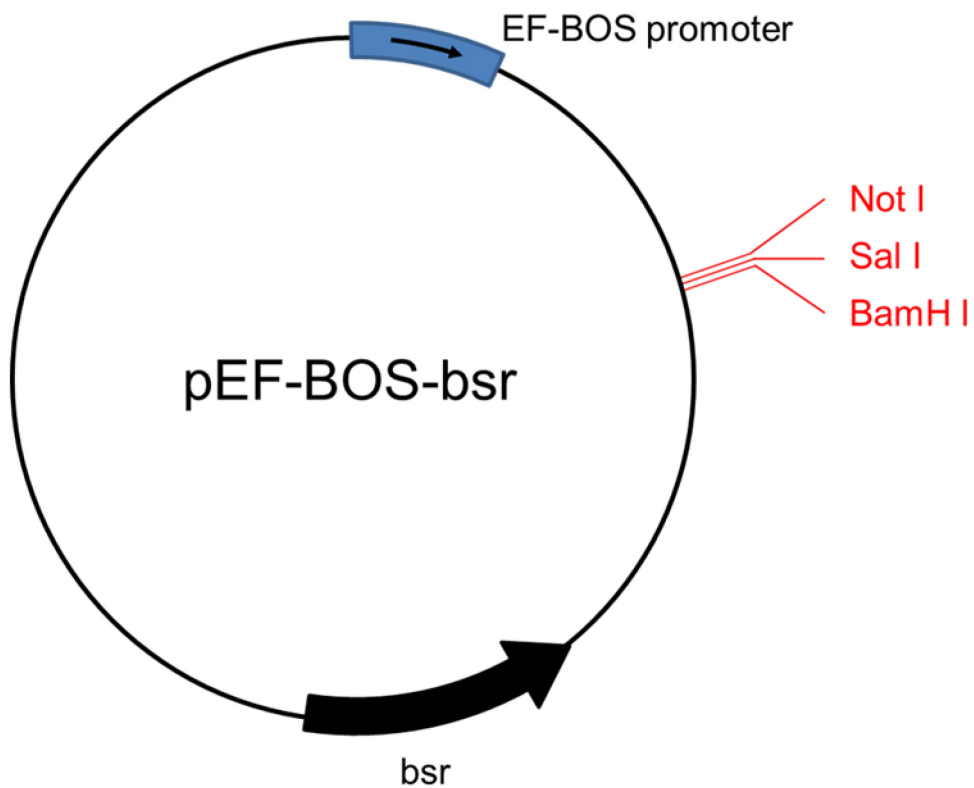


Fig. 2.1 作製したヒト FLT3L プラスミドと GM-CSF プラスミド

空の pEF-BOS-bsr プラスミドのマルチクローニングサイトに *FLT3LG* と *CSF2* のオープンリーディングフレームを挿入した。ヒト FLT3L プラスミドは *FLT3LG* を Not I と Sal I の間に挿入することで構築し、ヒト GM-CSF プラスミドは *CSF2* を NotI と BamHI の間に挿入することで構築した。

Biosciences) を用いた。なお、ヒト FLT3L の捕捉抗体に結合させた Functional Bead A9 は、Human GM-CSF Flex Set のヒト GM-CSF 捕捉抗体に結合している C9 Bead とは異なる蛍光強度を示している。CBA は Human Soluble Protein Master Buffer Kit の説明書通りに行った。データは FACSCanto II (BD Biosciences) により取得した後、PE の蛍光強度を FCAP Array Software v3.0 (BD Biosciences) を用いて解析した。各サイトカインの標準曲線は、組換えヒト FLT3L (R&D Systems) および GM-CSF (Human GM-CSF Flex Set 付属のもの) を用いて設定し、それぞれの検出限界は 0.01 ng/ml 未満であることを確認した。

2.2.7 細胞の調製

実験に使用した細胞は、ヒト化 NOJ マウスの脾臓と大腿骨・脛骨、また健康な日本人ボランティアから採血した末梢血より調製した。なおヒト末梢血は、ボランティアのインフォームド・コンセント、および国立感染症研究所内の医学研究倫理審査委員会の承認を事前に受けた上で使用した。

ヒト化 NOJ マウスの脾臓は、IVT 後 10 日目に採取し、Spleen Dissociation Kit mouse (Miltenyi Biotec) と gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて分散処理をした。分散後の脾細胞の一部は、Trucount tubes (BD Biosciences) を用いたフローサイトメトリー解析による絶対数測定に供した。残りの細胞は ACK Buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA-2Na; pH 7.2-7.4) による溶血を行った。その後 MACS Buffer (PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA-2Na) で洗浄し、同 Buffer で再懸濁後、フローサイトメトリー解析またはソーティングまで氷上で維持した。

ヒト化 NOJ マウスの大腿骨・脛骨は、IVT 後 10 日目に採取した。27 ゲージのシリンジを用いて MACS buffer をこれらの骨の内部に流すことで骨髓細胞を回収した。骨髓細胞の一部は、フローサイトメトリー解析による絶対数測定にそのまま使用した。残りの細胞は ACK Buffer による溶血を行った。その後 MACS Buffer で洗浄し、同 Buffer で再懸濁後、フローサイトメトリー解析またはソーティングまで氷上で維持した。

ヒト末梢血は、臍帯血の処理と同様の方法で末梢血単核球を分離した。次に末梢血単核球から EasySep Human T Cell Enrichment Kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を用いて、ヒト T 細胞を分離した。分離した T 細胞は R-10 培地に再懸濁し、混合リンパ球反応実験まで 37°C、5% CO₂ の条件下で維持した。

2.2.8 フローサイトメトリー解析・FACS

細胞のフローサイトメトリー解析には、Table 2.1 に示す蛍光標識モノクローナル抗体、非特異的な抗体結合のブロッキングのための FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec)、死細胞標識のための LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher Scientific) を Staining Buffer (PBS, 2% FBS, 0.01% NaN₃) に混合し、合計 100 μ l に調製した染色用混合液を使用した。この染色用混合液に細胞を懸濁し、30 分間氷上で染色した。その後細胞を Staining buffer で洗浄し、フローサイトメトリー解析に供した。細胞の絶対数測定では、Trucount tubes (BD Biosciences) に溶血前の脾細胞懸濁液または骨髄細胞懸濁液 20 μ l と染色用混合液 100 μ l を添加・混合し、20 分間室温で染色した。その後 ACK buffer 300 μ l を添加・混合し、5 分間の溶血処理直後にフローサイトメトリー解析に供した。

ソーティングでは、前述の染色用混合液に用いるバッファを Sorting buffer (HBSS (ナカライテスク), 2% FBS, 5 mM EDTA-2Na, 25 mM HEPES (ナカライテスク), 100 μ g/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) に変更した。細胞染色は、 1×10^6 細胞あたり 100 μ l の染色用混合液で細胞を再懸濁し、30 分間氷上で染色した。その後細胞を Sorting buffer で洗浄し、 5×10^6 細胞あたり 1 ml の同 Buffer で再懸濁した後に、ソーティングに供した。

データは FACSCanto II もしくは FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて取得し、データ解析は FlowJo software v10.0.7 (BD Biosciences) を用いた。

2.2.9 ヒト樹状細胞亜集団の形態学的解析

ヒト化 NOJ マウス骨髄細胞からセルソーターを用いて単離したヒト樹状細胞亜集団を、Shandon Cytospin 3 centrifuge (ThermoFisher Scientific) を用いてスライドガラスに塗抹し、メイ-グリュンワルド/ギムザ染色を施した。メイ-グリュンワルド/ギムザ染色では、May-Grünwald stain solution (富士フイルム和光純薬) および Giemsa's stain solution (富士フイルム和光純薬) を使用した。各塗抹標本について、Keyence オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 (キーエンス, 大阪) を用いて検鏡および画像取得を行った。

Table 2.1 第 2.2.8 項で使用したモノクローナル抗体一覧

Name	Clone	Fluorochrome	Source
CD1c	L161	Alexa Fluor 700	BioLegend
CD3	HIT3a	APC ^c	BioLegend
CD4	RPA-T4	PerCP ^d	BioLegend
CD11b	ICRF44	FITC ^e	BioLegend
CD11c	Bu15	PE	BioLegend
CD14	RMO52	ECD	Beckman Coulter ⁱ
CD19	HIB19	APC	eBioscience
CD33	P67.6	APC-Cy7 ^f	BioLegend
CD34	581	FITC	BioLegend
CD38	HIT2	PerCP	BioLegend
CD40	5C3	FITC	BioLegend
hCD45 ^a	HI30	Pacific Blue	BioLegend
mCD45 ^b	30-F11	FITC	BioLegend
CD80	2D10	PE	BioLegend
CD86	IT2.2	PerCP-Cy5.5 ^g	BioLegend
CD123	6H6	PE-Cy7 ^h	BioLegend
CD141	M80	Brilliant Violet 785	BioLegend
CD303/BDCA-2	AC144	FITC	Miltenyi Biotec
HLA-DR	L243	PerCP	BioLegend
Isotype control			
mouse IgG1	MOPC-21	FITC, PE, PerCP	BioLegend
mouse IgG2a	7T4-1F5	ECD	Beckman Coulter
mouse IgG2a	MOPC-173	PE, PerCP	BioLegend
mouse IgG2b	27-35	PE	BD Biosciences
mouse IgG2b	MPC-11	PerCP-Cy5.5	BioLegend
rat IgG2a	RTK2758	FITC	BioLegend

^a human CD45

^b mouse CD45

^c allophycocyanin

^d peridinin-chlorophyll protein

^e fluorescein isothiocyanate

^f allophycocyanin-cyanin 7

^g peridinin-chlorophyll protein-cyanin 5.5

^h phycoerythrin-cyanin 7

ⁱ Brea, CA, USA

2.2.10 ヒト樹状細胞亜集団と他家 T 細胞の混合リンパ球反応の検討

ヒト末梢血由来の T 細胞を、PBS で希釈した 0.5 μM の Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) と再懸濁し、37°C、5% CO₂ の条件下で 20 分間 CFSE 標識を行った。R-10 培地で洗浄し、同培地で再懸濁後、CFSE の細胞内への取り込みのための前培養を 37°C、5% CO₂ の条件下で 20 分間行った。前培養後、R-10 培地で 2 回洗浄を行い、残余 CFSE の除去を行った。CFSE 標識 T 細胞は、セルソーターを用いて単離したヒト化マウス脾臓由来の樹状細胞亜集団と、T 細胞 : 樹状細胞 = 10 : 1 の比率で R-10 培地 200 μl に混合懸濁した。その後、U 底 96-well プレート内で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。培養開始から 5 日目に細胞を回収し、フローサイトメトリー解析により CFSE の蛍光強度を測定した。

2.2.11 統計解析

データの正規性ならびに分散に基づき、2 群間の有意差検定では unpaired *t*-test もしくは Mann-Whitney *U* test を用いた。3 群間の有意差検定では one-way ANOVA もしくは Kruskal-Wallis test を使用し、その後多重比較検定として Holm-Sidak's multiple comparison test もしくは Dunn's multiple comparison test を行った。また、相関解析には Spearman's rank correlation coefficient を選択した。すべての解析において Prism software v6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用し、*P*-value < 0.05 を統計学的有意とした。

2.3. 結果および考察

2.3.1 *in vivo* transfection によるヒト FLT3L および GM-CSF の誘導

流体力学的遺伝子導入法による IVT (*in vivo* transfection) は、マウスの生体内にプラスミド DNA を簡便かつ高効率に導入できる手法である (Liu et al., 1999)。そのため免疫学研究においても、マウスの生体内にサイトカインを安価に誘導する方法として用いられてきた (Chen et al., 2009; Chen et al., 2012)。本研究においても、ヒト化 NOJ マウスにヒト FLT3L および GM-CSF の発現させるために、本手法による IVT を試みた。

定常状態 (Day 0) のヒト化 NOJ マウスにおける血漿中のヒト FLT3L および GM-CSF を定量した結果、すべてのマウスで各サイトカイン濃度は検出限界以下 (< 0.01 ng/ml) であった (Fig. 2.2)。次に、ヒト化 NOJ マウスに、FLT3L 発現プラスミドの単独導入 (F 群)、GM-CSF 発現プラスミドの単独導入 (G 群)、もしくは両方のプラスミドの同時導入 (F+G 群) の IVT を行ったところ、いずれの群においても導入したサイトカイン遺伝子と一致するサイトカインが、少なくとも IVT 後 3 日目に検出された。IVT 後 3 日目の FLT3L の幾何平均濃度は、F 群で 2,533 ng/ml、F+G 群で 2,762 ng/ml であった。また GM-CSF の幾何平均濃度は、G 群で 4.5 ng/ml、F+G 群で 7.6 ng/ml であった。IVT 後 3 日目以降、各サイトカインの濃度は経時的に減衰したが、少なくとも IVT 後 10 日目まで検出限界以上の濃度のサイトカインの発現が認められた。また IVT 後 3、7、10 日目すべての時点で、各群間の同一サイトカインの濃度に有意な差は認められなかった。

IVT により発現した FLT3L と GM-CSF の濃度を比較すると、同一の発現ベクターを用いて両サイトカインを発現させたにも関わらず、FLT3L の濃度は GM-CSF の濃度よりもはるかに高かった。この違いはサイトカインの半減期の違いが影響していると考えられる。ヒトの FLT3L と GM-CSF の半減期は文献による比較ができなかったが、マウスでは、血中の FLT3L の半減期が約 1.4 時間であるのに対し (Tu et al., 2014)、GM-CSF はわずか 12 分程度という報告がなされている (Daro et al., 2000)。生物種の違いはあるものの、これらの報告から IVT により発現した FLT3L の濃度が GM-CSF より高い一因として、サイトカインの半減期の違いによると考えられた。ただし、相対的に濃度が低い GM-CSF であっても、IVT 未実施の定常状態と比べて濃度は高いと考えられる。ヒトでは、定常状態における血漿中の FLT3L および GM-CSF はかろうじて検出可能な濃度であることが報告されている (FLT3L: < 100 pg/ml (Lyman et al., 1995)、GM-CSF: < 10 pg/ml (Carraway et al., 2000))。また、他グループの研究で、ヒト FLT3L 発現プラスミドを IVT したヒト化 NSG マウス (Chen et al., 2009) や、ヒト GM-CSF が安定的に発現し

ているヒト化 NSG-SGM3 マウス (Billerbeck et al., 2011) と比較しても、ヒト化 NOJ マウスにおける同サイトカインの濃度は約 100 倍の濃度であった。したがって、ヒト化 NOJ マウスで発現したヒト FLT3L および GM-CSF の濃度が高値であるとの前提の上で、以降の解析を実施した。なお、IVT 後 10 日目には FLT3L、GM-CSF ともに濃度が大幅に低下したが、サイトカインがまだ検出可能な濃度であったこと、また、ヒト化 NSG マウスへ同様に IVT を行った Chen らは導入されたサイトカイン濃度が大幅に低下した IVT 後 9 日目に実験を行ったことから (Chen et al., 2009)、本研究に関しても同時期の IVT 後 10 日目に樹状細胞亜集団について解析を行うこととした。

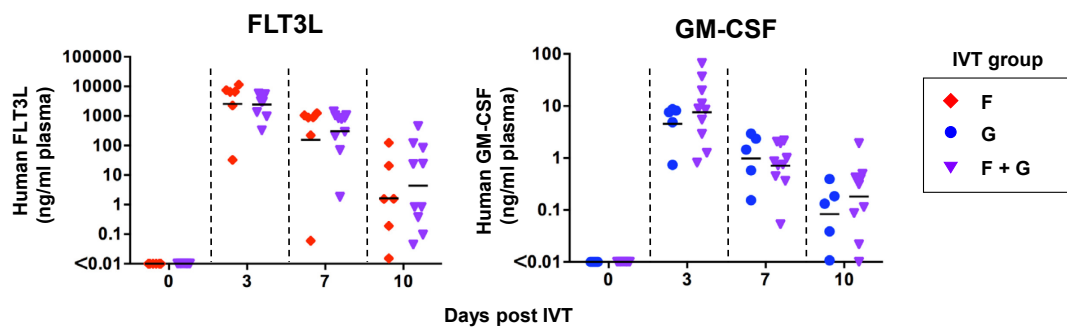


Fig. 2.2 IVT 後のヒト化 NOJ マウスにおけるヒト FLT3L および GM-CSF の発現

ヒト化 NOJ マウスにヒト FLT3L 発現プラスミド (F 群)、ヒト GM-CSF 発現プラスミド (G 群)、もしくはその両方 (F+G 群) を IVT により導入した。IVT 前および IVT 後 3、7、10 日目に得た血漿サンプルを採取し、各サイトカイン濃度を定量した。データは、各ヒト化マウス個体の値と幾何平均値を示す (F 群: $n=6$ 、G 群: $n=5$ 、F+G 群: $n=10$)。各時点における IVT 群間の比較は Mann-Whitney U test を使用したが有意な差は認められなかった。

Fig. 2.2 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). *Frontiers in immunology*, 9, 1042., under CC BY 4.0. / with minor modification of graph names and Y-axis titles.

2.3.2 定常状態のヒト化 NOJ マウスにおけるヒト樹状細胞様亜集団の性状解析

ヒト樹状細胞亜集団は、細胞表面マーカーの発現に基づき分類がなされている (Fig. 2.3)。古典的な樹状細胞亜集団には、血液やリンパ組織中に存在する cDC1、cDC2、pDC が知られており、それぞれ CD141、CD1c、CD123 の発現を特徴としている (Collin et al., 2013; Dzionek et al., 2000) (Fig. 2.3)。この他にも、末梢組織の樹状細胞の一部では、CD14 の発現を伴う亜集団が存在する (Boltjes & van Wijk, 2014; Collin et al., 2013)。ただし、CD14 を発現する樹状細胞は、古典的な骨髄由来樹状細胞亜集団とは系列が異なる MoDC (単球由来樹状細胞) と考えられており (Fig. 2.3)、通常の樹状細胞研究では解析から除外されてきた。しかし本研究では、ヒト化マウスで分化した多様な樹状細胞亜集団を検出するため、CD14 発現細胞を事前に除外せずに、CD141、CD1c、CD123 のマーカー分子の発現に基づき樹状細胞亜集団の分類を試みた。

まず、サイトカイン非発現条件下のヒト化マウスにおいて、樹状細胞亜集団が分化しうるか検討した。ナイーブのヒト化マウス、もしくは空ベクタープラスミドである pEF-BOS-bsr を IVT したヒト化マウス (以降この処置をしたマウス群を E 群と呼ぶ) から採取した脾細胞と骨髄細胞をフローサイトメトリーにより解析した。樹状細胞亜集団を同定するため、まず、T 細胞・B 細胞を除外した CD45⁺CD3⁻CD19⁻ 細胞を、CD123⁺CD33⁺ 細胞 (pDC 様亜集団) と CD123⁺CD33⁻ 骨髄系細胞に細分化した。さらに、CD123⁺CD33⁻ 骨髄系細胞は、CD141⁺ 細胞 (cDC1 様亜集団) と CD1c⁺ 細胞 (cDC2 様亜集団) に細分化した (Fig. 2.4A)。分画した各亜集団を単離し、メイ-グリュンワルド/ギムザ染色による形態を観察した結果 (Fig. 2.4B)、cDC1 様亜集団および cDC2 様亜集団は、ヒト末梢血 cDC に類似した、核が多分葉化した特徴を示した。また pDC 様亜集団は、ヒト末梢血 pDC に類似した、丸みを帯びた形状と核がくぼんだ特徴を示した。次に、樹状細胞亜集団に関連するマーカー分子 (HLA-DR、CD11c、CD303、CD4、CD11b および CD14) の発現を解析した (Fig. 2.4C)。その結果、3 つの樹状細胞様亜集団すべてで抗原提示細胞の特徴である HLA-DR (Poulter, 1983) の発現が認められた。CD4 は cDC および pDC の双方で発現することが知られているが (Dzionek et al., 2000)、ヒト化マウスの 3 つの亜集団すべてで発現が認められた。CD11c と CD303 は、それぞれ cDC と pDC を区別する特異的マーカーとして古くから用いられており (Dzionek et al., 2000; MacDonald et al., 2002)、ヒト化マウスの骨髄系細胞 (cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団) と pDC 様亜集団は、これらのマーカーによって明確に区別できた。CD11b は、cDC2 で発現が高いマーカーとして知られているが (Collin et al., 2013)、ヒト化マウスにおいて

も cDC2 様亜集団で発現が高いことが認められた。CD14 は、一般的に単球/マクロファージのマーカーと考えられているが、MoDC でも発現することが知られている (Segura et al., 2013; Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993)。本実験では、cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団で CD14 の発現が認められた。

これらの結果から、ヒト化マウスの pDC 様亜集団の表現型は、ヒト末梢血の pDC と非常に類似していることが示された。ただし、近年 pDC と同様の表現型を示す AXL⁺SIGLEC6⁺ DC (AS-DC) という樹状細胞亜集団が報告されている (Villani et al., 2017)。そのため pDC 様亜集団は、機能の評価により pDC もしくは AS-DC であるか検討する必要があると考えられる。cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団は、その大半が CD14 陰性の cDC1・cDC2 で構成されていることを想定していたが、実際は CD14 陽性の細胞も多く存在する、不均一な細胞集団であった。したがって、cDC1・cDC2 亜集団における CD14 陽性細胞がどのような条件で分化するのか、さらに検討する必要があると示唆された。

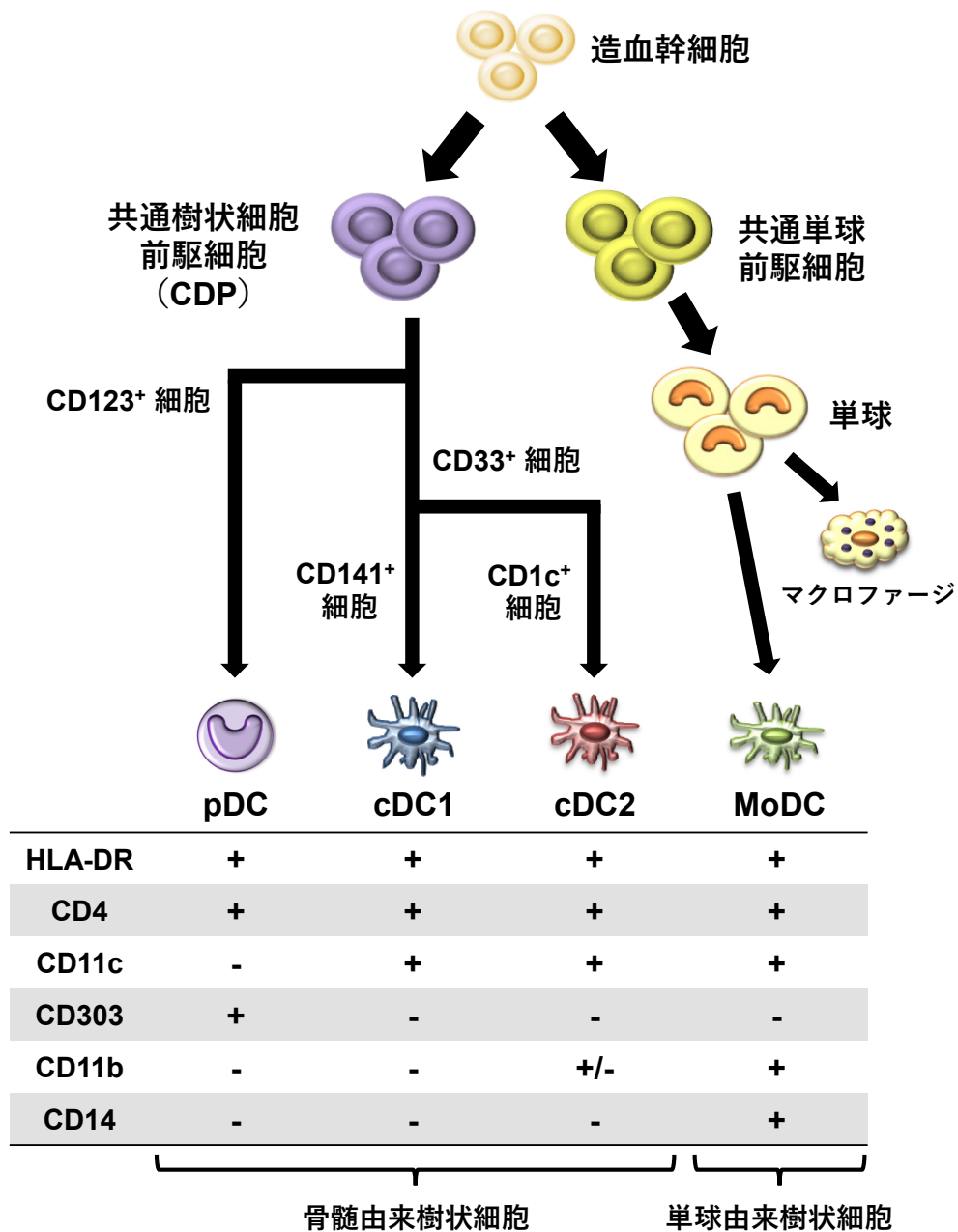


Fig. 2.3 分化経路・表面マーカーの発現に基づくヒト樹状細胞亜集団の分類

ヒト樹状細胞亜集団は、骨髄由来樹状細胞 (pDC、cDC1、cDC2) と単球由来樹状細胞 (MoDC) に大別され、それぞれ造血幹細胞から分化した共通樹状細胞前駆細胞 (CDP) と共通単球前駆細胞を由来とする。各樹状細胞亜集団は異なる表面マーカーの発現を示す。

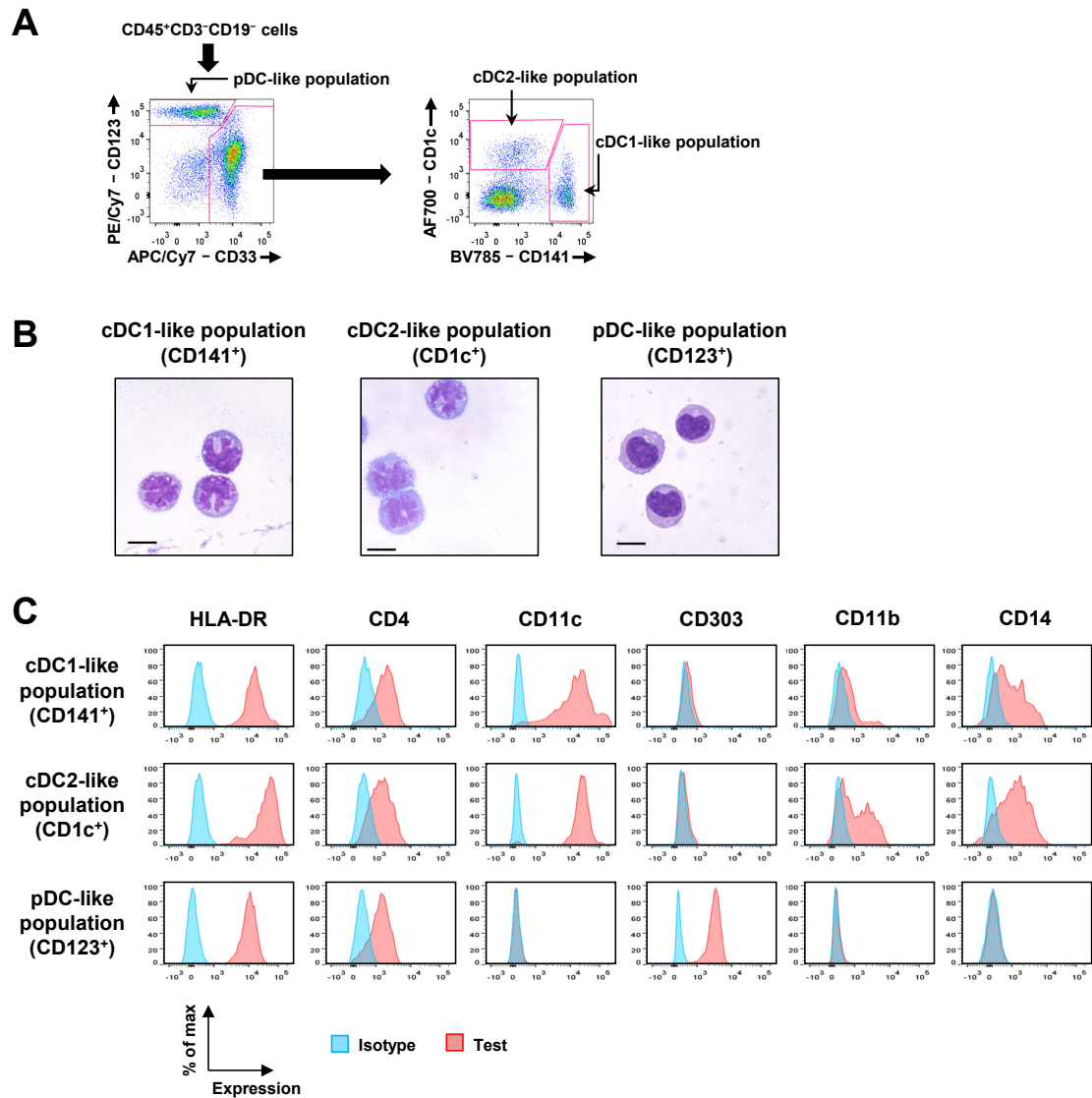


Fig. 2.4 ヒト化 NOJ マウスにおけるヒト樹状細胞様亜集団の性状解析

- (A) フローサイトメトリー解析における cDC1 様亜集団、cDC2 様亜集団、pDC 様亜集団の分画の代表例
- (B) 単離した各亜集団のメイ - グリェンワルド/ギムザ染色 (スケールバー = 10 μ m)
- (C) E 群のヒト化マウス脾臓における各亜集団のヒト樹状細胞関連マーカー分子の発現を示す代表的なヒストグラム

Fig. 2.4 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). *Frontiers in immunology*, 9, 1042., under CC BY 4.0. / with minor modification of population names and order of populations.

