

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15150

研究課題名(和文) ヒトDC前駆細胞、ヒト単球前駆細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of human DC and monocyte progenitors

研究代表者

橋木 俊聡 (OHTEKI, Toshiaki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：定常状態ならびに炎症状態において、樹状細胞及び単球/マクロファージは生体防御や組織炎症病態に関与する。マウスでは、先に、単球のみへの分化能を有する共通単球前駆細胞(cMoP)が同定されていた。本研究では、ヒトcMoPの同定に成功した。ヒトcMoPは、臍帯血や骨髄に存在する従来型顆粒球・単球前駆細胞(cGMP)の中の亜集団(CLEC12A高発現CD64高発現)として同定され、単球のみへの分化能を示し他のミエロイド細胞やリンパ球へは分化しなかった。また、cGMP中に、樹状細胞やリンパ球への分化能を示さない修正型GMPを同定することにも成功した。ヒトミエロイド細胞分化経路を書き換える研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells and monocytes/macrophages are critically involved in host defense and tissue pathology under steady-state and inflammatory conditions. A common monocyte progenitor (cMoP) that is strictly committed to the monocyte lineage has been recently identified in mice. In this study, we identified human cMoPs as a CLEC12A^{hi}CD64^{hi} subpopulation of conventional granulocyte-monocyte progenitors (cGMPs) in umbilical cord blood and in bone marrow. Human cMoPs gave rise to monocyte subsets without showing any potential for differentiating into myeloid or lymphoid cells. Within the cGMP population, we also identified revised GMPs that completely lacked DC and lymphoid potential. Our findings expand and revise the current understanding of human myeloid cell differentiation pathways.

研究分野：免疫学

キーワード：ヒトcMop 単球/マクロファージ cGMP rGMP

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DC) は生体内で最も強力な抗原提示能をもつ細胞であり、ナイーブ T 細胞の活性化に必要な細胞である (Annu Rev Immunol 23, 275 (2005))。単球は様々な組織に移入し、定常状態では組織マクロファージへと分化して多種多様な機能により組織恒常性の維持に寄与する一方で、炎症状態では、様々な組織の炎症病態構築にも関与する。両者ともに骨髄中の造血幹細胞 (HSC) より発生し、前駆細胞が段階的・連続的に分化・増殖することで供給される。我々は、マウスにおいて DC のみを生み出す共通 DC 前駆細胞 (common DC progenitor, CDP) の同定に成功してきた (Immunity 38, 943 (2013); Nat Immunol 8, 1207 (2007))。また近年、マウスにおいて Ly6c^{hi} 単球と Ly6c^{lo} 単球を生み出す共通単球前駆細胞 (common monocyte progenitor, cMoP) も同定された (Nat Immunol 14, 821 (2013))。マウス cMoP は DC と単球を供給する前駆細胞である単球-DC 前駆細胞 (MDP) から由来することが証明されている。一方、ヒトにおける DC や単球の前駆細胞は未同定であった。

2. 研究の目的

これらの研究背景並びに研究成果に基づき、本研究では、ヒト DC や単球/マクロファージ前駆細胞を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) サンプル

日本赤十字血液センターより分与されたヒト臍帯血を主な研究材料として、必要に応じてヒト骨髄細胞や末梢血を用いた。全てのヒトサンプルはインフォームドコンセントを取得後に実験に供した。

(2) フローサイトメーターによる細胞分離

それらサンプル中の前駆細胞を含む白血球分画を遠心分離後、さまざまな蛍光色素標識抗体で染色して、セルソーターで単離精製した。

(3) 細胞培養、解析

コロニーアッセイ系や我々の構築した ex vivo ミエロイド細胞培養系 (huFlt3L, thrombopoietin (TPO), stem cell factor (SCF) を添加) を駆使して、各々の前駆細胞の分化能を検討した。また、T 細胞分化能の評価には TST4/DLL4 ストローマと huFlt3L/IL-7 を、B-NK 細胞には、TST4 と huSCF, huIL-7, huTPO, huIL-2 を用いた。必要に応じて、細胞周期解析、単一細胞培養、食能解析、ELISA kit によるサイトカイン測定等を行った。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

cMoP を含む上下流の前駆細胞並びに単球

を用いて網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ)、バイオインフォマティクス解析を行った。

すべての研究計画は、東京医科歯科大学の倫理審査委員会承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 従来型顆粒球-単球前駆細胞 (cGMP) は 4 つの亜集団に分類できる

