

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04717

研究課題名(和文) 分化リプログラム技術を用いたマウス及びヒト貪食細胞の樹立とその応用

研究課題名(英文) Establishment and application of mouse and human phagocytes using differentiation reprogram

研究代表者

小内 伸幸 (Onai, Nobuyuki)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50323605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞は、従来型樹状細胞(cDC)と形質細胞様樹状細胞(pDC)に大別される。本研究では、pDC分化に重要な転写因子E2-2を可視化するマウスを用いて、DC前駆細胞からE2-2high細胞を発見した。E2-2high細胞はリンパ組織においてpDCのみに分化したが、小腸ではpDCのみならずcDCへと分化した。この分化転換は小腸で産生されているcサイトカインによって誘導された。E2-2high細胞由来のcDCは制御性T細胞の誘導能力を有していた。同T細胞は小腸における免疫寛容を維持していることが報告されており、E2-2high細胞由来のcDCは腸管組織恒常性維持に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs) are consisted conventional DCs and plasmacytoid DC (pDCs) which have antigen presentation capacity and type-I interferon producing capacity, respectively. In this study, we generate E2-2 reporter mouse which is essential transcription factor for pDC development. Using this mouse, we identified E2-2high and E2-2lo cells in the common DC progenitor (CDPs). E2-2highCDPs develop only pDC in vivo in the spleen, however, in the small intestine, some E2-2highCDPs develop into cDC. This trans-differentiation is mediated by IL-3, IL-5, GM-CSF (all enriched in the gut tissue). In ex vivo cultures with Flt3L+GM-CSF, E2-2highCDPs derived cDCs, but not pDCs, induce Foxp3+ Treg. E2-2 is therefore important in committing pDC differentiation but conversion to cDCs can occur in the intestine and modulate regulatory environment there.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 前駆細胞 転写因子 分化

1. 研究開始当初の背景

単核貪食細胞系統(mononuclear phagocyte system: MPS)は樹状細胞、単球、マクロファージから構成され、あらゆる組織に存在している。これら単核性貪食細胞は、分化的及び機能的可塑性を持ち、免疫反応、組織の修復、分化、恒常性維持に重要な役割を担っている。このため、その機能を生かした治療や創薬の標的として期待されている。しかしながらこれらの細胞は生体内で数が少なく且つ増殖能がほとんどないため扱いにくい。樹状細胞(dendritic cell: DC)は最も強力な抗原提示能力を有し、且つ自然免疫及び獲得免疫を始動させる重要な免疫担当細胞である。このDCは抗原提示能力に優れ、抗原特異的T細胞の活性化を誘導する従来型DC(conventional DC: cDC)と病原性微生物や自己の核酸成分を認識して大量のI型インターフェロンを産生する形質細胞様DC(plasmacytoid DC: pDC)に大別される。cDCに癌抗原をパルスし生体に戻す免疫療法は広く行われているが、期待される成果は得られていない。一方で、pDCはI型インターフェロンを大量に産生する特徴から、全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus: SLE)や乾癬治療の標的として期待されている。

単球及びマクロファージは強力な貪食能を持ち、アポトーシス細胞を貪食消化して生体の恒常性を維持している。このアポトーシス細胞の除去システムが破綻すると自己免疫疾患を発症する。マウス単球はLy6c⁺単球とLy6c⁻単球から構成され、*Listeria monocytogenes* (Mo)感染時にはLy6c⁺Moは感染部位に浸潤し、TNF- α やNOを産生して*Listeria Mo.*を除去している。

これらDCや単球は寿命が短いため、造血幹細胞から前駆細胞を経由して分化・供給されている。代表者はDC分化に重要なサイトカイン受容体の発現を指標に多重染色を行い、マウスの骨髄からDCサブセットのみに分化し、他の系列細胞へは分化しない共通DC前駆細胞(common DC progenitor: CDP)を世界に先駆けて同定した(Nat. Immunol., 8: 1207-1216, 2007; Immunity, 38: 943-957, 2013)。このCDPはその優れたDC分化能と一致するように造血幹細胞や他の前駆細胞と比較して、DC分化に重要な転写因子を高度に発現していた。一方で、Fogらはケモカイン受容体CX₃CR1^{GFP/+}