2.3.3 サイトカイン発現後の樹状細胞様重集団における CD14 陽性細胞の評価

サイトカイン非発現条件下で、cDC1・cDC2 様重集団の中に CD14⁺ 細胞の存在が想定より多く認められたので、この CD14⁺ 細胞の実態をより理解する必要があると考えた。そこで、CD14⁺ 細胞の分化が、リンパ組織の違いやサイトカイン発現の違いに影響を受けるのか検討した。また、cDC1・cDC2 様重集団とは異なる細胞分画における CD14⁺ 細胞との比較を行った。

まず、IVT 後 10 日目のヒト化マウスから採取した骨髄細胞・脾細胞をフローサイトメトリー解析し、cDC1・cDC2 様重集団に占める CD14⁺ 細胞の頻度を測定した (Fig. 2.5)。その結果、骨髄では GM-CSF の単独発現下 (G 群) で cDC2 様重集団に占める CD14⁺ 細胞の頻度が上昇した (Fig. 2.5A、上段左)。なお、FLT3L 単独発現下 (F 群) で pDC 様重集団でも上昇が認められたが (Fig. 2.5A、上段右)、CD14⁺ 細胞の頻度は 5%未満と全重集団の中で最小の頻度であった。これらの場合を除くと、その他の条件における CD14⁺ 細胞の頻度は、いずれも定常状態 (E 群) と同等もしくは減少することが認められた。

次に、ヒト化マウスの骨髄系細胞を構成する、cDC1 様重集団、cDC2 様重集団、および CD1c⁺CD141⁻ 細胞の 3 集団について、CD14 の発現強度を比較した。興味深いことに、CD1c⁺CD141⁻ 細胞では CD14 が高発現する細胞が認められた (Fig. 2.5B)。一方で、cDC1 および cDC2 様重集団では、骨髄と脾臓ともにサイトカインの発現に関わらず、CD14 は低-中程度の発現であった。

cDC1 および cDC2 様重集団に存在する CD14 を低-中程度発現する細胞は次の (i) ~ (iii) の可能性が考えられた。(i) 樹状細胞の他に、骨髄系細胞を構成する免疫細胞として単球が知られている。単球はさらに、CD14 の発現強度に基づき、古典的単球、中間的単球、非古典的単球の 3 種類に分類され、古典的単球および中間的単球の CD14 発現強度は非古典的単球よりも高いことが知られている (Ziegler-Heitbrock et al., 2010)。したがって、cDC1 および cDC2 様重集団における CD14⁺ 細胞は非古典的単球が含まれることが示唆された。(ii) 末梢組織や炎症環境で分化する MoDC は、CD1c または CD141 を発現すること (Boltjes & van Wijk, 2014; Collin et al., 2013)、さらに MoDC は単球からの分化の過程で CD14 の発現が低下することが知られている (Sallusto & Lanzavecchia, 1994)。そのため CD14⁺ 細胞は、MoDC の可能性も考えられた。(iii) 興味深いことに、近年のヒト末梢血中の樹状細胞を single cell RNA-sequencing (scRNA-Seq) で解析した研究において、cDC2 の中に、炎症性マーカー遺伝子とともに CD14 mRNA を発現する重集団が存在することが報告されている (Villani et al., 2017)。この報告から、少なくとも

cDC2は、環境要因によりCD14を発現する可能性が考えられた。本章の実験では、CD14⁺細胞が (i) ~ (iii) のいずれの細胞であるか特定することは困難であったが、(ii) や (iii) のように、cDC1 や cDC2 とは異なる樹状細胞亜集団である可能性が示唆された。

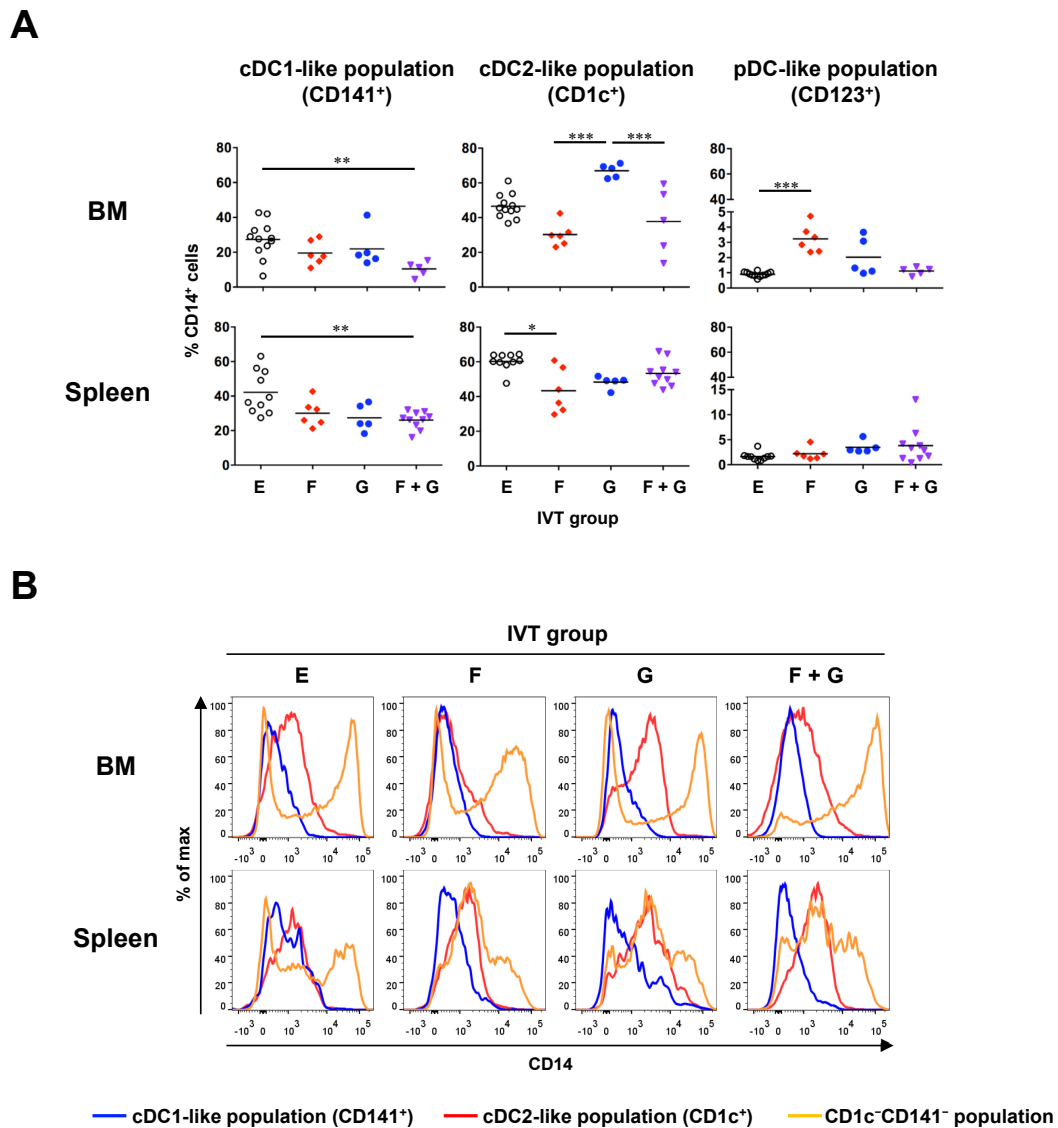


Fig. 2.5 ヒト化マウス骨髄系細胞集団における CD14 陽性細胞の分化

解析に用いた細胞は各 IVT 群のヒト化マウスの骨髄および脾臓から調製した。

(A) CD14⁺ 細胞 (cDC1 様亜集団)、CD1c⁺ 細胞 (cDC2 様亜集団)、および CD123⁺ 細胞 (pDC 様亜集団) に占める CD14⁺ 細胞の頻度

頻度の比較は各 IVT 群間 (n=5-12) で行った。有意差 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$) は、Kruskal-Wallis test に続いて Dunn's multiple comparison test を用いて決定した。

(B) cDC1 様亜集団、cDC2 様亜集団、および CD1c⁻CD141⁻ 骨髄系細胞における CD14 発現を示す代表的なヒストグラム

Fig. 2.5 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). *Frontiers in immunology*, 9, 1042., under CC BY 4.0. / with minor modification of population names and order of graphs and legends.

2.3.4 樹状細胞様亜集団の分化に及ぼすサイトカイン発現効果の評価

前 2.3.3 項より、サイトカイン発現条件下でも CD14⁺ 細胞が実質的に存在したことを受けて、cDC1 様亜集団、cDC2 様亜集団、pDC 様亜集団を CD14⁻ 細胞分画と CD14⁺ 細胞分画に細分化した。その上で、骨髄および脾臓中の各細胞集団について、細胞の絶対数とヒト白血球に占める頻度を測定し、各細胞集団の分化に及ぼすサイトカイン発現の効果を評価した (Fig. 2.6、2.7)。なお、細胞の絶対数は、各ヒト化マウス個体のヒト白血球の再構成レベルに依存する懸念が考えられたが、骨髄細胞および脾細胞におけるヒト白血球の割合 (キメリズム) は、各 IVT 群間で有意な差はないことを確認している (Fig. 2.8)。ただし、各細胞集団の分化に及ぼすサイトカイン発現の効果は、リンパ組織ごとに異なったため、リンパ組織ごとに結果の詳細を記述する。

骨髄 (Fig. 2.6) : 各亜集団の全細胞に着目すると (Fig. 2.6、上段)、GM-CSF の発現下 (G 群または F+G 群) で cDC2 様亜集団と pDC 様亜集団の絶対数・頻度の増加が認められた。一方で、cDC1 様亜集団では増加が認められなかった。そこで、各亜集団を CD14⁻ 細胞 (Fig. 2.6、中段) と CD14⁺ 細胞 (Fig. 2.6、下段) に分けて、増加の要因を検討した。その結果、cDC2 様亜集団の絶対数の増加は CD14⁺ 細胞に起因することが認められた。一方で、pDC 様亜集団では、CD14⁻ 細胞と CD14⁺ 細胞の両方で頻度の増加が認められた。ただし、頻度の平均値を比較すると、GM-CSF の発現による実質的な増加は、CD14⁺ 細胞 (0.3%) ではなく、CD14⁻ 細胞 (17.5%) によるものであることが認められた。

GM-CSF とは対照的に、FLT3L の発現下 (F 群および F+G 群) では、cDC1 様亜集団の絶対数・頻度の増加が認められた (Fig. 2.6)。また、この増加には CD14⁻ 細胞の増加が大きく寄与していることが考えられた (Fig. 2.6、中段)。興味深いことに、FLT3L と GM-CSF の同時発現 (F+G 群) では、cDC1 および cDC2 様亜集団の頻度の上昇がすべての分画で認められた。

以上の結果を総合すると、FLT3L および GM-CSF の発現は、cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団の分化の向上に、相加的な効果を発揮することが示唆された。一方で、pDC 様亜集団に対してはその効果が認められなかった。

脾臓 (Fig. 2.7) : 骨髄と同様に、FLT3L と GM-CSF の同時発現 (F+G 群) では、cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団の絶対数・頻度がすべての分画で上昇した。一方で、骨髄で認められた GM-CSF 単独発現 (G 群) における cDC2 様亜集団の増加は、脾臓では認められなかった。また、骨髄では認められなかった FLT3L 単独発現下 (F 群) における cDC2 様亜集団の分化の向上は、CD14⁻ 細胞と CD14⁺ 細胞の両方で認められた (Fig. 2.7)。

なお、pDC 様亜集団については、どのサイトカイン発現条件においても分化の向上は認められなかった。

以上の結果から、樹状細胞様亜集団の分化に及ぼす、FLT3L または GM-CSF 単独発現の効果は、リンパ組織ごとに異なることが明らかとなった。その要因には、1 次リンパ組織である骨髄と、2 次リンパ組織である脾臓では、組織の役割に基づく免疫細胞の流出・流入の違いや、各組織の微小環境の違いが影響していると考えられる。一方で、FLT3L および GM-CSF の同時発現下では、どちらの組織でも cDC1 および cDC2 様亜集団の分化の向上が認められた。この結果は、樹状細胞の発生学的見地からも理にかなっていることから (Kingston et al., 2009)、ヒト化マウスにおける骨髄系樹状細胞様亜集団の分化の向上には FLT3L および GM-CSF の同時発現が有効であることが示唆された。その一方で、pDC 様亜集団については、骨髄・脾臓の両方で顕著な分化の向上を可能とするサイトカイン発現条件を見出すことができなかった。しかし、過去のヒト化マウスの研究では、ヒト化 NOD/SCID マウスに対する組換えヒト FLT3L タンパクの投与が、骨髄・脾臓における pDC の分化を向上したという報告が存在する (Ding et al., 2014)。そのため、Ding らの報告と本研究の結果の相違について、さらなる検討が必要と考えた。

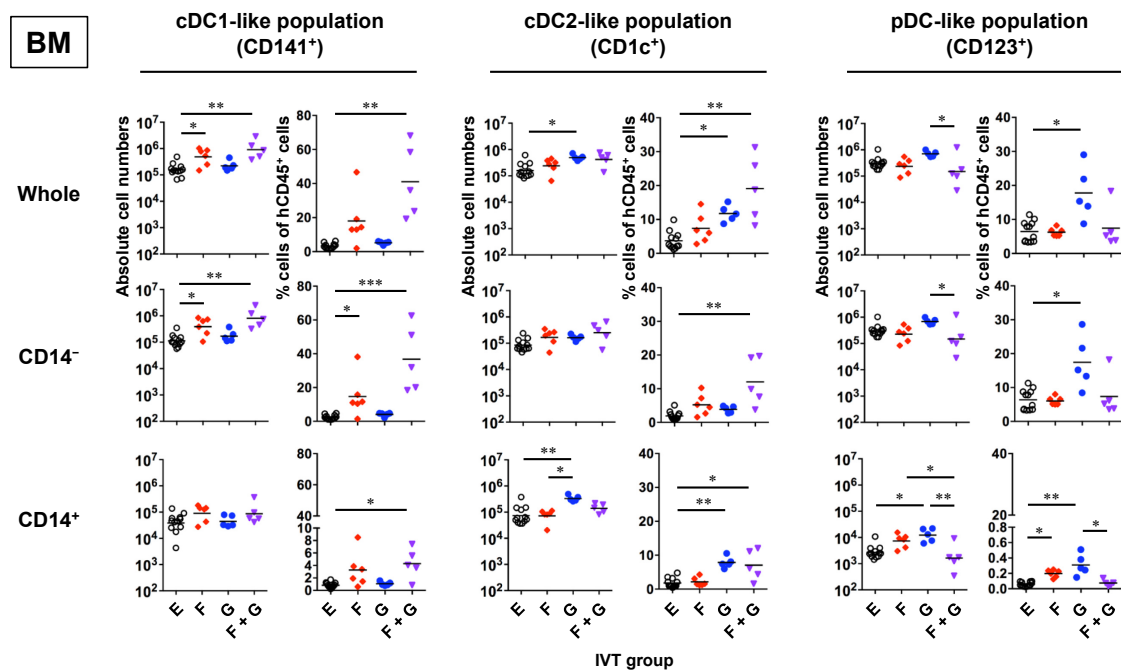


Fig. 2.6 IVT 後のヒト化マウス骨髄におけるヒト樹状細胞様亜集団の分化

骨髄における CD141⁺ 細胞 (cDC1 様亜集団)・CD1c⁺ 細胞 (cDC2 様亜集団)・CD123⁺ 細胞 (pDC 様亜集団) の絶対数 (各細胞分画の左列のグラフ)、およびヒト白血球に占める各亜集団の頻度 (各細胞分画の右列のグラフ)

データは、各ヒト化マウス個体の値と絶対数の幾何平均値および細胞頻度の平均値を示す (1 群あたり n = 5 ~ 12)。絶対数および頻度の比較は各 IVT 群間で行った。有意差 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$) は、Kruskal-Wallis test に続いて Dunn's multiple comparison test を用いて決定した。

Fig. 2.6 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). *Frontiers in immunology*, 9, 1042., under CC BY 4.0. / with minor modification of population names and order of graphs.

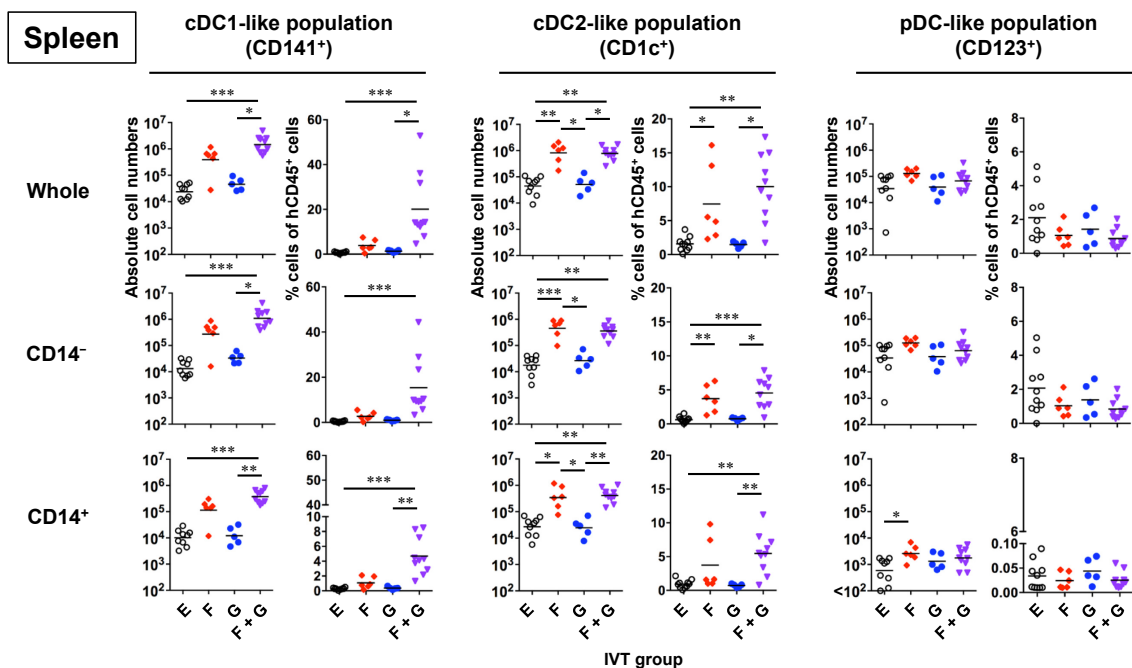


Fig. 2.7 IVT 後のヒト化マウス脾臓におけるヒト樹状細胞様亜集団の分化

脾臓における CD141⁺ 細胞 (cDC1 様亜集団)・CD1c⁺ 細胞 (cDC2 様亜集団)・CD123⁺ 細胞 (pDC 様亜集団) の絶対数 (各細胞分画の左列のグラフ)、およびヒト白血球に占める各亜集団の頻度 (各細胞分画の右列のグラフ)

データは、各ヒト化マウス個体の値と絶対数の幾何平均値および細胞頻度の平均値を示す (1 群あたり n = 5 ~ 12)。絶対数および頻度の比較は各 IVT 群間で行った。有意差 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$) は、Kruskal-Wallis test に続いて Dunn's multiple comparison test を用いて決定した。

Fig. 2.7 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). Frontiers in immunology, 9, 1042., under CC BY 4.0. / with minor modification of population names and order of graphs.

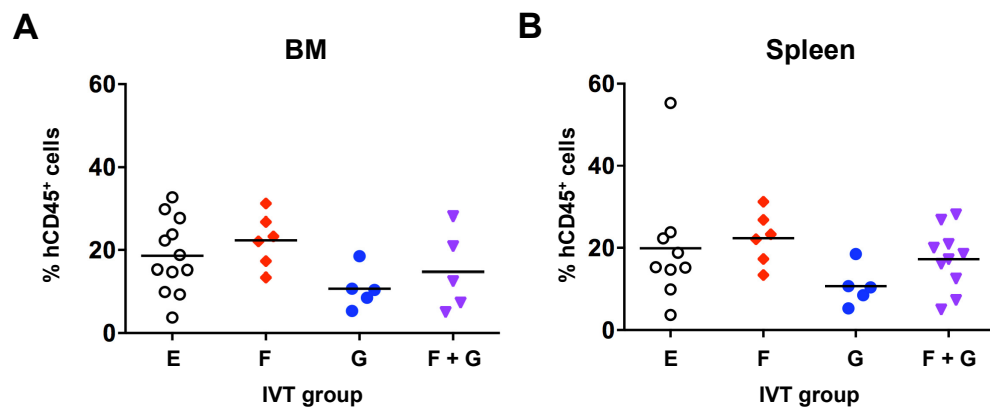


Fig. 2.8 Fig. 2.6、2.7 で使用したヒト化マウスにおけるキメリズム

(A) 各ヒト化マウスの骨髄細胞に占めるヒト白血球の割合

(B) 各ヒト化マウスの脾細胞に占めるヒト白血球の割合

IVT 群間の比較は Kruskal-Wallis test に続いて Dunn's multiple comparison test を使用したが、有意な差は認められなかった。

Fig. 2.8 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). *Frontiers in immunology*, 9, 1042., under CC BY 4.0.