ヒト血球分化研究において、これまでにミエロイド系細胞の前駆細胞として共通ミエロイド前駆細胞 (CMP)、赤芽球系前駆細胞 (MEP)、そして従来型-顆粒球/単球前駆細胞 (cGMP) が同定されてきた。そして近年、ヒト DC と単球を供給する前駆細胞である単球-DC 前駆細胞 (MDP) も同定され、この発見によって単球への分化能をもつヒト cMoP の存在が示唆された。

我々は、ヒト CDP や cMoP を同定することを目的として、臍帯血由来の cGMP を複数の分画に分け得るさまざまな細胞表面マーカーをスクリーニングした。その結果、c-type lectin である CLEC12A と Fc γ 受容体である CD64 を用いると cGMP が 4 つの分画、即ち CLEC12A^{hi}CD64^{hi} (R2)、CLEC12A^{hi}CD64^{int} (R3)、CLEC12A⁺CD64⁻ (R4)、CLEC12A⁻CD64⁻ (R5) に別れることを見出した (図 1)。また、我々は幹細胞マーカーである CD34 が陰性の分画に CLEC12A^{hi}CD64^{hi} (R2) と非常によく似た表現系を持つ細胞集団 (R1) を同定した。これら R1~R5 までの集団は臍帯血中のみならずヒト骨髄にも認められたが、末梢血中には検出されなかった。

次に、R1~R5 に含まれる細胞のおおまかな分化能とその増殖能を確かめるためにメチルセルロース培地を用いたコロニーアッセイを行なった。その結果、R2 と R5 はマクロファージコロニー (M) のみを作るようなクローンで構成されており、R3 と R4 は M コロニー、顆粒球コロニー (G) そして GM コロニーを形成するようなクローンで構成されていることが明らかになった。また、R1 はコロニーを作らず、増殖能を持たない細胞集団で構成されていることが示唆された。以上の結果により、cGMP は CLEC12A と CD64 によって 4 つの亜集団に分類できることがわかり、各々の亜集団はそれぞれ異なる分化能を持つ前駆細胞で構成されていることが示唆された。

(2) 共通単球前駆細胞 (cMoP) と修正型 GMP の同定

R1~R5 のより詳細なミエロイド系への分化能を確かめるために、単球、顆粒球、形質細胞様樹状細胞、従来型樹状細胞が分化し得る培養条件を確立し 5 つの細胞集団を培養した。その結果、R1 と R2 からは単球のみが、R3 からは単球と顆粒球が、R4 からは単球、顆粒球、形質細胞様樹状細胞、従来型樹状細胞が、R5 からは単球、形質細胞様樹状細胞、

