

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08322

研究課題名(和文)新規培養法を用いたヒトリンパ球系分化制御および腫瘍化の分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Study of human lymphopoiesis and neoplastic transformation with novel culture system

研究代表者

大石 晃嗣 (Ohishi, Kohshi)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00397506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでヒトリンパ球系分化の経路やその制御機構は明らかではない。申請者らが確立した様々なリンパ球系細胞と樹状細胞の分化を支持する培養系と、個々の細胞の遺伝子発現と網羅的に解析するsingle cell RNAseq解析を用いて、Bリンパ球系細胞と形質細胞様樹状細胞(pDC)がIL-7受容体陽性の共通の前駆細胞由来であることを突き止めた。さらに、LFA-1の発現の強さと、BとpDCの分化の方向性に関与していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染などの免疫反応において、抗原を認識しインターフェロンを産生する形質細胞様樹状と、抗体産生に関与するBリンパ球が共通の前駆細胞由来であるという知見は、当初予期していなかった画期的な発見である。Bリンパ球、形質細胞様樹状細胞、NK細胞が欠損した患者の報告もあり、生理学的にも重要な分化経路であると考えられる。今後、ウイルス感染等に対する新たな免疫制御機構の解明に寄与するとともに、リンパ球系腫瘍の起源等に対して新しい視点を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear about human lymphoid pathway and its regulatory mechanism. We identified the common pathway of B-lymphoid and plasmacytoid dendritic cells, using novel culture system which supports various lymphoid and dendritic cell differentiation and single cell RNA-seq analysis. Moreover, we revealed that expression levels of LFA-1 was associated with pDC over B-lymphoid differentiation bias.

研究分野：血液学

キーワード：lymphopoiesis human B Dendritic cell LFA-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、ヒト造血幹細胞は、骨髄球系前駆細胞とリンパ球系前駆細胞に分化し、さらに様々なリンパ球系細胞に分化すると考えられてきた。ところが、リンパ球系細胞のみならず単球や樹状細胞 (Dendritic cell, DC) への分化能を持つ多能性リンパ球系前駆細胞 (multilymphoid progenitor, MLP) が同定され、リンパ球系分化に対する概念が大きく変わりつつある。しかし、ヒトリンパ球系分化経路の全体像は未だ明らかになっていない。その主な理由は、同一条件で様々なリンパ球系細胞の分化を支持する培養系がないためである。我々は、不死化ヒトストローマ細胞を用いて、proT、proB、NK、リンパ球系細胞や様々な DC へ分化を同一条件下で支持する培養系の確立に世界で初めて成功した。そこで、本培養系を用いて、ヒトリンパ球系細胞の分化経路および DC への分化の関連を明らかにすることを目的として研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト造血幹細胞から様々なリンパ球系細胞および DC への分化経路およびその制御機構を、我々が確立した培養系を用いて明らかにすることである。本培養法を用いて、様々なリンパ球系前駆細胞分画の分化能を明らかにするのみならず、個々の細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する single cell RNA-seq 解析方法を用いて、遺伝子発現プロファイルからも分化経路を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト臍帯血を informed consent を得て採取し、マイクロビーズを用いて CD34⁺細胞を分離し保存した。培養には、個体間の差を減らす目的でいくつかの臍帯血を混合して使用した。目的とする細胞分画の細胞は FACS Aria を用いてソートし、予め不死化ストローマ細胞で confluent になっているプレートに SCF+TPO+Flt3-L+GM-CSF 存在下で培養した。10~14 日後に培養した細胞をハーベストし、生成された細胞を FACS スキャンで解析した。single cell RNA-seq 解析は、10X Genomics 社の Chromium system を用い、ライブラリー調製から NGS 解析を実施した。

