

博士論文審査報告書

論 文 題 目

ヒト化マウスにおける
ヒト樹状細胞亜集団の性状・機能の解析

Characterization of properties and functionality of
human dendritic cell subpopulations in humanized mice

申 請 者

岩渕	龍太郎
Ryutaro	IWABUCHI

生命医科学専攻 生命分子工学研究

2021年2月

1. 博士論文の構成と概要

樹状細胞は免疫の誘導において中心的な役割を担う細胞である。生体の樹状細胞の性状・機能に関する研究は、ヒト細胞を用いた実験が困難なことを理由に、主にマウスを用いて行われてきた。しかし DC3 と呼ばれる新たな樹状細胞亜集団は、ヒトで存在が確認されている一方で、マウスでは同一細胞亜集団が確認されていない。そのため生体内の DC3 に関する知見は不足しており、生体内での DC3 の動態を解析可能な動物モデルが必要とされている。生体内にヒト免疫系を構築したヒト化マウスは、ヒト樹状細胞を解析可能なモデルとして様々な分野で活用されている。しかし、ヒトと比べた場合、樹状細胞の分化能が低いという課題が存在し、DC3 が分化しうるか否かについても不明である。そこで本論文では、ヒト樹状細胞の分化向上を目指した新しいヒト化マウスモデルを作製し、分化した樹状細胞亜集団の性状・機能を解析することで、ヒト化マウスで DC3 が分化しうるか検証した。

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

第 2 章では、ヒトサイトカインの導入によりヒト樹状細胞亜集団の分化が向上したヒト化マウスの作製を行った。本研究では、樹状細胞の分化を促進するために必須のサイトカインと考えられる FLT3L と GM-CSF を組み合わせることでヒト化マウスに導入した。その結果、ヒトの主要な樹状細胞亜集団である CD141⁺ 骨髄系樹状細胞(cDC1)および CD1c⁺ 骨髄系樹状細胞(cDC2)と類似した表現型・形態を示す、CD141⁺ 細胞および CD1c⁺ 細胞の分化の向上と成熟化が認められた。さらに、これらは T 細胞に対する増殖刺激能を有する樹状細胞であることが認められた。興味深いことに、本章で作製したヒト化マウスで分化が向上した樹状細胞亜集団の中には、従来の樹状細胞の定義では cDC1 や cDC2 に分類されない、単球関連のマーカー分子である CD14 を発現する細胞が認められた。

第 3 章では、第 2 章で作製した FLT3L・GM-CSF 発現ヒト化マウスにおいて、DC3 が分化しうるか検証した。DC3 は樹状細胞の系統でありながら単球関連のマーカー分子である CD14 を発現することが近年報告されている。そこで、第 2 章で報告した CD14⁺ 細胞が DC3 と同等の樹状細胞であるか否か検証した。表現型の解析を行った結果、CD14⁺CD1c⁺ 細胞は DC3 と類似した表現型を示した。また、CD14⁺CD1c⁺ 細胞はナイーブ CD4⁺ T 細胞を機能的な IFN- γ ⁺ ヘルパー T 細胞へと分化誘導し、近年報告された DC3 の機能と一致した。さらにトランスクリプトーム解析より、CD14⁺CD1c⁺ 細胞で特徴的な転写産物は DC3 と一致した。これらの結果から、ヒト化マウスの CD14⁺CD1c⁺ 細胞はヒトで見られる DC3 と同等の樹状細胞亜集団であることが明らかとなった。

第 4 章では、研究全体の総括と今後の展望について記載した。今後生体内での DC3 の分化機序、分化後の生体内動態や病原体感染における DC3 の生理学的意義を解析する上で、本ヒト化マウスモデルの活用が期待される。

2. 公聴会審査内容

2020年11月5日に行われた予備審査会での質疑応答を踏まえて2021年1月6日に公聴会を開催した。公聴会では、申請者から博士論文の内容の説明が行われ、質疑応答が行われた。その概要を以下に記載する。