従来型樹状細胞が分化することがわかった (図1)。

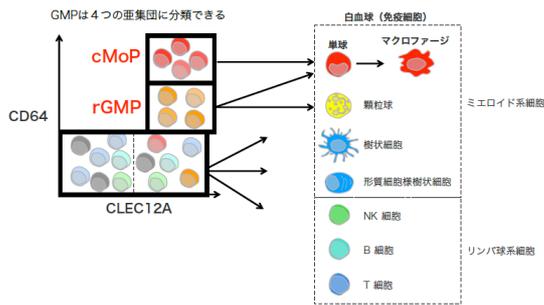


図1 ヒト cMoP, rGMP の同定

次に、cGMP には一部リンパ球への分化能が残っていることが報告されていたため (Nat Immunol 11, 585 (2010))、どの細胞集団にリンパ球への分化能を持つ細胞が含まれているかを確認した。その結果、R1~R3 にはリンパ球への分化能を有する細胞は検出されなかったが、R4 と R5 にはリンパ球の分化能を持つ細胞集団が含まれることが明らかになった (図1)。以上の結果より、我々は、 $CLEC12A^{hi}CD64^{hi}$ (R2) を全てのヒト単球サブセットを産生するヒト共通単球前駆細胞 (common monocyte progenitor: cMoP)、 $CLEC12A^{hi}CD64^{int}$ (R3) を、単球と顆粒球に分化する真の GMP、すなわち rGMP (revised GMP) と各々定義した (図1)。また、既報プレ単球 (J Exp Med 212, 401 (2015)) が R1 と同一の表現系であったことから、R1 はプレ単球であることが示唆された。

(3) cMoP/rGMP 由来 1 細胞がもつ分化能

cMoP と rGMP を構成する細胞集団の 1 細胞からどのような細胞が分化するかを確認するため、cMoP または rGMP に含まれる細胞を 1 細胞レベルで培養し、その分化能を検討した。その結果、cMoP は全ての単球サブセットに分化するクローンで構成され、rGMP は単球に分化するクローン、顆粒球に分化するクローンそして顆粒球と単球に分化するクローンで構成されることが示唆された。以上の結果より、我々が定義した cMoP は 1 細胞レベルでも全ての単球サブセットへの分化能を有する前駆細胞であること、rGMP は 1 細胞レベルで単球と顆粒球のみに分化する現在までには報告のない全く新しい前駆細胞であることが明らかになった。さらに、我々の結果から、マウスとヒトで単球の分化過程がわずかに異なっていることも示唆された。

(4) プレ単球、cMoP、rGMP の分化階層関係と単球の分化経路

プレ単球、cMoP、rGMP 三者間の分化階層関係を明らかにする目的で cMoP と rGMP を 24 時間培養し、それぞれがどの細胞に分化するか検証した。その結果、cMoP からはプレ単球のみが分化し、rGMP からはプレ単球と cMoP が分化した。以上の結果よりこの三者間での

分化階層関係は、rGMP→cMoP→プレ単球の順に分化することが明らかになった (図2)。

次に、我々は単球のより詳細な分化過程を明らかにするためにミエロイド系細胞分化系譜上最上流に位置する CMP (共通ミエロイド前駆細胞)、rGMP、cMoP、プレ単球、cMoP 由来単球、そして末梢血単球を用いて網羅的遺伝子発現解析 (マクロアレイ) を行なった。その結果、約 9000 遺伝子を用いた樹形図階層型クラスタリング解析では CMP→rGMP→cMoP→プレ単球→cMoP 由来単球 (*in vitro* で cMoP を培養し単球に分化させた細胞) →末梢血単球の順に各遺伝子発現パターンが紐付けされた。また、主成分解析を行うと主成分 1 は、クラスタリング解析と同様にして CMP→rGMP→cMoP→プレ単球→cMoP 由来単球→末梢血単球の順に分化することを強く示唆する結果となった。さらに末梢血単球に特徴的な遺伝子群を作成し、GSE (gene set enrichment) 解析を行なった。その結果、rGMP は CMP よりも、cMoP は rGMP よりも、プレ単球は cMoP よりも、そして、cMoP 由来単球はプレ単球よりも、各々単球に特徴的な遺伝子セットをより強く発現していることが明らかになった。以上より、網羅的遺伝子発現解析の結果からも、CMP→rGMP→cMoP→プレ単球→末梢血単球の順番に分化と増殖を繰り返しながら、単球が分化する経路が支持された (図2)。