2.3.5 若齢ヒト化 NOJ マウスを用いた pDC の分化における FLT3L 発現効果の評価

第 2.3.4 項の実験では、ヒト化マウスへの FLT3L の発現 (F 群・F+G 群) は pDC 様亜集団の分化には無関係であると考えられた。しかしながら、Ding らはヒト化マウスへの組換え FLT3L タンパクの投与が、cDC1 および cDC2 と同様に pDC の分化も向上させることを報告している (Ding et al., 2014)。この pDC の分化の不一致の原因を考えたところ、実験に用いたヒト化マウスの週齢の違いが影響している可能性が考えられた。

そこで、Ding らと同様に造血幹細胞移植後 4 週齢の若齢ヒト化マウスを用い、このマウスに FLT3L の IVT を行った。そして、IVT 後 10 日目の骨髄と脾臓における cDC1 様亜集団、cDC2 様亜集団、pDC 様亜集団の絶対数と頻度について、コントロール群 (young E: yE 群) と比較した。その結果、骨髄では cDC2 様亜集団と pDC 様亜集団の頻度が上昇した (Fig. 2.9A)。また、脾臓では cDC2 様亜集団と pDC 様亜集団の絶対数と頻度の両方が顕著に上昇した (Fig. 2.9B)。この結果より、ヒト化マウスにおいても、FLT3L の発現下で pDC 様亜集団の分化は向上しうることが示めされた。

その一方で、若齢ヒト化マウスにおける FLT3L の発現下 (Fig. 2.9、yF 群) では、第 2.3.4 項で認められた cDC1 様亜集団の分化の向上 (Fig. 2.6、2.7、F 群) が認められなかった。したがって、若齢のヒト化マウスを用いても、Ding らの報告のように、古典的な樹状細胞亜集団すべての分化を向上することはできなかった。本実験と Ding らの実験の違いは、ヒト化マウスの系統の違いを除くと、ヒト化マウスに導入した FLT3L の量に違いがある。しかし、FLT3L の存在量の違いが生体内の pDC もしくは cDC1 のいずれかの分化に偏極するという報告はないため、その可能性は考えにくい。

興味深いことに、近年新たに開発されたヒト化マウスを用いた研究では、FLT3L が必ずしも pDC の分化を向上するわけではないことが示唆されている (Anselmi et al., 2020)。その研究のヒト化マウスは、FLT3L を含む数種のサイトカインを発現した間質細胞と造血幹細胞を同時に移植することで作製されている。このヒト化マウスでは、コントロール群と比較して、cDC1 および cDC2 の分化は向上した一方で、pDC の分化の向上は認められなかった。この報告から、ヒト化マウスにおける FLT3L の発現が、古典的な樹状細胞亜集団すべての分化の向上を実現できない場合もある可能性が示唆される。本研究では、少なくともサイトカインの発現により pDC 様亜集団の分化の低下は起きていない。また、ヒト化マウスの週齢依存的な成長に伴う細胞の収量の増加を考慮すると、第 2.3.4 項で用いた 15-17 週齢のヒト化マウスを以降の実験で用いることが適していると判断した。

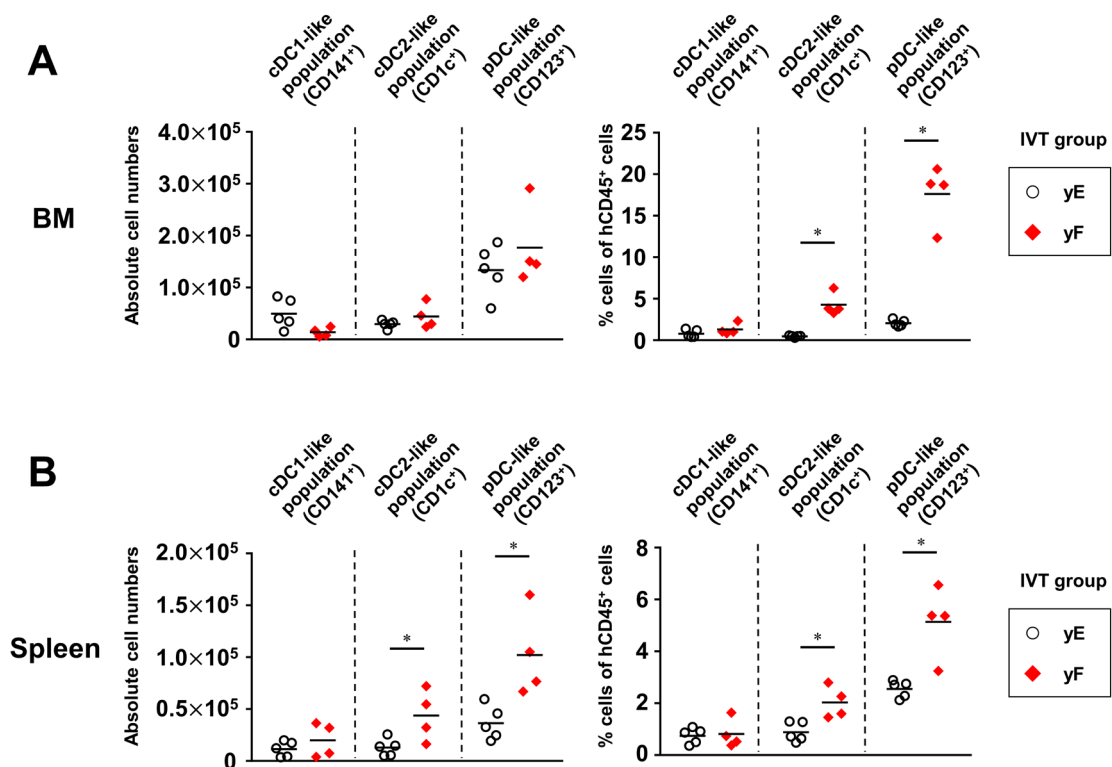


Fig. 2.9 若齢ヒト化マウスを用いた pDC の分化における FLT3L 発現効果の評価

造血幹細胞移植後 4 週齢の ヒト化マウスにヒト FLT3L 発現プラスミド (yF 群: n = 5) もしくは空ベクタープラスミド (yE 群: n = 4) の IVT を行った。解析に用いた細胞は IVT 後 10 日目の各 IVT 群のヒト化マウスから採取した骨髄および脾臓から調製した。

(A) 骨髄における cDC1 様亜集団・cDC2 様亜集団・pDC 様亜集団の絶対数 (左)、およびヒト白血球に占める各亜集団の頻度 (右)

(B) 脾臓における cDC1 様亜集団・cDC2 様亜集団・pDC 様亜集団の絶対数 (左)、およびヒト白血球に占める各亜集団の頻度 (右)

データは、各ヒト化マウス個体の値と絶対数の幾何平均値および細胞頻度の平均値を示す。絶対数および頻度の比較は各 IVT 群間で行った。有意差 (* $P < 0.05$) は、Mann-Whitney U test により決定した。

Fig. 2.9 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). *Frontiers in immunology*, 9, 1042., under CC BY 4.0. / with minor modification of population names and order of populations.

2.3.6 樹状細胞様亜集団の成熟度に及ぼすサイトカイン発現効果の評価

第 2.3.3 項から第 2.3.5 項までは、各亜集団の分化に及ぼすサイトカイン発現の効果を、各亜集団の絶対数・頻度で評価した。次に本項では、サイトカインの発現が各亜集団の成熟状態に影響を及ぼすか、CD40、CD80、CD86 の発現に基づき評価した。これらのマーカー分子の発現上昇は樹状細胞の成熟に関連していることが知られている (Cochand et al., 1999)。各マーカーの発現は、陰性細胞と陽性細胞に明確に区別することが困難であり、場合によってはアイソタイプコントロール抗体による蛍光のバックグラウンドレベルが IVT 群間で異なっていた (Fig. 2.10A)。そのため、各マーカーの発現の定量的な尺度には、正規化平均蛍光強度 (normalized mean fluorescence intensity; nMFI、 $nMFI = \text{テストマーカー抗体の MFI} / \text{アイソタイプコントロール抗体の MFI}$) を算出し、各 IVT 群間で比較した (Fig. 2.10B)。サイトカイン発現による各マーカーの発現パターンは亜集団ごとに異なったため、亜集団ごとに結果の詳細を記載する。

cDC1 様亜集団: CD40 は定常状態 (E 群) でも高発現しており、サイトカインの発現による差は認められなかった。CD80 の発現は GM-CSF の単独発現下 (G 群) で上昇したが、FLT3L との同時発現下 (F+G 群) では定常状態と差が認められなかった。CD86 はサイトカインの発現による発現の差は認められなかった。

cDC2 様亜集団: CD40 は cDC1 様亜集団と同様に定常状態 (E 群) でも高発現しており、サイトカインの発現による差は認められなかった。CD80 の発現は、FLT3L と GM-CSF の同時発現下 (F+G 群) で上昇した。また、CD86 の発現も FLT3L と GM-CSF の同時発現下 (F+G 群) で上昇した。

pDC 様亜集団: cDC1 および cDC2 様亜集団と異なり、CD40 の発現は GM-CSF の発現下 (G 群および F+G 群) で上昇した。CD80 は定常状態 (E 群) ではほとんど発現が認められなかったが、GM-CSF の発現下 (G 群および F+G 群) で発現上昇が認められた。CD86 の発現は FLT3L および GM-CSF の同時発現下でのみ上昇した。

T 細胞性の免疫誘導には樹状細胞の成熟化が必要である (Lutz & Schuler, 2002)。特に、T 細胞の活性化に関与し、共刺激分子として働く B7 分子 (CD80・CD86) の発現上昇が重要とされている (Lanier et al., 1995; Zheng et al., 2004)。しかし、FLT3L 単独では機能的な樹状細胞を分化させるには不十分である可能性が指摘されていた (Lutz et al., 2017)。本実験の結果からも、FLT3L 単独誘導下において有意な発現上昇を示した成熟関連マーカーは認められなかった。それとは対照的に、GM-CSF 誘導下 (G 群または F+G 群) では、すべての亜集団において CD80 の発現上昇が認められた。また、GM-CSF は FLT3L

と協調することで、cDC2 様亜集団と pDC 様亜集団の CD86 の発現を最も上昇させた。したがって、ヒト化マウスにおける樹状細胞様亜集団の成熟化には、FLT3L および GM-CSF の同時発現がより効果的であることが示唆された。ただし、cDC1 様亜集団には効果が乏しいことを考慮する必要がある。また、本実験では各亜集団から CD14⁺ 細胞を除いて解析ができなかったため、CD14⁻ 細胞と CD14⁺ 細胞の間で発現に差がある可能性も残されている。

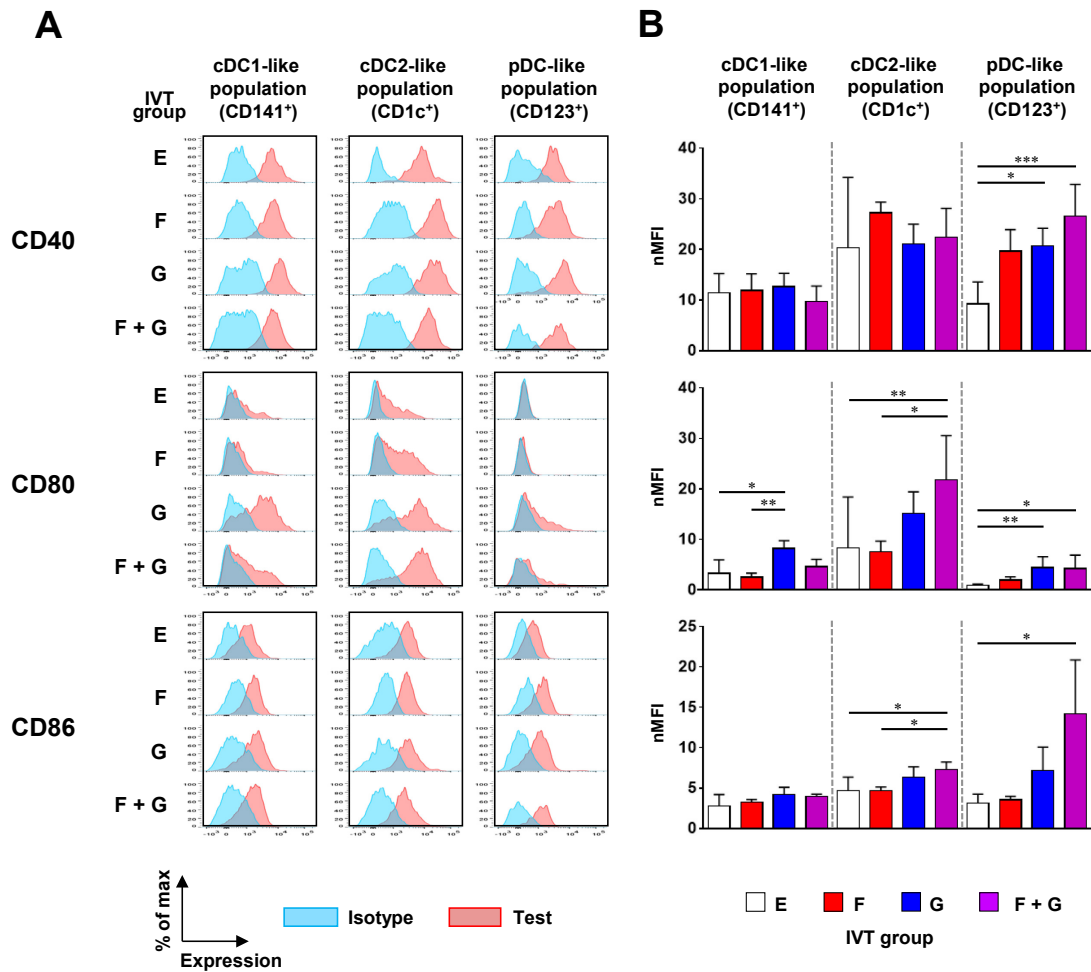


Fig. 2.10 IVT 後のヒト化マウスにおけるヒト樹状細胞様重集団の成熟状態

解析に用いた細胞は各 IVT 群のヒト化マウスの脾臓から調製した。

(A) フローサイトメトリー解析によるヒト樹状細胞関連マーカー分子のテストマーカー抗体およびアイソタイプコントロール抗体染色の代表的なヒストグラム

(B) IVT 群間の正規化平均蛍光強度 (nMFI) の比較

データは、平均±標準偏差を表している (E 群 : n=9、F 群 : n=6、G 群 : n=5、F + G 群 : n=6)。有意差 ($*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$) は、Kruskal-Wallis test に続いて Dunn's multiple comparison test によって決定した。

Fig. 2.10 was referred from the article: Iwabuchi et al., (2018). Frontiers in immunology, 9, 1042., under CC BY 4.0.

/ with minor modification of population names and order of populations.

2.3.7 分化した樹状細胞様亜集団の機能性の検討

第 2.3.4 項および第 2.3.6 項の結果から、FLT3L と GM-CSF の同時発現が樹状細胞様亜集団の分化・成熟に効果的であることが示唆された。そこで、FLT3L と GM-CSF により分化誘導した cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団が機能的であるか検討した。機能的な樹状細胞は T 細胞に対する増殖刺激能を有しており、他家のリンパ球と共培養すると、リンパ球の増殖を誘導する混合リンパ球反応を示すことが知られている (Steinman & Witmer, 1978)。そこで、この混合リンパ球反応を利用し、cDC1 および cDC2 様亜集団が機能的であるか検討した。

異なる 3 ドナーの造血幹細胞から作製したヒト化マウスに対して、IVT により FLT3L と GM-CSF を発現させ、IVT 後 10 日目に脾臓から cDC1 様亜集団、cDC2 様亜集団、pDC 様亜集団を単離した。そして各亜集団を、それぞれ CFSE で標識した他家ヒト末梢血由来 T 細胞と共培養し、5 日目に T 細胞の CFSE の蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。その結果、cDC1 および cDC2 様亜集団と共培養した T 細胞では CFSE の蛍光強度の減衰 (細胞分裂) が認められた (Fig. 2.11A)。また、CFSE の蛍光強度が減衰した細胞 (CFSE^{low} 細胞) の頻度は、cDC1 様亜集団と共培養で平均約 55%、cDC2 様亜集団との共培養で平均約 72%であった (Fig. 2.11B)。一方で pDC 様亜集団と共培養した T 細胞ではほとんど CFSE の減衰が認められず (Fig. 2.11A)、CFSE^{low} 細胞の頻度は平均約 6%であった (Fig. 2.11B)。これらの結果から、cDC1 および cDC2 様亜集団は T 細胞に対する増殖刺激能を有していたことから、機能的な樹状細胞であることが示唆された。そして、cDC2 様亜集団は cDC1 様亜集団よりも高い増殖刺激能を示したが、cDC2 様亜集団が T 細胞共刺激分子をより高いレベルで発現することが要因と考えられる (Fig. 2.10B)。一方で、pDC 様亜集団は T 細胞に対する増殖刺激能をほとんど有していなかったが、pDC は混合リンパ球反応をほとんど示さないことが知られており (See et al., 2017; Villani et al., 2017)、本結果は既報の結果と一致する。

本実験では、cDC1・cDC2 様亜集団における、CD14⁻ 細胞と CD14⁺ 細胞の増殖刺激能の違いについては言及できない。しかし、これまでの実験の結果を総合すると、CD14⁻ 細胞はヒト cDC1 および cDC2 と同一の細胞であると考えられる。一方で CD14⁺ 細胞については、今後さらなるマーカー分子の発現解析や遺伝子発現解析、詳細な機能性の検討により、CD14⁻ 細胞と同等の亜集団であるのか、もしくは新たな樹状細胞亜集団であるか明らかにする必要がある。

pDC 様亜集団には、第 2.3.2 項で述べた通り pDC の他に AS-DC である可能性も考えられた。しかしながら、pDC は増殖刺激能が乏しいことに対し、AS-DC は強い増殖刺激能を有していることが知られている (Villani et al., 2017)。本実験において、ヒト化マウスにおける pDC 様亜集団は T 細胞に対する増殖刺激能をほとんど示していないことから、pDC 様亜集団のほとんどがヒトの pDC と同一細胞であることが示唆された。

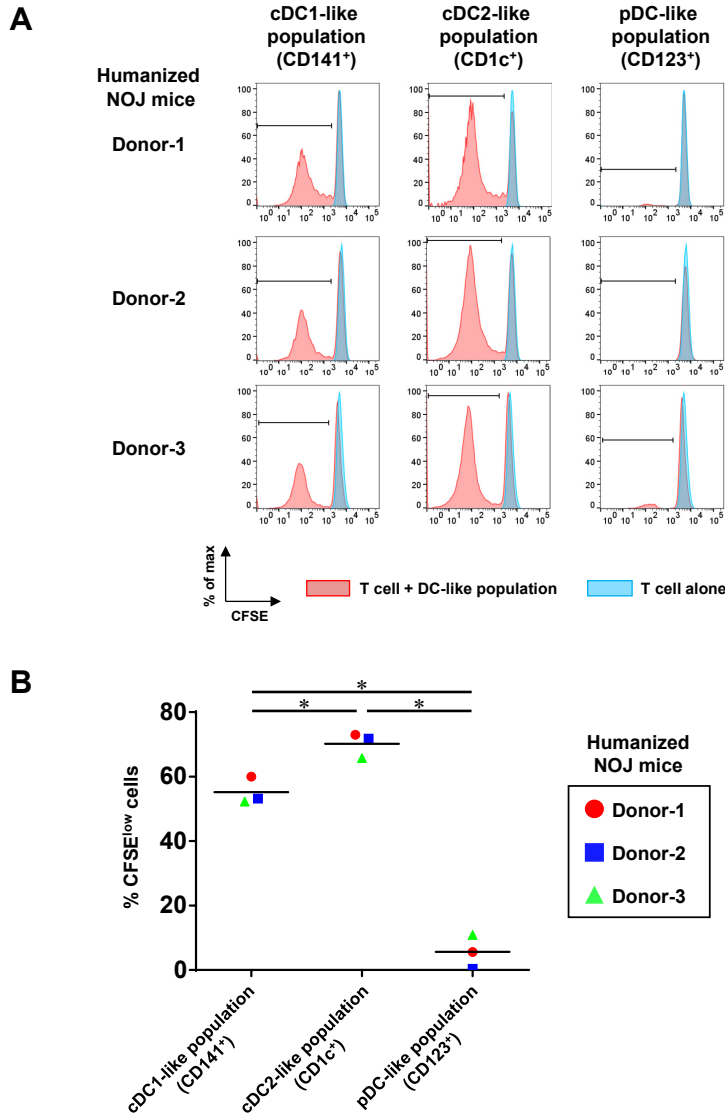


Fig. 2.11 ヒト化マウス脾臓の樹状細胞様亜集団の T 細胞増殖刺激能の検討

FLT3L および GM-CSF の IVT 後 10 日目のヒト化マウスの脾臓から cDC1 様亜集団、cDC2 様亜集団および pDC 様亜集団を単離し、CFSE で染色した他家ヒト末梢血由来 T 細胞と 5 日間共培養を行った。共培養 5 日目に回収した T 細胞の CFSE の蛍光強度を測定した。

- (A) 異なる 3 ドナーのヒト化マウスから単離した各亜集団と共培養した T 細胞における CFSE の蛍光強度を示したヒストグラム
- (B) 各亜集団と共培養した T 細胞の中で CFSE の蛍光強度が減衰した (CFSE^{low}) 細胞の頻度の比較

頻度の比較は共培養条件間 (n = 3) で行った。有意差 (*P < 0.05) は、one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて決定した。

2.4 結言

本章では、ヒト化 NOJ マウスに、流体力学遺伝子導入法を用いてヒト FLT3L および GM-CSF を発現させ、ヒト樹状細胞亜集団の分化誘導を試みた。流体力学遺伝子導入法によりヒト FLT3L 遺伝子およびヒト GM-CSF 遺伝子の導入を試みた結果、少なくとも導入後 3 日目から 10 日目まで FLT3L および GM-CSF の発現に成功した。次に、ヒトにおける主要な樹状細胞亜集団が、ヒト化マウスにおいても分化しうるか、サイトカイン非発現条件下・発現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 cDC1、cDC2、pDC と類似した表現型・形態を示す樹状細胞様亜集団がサイトカイン非発現条件下の骨髄と脾臓で認められた。また、サイトカインの発現条件下では、FLT3L と GM-CSF の同時発現が、骨髄と脾臓の cDC1 様亜集団および cDC2 様亜集団の分化を最も向上させた。一方で、pDC 様亜集団については、骨髄・脾臓の両方で顕著な分化の向上を可能とするサイトカイン発現条件は認められなかった。次に、サイトカインの発現による各亜集団の成熟化に及ぼす効果を検討した結果、GM-CSF の発現下で、すべての亜集団において成熟化マーカーの一つである CD80 の発現上昇が認められた。また FLT3L と GM-CSF の同時発現では、cDC2 様亜集団と pDC 様亜集団において別の成熟化マーカーである CD86 の発現上昇が認められた。これらの結果から、樹状細胞様亜集団の成熟化には FLT3L と GM-CSF の同時発現が効果的であることが示唆された。そこで FLT3L と GM-CSF の同時発現により分化誘導した cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団の機能について検討した。それぞれを他家のヒト T 細胞と共培養したところ、どちらの亜集団も T 細胞に対する増殖刺激能を示し、少なくとも一定の機能を有する樹状細胞であることが確認された。

以上より、ヒト化マウスへの FLT3L と GM-CSF の強制発現によって、機能的な cDC1 および cDC2 の分化を向上することに成功した。また pDC の分化を向上させるには至らなかったが、サイトカイン非発現条件下と同程度に分化していることを確認した。興味深いことに本研究では、過去のヒト化マウスの研究でも報告されているこれらの樹状細胞亜集団に加え、従来の定義から cDC1 や cDC2 に分類されない CD14⁺ 細胞の分化が認められた。そのため、この CD14⁺ 細胞の実態について更なる検証が必要であると考えられた。

第3章 ヒト FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスを用いたヒト樹状細胞亜集団の解析

3.1 緒言

本章では、第2章で作製したヒト FLT3L および GM-CSF を発現したヒト化マウスを用いて、ヒト化マウスで DC3 が分化しうるか否か明らかにすることを旨とする。

DC3 は、2017 年に Villani らによってその存在が示唆された樹状細胞亜集団である (Villani et al., 2017)。この研究では、ヒト末梢血に存在する樹状細胞亜集団を、scRNA-Seq による網羅的な遺伝子発現解析の結果に基づき再分類を行った。その結果、従来 cDC2 と考えられていた亜集団には、CD14 mRNA を発現しない古典的な cDC2 の他に、CD14 mRNA を発現する細胞集団が含まれており、これを便宜的に DC3 と呼称した。

これまでの研究で、末梢組織の真皮樹状細胞や、腫瘍腹水や関節滑液中の炎症性樹状細胞は細胞表面に CD14 を発現することが既に報告されている (Segura et al., 2012; Segura et al., 2013)。これらは単球から分化した樹状細胞 (MoDC) であるため、CD14 を発現していると考えられてきた。一方で、血液やリンパ組織に存在する cDC1、cDC2、pDC は、単球とは異なる骨髄系前駆細胞から分化することが明らかになっている (Guilliams et al., 2014)。そのため、前駆細胞の違いから、cDC1・cDC2・pDC と MoDC は異なる系統の樹状細胞として区別されてきた。また表現型に基づく分類では、真正の樹状細胞 (cDC1・cDC2・pDC) を CD14⁻ 細胞、MoDC を CD14⁺ 細胞と定義されてきた。そのため、DC3 の存在が示唆されるまでの樹状細胞研究では、真正の樹状細胞は CD14 を発現しないものと考えられてきた。

興味深いことに、第2章で作製した FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスでは、cDC1 および cDC2 に表現型が類似した CD14⁺ 細胞の分化が認められた (Iwabuchi et al., 2018)。また、Villani らの報告を裏付ける形で、DC3 は細胞表面に CD14 を発現する cDC1 とも cDC2 とも異なる真正の樹状細胞であることを、複数の研究グループが報告している (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。しかし、生体内における DC3 の分化機構や、免疫誘導組織における性状・機能について不明なことが多く、DC3 の解析が可能な動物モデルの開発が望まれている (Villar & Segura, 2020)。そこで本章では、第2章で作製した FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスにおける CD14⁺ 細胞に着目し、DC3 と同等の亜集団であるか検証した。

3.2 実験方法及び材料

3.2.1 ヒト臍帯血からの造血幹細胞の分離

第 2.2.1 項と同様の方法で行った。なお、本章では造血幹細胞を分離後の CD133⁺ 臍帯血単核球も実験で使用した。

3.2.2 マウスおよびヒト化マウスの構築

第 2.2.2、2.2.3 項と同様の方法でヒト化 NOJ マウスを構築した。なお本章では、造血幹細胞移植後 15-17 週齢のマウスをすべての実験に用いた。

3.2.3 流体力学的遺伝子導入法による *in vivo* transfection

第 2.2.4、2.2.5 項と同様の方法で、ヒト FLT3L プラスミド及びヒト GM-CSF プラスミド各 25 µg ずつを混合したものをヒト化 NOJ マウスに IVT した。

3.2.4 細胞の調製

実験に使用した細胞は、第 3.2.1 項で分離した CD133⁺ 臍帯血単核球に加えて、ナイーブおよび IVT ヒト化 NOJ マウスの脾臓・全血、および健康な日本人ボランティアから採血したヒト末梢血からも調製した。なお、ボランティアのインフォームド・コンセントおよび国立感染症研究所内の医学研究倫理審査委員会の承認を事前に受けた上で、ヒト末梢血を使用した。