レポーターマウスを用いて単球、マクロファージ及びDCサブセットへと分化するMDP(macrophage and DC progenitor)を同定した。また、最近、HettingerらはMo/M Φ 分化に必要なサイトカインM-CSF(macrophage colony stimulating factor)受容体の発現を指標に、マウス骨髄中のCDPとMDPを含まない分画に着目し、Ly6c⁺、Ly6c⁻単球のみに分化するcMoP(common monocyte progenitor)を同定した。このcMoPは単球由来樹状細胞や単球由来マクロファージへと分化する。これらCDP、MDP及びcMoPは強力な増殖能を持ち(特にCDPは1個の前駆細胞から500~1000個のDCへと分化する)、MPSの供給・採取源としては優れている。このように単核貪食細胞やこれらの前駆細胞は、その機能を生かした免疫細胞療法や病態における創薬の標的として期待されているが、単核貪食細胞にはほとんど増殖能がなく、且つ前駆細胞は骨髄のみに存在し、末梢組織にはほとんど存在せず扱いにくい点大きな問題である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これら単核貪食細胞分化に重要な転写因子をIrf8とE2-2のレポーターマウスを用いて単核貪食細胞の分化制御機構を明らかにし、且つIrf8を過剰発現され分化リプログラムを誘導して分化培養系を樹立することを目的とする。本研究成果により、分化制御機構の解明、リプログラム技術を元にした単核貪食細胞を分化誘導させる方法は他の血液細胞分化へ応用可能であり、この分野における学術的な意義は非常に高い。

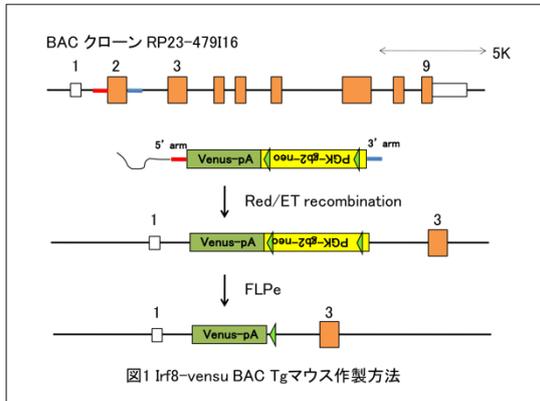
3. 研究の方法

(1) Irf8-venus BACトランスジェニックマウスの作製

本研究では、分化リプログラムが誘導されたかどうか評価するために、CD8 α ⁺従来型樹状細胞(conventional dendritic cell: cDC)の分化に必須転写因子Irf8のレポーターマウス(Irf8-venus-BAC)をBACテクノロジーを用いて作製した。Irf8のエクソン2の5'及び3'領域を組み込んだ組み替えVenus-PGK-Neo vectorとIrf8の遺伝子発現制御領域を含むBACクローン(RP23-479I16)を大腸菌に導入し、Red/ET相同組み替えを誘導する(図1)。さらに、FLPeを導入することでPGK-Neo

遺伝子を除去し、BAC コンストラクトを作製した。この Irf8-Venus BAC コンストラクトを C57BL/6J マウス由来の受精卵にインジェクションしマウスを作製した。

Tg マウスは定量的 PCR 方法にて判定し、内在性 Irf8 の発現と Venus 発現レベルが相関する系統を選択した。



(2) 樹状細胞サブセット及び前駆細胞における Irf8-Venus 発現レベルの検討。

Irf8-Venus Tg マウスの脾臓及び骨髄から細胞懸濁液を調整し、樹状細胞サブセット及び樹状細胞前駆細胞である CDP における Irf8-Venus 発現レベルをフローサイトメーターによって検討する。

