

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 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：15K15386

研究課題名(和文)革新的な単球・マクロファージ系細胞制御法開発への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to development of innovative method to control monocyte/macrophage lineages

研究代表者

森尾 友宏 (Morio, Tomohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30239628

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)：末梢血から得たiPS細胞を用いて、造血幹細胞からさらに単球へ分化を誘導する系を確立した。単球から樹状細胞への分化系を作成し、また活性型(M1)M^φ、抑制型(M2)M^φへの誘導を試みた。原因未知の単球分化異常症では体系的遺伝子解析によって責任遺伝子を明らかにした。患者からはiPS細胞を樹立し、また平行してknock inマウスを作成し、単球や樹状細胞への分化について検討を行った。応用的な研究として、既知の真菌抗原からのoverlapping peptidesを用いて、真菌特異的CD4 T細胞を誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We established a method to differentiate hematopoietic stem cells into monocytes using peripheral blood mononuclear cell derived iPS cells. We further refined a method to induce differentiation of monocytes to dendritic cells and also attempted to induce monocytes into M1 macrophages or to M2 macrophages. In this study, we have identified a novel responsible gene, OAS1, for B/Mo/DC deficiency with alveolar proteinosis through whole exome analysis of affected individuals. iPS cells were established from the patient; and a capacity of the cells to differentiate to monocytes or to DC was examined. In parallel, we generated OAS1 knock in mice to delve into the mechanism of monocyte differentiation defect. Finally, we were successful in inducing Aspergillus fumigatus-specific and Candida albicans-specific T cells using known overlapping peptides and optimized cytokines.

研究分野：小児科学、免疫学

キーワード：小児免疫 アレルギー 膠原病学

1. 研究開始当初の背景

単球・マクロファージ(Mo-M)系細胞は免疫系において極めて重要な役割を果たしており、多種多様な疾患の成り立ちにも深く関与している。一方、Mo-M系細胞の分化や機能獲得の分子機構については不明な点が多く、特にヒトにおいては解析が行いにくいという問題がある。Mo-M系細胞の機能の低下は、細胞内寄生菌感染症に繋がり、その機能亢進は血球貪食症候群や、炎症の増悪、動脈硬化等に関与している。近年はさらに、腫瘍周囲に浸潤する抑制性単球が腫瘍免疫を負に制御しているとの報告がある。Mo-M系細胞の制御法の開発は喫緊の課題である。

応募者は今までに好中球の分化や機能についての研究で成果をあげており、機能解析困難な好中球においても、タンパク導入手法を用いて、詳細な生化学的解析や機能改変に成功してきた(*Nature Immunology* 2012, *BBRC* 2012, *J Control Release* 2013, など)。本手法はMo-M系解析において大きな力を発揮するはずである。また、応募者の研究領域である免疫不全症(*J. Allergy. Clin. Immunol.* 2013, *Blood* 2012 など)においてもGATA2, IRF8欠損症において単球欠損が判明し、分化経路について様々な示唆を与えられている。近年iPS細胞からの単球の分化誘導やiPS細胞を経ないdirect reprogrammingが可能になっており、分化・活性化についての詳細な研究が行えるようになってきた。さらに応募者は、overlapping peptidesを用いて、ウイルス特異的T細胞をex vivoで増幅・精製する研究に携わってきた。その過程で特異的CD4T細胞を誘導すれば、真菌に対応するMo-Mを活性化できることに着目している。

2. 研究の目的

本研究では(1)末梢血から得たiPS細胞を用いて、単球へ分化を誘導し、顆粒球・単球前駆細胞(GMP) 単球・樹状細胞前駆細胞(MDP) 単球前駆細胞(PreMono) 単球(Mo)、各段階における発現遺伝子と後成的変化についてprofilingを行い、(2)得られた単球細胞から、樹状細胞や活性化型(M1)M、抑制型(M2)Mの誘導を試み、鍵となるシグナル分子をタンパク導入により活性化あるいは抑制して、機能改変を試みる。(3)原因未知の単球分化異常症においては体系的遺伝子解析により責任遺伝子を明らかにし、(1)とあわせて分化異常の原因を探索すると共に、分化の鍵分子を同定する。(4)さらに応用的な研究として、既知の真菌抗原からのoverlapping peptides(アスペルギルスのSHMT, SODやカンジダのMP65など)を用いて、特異的CD4T細胞を誘導し、Mo-Mとの共培養で活性化を誘導できるかを明らかに