ヒト化 NOJ マウスの脾臓は、ナイーブもしくは IVT 後 7 日目から採取し、Spleen Dissociation Kit mouse および gentleMACS Dissociator を用いて分散処理した。個々のヒト化 NOJ マウス脾細胞をフローサイトメトリー解析に供する場合は、分散した脾細胞を ACK buffer による溶血処理した後に、DC-staining buffer (PBS, 2% FBS, 5 mM EDTA-2Na, 0.01% NaN₃) で洗浄し、同 Buffer で再懸濁後、解析まで氷上で維持した。脾細胞から樹状細胞亜集団および単球をセルソーターにより単離する場合は、造血幹細胞ドナーが共通する複数匹のヒト化 NOJ マウス脾細胞を、分散処理後に 1 本のチューブにまとめた。次に、このまとめた脾細胞から、EasySep Mouse/Human Chimera Isolation kit (StemCell Technologies) を使用してヒト白血球を濃縮分離した。さらに、この濃縮ヒト白血球から、CD3 MicroBead (Miltenyi Biotec) および CD19 MicroBead (Miltenyi Biotec) を使用してヒト CD3⁺CD19⁻ 細胞を濃縮分離した。濃縮したヒト CD3⁺CD19⁻ 細胞は Sorting buffer で再懸濁し、ソーティングまで氷上で維持した。

ヒト化NOJマウスの全血は、イソフルラン吸入麻酔液 (Pfizer Inc, Pearl River, NY, USA) による全身麻酔下で、血液抗凝固剤のヘパリンナトリウム注射液 (エイワイファーマ, 東京) 100 μ l をあらかじめ入れた 26 ゲージのシリンジを用いて心臓採血により採取した。ヒト化 NOJ マウスの全血およびヒト末梢血は、臍帯血の処理と同様の方法で末梢血単核球を分離した。ヒト化 NOJ マウス由来の末梢血単核球は DC-staining buffer で洗浄し、同 Buffer で再懸濁後、解析まで氷上で維持した。ヒト由来の末梢血単核球については、EasySep Human Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (StemCell Technologies) を使用し、末梢血単核球からナイーブ CD4⁺ T 細胞を分離した。分離したナイーブ CD4⁺ T 細胞は、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMEM) -10 培地 (IMEM (ThermoFisher Scientific), 10% KnockOut Serum Replacement (ThermoFisher Scientific), 1% GlutaMAX solution, 100 μ g/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) に再懸濁し、混合リンパ球反応実験まで 37°C、5% CO₂ の条件下で維持した。

CD133⁺ 臍帯血単核球については、EasySep Human T cell Enrichment Kit を使用し、臍帯血単核球から T 細胞を分離した。さらに、分離した臍帯血由来 T 細胞から、EasySep Human CD4⁺ T cell Isolation Kit (StemCell Technologies) を使用し、臍帯血由来 CD4⁺ T 細胞を分離した。分離した臍帯血由来 CD4⁺ T 細胞は、R-10 培地に再懸濁し、staphylococcal enterotoxin B (SEB) 存在下共培養実験まで 37°C、5% CO₂ の条件下で維持した。

3.2.5 フローサイトメトリー解析・FACS

本章で使用した蛍光標識モノクローナル抗体は Table 3.1 に示した通りである。なお使用したすべてのモノクローナル抗体はヒト抗原特異的な抗体である。また、抗体の非特異的な結合を防ぐためのブロッキングには、抗マウス Fc γ II/III 抗体 (2.4G2) (Onodera et al., 2016)、および抗ヒト CD16 抗体 (3G8) に競合しない抗ヒト Fc 受容体抗体混合物 (Human TruStain FcX, BioLegend) を使用した。死細胞の標識には、LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (Aqua, Violet および Near-IR) を使用し、解析時に除外した。

フローサイトメトリー解析では、初めに 1 サンプル当たり最大 1×10^6 細胞をブロッキング抗体が含まれた DC-staining buffer 100 μ l で懸濁し、20 分間氷上でブロッキングを行った。次に、DC-staining buffer でサンプルを 1 回洗浄した後に、DC-staining buffer

Table 3.1 第 3.2.5 項で使用したモノクローナル抗体一覧

Name	Clone	Fluorochrome	Source
CD1c	L161	Alexa Flour 700	BioLegend
CD3	UCHT1	APC-Cy7, Brilliant Violet 605, PerCP	BD Biosciences, BioLegend
CD4	OKT4	Brilliant Violet 605	BioLegend
CD5	UCHT2	PE	BioLegend
CD8a	RPA-T8	Alexa Flour 647, 700	BioLegend
CD14	RMO52	FITC	Beckman Coulter
CD16	3G8	PerCP	BioLegend
CD19	HIB19	Brilliant Violet 605, PE	BioLegend
CD33	P67.6	APC-Cy7	BioLegend
CD45	HI30	Pacific Blue	BioLegend
CD56	5.1H11	Brilliant Violet 605	BioLegend
CD80	2D10	PE	BioLegend
CD123	6H6	PE-Cy7	BioLegend
CD141	M80	Brilliant Violet 785	BioLegend
CD163	GHI/61	PE	BioLegend
CD301/CLEC10A	H037G3	PE	BioLegend
CD370/CLEC9A	8F9	APC	BioLegend
IFN- γ	4S.B3	Brilliant Violet 785	BioLegend
IL-2	MQ1-17H12	PerCP-Cy5.5	BioLegend
IL-4	8D4-8	PE-Cy7	ThermoFisher Scientific
IL-6	MQ2-13A5	PE	BioLegend
IL-17A	eBio64DEC17	APC	ThermoFisher Scientific
HLA-DR	L243	Alexa Flour 488, PE	BioLegend
S100A8	REA917	PE	Miltenyi Biotec
S100A9	MRP 1H9	PE	BioLegend
TNF- α	MAb11	PE	ThermoFisher Scientific
Isotype control			
Mouse IgG1 kappa	MOPC-21	APC, Brilliant Violet 785, PerCP, PE, PE-Cy7	BioLegend
Mouse IgG2a kappa	MOPC-173	APC, PE	BioLegend
Mouse IgG2b kappa	MPC-11	APC	BioLegend
Rat IgG1 kappa	RTK2071	PE	BioLegend

に蛍光標識抗体と LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit を添加した 100 μ l の染色用混合液でサンプルを再懸濁し、30 分間氷上で染色した。その後 DC-staining buffer で洗浄し、フローサイトメトリー解析に供した。細胞内のタンパク質の染色では、上記の表面染色を行った後に、eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience/ThermoFisher Scientific) を用いて細胞の固定・透過処理を施し、細胞内タンパク質の染色を行った。

ソーティングでは、前述の染色用混合液に用いるバッファーを Sorting buffer に変更し、 1×10^6 細胞あたり 100 μ l の染色用混合液で細胞再懸濁し、30 分間氷上で染色した。その後細胞を Sorting buffer で洗浄し、 5×10^6 細胞あたり 1 ml の同 Buffer で再懸濁した後に、ソーティングに供した。データは FACS Aria III を用いて取得し、データ解析は FlowJo software v10.7.1 (BD Biosciences) を用いた。

3.2.6 *in vitro* における cDC2 の活性化

IVT 後 7 日目のヒト化 NOJ マウスの脾臓から $0.5-1.0 \times 10^5$ 細胞の cDC2 (CD14⁻CD1c⁺ 細胞) をセルソーターによって単離し、100 ng/ml の LPS (O55:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) を含有する R-10 培地で 16 時間、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。培養後細胞を回収し、再度細胞の表面染色を行った後、フローサイトメトリー解析を行った。

3.2.7 ヒト樹状細胞亜集団と他家ナイーブ CD4⁺ T 細胞の混合リンパ球反応の検討

ヒト末梢血単核球から調製した他家のナイーブ CD4⁺ T 細胞を 5 μ M の CellTrace Violet (CTV; ThermoFisher Scientific) で標識した。CTV 標識後、CD4⁺ T 細胞を IMEM-10 培地で 2 回洗浄した。

次にヒト化 NOJ マウスの樹状細胞亜集団および単球を、1 well あたり 180 μ l の IMEM-10 培地を加えた U 底 96-well プレートに 2000-2500 細胞ずつセルソーターを用いて分注した。さらに、CD4⁺ T 細胞 : 分注細胞 = 20:1 の比率になるよう 40000-50000 細胞の CTV 標識他家ナイーブ CD4⁺ T 細胞を加え、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。培養開始から 5 日目に、50 ng/ml の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) および 1 μ g/ml のイオノマイシン (Sigma-Aldrich) で CD4⁺ T 細胞を再刺激した。再刺激開始から 1 時間後に、5 μ g/ml の brefeldin A (BFA; Sigma-Aldrich) で細胞内タンパク質輸送を阻害した。BFA による阻害開始から 5 時間後に、各 well の共培養サンプルを回収し、細胞内タンパク質の染色後、フローサイトメトリー解析を行った。

3.2.8 SEB 存在下におけるヒト樹状細胞亜集団と自家 CD4⁺ T 細胞の共培養実験

ヒト化 NOJ マウスの樹状細胞亜集団および単球を、1 well あたり 180 μ l の R-10 培地を加えた U 底 96-well プレートに 500 細胞ずつセルソーターを用いて分注した。さらに、T 細胞 : 分注細胞 = 100 : 1 の比率になるよう 5×10^4 細胞の臍帯血単核球由来自家 CD4⁺ T 細胞を加え共培養を行った。その際、SEB を終濃度 1 μ g/ml で添加・混合した。SEB 添加から 1 時間後、5 μ g/ml の BFA で細胞内タンパク質輸送を阻害した。BFA による阻害開始から 5 時間後に、各 well の共培養サンプルを回収し、細胞内タンパク質の染色後、フローサイトメトリー解析を行った。

3.2.9 Bulk RNA-Seq

RNA-Seq による遺伝子発現解析では、セルソーターによって単離したヒト化 NOJ マウスの樹状細胞亜集団および単球を用いた。各細胞を最大 540 細胞ずつ 0.2 ml マイクロチューブに入れた 2.7 μ l の低張性溶解バッファー (0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 2 U/ μ l RNase inhibitor (ThermoFisher Scientific)) に溶解し、ドライアイスで急速冷凍後 cDNA ライブラリーの作製まで -80°C で保存した。cDNA ライブラリーの作製は SMART-Seq2 プロトコル (Picelli et al., 2014) に従い、冷凍細胞溶解液を 3 分間 72°C でインキュベーションした後、テンプレートスイッチングオリゴおよび SuperScript II reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) を含む反応液を加え cDNA 合成を行った。cDNA は KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて 18 サイクルの PCR 反応により増幅した。増幅した cDNA は 0.8 倍容量の Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) を用いて精製し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) および Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) による cDNA のクオリティチェックを行った。そして増幅した cDNA の量が 1 ng 以上のサンプルについて、Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてシーケンシングライブラリー調製を行った。シーケンシングライブラリーは Illumina Miseq (Illumina) を用いて 75 bp のペアエンドリードの配列情報を取得した。なお、シーケンスを行った各細胞サンプルは、造血幹細胞ドナーの異なるヒト化マウス 3 群から単離した細胞を用いてバイオロジカルレプリケートを 3 とした。ただし、単球サンプルのみ、1 サンプルで cDNA のクオリティチェック時に cDNA の増幅が不十分であったため、シーケンスサンプルから除外し、バイオロジカルレプリケートは 2 となった。

3.2.10 RNA-Seq データの前処理および解析

得られたシーケンスデータは、Flexbar v.3.4.0 (Roehr et al., 2017) を用いて低クオリティのリードやアダプター配列を除去した。このフィルタリングをされたシーケンスリードは HISAT v2.1.0 (Kim et al., 2019) を用いて human reference genome GRCh38.p13 (GENCODE release 32) のレファレンスゲノムにマッピングし、遺伝子に割り当てられたリード数は featureCounts v1.6.4 (Liao et al., 2014) で計測した。

任意のサンプルのペア間の遺伝子発現の差異は、多重仮説検定のための p 値のデフォルト FDR 調整を使用して、R パッケージ DESeq2 v1.28.1 (Love et al., 2014) を使用して評価した。クラスタリング分析には、まずカウント生値を分散安定化変換 (variance-stabilizing transformation: VST) (Anders & Huber, 2010) により変換した値を用いた。次に、R パッケージ biomaRt v2.28.0 (Durinck et al., 2009) で Gene Ontology の Biological Process に含まれる「immune system process」 (GO: 0002376) にアノテーションされた遺伝子に対応した 488 遺伝子について、樹状細胞亜集団と単球の間の発現に基づき、ユークリッド距離と完全連結法を用いて階層的クラスタリングを行い、Z スコア変換後に R パッケージ pheatmap v1.0.12 (Kolde, 2015) を用いてヒートマップを作製した。ヒト化マウスの 2 つの樹状細胞亜集団間の発現変動遺伝子を表示するボルケーノプロットは、閾値を $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1.5$ 、adjusted p-value < 0.01 に設定し、R パッケージ EnhancedVolcano v1.6.0 (Blighe et al., 2019) を使用して生成した。

主成分分析には、本研究で取得した RNA-Seq の遺伝子発現データと、SRA (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) に寄託された bulk RNA-Seq のシーケンスデータを使用した。SRA に寄託されたシーケンスデータは、parallel-fastq-dump v0.6.6 (<https://github.com/rvalieris/parallel-fastq-dump>) を用いて、ヒト CD5⁺ cDC2 (SRA: SRR10056374, SRR10056375, SRR10056376, SRR10056377)、ヒト DC3 (SRA: SRR11832588, SRR11832589, SRR11832590, SRR11832591)、ヒト古典的単球 (classical monocyte: cMo; SRA: SRR6298336, SRR6298307, SRR6298370, SRR6298278)、ヒト中間単球 (intermediate monocyte: iMo; SRA: SRR6298307, SRR6298308, SRR6298371, SRR6298279)、ヒト非古典的単球 (non-classical monocyte: ncMo; SRA: SRR6298338, SRR6298309, SRR6298372, SRR6298280)、ヒトランゲルハンス細胞 (LC; SRA: SRR7896371, SRR7896374, SRR7896377)、ヒト monocyte-derived macrophage (MDM; SRA: SRR8787287, SRR8787291, SRR8787295)、およびヒト MoDC (SRA: SRR6815986, SRR6816010, SRR6815991) をダウンロードし、本研究で取得したシーケンスデータと同様に前処理を行った。そしてこ

これらのサンプルおよび本研究のヒト化マウス由来のサンプルの間で最も変動が大きい 500 遺伝子を用いて主成分分析を行った。

ヒト化マウスの 2 つの樹状細胞亜集団における、樹状細胞特異的な遺伝子群の発現を評価するため Gene set enrichment analysis (GSEA; <https://www.broad.mit.edu/gsea>) (Subramanian et al., 2005) による解析を行った。本解析では、正規化濃縮スコア (normalized enrichment score: NES) の絶対値が 1.00 以上、FDR (q) < 0.25 を有意な遺伝子群の濃縮とみなした。本解析では Table 3.2 に示す Villani らが報告したヒト末梢血 cDC2 および DC3 で特異的と定義された遺伝子群を用いた (Villani et al., 2017)。

Table 3.2 GSEA に使用した DC3 遺伝子群および cDC2 遺伝子群のリスト

cDC2>ALL	DC3>ALL	cDC2>DC3	DC3>DC2	cDC2>ALL	DC3>ALL	cDC2>DC3	DC3>DC2
CD1C	S100A9	HLA-DPB1	BACH1		NFE2	TOP1MT	SULT1A1
FCER1A	S100A8	HLA-DQB1	CA5BP1		ASGR1		TOM1
CLEC10A	VCAN	HLA-DQA1	TSC2		BST1		KCNE3
ADAM8	LYZ	HLA-DQA2	SHOC2		IL1RN		PYGL
CD1D	ANXA1	CD1C	HPCAL1		NOD2		SLC11A1
FCGR2B	PLBD1	HLA-DOB	PVR		NLRP3		HK3
CLEC4A	RNASE2	P2RY14	RIPK2		LMNA		ACSL1
SLC2A3	FCER1A	ARL4C	STIM1		CARD19		IER3
CD33	SLC2A3	CLIC2	ID1		IL27RA		CFD
ETS2	CD163	CLEC17A	IKBKE		NLRP12		LMNA
CLIC2	CSF3R	C10ORF128	KCNN4		RAB27A		MSRB1
PEA15	MNDA	CALHM6	EMP1		EREG		TREM1
CACNA2D3	CD14	ASAP1	PLPPR2				PILRA
CD1E	NAIP	SLC41A2	GPBAR1				ASGR1
MBOAT7	CSTA	SLAMF7	MKNK1				TXNRD1
C10ORF128	FCN1	CST7	KIAA0513				GLUL
NR4A2	CD1D	PKIB	FOXO3				PSTPIP1
GPAT3	FPR1	HSPA7	EMC3				CSF3R
ENTPD1	F13A1	CXCL16	YWHAG				STAB1
CD2	CLEC10A	RUNX3	TAB1				RETN
PER1	CES1	WDFY4	OSM				SERPINA1
PID1	PID1	IL18R1	GABARAPL1				SLC7A7
AREG	S100A12	FCGR2B	ASPH				CTSD
PTGS1	MTMR11	MYO1E	PDLIM7				NEAT1
SMN1	SMN1	AXL	QPCT				CES1P1
CLEC17A	LAT2	PEA15	RIN2				FPR1
ITGA5	RETN	SIGLEC10	MRPS23				CD163
CREB5	TMEM173	CD1E	PLXND1				S100A12
PTAFR	AOAH	GOLGA8B	CLEC12A				CYBB
NOD2	RAB3D	IFITM1	TMEM176A				F13A1
CCR6	CD36	ITGB2-AS1	PISD				CES1
	MGST1	FEZ1	PLA2G7				BST1
	TREM1	INSIG1	TMEM141				MTMR11
	HNMT	SPATS2L	NINJ1				CD36
	CES1P1	GRIP1	AGTRAP				MGST1
	ADAM15	MCOLN2	BLVRA				RAB3D
	IL13RA1	SERTAD3	HBEGF				PLBD1
	MICAL2	PPP1R14A	DMXL2				TMEM176B
	ITGA5	UVRAG	CARD19				CD14
	CREB5	SIGLEC6	IL1B				FCN1
	IL1B	KPNA6	NLRP12				RNASE2
	NR4A2	LGMN	SORL1				VCAN
	MPP7	SPIB	NFE2				S100A8
	PTAFR	SNRPN	ADAM15				S100A9
	HBEGF	WFDC21P	CCDC69				

3.2.11 *in vivo* ICS assay を用いたヒト化 NOJ マウスにおける炎症応答の検出

IVT 後 7 日目に 2 μg の LPS (O55:B5, Sigma-Aldrich) を混合した 200 μl の PBS を腹腔内投与した。LPS 投与から 1 時間後、生体内の細胞内サイトカイン合成を測定する *in vivo* ICS assay (Liu & Whitton, 2005) を行うため、250 μg の BFA を混合した 500 μl の PBS を静脈内投与した。BFA 投与から 5 時間後、ヒト化 NOJ マウスから脾臓を採取し、直ちに分散処理・細胞内染色を行い、フローサイトメトリーによる細胞内の炎症性サイトカインの検出を行った。

3.2.12 統計解析

データの正規性ならびに分散に基づき、2 群間の有意差検定では unpaired *t*-test、ratio-paired *t*-test、もしくは Mann-Whitney *U* test を用いた。3 群間の有意差検定では one-way ANOVA、repeated-measures one-way ANOVA もしくは two-way ANOVA を使用し、その後多重比較検定として Holm-Sidak's multiple comparison test を行った。すべての解析において Prism software v6 を使用し、*P*-value < 0.05 を統計学的有意とした。

3.3 結果・考察

3.3.1 CD14 の発現に基づく樹状細胞亜集団の再分類

第 2 章で作製したヒト FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスモデルでは、CD14⁺ 細胞が CD141⁺ 細胞集団と CD1c⁺ 細胞集団の両方で認められた。一方で、近年の DC3 の研究では、CD141⁺ 細胞集団において CD14⁺ 細胞は報告されていない (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。この相違から、第 2 章の実験で検出した CD14⁺ 細胞には CD14 偽陽性細胞が含まれていた可能性が危惧された。そこで、他のマーカー分子を標識した蛍光の漏れこみによる CD14 偽陽性細胞の出現を減らすため、本章の実験では、抗 CD14 モノクローナル抗体と共役する蛍光標識を ECD から FITC に変更してフローサイトメトリー解析を行った。

初めに、骨髄系細胞集団を CD45⁺CD3⁻CD19⁻CD56⁻CD33⁺ 細胞として分画し、さらに CD141⁺ 細胞集団 (cDC1 様細胞)、CD1c⁺ 細胞集団 (cDC2 様細胞)、および CD1c⁻CD141⁻ (double negative; DN) 細胞集団の 3 つの細胞集団に分画した (Fig. 3.1A)。これら 3 つの細胞集団を、さらに CD14 陰性細胞と陽性細胞に細分化した (Fig. 3.1B)。なお CD14 に対するゲーティングは、FITC-CD14 抗体のアイソタイプコントロール染色に基づいて設定した (Fig. 3.1C)。その結果、過去の DC3 の研究と同様に、cDC1 様細胞では CD14 の発現が認められず、すべて cDC1 であることが示唆された。対照的に、cDC2 様細胞では、CD14 を発現する細胞が認められた。ただし、この CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、実験に用いたすべてのヒト化マウスで検出されたが、その数は CD14 陰性の cDC2 と比較して、約 150 倍も少なかった (Fig. 3.2A)。なお、DN 細胞集団では、典型的な単球の表現型を示す CD14^{high} 細胞が認められた。CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、他の細胞集団よりも数が少ないものの (Fig. 3.2B)、サイトカイン非発現のヒト化マウスと比較すると、FLT3L と GM-CSF の発現により分化が向上する細胞であることが認められた (Fig. 3.2C)。以上のことから、FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスでは、cDC1 と cDC2 に加え、cDC2 の特徴 (CD1c の発現) を有しつつも CD14 を発現する細胞 (CD14⁺CD1c⁺ 細胞) の分化が確認された。

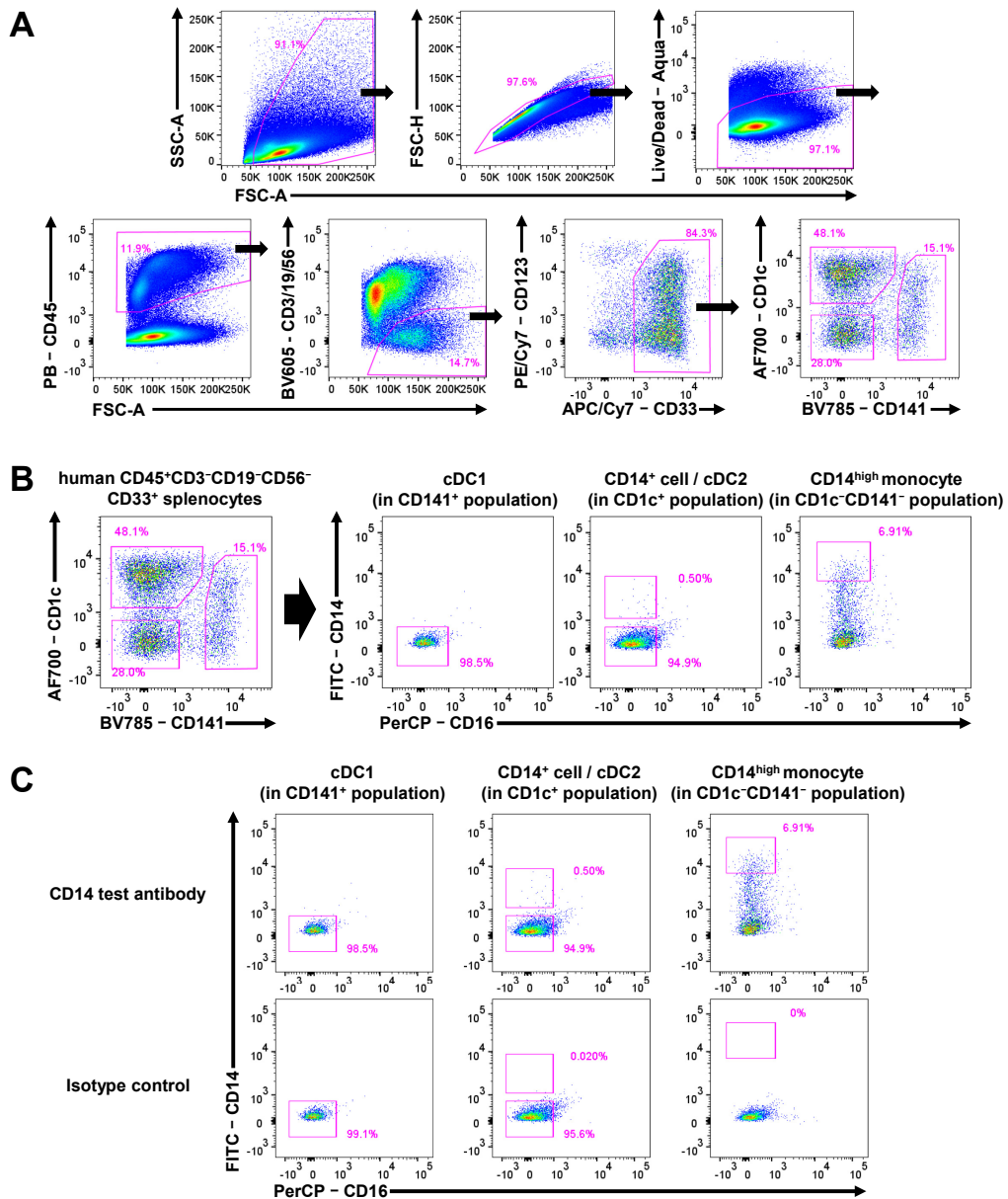


Fig. 3.1 ヒト NOJ マウスにおけるヒト樹状細胞亜集団の分類

解析に用いた細胞は IVT 後 7 日目の脾臓から調製した。

- (A) フローサイトメトリー解析における $CD141^+$ 細胞集団、 $CD1c^+$ 細胞集団、 $CD1c^-CD141^-$ 細胞集団の分画の代表例
- (B) フローサイトメトリー解析における cDC1、cDC2、 $CD14^+CD1c^+$ 細胞、 $CD14^{high}$ 単球の分画の代表例
- (C) フローサイトメトリー解析における抗 CD14 モノクローナル抗体染色による cDC1、cDC2、 $CD14^+CD1c^+$ 細胞および $CD14^{high}$ 単球の分画 (上側)、および同一サンプルにおけるアイソタイプコントロール抗体を用いた染色 (下側) の代表例