3. 研究成果

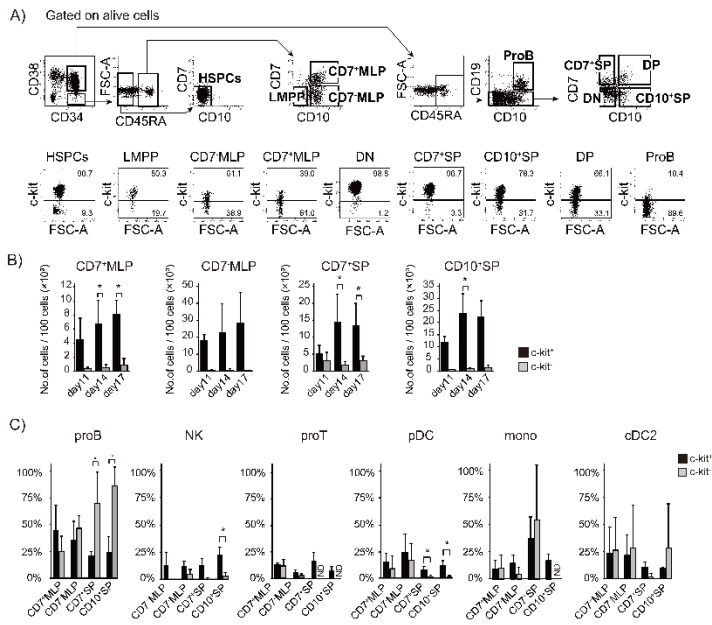
A. c-kit 発現とリンパ球系分化・増殖との関連

造血幹・前駆細胞、未分化なリンパ球系前駆細胞である MLP、やや分化した CD10⁺SP や CD7⁺SP 細胞において c-kit の発現を調べたところ、各分画で程度の差はあるものの c-kit 陽性分画と陰性分画に分かれた。特に、B 細胞マーカーである CD10 を発現している MLP や CD10⁺SP 細胞で c-kit 陰性分画が多い傾向がみられた (図 1A)。

MLP: CD34+CD38-CD45RA+CD10+CD7- MLP
CD10⁺SP: CD34+CD38+CD45RA+CD10+CD7- CD10+SP
CD7⁺SP: CD34+CD38+CD45RA+CD10-CD7+ CD7+SP

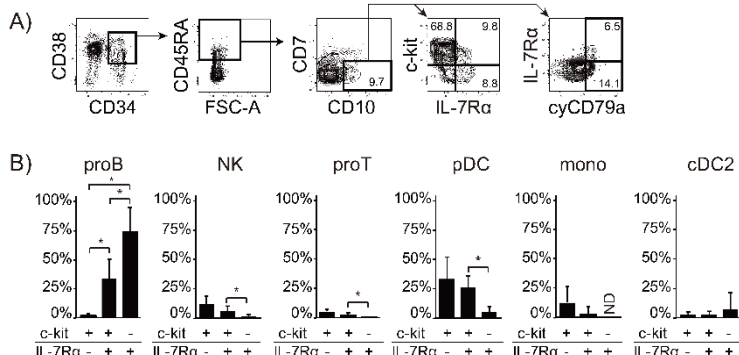
MLP、CD10⁺SP、CD7⁺SP 分画細胞の c-kit 陽性および陰性分画の細胞をストローマ細胞上で培養し比較検討したところ、図 1B で示すように、c-kit 陽性分画の細胞は c-kit 陰性分画の細胞に比べて増殖能が高いことが明らかとなった。

分化能について検討したところ、どのリンパ球系前駆細胞分画においても、c-kit 陽性分画は proT 細胞、proB 細胞、NK 細胞、形質細胞様樹状細胞 plasmacytoid DC, pDC)、古典的樹状細胞 (conventional DC, cDC)、単球への分化がみられた。一方、MLP の c-kit 陰性分画は NK 細胞への分化能が低下しており、CD10⁺SP や CD7⁺SP 細胞の c-kit 陰性分画の細胞は proB への分化傾向が強く、NK、proT、pDC への分化傾向が低下していた (図 1C)。



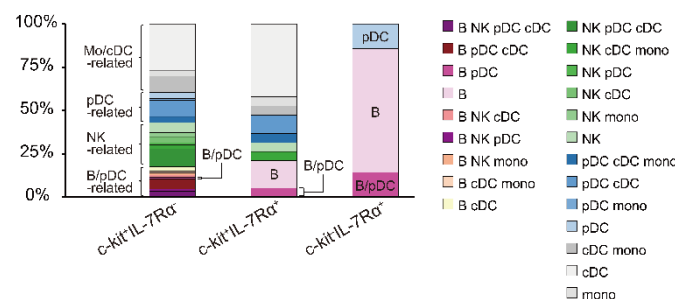
B. IL-7 受容体 (receptor, R) の発現とリンパ球系分化との関連

CD10⁺SP 分画は、これまで B/NK 前駆細胞分画と考えられてきたが、未分化な細胞から B に分化が偏向している細胞を含むヘテロな細胞分画であることが明らかとなった。そこで、CD10⁺SP 分画をさらに細分化するために IL-7R の発現を調べたところ、c-kit 陽性・陰性分画はさらに IL-7R 陽性・陰性に分かれることがわかった (図 2A)。各分画を培養したところ、c-kit⁺IL-7R⁻分画に比べて c-kit⁺IL-7R⁺分画はより proB への分化傾向が強いものの、pDC への分化能は両群とも比較的高く顕著な差がないことが明らかとなった。c-kit⁻IL-7R⁺分画は、c-kit⁺IL-7R⁺分画よりさらに proB への分化能が高い傾向がみられた (図 2B)。以上より、c-kit⁺IL-7R⁺分画は、B と pDC への分化能が高い細胞分画であることが明らかとなった。