(3) Irf8-Venus 陽性 CDP の *in vitro* における分化能の検討

Irf8-Venus⁺CDP 細胞分画をセルソーターにて純化し、*in vitro* において Flt3 リガンドを用いて培養し、各樹状細胞サブセットへの分化能を検討する。また、純化した Irf8-Venus⁺CDP を各造血系サイトカインを含むメチルセルロース培地 M-3434 にて培養し、*in vitro* コロニー形成実験を行い、各系列細胞への分化能を検討する。

(4) Irf8-Venus 陽性 CDP の *in vivo* における分化能の検討

Irf8-Venus⁺CDP 細胞分画をセルソーターにて純化し、致死量の X 線を照射した B6・SJL マウス (CD45.1⁺) に移植し、移植後の脾臓における Irf8-Venus⁺CDP 由来の細胞の細胞表面マーカーを解析することで *in vivo* における分化能を検討する。

(5) Irf8 遺伝子を骨髄前駆細胞に過剰発現させ、樹状細胞サブセットへの分化能を検討する。

Irf8 遺伝子をレトロウイルスベクター (pMYS-IRES-EGFP) に組み込み造血前駆細胞に

遺伝子導入し、樹状細胞サブセットへの分化能を検討する。また、Irf8 遺伝子を導入した前駆細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成して、各樹状細胞サブセットの分化関連遺伝子発現を定量的 PCR 方法によって検討する。

(6) 樹状細胞サブセット及び前駆細胞における E2-2-Kusabiraorange (KuOr) 発現レベルの検討。

Irf8-KuOr Tg マウスの脾臓及び骨髄から細胞懸濁液を調整し、樹状細胞サブセット及び樹状細胞前駆細胞である CDP における E2-2-KuOr 現レベルをフローサイトメーターによって検討する。

(7) E2-2-KuOr 陽性 CDP の *in vitro* における分化能の検討

E2-2-KuOr⁺CDP 細胞あるいは E2-2-KuOr⁻CDP 細胞分画をセルソーターにて純化し、*in vitro* において Flt3 リガンドを用いて培養し、各樹状細胞サブセットへの分化能を検討する。また、純化した E2-2-KuOr⁺CDP 細胞あるいは E2-2-KuOr⁻CDP 細胞を各造血系サイトカインを含むメチルセルロース培地 M-3434 にて培養し、*in vitro* コロニー形成実験を行い、各系列細胞への分化能を検討する。

(8) E2-2-KuOr 陽性 CDP の *in vivo* における分化能の検討

E2-2-KuOr⁺CDP 細胞あるいは E2-2-KuOr⁻CDP 細胞分画をセルソーターにて純化し、内在性の樹状細胞を除去した B6SJL-CD11c-DTR-Flt3 マウス (CD45.1⁺CD45.2⁺) に移植し、移植後の脾臓、リンパ節あるいは小腸におけるそれぞれの前駆細胞由来の細胞の細胞表面マーカーを解析することで *in vivo* における分化能を検討する。

(9) 各組織におけるサイトカイン発現の検討

骨髄、脾臓、脳、肝臓、腎臓、小腸、大腸から RNA を抽出し、cDNA を合成して β c サイトカイン (IL-3, IL-5, GM-CSF) の遺伝子発現を定量的 PCR 方法によって検討する。

(10) E2-2-KuOr⁺CDP 由来の樹状細胞の機能解析

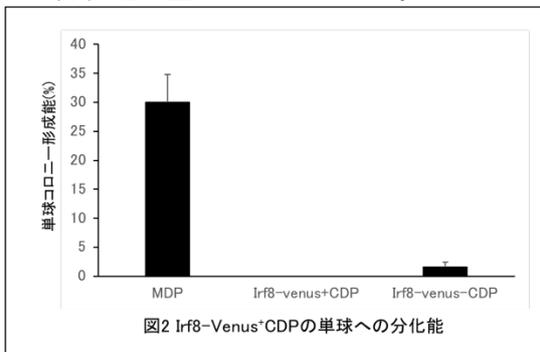
E2-2-KuOr⁺CDP を Flt3 リガンドと GM-CSF を用いて培養し、従来型樹状細胞を分化誘導させ、ALDH 活性をフローサイトメーターにて解析した。また、オボアルブミンを認識する T 細胞受容体を発現する OT-II マウスからナイーブ T 細胞を精製し、オボアルブミンペプチド、TGF- β 及び IL-2 存在下で E2-2-KuOr⁺CDP 由