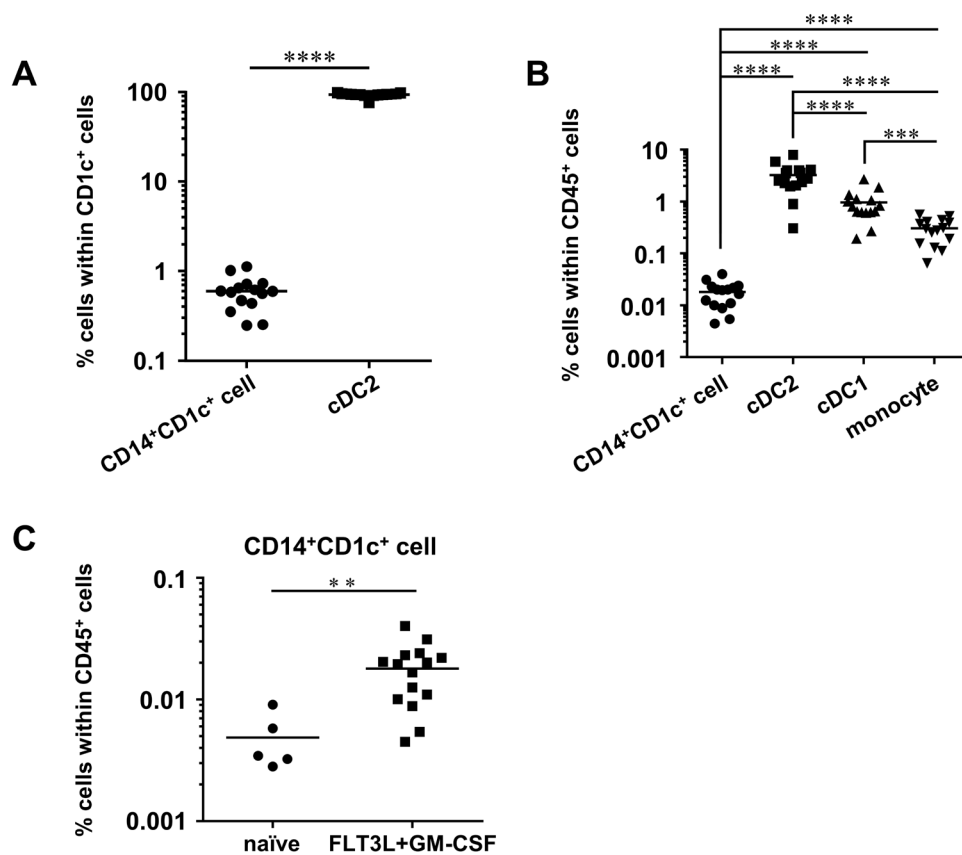


Fig. 3.2 Fig. 3.1 で分画した各亜集団の頻度

解析に用いた細胞はサイトカイン非発現のヒト化マウスもしくは IVT 後 7 日目のヒト化マウスの脾臓から調製した。

(A) CD1c⁺ 細胞集団に占める CD14⁺CD1c⁺ 細胞及び cDC2 の頻度

頻度の比較 (n = 15) は ratio-paired *t*-test を用いて行い、有意差 (*****P* < 0.0001) を決定した。

(B) ヒト白血球に占める CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1 および単球の頻度

頻度の比較はすべての亜集団間 (n = 15) で行った。有意差 (****P* < 0.001、*****P* < 0.0001) は、repeated-measures one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて決定した。

(C) サイトカイン非発現のヒト化マウスおよび FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスにおけるヒト白血球に占める CD14⁺CD1c⁺ 細胞の頻度

頻度の比較 (非発現群 : n = 5、IVT 群 : n = 15) は Mann-Whitney *U* test を用いて行い、有意差 (***P* < 0.01) を決定した。

3.3.2 再分類した亜集団の表現型の解析

次に、Fig. 3.1B で分画した各亜集団について、樹状細胞および単球/マクロファージ関連マーカー (CLEC9A、CLEC10A、HLA-DR、CD163、CD5) の発現をフローサイトメトリー解析した (Table 3.3、Fig. 3.3)。cDC1 および cDC2 特異的なマーカーとして、CLEC9A および CLEC10A がそれぞれ知られている (Heger et al., 2018; Poulin et al., 2012)。ヒト化マウスの cDC1 および cDC2 においても、それぞれ CLEC9A、CLEC10A の発現が認められた (Fig. 3.3A)。興味深いことに、CLEC10A の発現は CD14⁺CD1c⁺ 細胞でも認められた。HLA-DR は抗原提示細胞のマーカーとして知られているが (Poulter, 1983)、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1、単球すべてで HLA-DR の発現が認められ、また CD14⁺CD1c⁺ 細胞の HLA-DR の発現レベルは単球よりも cDC2 に類似した。

CD163 は単球/マクロファージ関連マーカーとして知られているが (Buechler et al., 2000)、DC3 でも発現していることが報告されている (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。そして本実験の結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞および単球で CD163 の発現が認められた。ただし、CD163 を発現する細胞の頻度は、ヒト化マウスに移植した造血幹細胞のドナーによって大きく異なっていた (Fig. 3.3B)。CD5 は cDC2 関連マーカーとして知られている (Yin et al., 2017)。ヒト化 NOJ マウスでは、cDC2 で発現が認められたのに対し、CD14⁺CD1c⁺ 細胞では発現が認められなかった。

以上の解析結果から、ヒト化マウスにおける cDC1、cDC2 および単球は、それぞれヒト末梢血の cDC1、cDC2 および単球と同様の表現型を示した (Table 3.3)。また、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は CD163⁺CD5⁻ の表現型を示したことから、これまでに報告されている DC3 の表現型と類似した (Table 3.3) (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。ただし、DC3 で高く発現するとされている CD163 は、CD14⁺CD1c⁺ 細胞ではヒト化マウス個体間ごとに発現レベルが異なった (Fig. 3.3B)。また個体間での CD163 の発現レベルの変動は単球においても認められた (Fig. 3.3B)。一方、ヒト末梢血由来の単球では、ドナー間で CD163 の発現が大きく異なること、またその発現は生体内のサイトカインや炎症性メディエーターの存在により容易に変動することが報告されている (Tippett et al., 2011)。したがって、CD14⁺CD1c⁺ 細胞の CD163 の発現の変動はヒト化マウス個体ごとの免疫環境の違いが影響していることが示唆された。

興味深いことに、DC3 は FLT3L や GM-CSF の存在下で、分化が促進されることが報告されている (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。本研究のヒト化マウスでも、CD14⁺CD1c⁺ 細胞の分化は FLT3L と GM-CSF の発現により亢進した (Fig. 3.2C)。この

ことは、 $CD14^+CD1c^+$ 細胞が DC3 と同一あるいは類似した細胞である可能性を支持する。ただし、ヒト化マウスの $CD14^+CD1c^+$ 細胞は、ヒト末梢血における DC3 よりも数が少ない細胞集団であった (Fig. 3.2A、B) (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。その要因の 1 つには、フローサイトメトリー解析法の違いが影響していると考えられる (Fig. 3.4)。これまでの DC3 の研究では、本研究と同様に $CD14^+$ 細胞を含めた上で樹状細胞亜集団の分画を行っている。しかし、最終的な DC3 の分画は、 $CD14$ 以外のマーカーの組み合わせ ($CD5$ および $CD163$ (Dutertre et al., 2019) または $BTLA$ および $CD163$ (Bourdely et al., 2020)) により行われていた。また、これらの研究における $CD14$ の扱いは、分画した DC3 の表現型を確認するための、補助的なマーカーとして用いられていた。また、この分画法の手順の違いだけでなく、ヒト化マウスとヒトの生物種の差も $CD14^+CD1c^+$ 細胞と DC3 の存在量の違いに影響していると考えられる。すなわち、本研究のヒト化マウスでは、 $FLT3L$ と $GM-CSF$ 以外のヒトサイトカインがないことを考慮しなければならない。しかし、たとえ $CD14^+CD1c^+$ 細胞が少ない細胞集団であっても、DC3 に類似した細胞集団がヒト化マウスで分化することを示唆されたことは非常に意義がある。

Table 3.3 ヒト樹状細胞亜集団および単球における各マーカーの発現プロファイル

Marker	cDC1	cDC2	DC3	Monocyte
CLEC9A	+	-	-	-
CLEC10A	-	+	+	-
HLA-DR	high	high	high	low
CD163	-	-	+	+
CD5	-	high-low	-	-

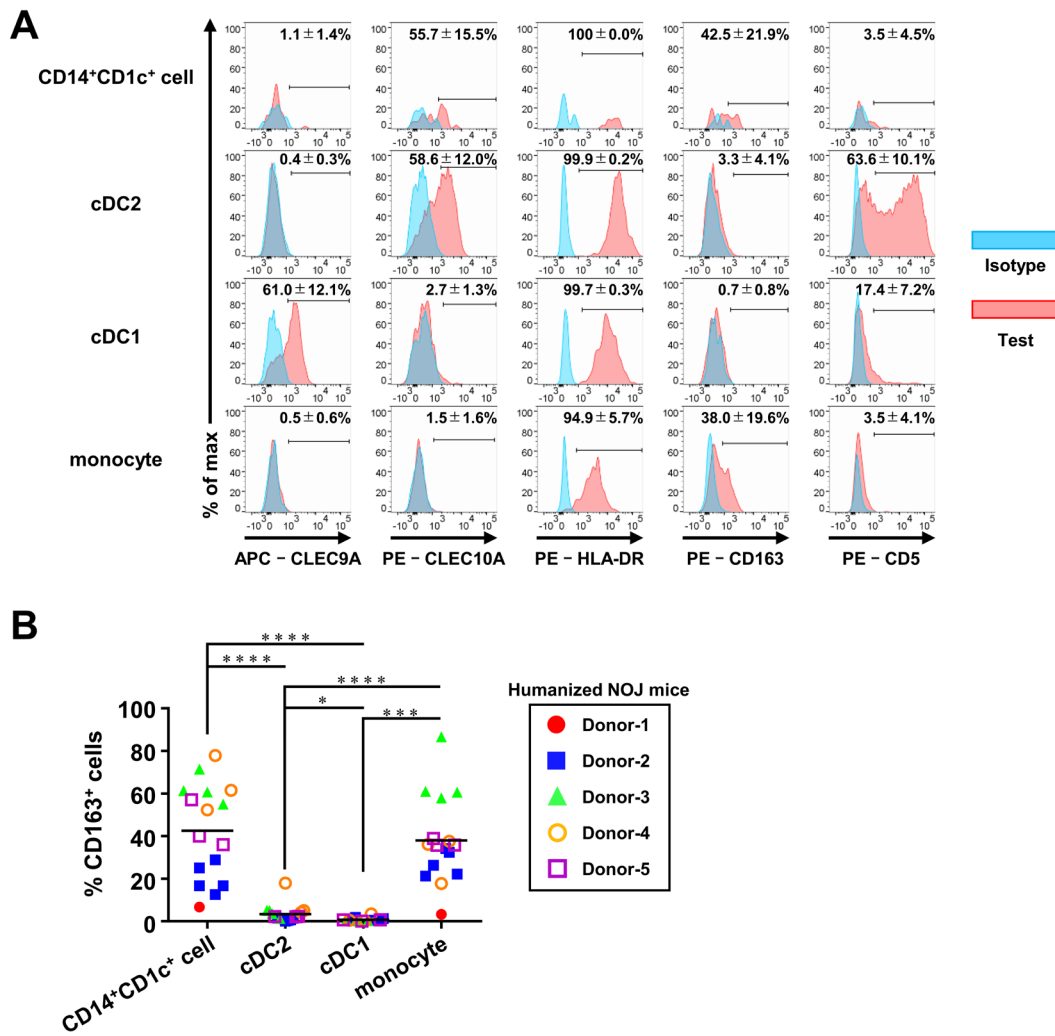


Fig. 3.3 Fig. 3.1 で分画した各亜集団の表現型の解析

解析に用いた細胞は IVT 後 7 日目のヒト化 NOJ マウスの脾臓から調製した。

(A) CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1 および単球における樹状細胞および単球/マクロファージ関連マーカーの発現を示す代表的なヒストグラム

各ヒストグラム右上のパーセンテージは、各亜集団におけるマーカー陽性細胞の頻度の平均値 ± 標準偏差を示す (CLEC9A: n = 8, CLEC10A: n = 4, HLA-DR: n = 4, CD163: n = 16, CD5: n = 5)。

(B) Fig. 3.3A に関連する個々のヒト化マウスにおける各亜集団の CD163 陽性細胞の頻度

同じシンボルは同一の造血幹細胞ドナー由来のヒト化マウス由来のサンプルを示す。頻度の比較はすべての亜集団間 (n = 15) で行った。有意差 (*P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001) は、repeated-measures one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて決定した。

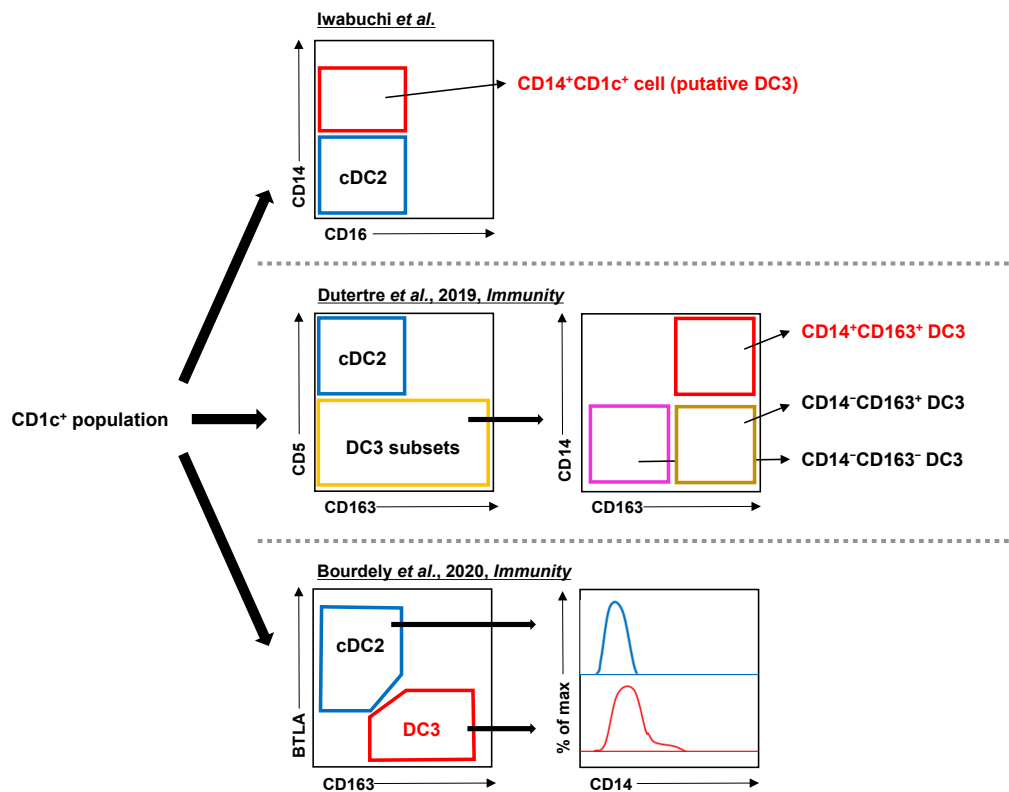


Fig. 3.4 本研究および他研究における CD14⁺CD1c⁺ 細胞および DC3 の分画法の手順

フローサイトメトリー解析において、本研究 (Iwabuchi et al)では、CD1c⁺ 細胞集団における CD14⁺ 細胞を CD14⁺CD1c⁺ 細胞として分画した。Dutertre らは、CD1c⁺ 細胞集団における CD5⁻ 細胞を DC3 亜集団として分画し、さらに CD14 と CD163 の発現に基づき、CD14⁺CD163⁺ 細胞を真正の DC3 とした。一方 Bourdely らは、CD1c⁺ 細胞集団における BTLA⁻CD163⁺ 細胞を DC3 として分画し、DC3 分画で CD14 の発現が高いことを確認した。

3.3.3 cDC2 における CD14 可塑性の検討

第 3.3.2 項の結果から、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞は cDC2 と表現型の異なる細胞であることが明らかとなった。しかし本研究での CD14⁺CD1c⁺ 細胞と cDC2 の分画は、あくまで CD1c⁺ 細胞集団において CD14 の発現の違いのみに基づいて行っている (Fig. 3.1B)。CD14 の発現に関するこれまでの研究で、樹状細胞を含む骨髄系細胞は、活性化状態により CD14 の発現に可塑性があることが報告されている (Krakow et al., 2019)。そのため、CD14⁺CD1c⁺ 細胞には、活性化により一時的に CD14 を発現した cDC2 が混入している可能性も考えられた。そこで、cDC2 の活性化状態と CD14 発現の可塑性について検討した。

まず、ヒト化マウス脾臓から単離した cDC2 を TLR リガンドの 1 種である LPS の存在下で 16 時間培養し活性化刺激を与えた。その後、フローサイトメトリー解析により、活性化状態の指標として CD80 の発現強度の評価を行った (Fig. 3.5A)。その結果、LPS 無刺激条件と比較して、LPS 刺激条件では CD80 の発現レベルが約 3 倍の上昇が認められ、cDC2 の活性化が確認された (Fig. 3.5B)。そこで、この LPS 刺激を与えた cDC2 における CD14 の発現を評価したところ、ドナーの異なるヒト化マウス 3 群すべてで、CD14 を発現する細胞は 0.05%未満しか認められなかった (Fig. 3.5C)。

以上の結果から、CD14 の発現レベルは、単なる cDC2 の活性化状態により変動するものではないと考えられた。また DC3 の研究においても、DC3 は cDC2 と単球のいずれからも分化は認められず、cDC2 と単球とも異なる前駆細胞から独立して分化することが報告されている (Bourdely et al., 2020)。したがって、ヒト化マウスにおける CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、cDC2 とは異なる細胞亜集団であると仮定してさらなる解析を進めた。

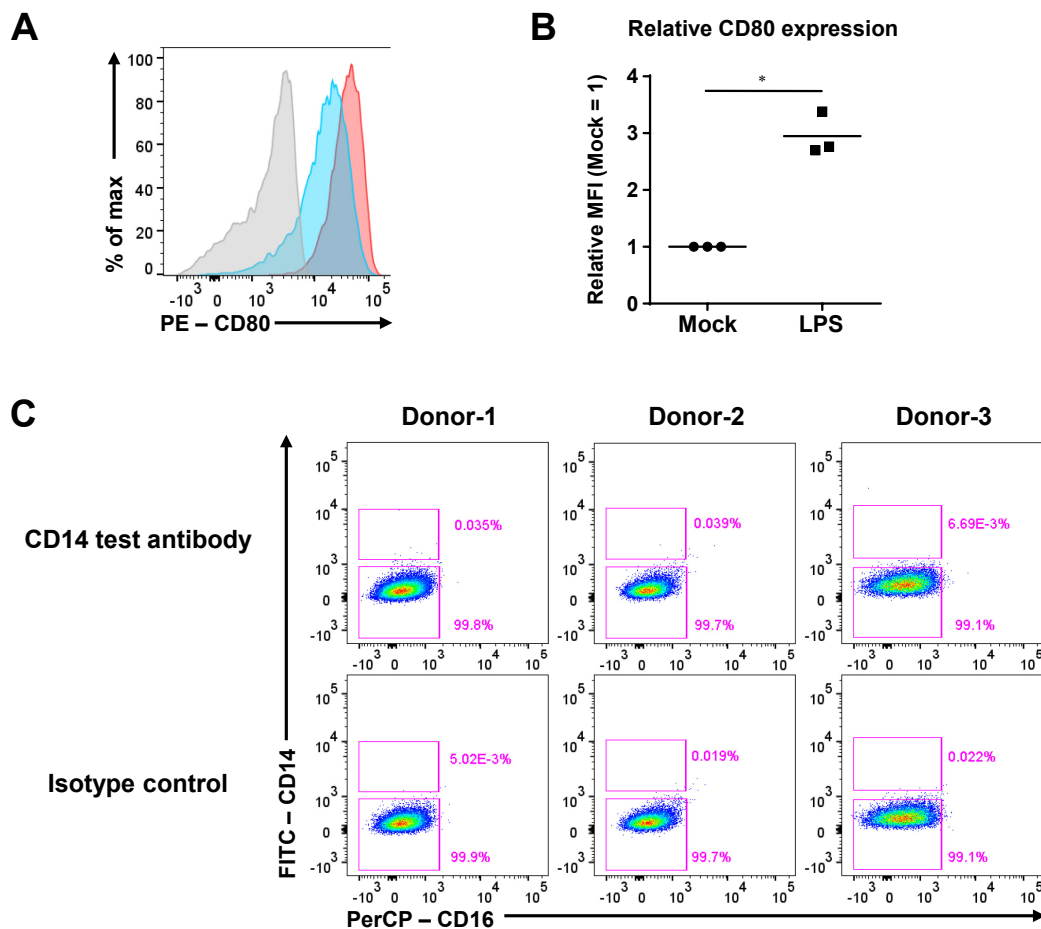


Fig. 3.5 LPS 刺激による cDC2 の表現型の変化の検討

IVT 後 7 日目のヒト化マウスの脾臓から単離した cDC2 を LPS の存在下で培養し、培養 16 時間後の細胞を解析に用いた。

(A) cDC2 における CD80 の発現を示す代表的なヒストグラム

グレー：アイソタイプコントロール、青：LPS 無刺激、赤：LPS 刺激

(B) cDC2 における LPS 無刺激および刺激条件間の CD80 の相対的な発現強度の比較
発現強度の比較 (n = 3) は ratio-paired *t*-test を用いて行い、有意差 (**P* < 0.05) を決定した。

(C) LPS 刺激後の cDC2 における CD14 の発現

抗 CD14 モノクローナル抗体を用いた染色 (上段) およびアイソタイプコントロール抗体を用いた染色 (下段) を行った異なる造血幹細胞ドナー由来のヒト化マウス 3 グループの cDC2 のフローサイトメトリー解析結果。

3.3.4 樹状細胞亜集団の CD4⁺ T 細胞との相互間作用能の評価

次に、ヒト化 NOJ マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞および cDC が CD4⁺ T 細胞と相互作用する機能的な樹状細胞であるか検討した。

まず CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1 および単球が CD4⁺ T 細胞に対する増殖刺激能を有するか検討するため、各亜集団を他家ヒト末梢血由来 CD4⁺ T 細胞と共培養し、混合リンパ球反応を評価した。ドナーの異なるヒト化マウス 3 群について、脾臓から単離した各亜集団と、CTV で標識したナイーブ CD4⁺ T 細胞を 5 日間共培養した。共培養後 5 日目に CD4⁺ T 細胞における CTV の蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した (Fig. 3.6A)。その結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および cDC1 と共培養した CD4⁺ T 細胞では、単球との共培養条件と比較して明確な CTV の蛍光強度の減衰、すなわち CD4⁺ T 細胞の増殖が認められた (Fig. 3.6B)。いずれの共培養条件も、CD4⁺ T 細胞単独培養と比較して統計的に有意な増殖は認められなかったが、CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および cDC1 の共培養条件では、すべてのドナーグループにおいて CD4⁺ T 細胞の増殖を誘導し、最も低いサンプルでも 6 倍以上の増殖を示した (Fig. 3.6C)。

樹状細胞は、ナイーブ CD4⁺ T 細胞の増殖を誘導するだけでなく、機能的なヘルパー T 細胞 (Th 細胞) への分極化を誘導する。そこで、本実験においてもナイーブ CD4⁺ T 細胞の増殖を誘導した CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および cDC1 がどのような分極化を誘導するか検討した。これらの亜集団と 5 日間共培養したナイーブ CD4⁺ T 細胞に対して、PMA およびイオノマイシンによる再刺激を行った。その後、Th 細胞サブタイプ特異的サイトカインの IFN- γ (Th1) および IL-4 (Th2) の細胞内染色を行い、これらのサイトカインの発現に基づいて分極化した CD4⁺ T 細胞の分類を行った (Fig. 3.7A)。その結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、最も多く IFN- γ ⁺CD4⁺ T 細胞を誘導し、cDC2 と比較して有意な Th1 細胞への分極化を誘導した (Fig. 3.7B)。一方、Th2 細胞 (IL-4⁺CD4⁺ T 細胞) への分極化は各亜集団で認められたが、亜集団間で有意な差は認められなかった (Fig. 3.7B)。なお、Th17 細胞特異的な IL-17A の発現も評価したが、IL-17A⁺CD4⁺ T 細胞は Th1 細胞および Th2 細胞と比較して非常に少なく、各亜集団間で有意な差も認められなかった (Fig. 3.8A、B)。

DC3 に関して、2つの研究グループから DC3 は cDC2 と同様にナイーブ CD4⁺ T 細胞を刺激し、増殖を誘導するという共通の見解が示されている (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019)。しかし Th 細胞への分極化については、異なる報告がされている。すなわち、Bourdely らはナイーブ CD4⁺ T 細胞が Th1 細胞に分極されることを示したの

に対し (Bourdely et al., 2020)、Dutertre らは、Th17 細胞に有意に分極されるが、Th1 細胞への有意な分極は起きないことを示した (Dutertre et al., 2019)。この違いは、実験に使用した DC3 の状態の違いによるものと考えられる。Bourdely らは単離後に複数の TLR リガンドで活性化した DC3 を実験に使用した (Bourdely et al., 2020)。一方で、Dutertre らは単離後に刺激のない DC3 を使用した (Dutertre et al., 2019)。本研究では、第 2 章においてヒト化マウスにおける FLT3L と GM-CSF の発現が樹状細胞亜集団の活性化/成熟化を向上することを示している (Fig. 2.10B)。したがって、CD14⁺CD1c⁺ 細胞が Th1 細胞を誘導する一方、Th17 細胞を誘導しない点は (Fig. 3.7B、Fig. 3.8B)、Bourdely らの DC3 と同様の性質を示したためと考えられる。またこれらの結果は、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞が機能的な樹状細胞であり、cDC2 とは異なる機能を有することを示唆している。