する。

3. 研究の方法

iPS細胞からの単球・マクロファージ系(Mo-M)への分化誘導系を確立し、分化過程における遺伝子発現、後成的変化や、鍵となるシグナルを明らかにする。また原因未知の単球異常症検体を用いて、家族を含む全エクソン解析で原因を明らかにし、前記実験と相補的なものとする。実際に分化異常においてはiPS細胞からのMo、樹状細胞分化系を用いて、分化停止を模倣し、その機序について生化学的に解析を加える。

さらにMo-Mからは活性化型M、抑制型Mを誘導する系を立ち上げ、その中で重要なシグナルを抽出する。それに対してはタンパク導入の手法を用いて、シグナルを正または負に自在に制御し、分化の誘導や機能亢進あるいは抑制を試みる。

臨床応用的な課題として、Mo-M活性化による真菌感染症制御に向けた免疫制御法を検討する。ここでは抗原特異的なT細胞を介在させて、Mo-Mを活性化して、病原体の排除が可能かどうかを明らかにする。

本研究ではiPS細胞樹立は東京大学医科学研究所大津真博士の指導を受けながら実施し、大学院生3名と応募者が研究分担して、効率の良い研究を実施する。

4. 研究成果

本研究ではiPS細胞を用いて単球の分化過程を分子レベルで明らかにし、未知の単球分化異常症の原因を明らかにすると共に、活性化型(M1)・抑制型(M2)マクロファージの誘導と制御法を検討し、応用研究として真菌特異的T細胞の誘導によるマクロファージの活性化の実現性を検証することを目的としている。

平成27年度はまず分化過程における特性解析に先駆けて、ヒト骨髄細胞における分化経路について、東京医科歯科大学難治疾患研究所榑木博士Gの支援を得て、詳細な検討を行った。その結果、単球-樹状細胞前駆細胞(MDP)、顆粒球-単球前駆細胞(GMP)、共通樹状細胞(DC)前駆細胞(CDP)、共通単球前駆細胞(CMoP)などを表面抗原の差異で分離することができるようになった。それを用いて各分画の単離と、体系的発現解析に向けての準備を整えた。

単球・DC欠損症患者から、新規責任遺伝子(OAS1:2'-5'-oligoadenylate synthetase 1)が同定されたことが本年度の研究の成果である。本患者で分化系の解析を行い、さらに責任遺伝子産物の機能について多角的に検討を行った。実際には、患者由来EBV形質転換B細胞株を用いての体系的転写プロファイリングや、RiboClusterProfilerを用いての転

写後遺伝子発現制御などを解析した。

さらに同遺伝子の機能については Knock in mice の作成や、iPS 細胞の作成に着手をした。iPS 細胞については、申請段階においては OP9 細胞を用いる分化系と、feeder free システムの両者を考えていたが、東京大学医科学研究所大津真博士との共同研究により、造血幹細胞への分化の後は、サイトカイン及び生理活性物質にのみ依存した分化系を用いることとした。患者由来 iPS 細胞の樹立に着手すると共に、Knock in iPS 細胞のデザインも開始した。

平成 28 年度には iPS 細胞からの分化系について本格的な解析に着手した。実際にはマウスフィーダー細胞上で造血幹細胞を誘導したのちに、GM-CSF と M-CSF 存在下で 10 日培養を行い CD14 陽性単球への分化を行った。その後 M-CSF のみで 10 日間培養を継続することにより樹状細胞への分化を誘導した。誘導した細胞においては CD11, CD14, CD16, CD68, CD206 などの表面抗原分析を行うと共に、class I MHC, class II MHC 発現、貪食能等を評価した。

実際にこれらの分化系がヒトにおける DC の分化系を模倣するかどうかについて、培養各段階で細胞を分取して、RNASeq で解析するところまでで検討が終了しているが十分な profiling には至っていない。M1, M2 マクロファージについては、さらに単球から分化するべく、TLR リガンド、IFN- γ (M1)、IL-4, IL-13(M2)など各種サイトカインへ暴露して、検討を行っているが、現在も様々な亜集団の報告が次々となされている状態であり、最終的な分化系確立には成功していないが、継続課題として取り組んだ。