来の樹状細胞と共培養し、制御性 T 細胞への分化能を転写因子 Foxp3 の細胞内染色を行うことで検討した。

4. 研究成果

(1) 作製した Irf8-venus マウスを用いて、venus の発現を各 DC サブセットや、骨髄中の共通 DC 前駆細胞 (common DC progenitor: CDP) 中の venus の発現レベルを検討したところ、全ての CD8⁺ cDC が Irf8-Venus 陽性であり、CD11b⁺ cDC は Irf8 陰性であった。また、15%の CDP が Irf8-venus 陽性であった。

この Irf8-venus⁺CDP を純化し、*in vitro*にて Flt3 リガンドを用いて 8 日間培養したところ、CD8⁺ cDC のみへと分化し、他の DC サブセットには分化しなかった。さらに同細胞をメチルセルロース培地 M-3434 にて培養し、*in vitro*コロニー形成実験を行ったところ、単球への分化能は全くなかった (図 2)。

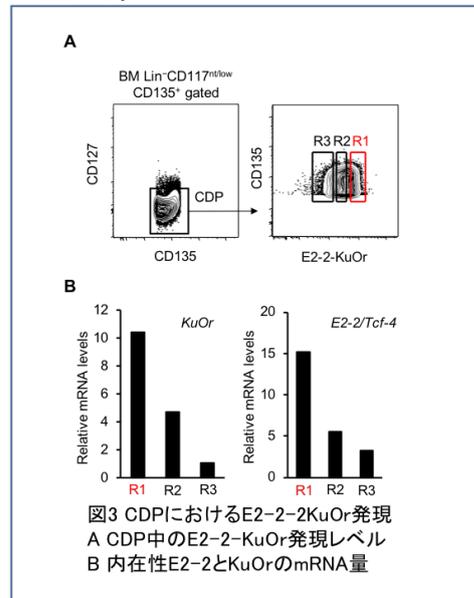


(2) *in vivo*における分化能を検討するために Irf8-venus⁺CDP を純化し、X 線照射したマウスに移植した。移植から 8 日後の脾臓における細胞を検討したところ、*in vitro*培養実験と同様に Irf8-venus⁺CDP 由来の細胞は CD8⁺ cDC 相当の細胞である CD24⁺ cDC のみに分化し、他の DC サブセット及び他系列細胞へは分化しなかった。これらの結果から、Irf8-venus⁺CDP は CD8⁺ cDC にコミットした前駆細胞であることが示唆された。

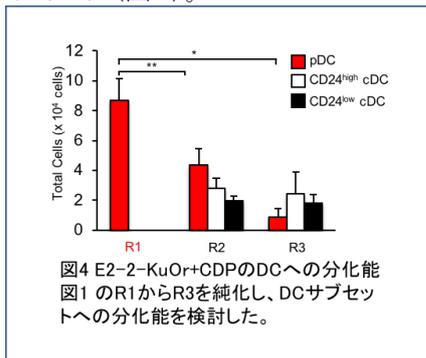
(3) レトロウイルスベクター pMYS-IRES-EGFP を用いて Irf8 を造血幹細胞や前駆細胞が濃縮された骨髄の Lin⁻kit⁺細胞に導入し、Flt3 リガンドを用いて培養したところ、CD8⁺ cDC への分化能が増強された。さらに Irf8⁺CDP 及び Irf8 を導入した Lin⁻kit⁺細胞における樹状細胞分化関連遺伝子の発現を定量的 PCR 方法にて検討したところ、Batf3 及び Id2 といった CD8⁺ cDC 分化に重要な転写因子の発現が増加し、E2-2、Spi-B といった

pDC 分化に重要な転写因子、Irf4、RelB、E2-2 といった CD8⁻ cDC 分化及び pDC に重要な転写因子の mRNA 発現が減少していた。これらの結果から転写因子 Irf8 単独過剰発現によって、CD8⁺ cDC への分化リプログラムが誘導されていることが示唆された。