- 1) (第2・3章) データの統計解析について、他群間の比較における多重検定を2種類使い分けている際の基準について質問があった。これに対し、Brown-Forsythe検定によるデータの分散性評価に基づき、パラメトリック検定としてHolm-Sidak's multiple comparison test、ノンパラメトリック検定としてDunn's multiple comparison testを使用した(副査による補足説明あり)。また、使用したこれらの多重検定は、使用した統計解析ソフトGraphPad Prismに付属の統計解析ガイドに従い選択したと説明がされた。
- 2) (第3章) トランスクリプトーム解析の主成分分析の結果について、第一主成分でヒト化マウスのCD14⁺CD1c⁺細胞とヒトのDC3が完全には一致していない理由について質問があった。これに対し、2020年に発表された他グループの論文では、ヒト末梢血の樹状細胞と比較して、ヒト化マウスで分化誘導された樹状細胞では、細胞活性化に関わる遺伝子の発現上昇など、ヒト化マウス特有の遺伝子発現パターンが存在することが報告されているとの説明があった。このため、本研究のヒト化マウス由来CD14⁺CD1c⁺細胞とヒトDC3の遺伝子発現の差は、ヒト化マウスに由来する分化環境の違いを反映している可能性があるとの説明がされた。
- 3) (第3章) 2. の説明に関連して、ヒト化マウスモデルをDC3の機能解析のために使う場合、ヒト遺伝子発現との違いを考慮する必要があるのかという質問があった。これに対し、本点は重要なポイントで十分に考慮すべきであるとの説明がされた。ただし、本ヒト化マウスモデルは、例えば組織の局在の違いがもたらすDC3の機能の違いなど、ヒトでは容易には検討できないことについて基礎的な知見を得るには有用であることについて、追加の説明があった。
- 4) (第3章) cDC1やcDC2を残したまま、ヒト化マウスでDC3を選択的に除去するためにはどうすればよいか質問があった。これに対し、本研究のCD14⁺CD1c⁺細胞のRNA-Seqの解析結果や、他の研究のDC3のシングルセルRNA-Seq(scRNA-Seq)の解析結果から、DC3特異的なマーカーが見つからないため、現状ではDC3を特異的に除去することは難しいとの説明があった。
- 5) 4. の説明に関連して、今回の研究ではCD14⁺CD1c⁺細胞のbulk RNA-Seqでは特異的なマーカーを見出すことができなかったが、今後scRNA-Seqをすることで見出すことは可能なのかという質問があった。これに対して、ヒト化マウスのCD14⁺CD1c⁺細胞を用いてscRNA-Seq解析を行うことにより、特異的なマーカーが見出せる可能性はあるとの説明があった。

6) (第3章) 第3章で示した結果のみで、ヒト化マウスで DC3 が存在すると広く受け入れられるものなのかという質問があった。これに対して、表現型・機能性・遺伝子発現の3点で DC3 と類似した CD14⁺CD1c⁺ 細胞が分化していることは実験的に証明できているため、ヒト化マウスで DC3 が存在することはある程度受け入れられると考えているとの説明があった。

7) (第3章) 6. の説明に関連して、DC3 の絶対的なマーカーとなる転写因子などのマスターレギュレーターを探索する必要について、検討の余地があるかどうか質問があった。これに対し、これまで DC3 特異的な転写因子が見出されていないため、現状ではヒト化マウスの DC3 との比較検討は困難であること、また今後ヒト DC3 のマスターレギュレーターが明らかになった際には確認する必要があると説明がされた。

8) (第4章) まとめの図 (Fig. 4) の説明文章をタイトルの下に追記すべきとコメントがなされた。これに対し、本文中の内容を端的にまとめた説明文章を追記する旨回答があった。

以上の研究内容の報告と質疑応答を通じ、申請者が本研究の意義と結果、また本研究に関連する研究内容に対して十分な学識を有していると審査員全員の一致する意見として判断した。質疑応答の際に、追記すると回答された説明文章に関し、適切であることも確認された。本研究成果は、一部の内容はすでに国際学術誌にて論文発表されているとともに、未発表部分も論文投稿中であり、研究の質・量の点でも申し分ないと考えられる。以上の理由から、本論文が博士(理学)の学位論文として相応しいと判断した。また、最終的な学位論文には、剽窃など研究不正がないことも確認した。

2021年1月

審査員

主査

高橋宜聖 国立感染症研究所免疫部部長・早稲田大学客員教授

博士(農学) 東京大学

副査

竹山春子 早稲田大学教授 博士(工学) 東京農工大学

大島登志男 早稲田大学教授 医学博士 山梨医科大学

仙波憲太郎 早稲田大学教授 理学博士 東京大学

寺原和孝 国立感染症研究所免疫部主任研究官

博士(農学) 東北大学