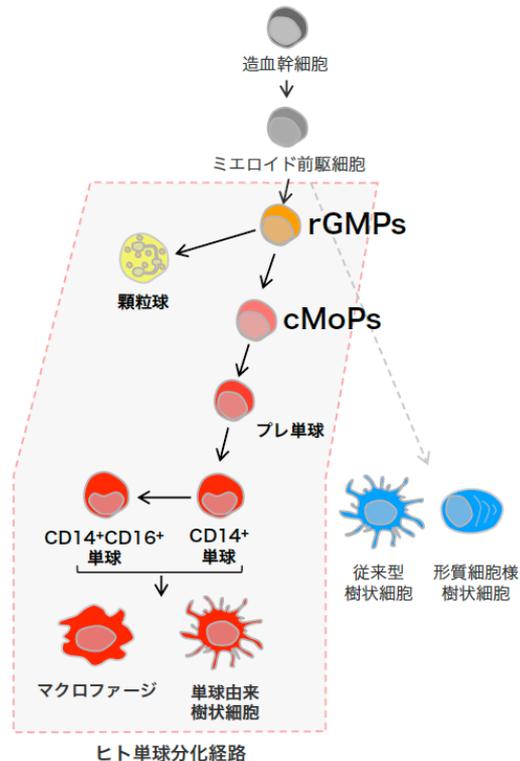


図2 ヒト単球分化経路の解明

(5) マウス cMoP とヒト cMoP の比較

マウスでは cMoP が同定され (Nat Immunol 14, 821 (2013))、疾患における cMoP の挙動やその機能が解析されている。したがって、

ヒト cMoP とマウス cMoP の比較は、ヒトのサンプルではなかなか解析できない部分をマウスの実験系を用いて代替的に解析することが有意義か否かを判断する指標となりうる。そこで我々は、既報のマウス cMoP 網羅的遺伝子発現パターンの中からヒトのホモログを抽出し、それをヒト cMoP の遺伝子発現パターンと比較した。約 5000 遺伝子を用いて樹形図階層型クラスタリング解析を行ったところ、両者間には統計学的に優位な相関性が認められた。ヒト単球とマウス単球ではその分化過程に違いがあるものの、単球に限局した分化能を示す cMoP においては非常によく似た表現系を持つことから、マウス cMoP 由来の単球が関与する疾患モデルにおいて得られた知見をヒトにも応用することができる可能性を与えるものである。

ヒト血液細胞の分化過程は、サンプルの入手が困難なことやその実験系に限界があるため、未詳な点が数多く残っている。またヒトではマウスにおいて未だ確認されていない分化能を持つ細胞なども発見されており、ヒトとマウスの血液分化はある程度の相同性を持ちながらそれぞれに特徴的な過程が存在している。本研究において我々は、ヒト cMoP を同定するために単球-MΦ に発現するマーカー CLEC12A とマーカー CD64 に着目し、これらマーカーを用いることで、ヒト臍帯血または骨髄中の cGMP が四分画に分かれることを見出した。そして、その分画中にヒト cMoP (CLEC12A^{hi}CD64^{hi})、ヒト修正型 GMP (CLEC12A^{hi}CD64^{int}) を同定することに成功した。さらに興味深いことに *ex vivo* の実験結果から、ヒト cMoP は rGMP より供給されることが示されたため、ヒトとマウスにおける単球の分化過程が異なることが示唆された。ヒト cMoP は、単球を経て、炎症性腸疾患では炎症惹起性マクロファージ、骨疾患では破骨細胞、さらに腫瘍組織では腫瘍随伴マクロファージ (TAM) に分化するため、ヒト cMoP を標的とした新規治療法の開発が期待される。

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 6 件)

① Kawamura S, Onai N, Miya F, Sato T, Tsunoda T, Kurabayashi K, Yotsumoto S, Kuroda S, Takenaka K, Akashi K and Ohteki T. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential: a counterpart of mouse cMoP. *Immunity*. 2017 May 16;46(5):835-848. E4. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.019. 査読有

② Onai N, Ohteki T. Isolation of dendritic cell progenitor and bone marrow progenitor cells from mouse. *Methods Mol Biol*. 1423,