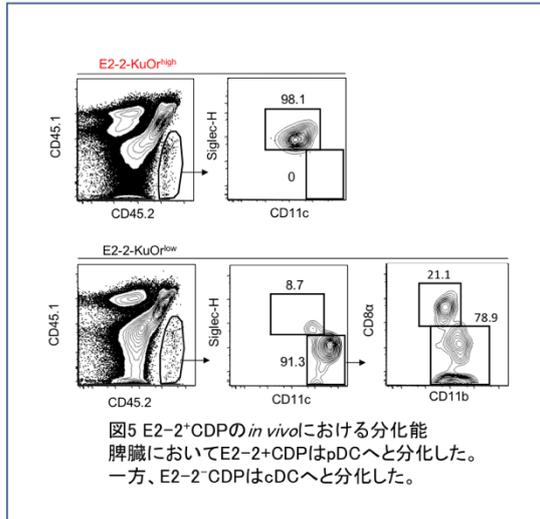
(4) 我々は BAC テクノロジーを用いて pDC 分化に必須転写因子 E2-2 のレポーターマウス、E2-2-kusabiraorange (KuOr) -BAC トランスジェニックマウスを作製した。この Tg マウスの各細胞における E2-2-KuOr 発現レベルを検討したところ、pDC で有意な発現が認められ、E2-2 陽性細胞が可視化可能であることが明らかになった。そこで CDP における E2-2 発現を検討したところ、E2-2⁺CDP と E2-2⁻CDP を見出した (図 3A)。またこのレポーター遺伝子 E2-2-KuOr は内在性 E2-2 の発現量と相関していた (図 3B)。



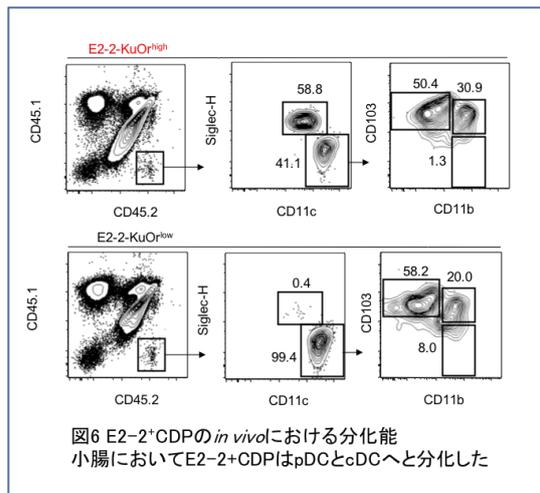
またこれら E2-2⁺CDP (R1)、E2-2^{int}CDP (R2)、E2-2⁻CDP (R3) を純化し、DC サブセットへの分化能を検討したところ、E2-2⁺CDP は pDC のみに分化し、一方で E2-2⁻CDP は主に cDC へと分化し、pDC への分化能は E2-2 発現レベルと相関していた (図 4)。



(5) さらに E2-2⁺CDP を純化し、内在性の樹状細胞を除去したマウスに移植し、*in vivo* における分化能を検討した。この結果、定常状態の脾臓やリンパ節においても E2-2⁺CDP pDC のみに分化し、E2-2⁺CDP は主に cDC へと分化した(図 5)