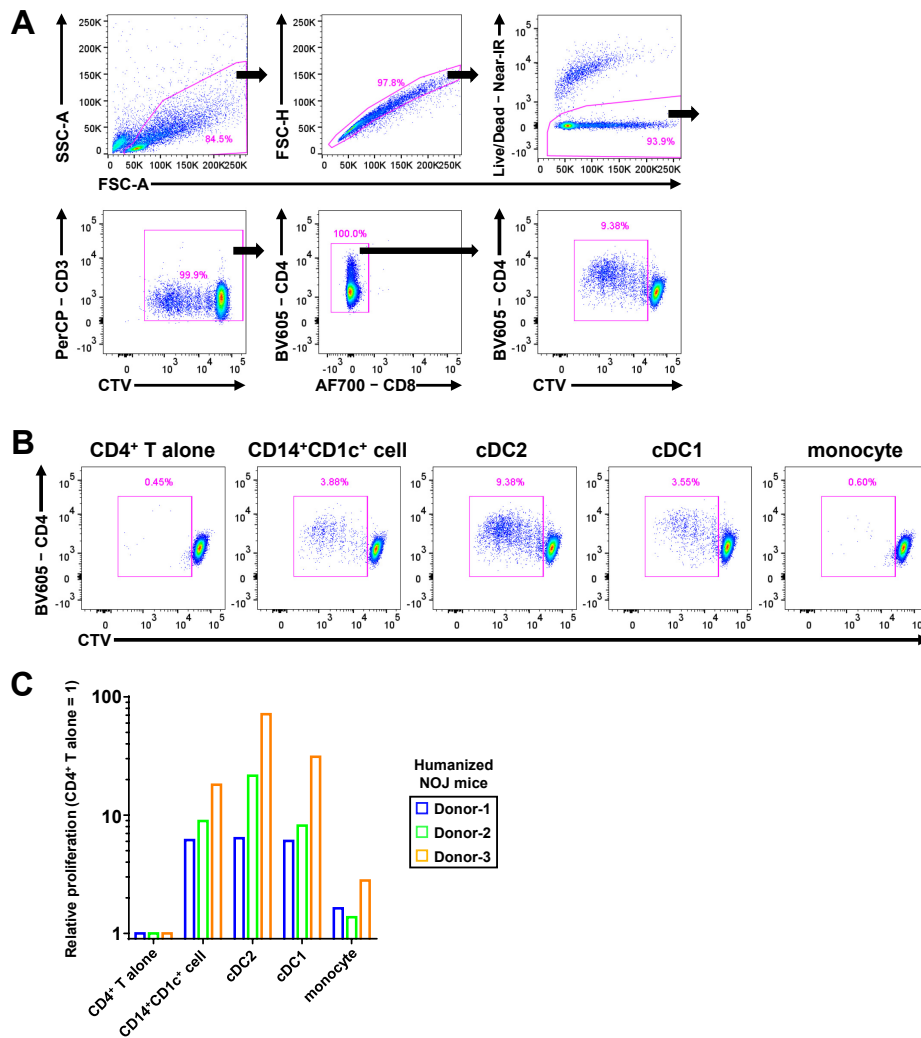


Fig. 3.6 ヒト化マウスの各樹状細胞亜集団の T 細胞増殖刺激能の検討

IVT 後 7 日目のヒト化マウスの脾臓から CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1 および単球を単離し、CTV で標識した他家ヒト末梢血由来ナイーブ CD4⁺ T 細胞と 5 日間共培養を行った。共培養 5 日目に、CD4⁺ T 細胞の CTV の蛍光強度を測定した。

(A) フローサイトメトリー解析における CD4⁺ T 細胞の分画の代表例

(B) フローサイトメトリー解析における各培養条件での CTV 標識された CD4⁺ T 細胞の代表例

(C) 各亜集団と共培養した CD4⁺ T 細胞の中で CTV の蛍光強度が減衰した (CTV^{low}) 細胞の相対値の比較

ヒト化マウスは造血幹細胞ドナーごとに、異なる色で示した (n = 3)。

CD4⁺ T 細胞単独培養を 1 とし、他の培養条件間との比較をするため one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を行ったが、有意な差は認められなかった。

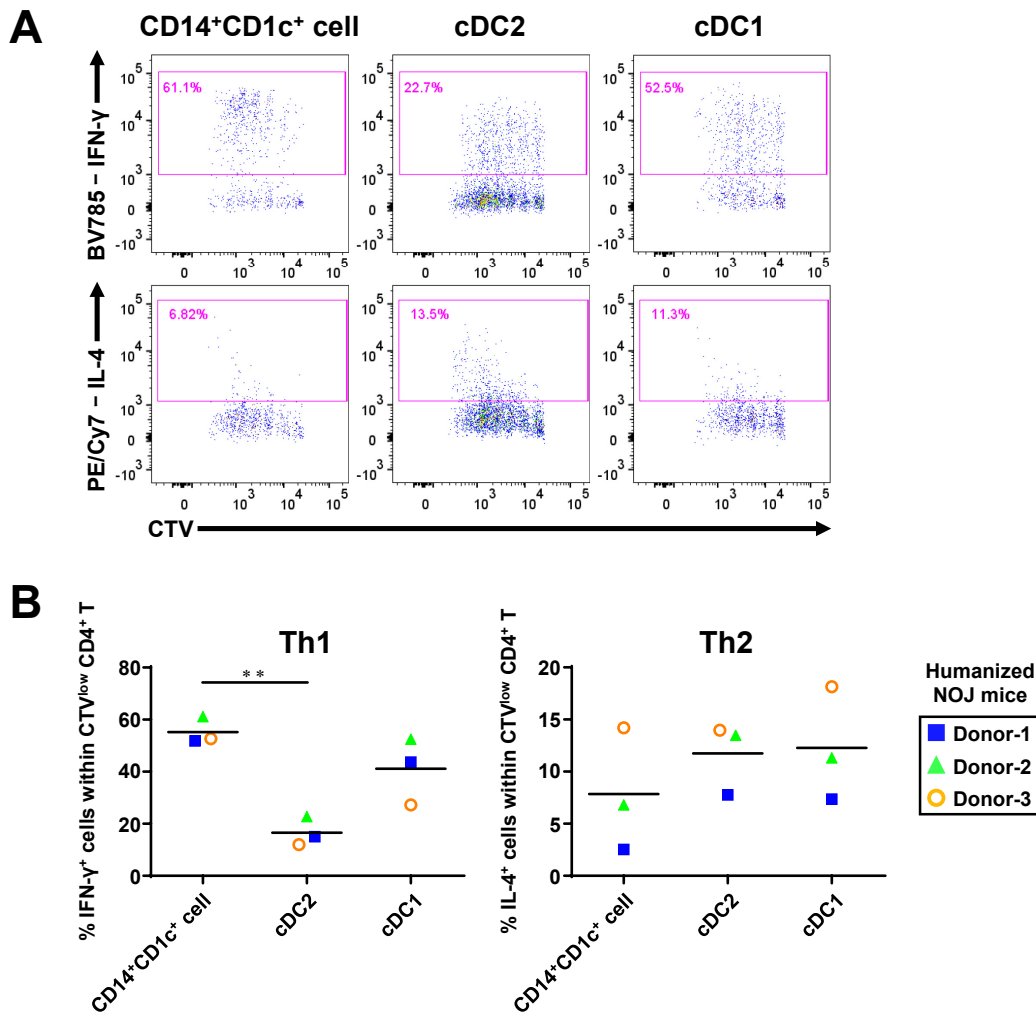


Fig. 3.7 ヒト化マウスの各樹状細胞亜集団の Th1 細胞および Th2 細胞分極化誘導能の評価

CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および cDC1 と 5 日間共培養したナイーブ CD4⁺ T 細胞を PMA およびイオノマイシンで再活性化し、細胞内に産生されるサイトカインをフローサイトメトリーで検出した。

(A) フローサイトメトリー解析における IFN-γ⁺CD4⁺ T 細胞および IL-4⁺CD4⁺ T 細胞の分画の代表例

(B) 各亜集団と共培養した CD4⁺ T 細胞に占める IFN-γ⁺ 細胞および IL-4⁺ 細胞の頻度の比較

同一のシンボルは同一の造血幹細胞ドナーのヒト化マウスを示す (n = 3)。

各共培養条件間の頻度の比較は one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて行い、有意差 (**P < 0.01) を決定した。

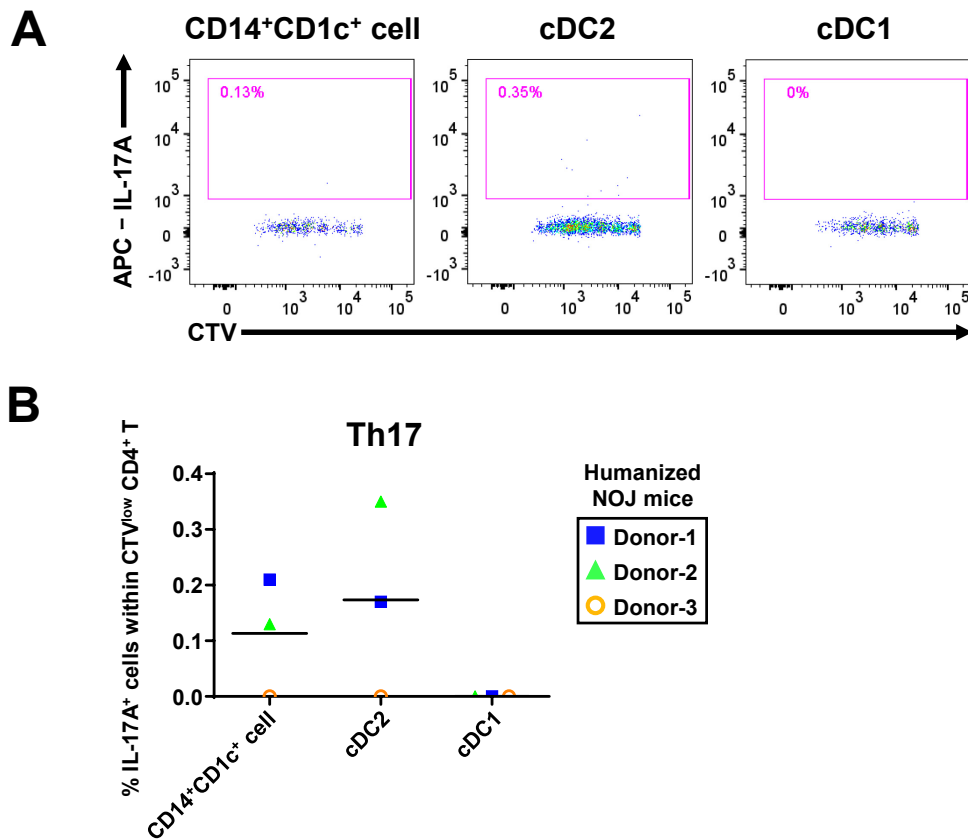


Fig. 3.8 ヒト化マウスの各樹状細胞亜集団の Th17 細胞分極化誘導能の評価

CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および cDC1 と 5 日間共培養したナイーブ CD4⁺T 細胞を PMA およびイオノマイシンで再活性化し、細胞内に産生されるサイトカインをフローサイトメトリーで解析した。

(A) フローサイトメトリー解析における IL-17A⁺CD4⁺T 細胞の分画の代表例

(B) 各亜集団と共培養した CD4⁺T 細胞を占める IL-17A⁺ 細胞の頻度の比較

同一のシンボルは同一の造血幹細胞ドナーのヒト化 NOJ マウスを示す (n = 3)。

各共培養条件間の頻度の比較をするため one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を行ったが、有意な差は認められなかった。

3.3.5 抗原存在下における樹状細胞亜集団の CD4⁺ T 細胞刺激能の評価

第 3.3.4 項では、他家の CD4⁺ T 細胞を用いて、CD14⁺CD1c⁺ 細胞が機能的な樹状細胞亜集団であることを明らかにした。そこで本項では、自家の CD4⁺ T 細胞を用いて、抗原存在下における CD14⁺CD1c⁺ 細胞の CD4⁺ T 細胞に対する刺激能を、他の樹状細胞亜集団と比較検討した。

本実験で用いた自家の CD4⁺ T 細胞は、ヒト化マウスの作製時に残余した臍帯血単核球より分取した。そして、作製したヒト化マウスの脾臓から単離した CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1、単球それぞれと、SEB の存在下で 6 時間共培養した。この共培養実験は、臍帯血のドナーが異なるヒト化マウス 3 群で行った。各亜集団による SEB を介した CD4⁺ T 細胞の刺激・活性化を評価するため、共培養 6 時間後の CD4⁺ T 細胞における細胞内 IL-2 をフローサイトメトリーで解析した (Fig. 3.9A)。CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および cDC1 と共培養した CD4⁺ T 細胞では、SEB 非存在下 (Mock) と比較して、SEB 存在下で IL-2⁺CD4⁺ T 細胞の誘導が認められた (Fig. 3.9B)。次に、CD14⁺CD1c⁺ 細胞との共培養条件における IL-2 の発現細胞頻度を 1 としたときの、相対的な IL-2 発現細胞頻度をその他の共培養条件と比較した。その結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞と、cDC2 および cDC1 の間に大きな差は認められなかった。したがって、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、他の樹状細胞亜集団と同様に、抗原の存在下で自家の CD4⁺ T 細胞を刺激・活性化できることが示唆された。

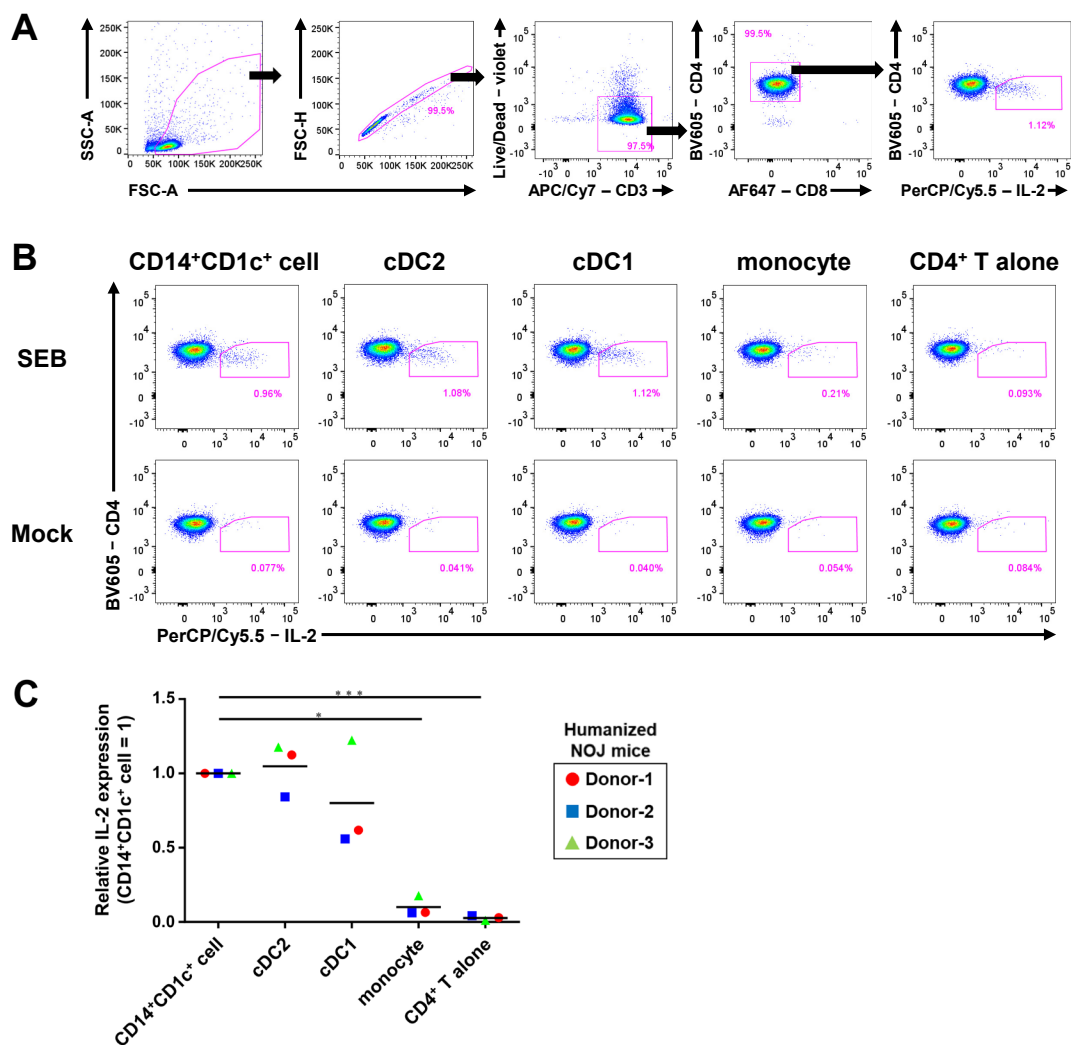


Fig. 3.9 SEB 存在下における樹状細胞亜集団の CD4⁺ T 細胞刺激能の評価

IVT 後 7 日目のヒト化マウスの脾臓から CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1 および単球を単離し、ヒト化マウスとドナーが同一の自家 CD4⁺ T 細胞を SEB 存在下で共培養を行った。共培養から 6 時間後、CD4⁺ T 細胞の細胞内 IL-2 をフローサイトメトリーで解析した。

(A) フローサイトメトリー解析における CD4⁺ T 細胞の分画の代表例

(B) フローサイトメトリー解析における各培養条件での IL-2⁺CD4⁺ T 細胞の代表例

(C) 各亜集団と共培養した CD4⁺ T 細胞における IL-2 の発現頻度の相対比較

同一のシンボルは同一の造血幹細胞ドナーのヒト化マウスを示す (n = 3)。

CD14⁺CD1c⁺ 細胞とその他の共培養条件間の頻度の比較は one-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて行い、有意差 (*P < 0.05、***P < 0.001) を決定した。

3.3.6 樹状細胞亜集団の RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析

次に、CD14⁺CD1c⁺ 細胞について、表現型に一部重複が認められた cDC2 および単球との違いをトランスクリプトームの観点から検討した。ドナーの異なるヒト化マウス 3 群から、CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および単球を単離し、bulk RNA-Seq により各亜集団の転写プロファイルを解析した。なお単球の 1 サンプルに関しては、cDNA のクオリティチェック時に cDNA の増幅が認められなかったため、シーケンスサンプルから除外した。

初めに、CD14⁺CD1c⁺ 細胞の遺伝子発現が cDC2 もしくは単球のどちらに近いかが検討した。Gene Ontology の Biological Process に含まれる「immune system process」にアノテーションされる遺伝子のうち、少なくとも 1 サンプルで発現している 488 遺伝子を用いて、階層クラスタリングを行った (Fig. 3.10)。その結果、亜集団ごとにクラスターが形成され、CD14⁺CD1c⁺ 細胞のクラスターは cDC2 に近いことが認められた。

次に CD14⁺CD1c⁺ 細胞と、ヒト由来の骨髄系細胞亜集団のトランスクリプトームを比較した。ヒトのトランスクリプトームデータは、SRA にアップロードされているヒト cDC2、DC3、単球亜集団、および単球由来細胞 (MoDC、マクロファージ、ランゲルハンス細胞) のシーケンスデータを用いた。そして、各サンプル間で発現の変動が大きい、上位 500 遺伝子を用いて主成分分析を行った (Fig. 3.11)。その結果、PC1 軸方向 (寄与率 42%) で、CD14⁺CD1c⁺ 細胞 (hNOJ_CD14+) はヒト cDC2 および DC3 の近くに位置し、一方で単球亜集団や単球由来細胞からは明確に分離していた。つまり、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、樹状細胞に類似した遺伝子発現を示した。

次に、CD14⁺CD1c⁺ 細胞のさらなる特徴づけを行うため、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞と cDC2 との間の発現変動遺伝子の同定を試みた (Fig. 3.12)。その結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は *CD14* および *CD163* の発現が高く、cDC2 では *CD1c* および *CD5* の発現が高かった。この結果は、第 3.3.2 項の Fig. 3.3A に示した細胞表面マーカーの発現傾向と一致していた。また CD14⁺CD1c⁺ 細胞では炎症に関連する *S100A8*、*S100A9* (S. Wang et al., 2018) および *IL-6* の発現上昇が認められた。さらに、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、*S100A12*、*TMEM176A* および *TMEM176B* などの DC3 関連遺伝子 (Villani et al., 2017) の発現上昇も認められた。

そこで、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞がヒト末梢血の DC3 に類似した転写プロファイルを有するか検証した。この検証には、2 群間で発現の異なる遺伝子が特定の遺伝子群に偏っているか解析する GSEA という手法 (Subramanian et al., 2005) を使用し

た。GSEA では、Villani ら (Villani et al., 2017) によって近年報告された DC3 もしくは cDC2 で特異的とされる遺伝子群 (DC3: DC3 > ALL、DC3 > cDC2; cDC2: cDC2 > ALL、cDC2 > DC3) を用いて (Table 3.2)、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞と cDC2 を比較解析した。その結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞において DC3 の遺伝子群 (DC3 > ALL および DC3 > cDC2) の有意な濃縮が認められた (Fig. 3.13A ; DC3 > ALL: NES = 1.42, q = 0.027; DC3 > DC2: NES = 1.74, q < 0.001)。一方で、cDC2 遺伝子群 (cDC2 > DC3) は、cDC2 において有意に濃縮された (Fig. 3.13B; NES = -1.49, q = 0.026)。

以上のトランスクリプトーム解析の結果から、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞は DC3 に類似した特徴的な転写プロファイルを有することが明らかとなり、cDC2 とは異なる樹状細胞亜集団であることが支持された。ただし、cDC2 特異的とされる遺伝子群 (cDC2 > ALL) の濃縮が、ヒト化マウスの cDC2 のみならず CD14⁺CD1c⁺ 細胞でも認められた結果については注意する必要がある (Fig. 3.13B ; 左)。この結果は CD14⁺CD1c⁺ 細胞が DC3 と類似した転写プロファイルを示す細胞以外に、cDC2 に類似した転写プロファイルを示す細胞を包括する可能性を示唆している。この点を明らかにするためには、今後 CD14⁺CD1c⁺ 細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析等が必要であると考えられる。

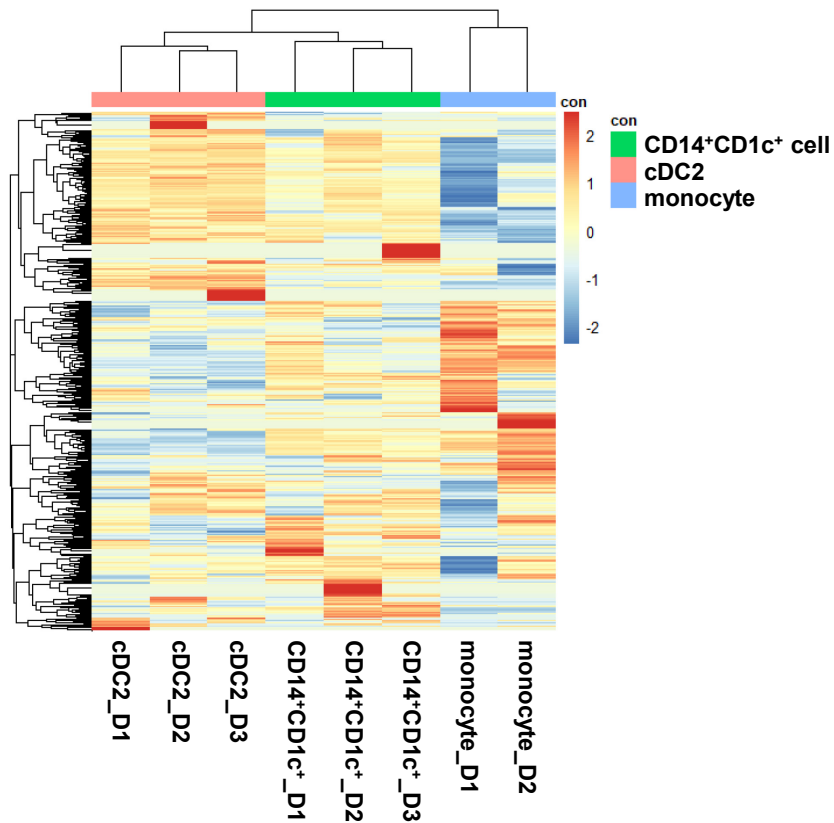


Fig. 3.10 ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2 および単球における遺伝子発現のヒートマップ

Gene Ontology の Biological Process に含まれる「immune system process」にアノテーションされる遺伝子のうち、CD14⁺CD1c⁺ 細胞 (n=3)、cDC2 (n=3) および単球 (n=2) の中で少なくとも 1 サンプルで発現している 488 遺伝子の発現に基づき階層クラスタリングを行った。また z-score normalization による正規化を行った値をヒートマップで可視化した。