原因を明らかにした OAS1 異常症においては、さらに検討を継続した。OAS1 はマウスでは遺伝子が重複しているが、すべての OAS1 ファミリーを KO したマウスが作成されている。これらの解析においては Mo, DC 分化異常症を認めなかった。また OAS1a Knock in マウスを作成し、OAS1a/1g double Knock in も作成された。これらのマウスを詳細に検討したが、Mo, DC 分化異常は同定されなかった。In vitro での OAS1 分子機能解析や OAS1 isotype (p42, p44, p48, p52 など)の解析を進めると共に、iPS 細胞の樹立を何度か試み、平成 28 年度中に成功した。患者末梢血単核球からの樹立であったが、BCR, TCR 遺伝子再構成は認めず、non B, non T からの iPS 細胞として使用に供した。今までに蓄積した Mo, DC 分化技術を用いて、多角的な検討を実施しており、ゲノム編集技術を駆使して、野生型 iPS 細胞への転換や、正常 iPS 細胞での OAS1 変異を作成しているところである。

真菌特異的 T 細胞については平成 28 年度に

解析を行った。具体的には *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* の抗原から得たオーバーラップペプチドを用意し、末梢血単核球と IL-4, IL-7 共存下で培養を行った。その結果、背景レベルに比して明らかな特異的 T 細胞が IFN- γ 産生細胞として検出された。多くは CD4 陽性細胞であったが、CD8 陽性細胞も検出された。

研究を開始した当初は、まだ iPS 細胞からの分化系も確立しておらず、また疾患特異的 iPS 細胞も樹立されていなかったが、2 年間の研究により、共に成功に至ることができ、また疾患特異的 iPS 細胞では他の細胞モデルやマウス系では得られない、分化解析が行えるようになった。また真菌特異的 T 細胞の増幅についても、実現が可能であることが明らかになり、今後より solid な研究に推移することが可能な状況に至りつつある。

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 1 件、査読有)

1. Matsuda G, Imadome K, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Immunotherapy*. 7:335-341, 2015.

[学会発表](計 3 件)

1. 森尾友宏: 細胞治療-これからの日本の戦略と課題 Strategy for implementation of cell therapy and challenges that lie ahead, **第 38 回日本造血細胞移植学会(シンポジウム)**, 名古屋(名古屋国際会議場)、2016 年 3 月 5 日
2. 森尾友宏: 原発性免疫不全症の遺伝子解析: その成果と限界, **第 43 回日本臨床免疫学会(ワークショップ)**, 神戸(神戸国際会議場)、2015 年 10 月 23 日
3. 森尾友宏: 稀少性免疫難病の診断と治療, **日本人類遺伝学会第 60 回大会(特別講演)**, 東京(京王プラザホテル)、2015 年 10 月 15 日

[図書](計 6 件)

1. 森尾友宏: (分担執筆) IL-7R 欠損症、CD3 欠損症、(家族性) CD8 欠損症、ZAP-70 欠損症(selective T-cell defect), MHC class I 欠損症、MHC class II 欠損症、ITK 欠損症、MATGT1 欠損症、XMEN 症候群、DOCK8 欠損症、RhoH 欠損症(RHOH)、MST1(STK4)欠損症、TCR 欠損症、LCK 欠損症、MALT1 欠損症、IL-21 欠損症、IL-21 受容体欠損症、CARD11 欠損症、BCL10 欠

損症、OX40 欠損症、IKKB 欠損症、Lipopolysaccharide-responsive, beige-like anchor protein(LRBA)欠損症、CTPS1 欠損症、分類不能型免疫不全症、Activated PI3K-delta syndrome(APDS)、アデノシンデアミナーゼ(ADA)2 欠損症、**新領域別症候群シリーズ No36 免疫症候群 (第2版)** 別冊日本臨牀、p25-28,p87-89, p90-92, p93-98, p99-103, p104-107,p108-111, p112-114, p115-118, p119-121, p122-124,p125-128, p129-132, p133-136, p137-139, p140-142,p143-146, p147-150, p151-154, p155-157, p158-160, p167-170, p354-358,p414-417,p554-557、日本臨牀社、2016年3月20日

2. **森尾友宏**：iPS 細胞による原発性免疫不全症の治療戦略 **炎症と免疫** 24:86-90, 2016.
3. **森尾友宏**：リンパ浮腫など特徴的所見を伴う免疫不全症 **リンパ学** 38:47-49, 2016.
4. 岡野翼, **森尾友宏**：原発性免疫不全症 **リウマチ科** 54:336-341, 2015.
5. **森尾友宏**：先天性免疫不全症候群 **内科** 115:1180-1183, 2015.
6. **森尾友宏**, 高島健浩, 今井耕輔：多パラメータ解析による免疫担当細胞亜群同定と機能解析 **医学のあゆみ** 252:48-54, 2015.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

森尾 友宏 (MORIO, Tomohiro)
東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30239628

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

大津 真 (OTSU, Makoto)
東京大学医科学研究所・幹細胞プロセッシング分野・准教授