大変興味深いことに、非リンパ組織である小腸ではこの E2-2⁺CDP は pDC のみならず cDC へと分化した(図 6)。



この pDC から cDC への分化転換は小腸にて高度に発現している β c サイトカイン IL-3, IL-5, GM-CSF によって誘導されていることが明らかになった。小腸がこれら β c サイトカイン IL-3, IL-5, GM-CSF を他の臓器(骨髄、脾臓、肝臓、腎臓、脳など)と比較して高度に発現していることを定量的 PCR にて確認して入り。すなわち E2-2⁺CDP を移植したマウスに β c サイトカイン IL-3, IL-5, GM-CSF 中和抗体を投与したり、 β c サイトカイン受容体遺伝子欠損マウス (E2-2-KuOr/Csf2rb^{-/-}マウス) から E2-2⁺CDP を単離し、移植したところ、小腸における pDC から cDC への分化転換が著しく

抑制された。さらに、E2-2⁺CDP 由来の cDC は ALDH 活性を有し、*ex vivo* においてナイーブ CD4⁺T 細胞からは Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導能力を有していた。この制御性 T 細胞は小腸における免疫寛容維持に重要なことが報告されており、E2-2⁺CDP 由来の cDC は腸管組織恒常性維持に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Onai N, Asano J, Kurosaki R, Kuroda S, Ohteki T. Flexible fate commitment of E2-2^{high} common DC progenitors implies tuning in tissue microenvironments. *Int Immunol* 29: 443-456, 2017 (査読有り)
- ② Matsuda K, Okamoto N, Kondo M, Arkwright PD, Karasawa K, Ishizaka S, Yokota S, Matsuda A, Jung K, Oida K, Amagai Y, Jang H, Noda E, Kakinuma R, Yasui K, Kaku U, Mori Y, Onai N, Ohteki T, Tanaka A, Matsuda H. Mast cell hyperactivity underpins the development of oxygen-induced retinopathy. *J Clin Invest*. 127:3987-4000, 2017 (査読有り)
- ③ Asano J, Sato T, Ichinose S, Kajita M, Onai N, Shimizu S, Ohteki T. Intrinsic Autophagy Is Required for the Maintenance of Intestinal Stem Cells and for Irradiation-Induced Intestinal Regeneration. *Cell Rep* 20:1050-1060, 2017 (査読有り)
- ④ Kawamura S, Onai N, Kurabayashi K, Sato T, Miya F, Tsunoda, T, Yotsumoto S, Kuroda S, Takenaka K, Akashi K, Ohteki T. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential - a counterpart of mouse cMoPs. *Immunity* 45: 835-848, 2017 (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nobuyuki Onai and Toshiaki Ohteki.

Identification of Flt3-ligand producing cells by generating Flt3-ligand mCherry reporter mouse. 5th Annual Meeting of the international Cytokine and Interferon Society. 2017

- ② Toshiki Yabe-Wada, Shintaro Matsuba, Kazuya Takeda, Akira Nakamura, Haifeng Shi, Caroline C. Philpott, Nobuyuki Onai. Involvement of poly-rC binding proteins in posttranscriptional regulation of Sortilin, the cytokine trafficking mediator. 5th Annual Meeting of the international Cytokine and Interferon Society. 2017
- ③ Nobuyuki Onai and Toshiaki Ohteki. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2017
- ④ Shintaro Matsuba, Toshiki Yabe-Wada, Kazuya Takeda, Nobuyuki Onai, Toshiyuki Takai, Akira Nakamura. SLPI negatively regulates LPS-induced eosinophil activation via inhibition of Elk-1 phosphorylation. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2017
- ⑤ Nobuyuki Onai, Junpei Asano, Shoko Kuroda, and Toshiaki Ohteki. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. 第27回日本樹状細胞研究会. 2017年
- ⑥ 和田 俊樹、松葉 慎太郎、小内 伸幸. ポリC結合蛋白質による Sortilin の転写後発現制御機構. 第40回日本分子生物学会 2017

[その他]

ホームページ等

http://www.kanazawa-med.ac.jp/~serol/Immunology/Top_Page.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小内 伸幸 (ONAI, Nobuyuki)

金沢医科大学・医学部・教授