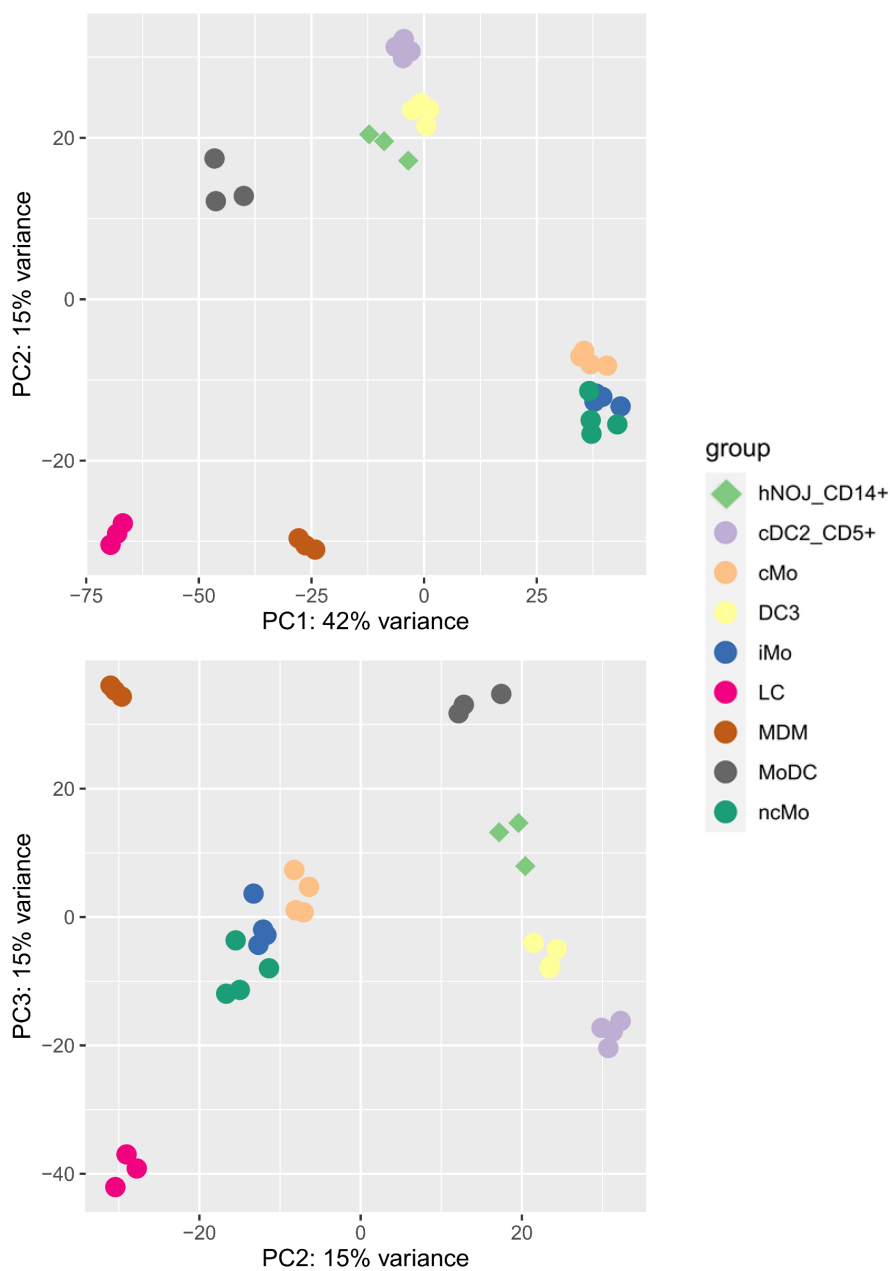


Fig. 3.11 ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞とヒトの骨髄系細胞亜集団の主成分分析

ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞 (n = 3)、ヒト CD5⁺ cDC2 (n = 4)、ヒト DC3 (n = 4)、ヒト古典的単球 (cMo; n = 4)、ヒト中間単球 (iMo; n = 4)、ヒト非古典的単球 (ncMo; n = 4)、ヒト MoDC (n = 3)、ヒト単球由来マクロファージ (MDM; n = 3) およびヒトランゲルハンス細胞 (LC; n = 3) について、すべてのサンプル間で発現変動の大きい 500 遺伝子を用いて主成分分析を行った。

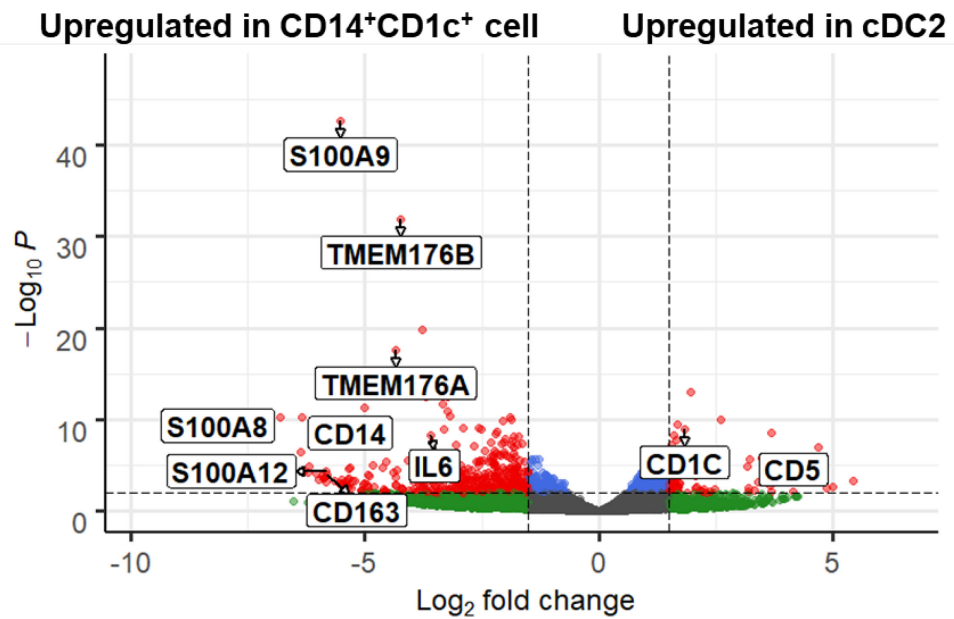


Fig. 3.12 ヒト化マウスの $CD14^+CD1c^+$ 細胞と cDC2 の間の発現変動遺伝子を示すボルケーノプロット

$|\log_2(\text{fold change})| > 1.5$ 、かつ p 値 < 0.01 の遺伝子を有意な発現変動遺伝子と見なし、赤のプロットで示した。

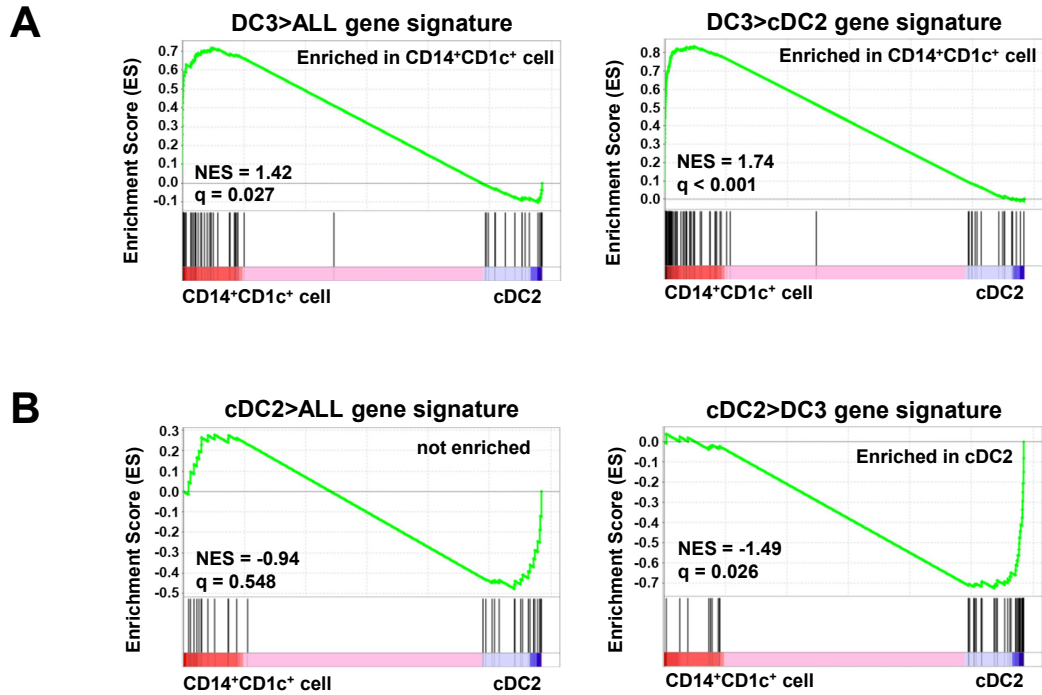


Fig. 3.13 GSEA によるヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞および cDC2 の比較

ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞および cDC2 について、Villani らが公表した DC3 および cDC2 の遺伝子群の濃縮を比較した。

(A) DC3 特異的な遺伝子群 (DC3 > ALL, DC3 > cDC2) を用いた比較

(B) cDC2 特異的な遺伝子群 (cDC2 > ALL, cDC2 > DC3) を用いた比較

統計学的有意性は、デフォルトパラメータを用いて GSEA ソフトウェアによって計算された、NES と q 値に基づき、 $|NES| \geq 1.00$ および $q < 0.25$ を有意と判定した。

3.3.7 樹状細胞亜集団の生体内における炎症応答の評価

第 3.3.6 項のトランスクリプトーム解析の結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は潜在的に炎症関連の機能を有していることが示唆された。そこでヒト化マウスに 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。また PBS を投与したヒト化マウスをコントロール (Mock) 群とした。生体内における各亜集団の炎症応答の評価は、*in vivo* ICS assay (Liu & Whitton, 2005) による細胞内の炎症関連タンパク質およびサイトカインの検出により行った。*in vivo* ICS assay を行うにあたり、LPS もしくは PBS を投与してから 1 時間後に、BFA を静脈内投与した。それから 5 時間後に脾臓を採取し、CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1、単球についてフローサイトメトリー解析を行った。

まず、LPS の投与が脾臓における各亜集団の細胞数に与える影響を検討した。ヒト白血球に占める各亜集団の頻度を LPS 群と Mock 群で比較した結果、LPS 投与により CD14⁺CD1c⁺ 細胞の有意な増加が認められた (Fig. 3.14)。この結果は、LPS の投与による急性炎症に応答した CD14⁺CD1c⁺ 細胞が、脾臓に集積したことを示唆している。

次に、各亜集団の、炎症関連タンパク質 (S100A8、S100A9) および炎症関連サイトカイン (IL-6、TNF- α) の発現をフローサイトメトリーで解析した (Fig. 3.15)。S100A8 および S100A9 は自己免疫疾患や感染症による炎症に応答して、好中球、単球、マクロファージで産生されるタンパク質として知られている (Silvin et al., 2020; S. Wang et al., 2018)。また近年の研究では、健康人の末梢血由来の DC3 において、S100A8 および S100A9 の mRNA が高く発現していることが示されている (Bourdely et al., 2020; Dutertre et al., 2019; Villani et al., 2017)。本実験の結果、ヒト化マウスでは、LPS 投与および非投与のいずれの条件でも、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は cDC1 や cDC2 と比較して、S100A8 および S100A9 産生細胞の頻度が非常に高かった (Fig. 3.16A、B、赤・青の***, ****を参照)。一方で単球における S100A8 および S100A9 産生細胞の頻度と比較すると、同等もしくはそれ以下であった (Fig. 3.16A、B、赤・青の*, **を参照)。また、CD14⁺CD1c⁺ 細胞と単球において、LPS の有無による S100A8 および S100A9 産生細胞の頻度に変動は認められなかった。

次に、炎症性サイトカインの IL-6 および TNF- α の発現について評価した。LPS 非投与時における IL-6 の発現については、CD14⁺CD1c⁺ 細胞における IL-6 産生細胞の頻度が cDC1 や単球よりも有意に高かった一方で、cDC2 とは有意な差が認められなかった (Fig. 3.16C、赤の***, ****を参照)。LPS 投与時では、cDC1 を除くすべてのサブセット

において IL-6 産生細胞の頻度が有意に上昇した (Fig. 3.16C、黒の#, ##, #####を参照)。さらに、CD14⁺CD1c⁺ 細胞はすべての亜集団の中で最も多くの IL-6 産生細胞で構成されていた (Fig. 3.16C、青の*, **, ****を参照)。IL-6 とは対照的に、LPS 非投与時における TNF- α の産生は、CD14⁺CD1c⁺ 細胞でもほとんど認められなかった (Fig. 3.16D)。一方で、LPS 投与時では、個体間でばらつきはあるものの、CD14⁺CD1c⁺ 細胞における TNF- α の産生細胞の頻度が有意に増加し (Fig. 3.16D、黒の###を参照)、他の亜集団と比較して最も TNF- α 産生細胞の頻度が高かった (Fig. 3.16D、青の**, ***を参照)。

第 3.3.4 項では、CD14⁺CD1c⁺ 細胞はナイーブ CD4⁺ T 細胞に対して炎症に関連する Th17 細胞の分極化を誘導しなかったが (Fig. 3.8)、本項の結果より CD14⁺CD1c⁺ 細胞は炎症環境下において最も強力な炎症反応を示す樹状細胞亜集団であることが示唆された。また、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞における S100A8 および S100A9 の恒常的な発現や炎症環境下における TNF- α の顕著な産生能は、DC3 と一致した。したがって、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞と DC3 の類似性は表現型や転写プロファイルだけでなく、炎症に関連した性状でも認められた。

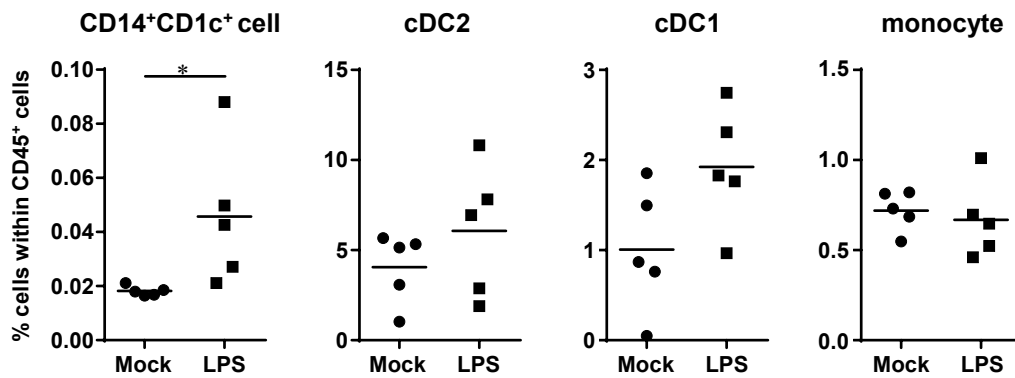


Fig. 3.14 LPS 投与・非投与ヒト化マウスの脾臓における各亜集団の頻度の比較

IVT 後 7 日目のヒト化マウスに、LPS もしくは PBS を腹腔内投与し、投与から 6 時間後の脾臓から調製した細胞を解析に使用した。

ヒト白血球に占める CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、cDC1 および単球の頻度について、LPS 群 (n = 5) と Mock 群 (n = 5) を比較した。有意差 (* $P < 0.05$) は、Mann-Whitney U test により決定した。

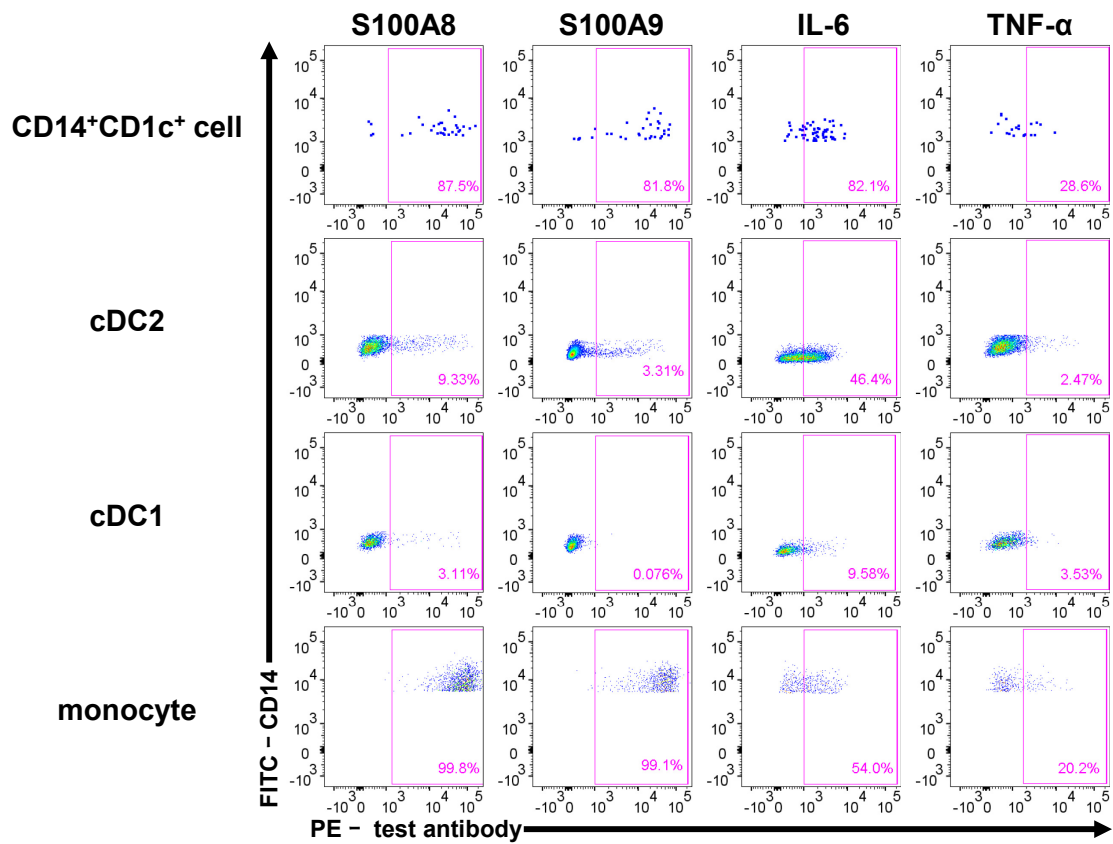


Fig. 3.15 LPS 投与ヒト化マウス脾臓における各亜集団の細胞内炎症関連タンパク質およびサイトカインの発現

CD14⁺CD1c⁺細胞、cDC2、cDC1 および単球における細胞内炎症関連タンパク質およびサイトカインのフローサイトメトリー解析の代表例

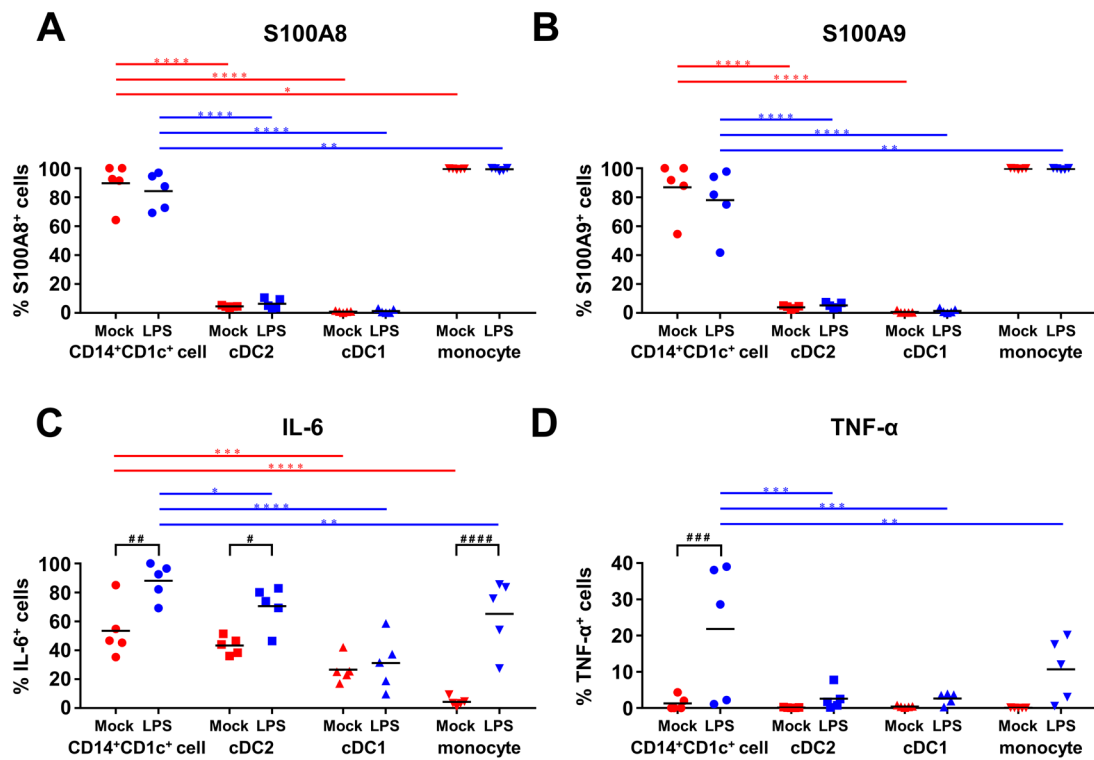


Fig. 3.16 各亜集団における細胞内炎症関連タンパク質およびサイトカイン産生細胞の頻度の比較

各亜集団に占める細胞内炎症関連タンパク質およびサイトカイン産生細胞の頻度。

(A) 各亜集団に占める S100A8⁺ 細胞の頻度

(B) 各亜集団に占める S100A9⁺ 細胞の頻度

(C) 各亜集団に占める IL-6⁺ 細胞の頻度

(D) 各亜集団に占める TNF- α ⁺ 細胞の頻度

同一条件のヒト化マウスにおける CD14⁺CD1c⁺ 細胞 (n = 5) と各亜集団 (すべて n = 5) の比較は、repeated-measures two-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて行い、有意差 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$) を決定した。また、同一の亜集団における LPS 群 (n = 5) と Mock 群 (n = 5) の比較についても repeated-measures two-way ANOVA に続いて Holm-Sidak's multiple comparison test を用いて行い、有意差 (# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 、### $P < 0.001$) を決定した。

3.4 結言

本章では、FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスで認められた CD14⁺ 細胞が、ヒトの DC3 と同等の細胞であるか検証した。CD14⁺ 細胞の検出に適した蛍光標識抗体による染色で、各樹状細胞亜集団をフローサイトメトリーで解析したところ、cDC2 が大半に占める CD1c⁺ 細胞の一部において、CD14 の発現が認められた。この CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、cDC2 とは異なる表現型を示し、その表現型は DC3 と類似した。この CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、他家のナイーブ CD4⁺ T 細胞に対する増殖刺激能や、抗原の存在下で自家の CD4⁺ T 細胞を活性化させる機能を示し、機能的な樹状細胞亜集団であることが確認された。さらに CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を顕著に IFN- γ Th1 細胞へと分極化させ、cDC2 と異なる機能を示した。また、この Th1 細胞への分極化の誘導は、Bourdely らが報告している DC3 の特徴と一致した (Bourdely et al., 2020)。CD14⁺CD1c⁺ 細胞、cDC2、単球についてのトランスクリプトーム解析を行った結果、これまでの他の研究グループによる表現型・機能解析の結果と同様、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は cDC2 および単球とは異なる細胞集団であることが確認された。また、CD14 を発現する単球由来樹状細胞やマクロファージとも異なる遺伝子発現を示したことから、単球由来の樹状細胞ではないと結論付けた。さらに、GSEA 解析により、CD14⁺CD1c⁺ 細胞の特徴的な転写産物は DC3 のそれと重複し、炎症関連の機能を有していることが示唆された。そこで、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、DC3 と同様に、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は S100A8 および S100A9 を恒常的に発現し、また炎症環境下で TNF- α を高レベルで産生することが認められた。

以上の結果は、CD14⁺CD1c⁺ 細胞が、cDC2 とは異なる炎症性の樹状細胞亜集団であることに加え、DC3 により近い樹状細胞亜集団であることを支持する。ただし、本研究で用いたヒト化マウスモデルは、FLT3L と GM-CSF 以外のヒトサイトカインが発現していないという点で、ヒトの生体内の条件とは大きく異なることも考慮しなければならない。ヒトにおける DC3 の分化レベルと同程度の CD14⁺CD1c⁺ 細胞の分化レベルをヒト化マウスで実現するためには、発現させるサイトカインの種類や量の更なる検討が必要である。また、本研究で解析した CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、脾臓で前駆細胞から分化した細胞だけでなく、末梢血から脾臓に流入したすでに分化済みの細胞も含まれていると考えられる。本研究では血中を循環する樹状細胞が少なかったため、血中の CD14⁺CD1c⁺ 細胞と比較ができなかったが、シングルセル解析を行うことで脾臓の CD14⁺CD1c⁺ 細

胞の由来が推定できると考えられる。またこの解析は、脾臓の CD14⁺CD1c⁺ 細胞における、CD163 の発現のばらつきや GSEA の結果から示唆された細胞の不均一性の原因についても明らかにできると考えられる。

第4章 結論

本研究では、ヒトサイトカインを発現させることで樹状細胞亜集団の分化を向上させたヒト化マウスを構築し、これまでヒト化マウスで報告されていない DC3 が分化するか否か検証した。

第2章では、これまで検討がなされていないサイトカインの組み合わせである、ヒト FLT3L と GM-CSF をヒト化マウスに導入し、樹状細胞亜集団の分化誘導を試みた。マウスの体内にサイトカインを発現させる手段として、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 を強制発現させた。ヒト化マウスにヒト FLT3L 発現プラスミドおよびヒト GM-CSF 発現プラスミドを、単独または同時に IVT した結果、少なくとも IVT 後 3 日目から 10 日目まで FLT3L および GM-CSF の発現に成功した。次に、ヒトにおける主要な樹状細胞亜集団が、ヒト化マウスにおいても分化するか、サイトカイン非発現条件下・発現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 cDC1、cDC2、pDC と類似した表現型・形態を示す樹状細胞様亜集団が、サイトカイン非発現条件下のリンパ組織で認められた。また、サイトカインの発現条件下では、FLT3L と GM-CSF の同時発現が、リンパ組織の cDC1 様亜集団および cDC2 様亜集団の分化を最も向上させた。興味深いことに、これらの亜集団には CD14⁺ 細胞と CD14⁺ 細胞の存在が認められ、FLT3L および GM-CSF の同時発現はどちらの細胞の分化の向上にも寄与した。なお、どのサイトカインの発現条件下でも pDC 様亜集団の分化の向上は認められなかった。次に、サイトカインの発現が各亜集団の成熟化に及ぼす効果を検討した結果、GM-CSF 単独もしくは FLT3L との同時発現下で、各亜集団の CD80・CD86 の発現上昇を特徴とする成熟化が認められた。さらに cDC1 様亜集団と cDC2 様亜集団は、T 細胞に対する増殖刺激能を示したことより、機能的な樹状細胞であることが示唆された。以上の結果から、ヒト化マウスへの FLT3L と GM-CSF の導入によって、機能的な cDC1 および cDC2 の分化の向上に成功した。さらに従来の樹状細胞の定義では cDC1 や cDC2 に分類されない CD14⁺ 細胞の分化が認められた。

第3章では、第2章で作製したヒト FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスで認められた CD14⁺ 細胞が、近年ヒトで報告されている DC3 と同等の樹状細胞であるか検証した。まず、フローサイトメトリーによる樹状細胞および単球/マクロファージ関連マーカーの発現を解析した結果、cDC2 様亜集団に存在する CD14⁺CD1c⁺ 細胞の表現型が DC3 と類似した。そこで、CD14⁺CD1c⁺ 細胞について CD4⁺ T 細胞との相互間作用を評価した結果、cDC1 や cDC2 と同様に CD4⁺ T 細胞を刺激・活性化し、機能的な樹状細胞である