53-59 (2016) doi : 10.1007 / 978 - 1- 4939 -3606-9_4 査読有

③ 川村俊輔、樗木俊聡「ヒトにおける共通単球前駆細胞の同定」*ライフサイエンス 新着論文レビュー*(2017) DOI: 10.7875/first.author.2017.048 査読無

④ 川村俊輔、小内伸幸、樗木俊聡「マクロファージの発生・分化」*JSI Newsletter vol.24 No.2 特集「マクロファージ」日本免疫学会会報* p16-16 (2016) 査読無

⑤ 小内伸幸、樗木俊聡「樹状細胞前駆細胞および樹状細胞サブセットのソーティング」*実験医学 別冊 最強のステップ UP シリーズ 新版! フローサイトメトリー*. 羊土社 ISBN-13: 978-4758101967 p229-240, 2016 査読無

⑥ 樗木俊聡「マクロファージ・樹状細胞の起源と多様性」*医学のあゆみ* 259 巻 5 号 マクロファージのすべて p347-352(2016) 査読無

[学会発表] (計 11 件)

① Kawamura S, Onai N and Ohteki T. Identification of human common monocyte progenitors. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム) 2016. 6. 4 御茶ノ水ソラシティ (東京都文京区)

② Nakanishi Y and Ohteki T. Dynamics of clonic macrophages during the development of colitis. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム) 2016. 6. 4 御茶ノ水ソラシティ (東京都文京区)

③ Onai N, Asano J, Nakamura R, Kuroda S and Ohteki T. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム) 2016. 6. 4 御茶ノ水ソラシティ (東京都文京区)

④ Ohteki T. Identification of mononuclear phagocyte progenitors. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第 44 回日本免疫学会学術集会) 2015. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑤ Nakanishi Y and Ohteki T. Dynamics of colonic macrophages during the

development of colitis. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第44回日本免疫学会学術集会) 2015. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑥Kawamura S, Onai N and Ohteki T. Identification of cMoP and bona fide GMP in human umbilical cord blood. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第44回日本免疫学会学術集会) 2015. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑦榑木俊聡「免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞の同定」第22回輸血細胞治療学会シンポジウム 2015. 10. 23 軽井沢プリンスホテル (長野県軽井沢市)

⑧Onai N, Nakamura R and Ohteki. Identification of Flt3-Ligand Producing cells by Generating Flt3-Ligand Mcherry reporter Mouse. 44th International Society for Experimental Hematology (第44回国際実験血液学会) 2015. 9. 17 国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑨Kawamura S, Onai N, Takenaka K, Akashi K and Ohteki T. Identification of Common Monocyte Progenitors, Pre-Monocytes, and Granulocyte Monocyte Progenitors in Human Umbilical Cord Blood. 44th International Society for Experimental Hematology (第44回国際実験血液学会) 2015. 9. 17 国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑩Ohteki T. Identity and flexibility of common dendritic cell progenitor. 4th European Congress of Immunology, 2015. 9. 9 ウィーン (オーストリア)

⑪榑木俊聡「免疫の司令塔、樹状細胞は医療に貢献し得るか？」2014年度クリニカルサミット第2回研究会 (フローサイトメーターの発展的応用の可能性) 2015. 2. 3 東京医科歯科大学 (東京都文京区)

[図書] (計2件)

①小内伸幸、榑木俊聡、大八木秀明、澤田賢一「単球由来樹状細胞による血球貪食と免疫制御」Annual Review 血液 (2015), 143-148 (2015) 中外医学社 285 ページ 2015/01 ISBN-10: 4498125819 ISBN-13: 978-4498125810

②榑木俊聡「樹状細胞の起源」Annual Review 呼吸器 (2015), 55-62 (2015) 中外医学社 252 ページ 2015/01 ISBN-10: 4498130138 ISBN-13: 978-4498130135

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑木 俊聡 (OHTEKI Toshiaki)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：50233200

(2) 連携研究者

小内 伸幸 (ONAI Nobuyuki)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師
研究者番号：50323605