ことが示唆された。さらに CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、顕著な Th1 細胞への分極化を誘導し、DC3 で報告されている機能と一致した。RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析では、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は、cDC2 や CD14 陽性の単球関連細胞とは異なる転写プロファイルを示した。さらに CD14⁺CD1c⁺ 細胞の特徴的な転写産物は、DC3 の特徴的な転写産物と重複し、炎症関連の機能を有していることが示唆された。そこで、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、恒常的に炎症関連タンパク質の S100A8 および S100A9 を発現した。また、炎症環境下では炎症性サイトカインである IL-6 および TNF- α を産生する細胞が最も多くみられる細胞集団であり、これらの特徴も DC3 と一致した。これらの表現型・トランスクリプトーム・機能性の解析から、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞は DC3 と同等の性状・機能を示す樹状細胞であることが明らかとなった (Fig. 4)。

以上のように、本研究では、ヒト FLT3L と GM-CSF を発現したヒト化マウスで分化誘導した CD14⁺CD1c⁺ 細胞が、DC3 と同等の樹状細胞であることを明らかにした (Fig. 4)。本研究によって、生体内の DC3 を解析可能とする動物モデルがヒト化マウスで実現可能であることを示したといえる。ただし、本ヒト化マウスモデルは、ヒトにおける DC3 の分化レベルと同程度に、CD14⁺CD1c⁺ 細胞の分化を誘導できていない。その要因には、本ヒト化マウスモデルでは、FLT3L と GM-CSF 以外のヒトサイトカインが発現しておらず、ヒトの発生条件が異なることが挙げられる。しかしその反面、本ヒト化マウスモデルに、さらに別種のサイトカインを導入し、CD14⁺CD1c⁺ 細胞の分化がさらに向上するか検討することで、DC3 の分化に関わる新たなサイトカインの発見につながると考えられる。

本ヒト化マウスモデルの CD14⁺CD1c⁺ 細胞について、さらなる詳細な解析は必要であるものの、ヒト化マウスで DC3 の分化が可能であることは確かな事実である。マウスではヒトの DC3 と同一の細胞が見つからない現状を鑑みると (Villar & Segura, 2020)、ヒト化マウスは DC3 の生体内での分化機構や、分化後の動態を明らかにする上で有用な動物モデルである。これまでの DC3 に関する研究では、*in vitro* の実験により DC3 の前駆細胞が近年同定されていることから (Bourdely et al., 2020; Cytlak et al., 2020)、この前駆細胞を移植したヒト化マウスを作製することで、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 の局在・動態の解明ができると考えられる。加えてヒト化マウスでは病原体の感染実験が行えるため、病原体の感染に対する DC3 の分化・動態を解析する動物モデルとしての活用も可能である。基礎免疫学のみならず、免疫療法への応用も望まれる樹状細胞研究の発展には、これらの観点について知見を得ることが必須であり、本研究で示した DC3 が分化したヒト化マウスモデルの活用がその端緒になると期待する。

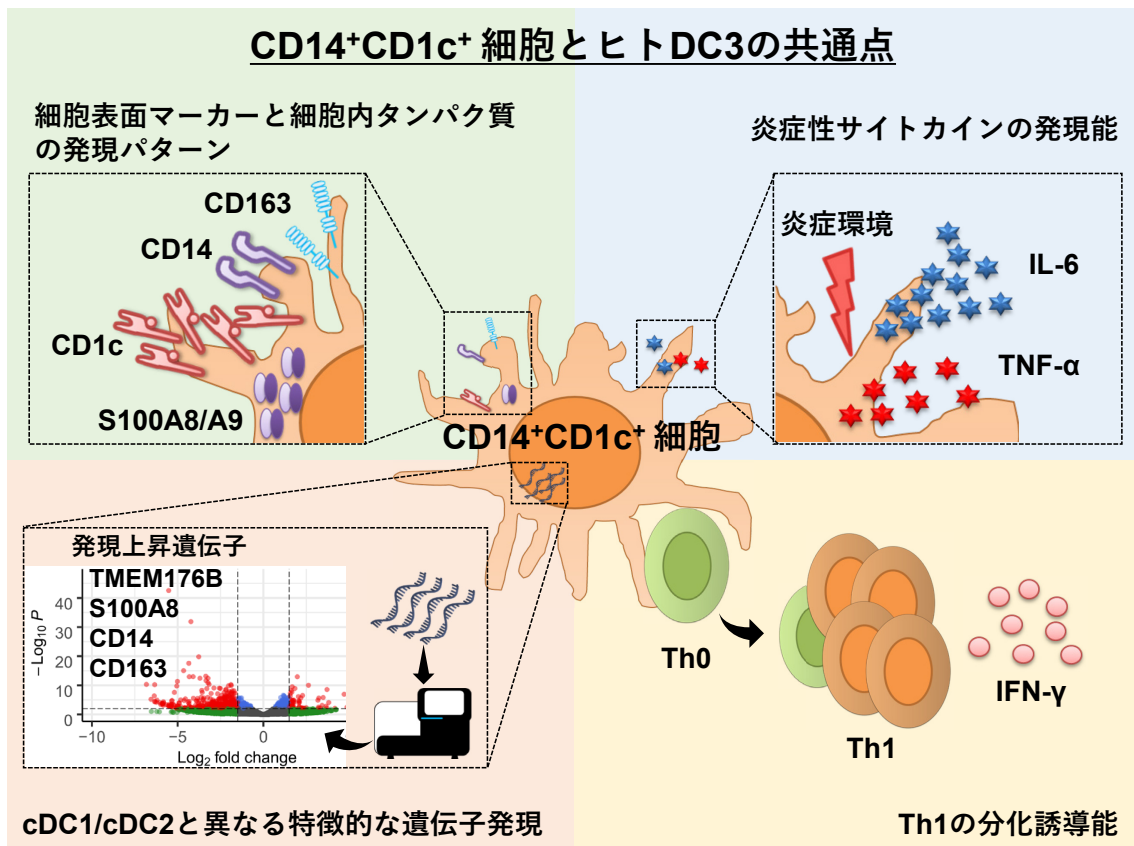


Fig. 4 本研究で明らかにしたヒト化マウス CD14⁺CD1c⁺ 細胞の性状・機能のまとめ

本研究で行った表現型・トランスクリプトーム・機能性の解析から、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞はヒトの 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。

参考文献

- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, *11*(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Anselmi, G., Vaivode, K., Dutertre, C. A., Bourdely, P., Missolo-Koussou, Y., Newell, E., Hickman, O., Wood, K., Saxena, A., Helft, J., Ginhoux, F., & Guermontprez, P. (2020). Engineered niches support the development of human dendritic cells in humanized mice. *Nature Communications*, *11*(1), 2054. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15937-y>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245-252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Billerbeck, E., Barry, W. T., Mu, K., Dorner, M., Rice, C. M., & Ploss, A. (2011). Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2Rgamma(null) humanized mice. *Blood*, *117*(11), 3076-3086. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301507>
- Blighe, K., Rana, S., & Lewis, M. (2019). EnhancedVolcano: publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. *R package version, 1*(0).
- Boltjes, A., & van Wijk, F. (2014). Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in Immunology*, *5*, 131. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00131>
- Bosma, G. C., Custer, R. P., & Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, *301*(5900), 527-530. <https://doi.org/10.1038/301527a0>
- Bourdely, P., Anselmi, G., Vaivode, K., Ramos, R. N., Missolo-Koussou, Y., Hidalgo, S., Tosselo, J., Nunez, N., Richer, W., Vincent-Salomon, A., Saxena, A., Wood, K., Lladser, A., Piaggio, E., Helft, J., & Guermontprez, P. (2020). Transcriptional and functional analysis of CD1c(+) human dendritic cells identifies a CD163(+) subset priming CD8(+)CD103(+) T cells. *Immunity*, *53*(2), 335-352 e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.002>
- Brehm, M. A., Shultz, L. D., Luban, J., & Greiner, D. L. (2013). Overcoming current limitations in humanized mouse research. *Journal of Infectious Diseases*, *208* Suppl 2, S125-130. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit319>
- Breton, G., Zheng, S., Valieris, R., Tojal da Silva, I., Satija, R., & Nussenzweig, M. C. (2016). Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c⁺ or CD141⁺ DCs. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(13), 2861-2870. <https://doi.org/10.1084/jem.20161135>

- Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., & Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(1), 97-103. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.97>
- Carraway, M. S., Ghio, A. J., Carter, J. D., & Piantadosi, C. A. (2000). Detection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(4 Pt 1), 1294-1299. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9906080>
- Chen, Q., He, F., Kwang, J., Chan, J. K., & Chen, J. (2012). GM-CSF and IL-4 stimulate antibody responses in humanized mice by promoting T, B, and dendritic cell maturation. *Journal of Immunology*, 189(11), 5223-5229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201789>
- Chen, Q., Khoury, M., & Chen, J. (2009). Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21783-21788. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912274106>
- Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., & Nicod, L. P. (1999). Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21(5), 547-554. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.5.3785>
- Cohn, L., Chatterjee, B., Esselborn, F., Smed-Sorensen, A., Nakamura, N., Chalouni, C., Lee, B. C., Vandlen, R., Keler, T., Lauer, P., Brockstedt, D., Mellman, I., & Delamarre, L. (2013). Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *Journal of Experimental Medicine*, 210(5), 1049-1063. <https://doi.org/10.1084/jem.20121251>
- Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154(1), 3-20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>
- Collin, M., McGovern, N., & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140(1), 22-30. <https://doi.org/10.1111/imm.12117>
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C. A., Ventre, E., Vu Manh, T. P., Baranek, T., Storset, A. K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., & Dalod, M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1283-1292. <https://doi.org/10.1084/jem.20100223>
- Cyster, J. G., & Allen, C. D. C. (2019). B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. *Cell*, 177(3), 524-540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>

- Cytlak, U., Resteu, A., Pagan, S., Green, K., Milne, P., Maisuria, S., McDonald, D., Hulme, G., Filby, A., Carpenter, B., Queen, R., Hambleton, S., Hague, R., Lango Allen, H., Thaventhiran, J. E. D., Doody, G., Collin, M., & Bigley, V. (2020). Differential IRF8 transcription factor requirement defines two pathways of dendritic cell development in humans. *Immunity*, *53*(2), 353-370 e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.003>
- Daro, E., Pulendran, B., Brasel, K., Teepe, M., Pettit, D., Lynch, D. H., Vremec, D., Robb, L., Shortman, K., McKenna, H. J., Maliszewski, C. R., & Maraskovsky, E. (2000). Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b(high)CD11c(high) but not CD11b(low)CD11c(high) murine dendritic cells in vivo: a comparative analysis with Flt3 ligand. *Journal of Immunology*, *165*(1), 49-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.49>
- Ding, Y., Wilkinson, A., Idris, A., Fancke, B., O'Keeffe, M., Khalil, D., Ju, X., Lahoud, M. H., Caminschi, I., Shortman, K., Rodwell, R., Vuckovic, S., & Radford, K. J. (2014). FLT3-ligand treatment of humanized mice results in the generation of large numbers of CD141+ and CD1c+ dendritic cells in vivo. *Journal of Immunology*, *192*(4), 1982-1989. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302391>
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, *4*(8), 1184-1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>
- Dutertre, C. A., Becht, E., Irac, S. E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P. Y., van den Hoogen, L. L., Leong, J. Y., Lee, B., Chevrier, M., Zhang, X. M., Yong, P., Koh, G., Lum, J., Howland, S. W., Mok, E., Chen, J., Larbi, A., ... Ginhoux, F. (2019). Single-cell analysis of human mononuclear phagocytes reveals subset-defining markers and identifies circulating inflammatory dendritic cells. *Immunity*, *51*(3), 573-589 e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.008>
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., & Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology*, *165*(11), 6037-6046. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6037>
- Ezekowitz, R. A. B., & Hoffmann, J. A. (1996). Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *8*(1), 1-2. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(96\)80096-3](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(96)80096-3)
- Gerling, I. C., Serreze, D. V., Christianson, S. W., & Leiter, E. H. (1992). Intrathymic islet cell transplantation reduces beta-cell autoimmunity and prevents diabetes in NOD/Lt mice. *Diabetes*, *41*(12), 1672-1676. <https://doi.org/10.2337/diab.41.12.1672>

- Greiner, D. L., Shultz, L. D., Yates, J., Appel, M. C., Perdrizet, G., Hesselton, R. M., Schweitzer, I., Beamer, W. G., Shultz, K. L., & Pelsue, S. C. (1995). Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *The American journal of pathology*, *146*(4), 888-902.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., & Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, *14*(8), 571-578. <https://doi.org/10.1038/nri3712>
- Hachiya, A., Aizawa-Matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M., & Oka, S. (2001). Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing HeLa/CD4(+) cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(2), 495-501. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.495-501.2001>
- Heger, L., Balk, S., Luhr, J. J., Heidkamp, G. F., Lehmann, C. H. K., Hatscher, L., Purbojo, A., Hartmann, A., Garcia-Martin, F., Nishimura, S. I., Cesnjevar, R., Nimmerjahn, F., & Dudziak, D. (2018). CLEC10A is a specific marker for human CD1c(+) dendritic cells and enhances their Toll-like receptor 7/8-induced cytokine secretion. *Frontiers in Immunology*, *9*, 744. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00744>
- Heger, L., Hofer, T. P., Bigley, V., de Vries, I. J. M., Dalod, M., Dudziak, D., & Ziegler-Heitbrock, L. (2020). Subsets of CD1c(+) DCs: dendritic cell versus monocyte lineage. *Frontiers in Immunology*, *11*, 559166. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.559166>
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T., & Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, *100*(9), 3175-3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0207>
- Iwabuchi, R., Ikeno, S., Kobayashi-Ishihara, M., Takeyama, H., Ato, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., & Terahara, K. (2018). 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. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1042. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01042>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, *16*(4), 343-353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jimenez, R., Ramirez, R., Carracedo, J., Aguera, M., Navarro, D., Santamaria, R., Perez, R., Del Castillo, D., & Aljama, P. (2005). Cytometric bead array (CBA) for the measurement of

- cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. *Cytokine*, 32(1), 45-50.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.07.009>
- Kikutani, H., & Makino, S. (1992). The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Advances in Immunology* (Vol. 51, pp. 285-322). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60490-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60490-3)
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907-915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kingston, D., Schmid, M. A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., & Manz, M. G. (2009). The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood*, 114(4), 835-843. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206318>
- Kolde, R. (2015). pheatmap: Pretty heatmaps [Software]. R package version 1.0.12. In: CRAN.
<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>
- Krakow, S., Crescimone, M. L., Bartels, C., Wiegeling, V., Eyrich, M., Schlegel, P. G., & Wolf, M. (2019). Re-expression of CD14 in response to a combined IL-10/TLR stimulus defines monocyte-derived cells with an immunoregulatory phenotype. *Frontiers in Immunology*, 10, 1484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01484>
- Lanier, L. L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J. H., Linsley, P. S., Okumura, K., Ito, D., & Azuma, M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *Journal of Immunology*, 154(1), 97-105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527824>
- Li, Y., Teteloshvili, N., Tan, S., Rao, S., Han, A., Yang, Y. G., & Creusot, R. J. (2019). Humanized mice reveal new insights into the thymic selection of human autoreactive CD8(+) T cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 63. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00063>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Liu, F., Song, Y., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(7), 1258-1266. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>
- Liu, F., & Whitton, J. L. (2005). Cutting edge: re-evaluating the in vivo cytokine responses of CD8+ T cells during primary and secondary viral infections. *Journal of Immunology*, 174(10), 5936-5940. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.5936>

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lutz, M. B., & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*, 23(9), 445-449. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02281-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02281-0)
- Lutz, M. B., Strobl, H., Schuler, G., & Romani, N. (2017). GM-CSF monocyte-derived cells and Langerhans cells as part of the dendritic cell family. *Frontiers in Immunology*, 8, 1388. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01388>
- Lyman, S. D., Seaberg, M., Hanna, R., Zappone, J., Brasel, K., Abkowitz, J. L., Prchal, J. T., Schultz, J. C., & Shahidi, N. T. (1995). Plasma/serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia. *Blood*, 86(11), 4091-4096. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.11.4091.bloodjournal86114091>
- MacDonald, K. P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J., & Hart, D. N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*, 100(13), 4512-4520. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0097>
- Manz, M. G. (2007). Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity*, 26(5), 537-541. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.001>
- Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C. R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M. E., & McKenna, H. J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood*, 96(3), 878-884. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.3.878>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), 4-9. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(97\)80152-5](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(97)80152-5)
- Miller, P. H., Cheung, A. M., Beer, P. A., Knapp, D. J., Dhillon, K., Rabu, G., Rostamirad, S., Humphries, R. K., & Eaves, C. J. (2013). Enhanced normal short-term human myelopoiesis in mice engineered to express human-specific myeloid growth factors. *Blood*, 121(5), e1-4. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-456566>
- Minoda, Y., Virshup, I., Leal Rojas, I., Haigh, O., Wong, Y., Miles, J. J., Wells, C. A., & Radford, K. J. (2017). Human CD141(+) dendritic cell and CD1c(+) dendritic cell undergo concordant early genetic programming after activation in humanized mice in vivo. *Frontiers in Immunology*, 8, 1419. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01419>

- Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., & Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*, *335*(6187), 256-259. <https://doi.org/10.1038/335256a0>
- Okada, S., Harada, H., Ito, T., Saito, T., & Suzu, S. (2008). Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3null mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34 + cells. *International Journal of Hematology*, *88*(5), 476-482. <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0215-z>
- Onodera, T., Hosono, A., Odagiri, T., Tashiro, M., Kaminogawa, S., Okuno, Y., Kurosaki, T., Ato, M., Kobayashi, K., & Takahashi, Y. (2016). Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through TLR signaling. *Journal of Immunology*, *196*(10), 4172-4184. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600046>
- Pearson, F. E., Chang, K., Minoda, Y., Rojas, I. M. L., Haigh, O. L., Daraj, G., Tullett, K. M., & Radford, K. J. (2018). Activation of human CD141(+) and CD1c(+) dendritic cells in vivo with combined TLR3 and TLR7/8 ligation. *Immunology and Cell Biology*, *96*(4), 390-400. <https://doi.org/10.1111/imcb.12009>
- Pearson, T., Shultz, L. D., Miller, D., King, M., Laning, J., Fodor, W., Cuthbert, A., Burzenski, L., Gott, B., Lyons, B., Foreman, O., Rossini, A. A., & Greiner, D. L. (2008). Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clinical and Experimental Immunology*, *154*(2), 270-284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03753.x>
- Picelli, S., Faridani, O. R., Bjorklund, A. K., Winberg, G., Sagasser, S., & Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nature Protocols*, *9*(1), 171-181. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.006>
- Poulin, L. F., Reyat, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B. U., Sancho, D., Murphy, K. M., Håkansson, U. K., Moita, L. F., Agace, W. W., Bonnet, D., & Reis e Sousa, C. (2012). DNCR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood*, *119*(25), 6052-6062. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406967>
- Poulter, L. W. (1983). Antigen presenting cells in situ: their identification and involvement in immunopathology. *Clinical and Experimental Immunology*, *53*(3), 513-520. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6352095>
- Roehr, J. T., Dieterich, C., & Reinert, K. (2017). Flexbar 3.0 - SIMD and multicore parallelization. *Bioinformatics*, *33*(18), 2941-2942. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx330>

- Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E. E., Flavell, R. A., & Manz, M. G. (2013). Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annual Review of Immunology*, *31*, 635-674. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095921>
- Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S. V., Teichmann, L. L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A. K., Manz, M. G., & Flavell, R. A. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 364-372. <https://doi.org/10.1038/nbt.2858>
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(4), 1109-1118. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>
- Schlitzer, A., McGovern, N., & Ginhoux, F. (2015). Dendritic cells and monocyte-derived cells: two complementary and integrated functional systems. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *41*, 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.011>
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A. W., See, P., Shin, A., Wasan, P. S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H. A., Hilkens, C. M., Tam, J., Poidinger, M., ... Ginhoux, F. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*, *38*(5), 970-983. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011>
- See, P., Dutertre, C. A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S. E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., Sumatoh, H., Ruffin, N., Jouve, M., Gea-Mallorquí, E., Hennekam, R., Lim, T., Yip, C. C., Wen, M., Malleret, B., ... Ginhoux, F. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*, *356*(6342), eaag3009. <https://doi.org/10.1126/science.aag3009>
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiochia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., & Amigorena, S. (2013). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*, *38*(2), 336-348. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.018>
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M. H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., & Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(4), 653-660. <https://doi.org/10.1084/jem.20111457>

- Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V., & Greiner, D. L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature Reviews Immunology*, *12*(11), 786-798. <https://doi.org/10.1038/nri3311>
- Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L., & Handgretinger, R. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *Journal of Immunology*, *174*(10), 6477-6489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>
- Silvin, A., Chapuis, N., Dunsmore, G., Goubet, A. G., Dubuisson, A., Derosa, L., Almire, C., Hénon, C., Kosmider, O., Droin, N., Rameau, P., Catelain, C., Alfaro, A., Dussiau, C., Friedrich, C., Sourdeau, E., Marin, N., Szwebel, T. A., Cantin, D., ... Solary, E. (2020). Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell*, *182*(6), 1401-1418 e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.002>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, *137*(5), 1142-1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Steinman, R. M., & Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(10), 5132-5136. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.5132>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(43), 15545-15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Tanaka, S., Saito, Y., Kunisawa, J., Kurashima, Y., Wake, T., Suzuki, N., Shultz, L. D., Kiyono, H., & Ishikawa, F. (2012). Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2rgammaKO mice. *Journal of Immunology*, *188*(12), 6145-6155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103660>
- Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y. Y., Okada, S., Kobayashi, K., & Tsunetsugu-Yokota, Y. (2013). Expansion of activated memory CD4+ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3null mice. *PloS One*, *8*(1), e53495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053495>

- Tezuka, K., Xun, R., Tei, M., Ueno, T., Tanaka, M., Takenouchi, N., & Fujisawa, J. (2014). An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. *Blood*, *123*(3), 346-355. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508861>
- Tippett, E., Cheng, W. J., Westhorpe, C., Cameron, P. U., Brew, B. J., Lewin, S. R., Jaworowski, A., & Crowe, S. M. (2011). Differential expression of CD163 on monocyte subsets in healthy and HIV-1 infected individuals. *PloS One*, *6*(5), e19968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019968>
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J. C., Lanzavecchia, A., & Manz, M. G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science*, *304*(5667), 104-107. <https://doi.org/10.1126/science.1093933>
- Tu, H., Burke, T. M., Oderup, C., Huang, K., Wong, K., Lewen, S., LaJevic, M., & Zabel, B. A. (2014). Robust expansion of dendritic cells in vivo by hydrodynamic FLT3L-FC gene transfer. *Journal of Immunological Methods*, *413*, 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.07.008>
- Van Voorhis, W. C., Hair, L. S., Steinman, R. M., & Kaplan, G. (1982). Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine*, *155*(4), 1172-1187. <https://doi.org/10.1084/jem.155.4.1172>
- Villadangos, J. A., & Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8⁺ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(6), 1131-1134. <https://doi.org/10.1084/jem.20100985>
- Villani, A. C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E., Nilsson, E., Grundberg, I., McDonald, D., Filby, A., Li, W., De Jager, P. L., ... Hacohen, N. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*, *356*(6335), eaah4573. <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>
- Villar, J., & Segura, E. (2020). The more, the merrier: DC3s join the human dendritic cell family. *Immunity*, *53*(2), 233-235. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.014>
- Vu Manh, T. P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., & Dalod, M. (2015). Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. *Frontiers in Immunology*, *6*, 260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00260>
- Wang, M., Yao, L. C., Cheng, M., Cai, D., Martinek, J., Pan, C. X., Shi, W., Ma, A. H., De Vere White, R. W., Airhart, S., Liu, E. T., Banchereau, J., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Shultz, L. D., Palucka, K., & Keck, J. G. (2018). Humanized mice in studying efficacy and

- mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB Journal*, 32(3), 1537-1549. <https://doi.org/10.1096/fj.201700740R>
- Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., & Ma, J. (2018). S100A8/A9 in inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9, 1298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>
- Watanabe, Y., Takahashi, T., Okajima, A., Shiokawa, M., Ishii, N., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Minegishi, M., Minegishi, N., Tsuchiya, S., & Sugamura, K. (2009). The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *International Immunology*, 21(7), 843-858. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp050>
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7-24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., Wang, S., & Zhang, L. (2017). Human blood CD1c⁺ dendritic cells encompass CD5^{high} and CD5^{low} subsets that differ significantly in phenotype, gene expression, and functions. *Journal of Immunology*, 198(4), 1553-1564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600193>
- Zaneti, A. B., Yamamoto, M. M., Sulczewski, F. B., Almeida, B. D. S., Souza, H. F. S., Ferreira, N. S., Maeda, D., Sales, N. S., Rosa, D. S., Ferreira, L. C. S., & Boscardin, S. B. (2019). Dendritic cell targeting using a DNA vaccine induces specific antibodies and CD4(+) T cells to the dengue virus envelope protein domain III. *Frontiers in Immunology*, 10, 59. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00059>
- Zheng, Y., Manzotti, C. N., Liu, M., Burke, F., Mead, K. I., & Sansom, D. M. (2004). CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 172(5), 2778-2784. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2778>
- Ziegler-Heitbrock, H. W., & Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today*, 14(3), 121-125. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90212-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90212-4)
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご高配を賜りました、早稲田大学 理工学術院 竹山春子教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、副査をつとめてくださいました早稲田大学 理工学術院 大島登志男教授、仙波憲太郎教授に深く感謝いたします。

また、これまでの研究活動に際し、多くのご協力ならびに助言をいただきました、国立感染症研究所 免疫部 高橋宜聖部長、寺原和孝主任研究官、東京工科大学 医療保健学部 横田恭子教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究にご協力いただきました、
早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構 細川正人博士、松永浩子博士、
早稲田大学竹山研究室 井手圭吾氏、我妻竜太氏
に深く感謝の意を表します。

最後に、これまで支えてくれた常に支えてくれた家族、友人、生命医科学専攻、国立感染症研究所 免疫部の皆様に心より感謝いたします。

令和3年1月
岩渕 龍太郎

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.