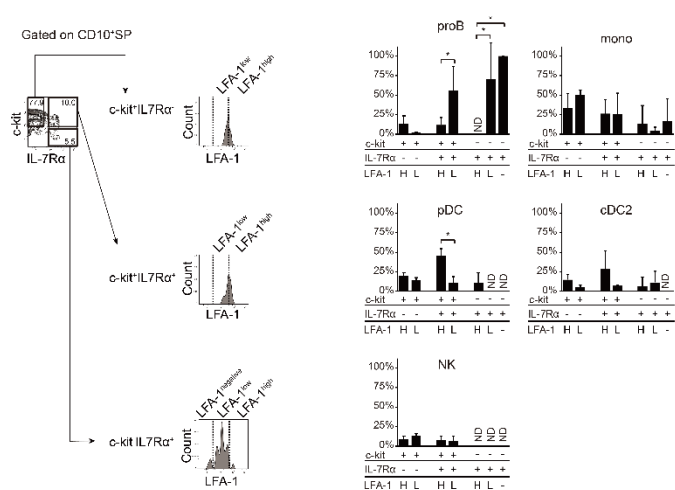
C. B/pDC 前駆細胞の同定

B と pDC への分化能が高い分画がみられたことから、B/pDC 共通の前駆細胞が存在するかどうかを明らかにするために、CD10⁺SP 細胞の一個一個の細胞を培養 (single cell culture) し検討した。その結果、c-kit⁺IL-7R⁻分画には様々な未分化前駆細胞が含まれていたものの、c-kit⁺IL-7R⁺分画には B や DC の前駆細胞に加えて、B/pDC 前駆細胞が存在し、c-kit⁻IL-7R⁺分画には、主に B 前駆細胞が存在することが明らかとなった (図 3)。



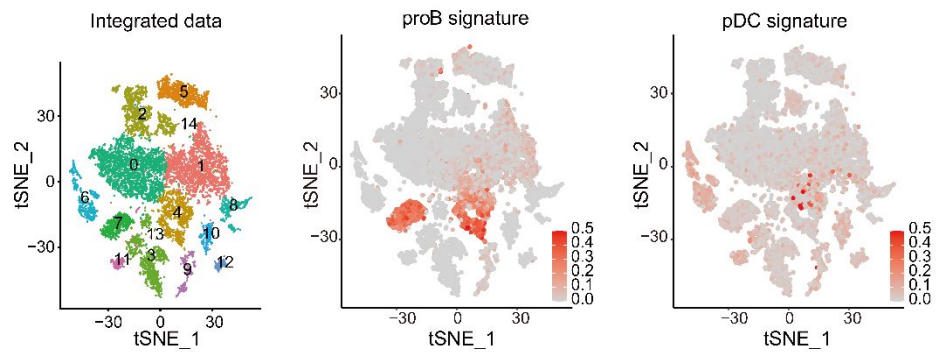
D. LFA-1 発現と pDC 分化との関連

B/pDC 前駆細胞から B あるいは pDC へ分化する制御機序を明らかにするために、様々な分子の発現を調べたところ、接着因子である LFA-1 は c-kit⁺IL-7R⁺分画や c-kit⁺IL-7R⁻分画では比較的発現が高いものの、c-kit⁻IL-7R⁺分画での LFA-1 の発現は陰性から陽性まで幅があることがわかった (図 4 左)。c-kit⁺IL-7R⁺分画や c-kit⁺IL-7R⁻分画を LFA-1^{high} と LFA-1^{low} に、c-kit⁻IL-7R⁺分画を LFA-1 発現が high、intermediate、low の分画に分けて培養したところ、c-kit⁺IL-7R⁺分画では差はなかったものの、c-kit⁺IL-7R⁻分画では LFA-1 発現が高い分画がより pDC に、低い分画ではより proB に分化する傾向がみられた (図 4 右)。c-kit⁻IL-7R⁺分画では、LFA-1^{high} 分画からは proB への分化がみられず、LFA-1^{intermediate/low} 分画からは主に proB への分化がみられた。以上より、LFA-1 の発現が高いほど pDC への分化が、低いほど proB への分化傾向がみられ、LFA-1 発現と pDC 分化傾向が関連することが明らかとなった。



E. Single cell RNA-seq 解析

B と pDC は共通の前駆細胞由来であることが、培養実験から示唆された。これらの分化経路を遺伝子発現プロファイルからも検討するために、single cell RNA-seq 解析を行った。CD10⁺SP 細胞と、公開されているヒト骨髄細胞と末梢血細胞の遺伝子情報を統合 (integration) し解析を行ったところ、13 のクラスターに分かれた。Cluster4 では、proB 細胞の遺伝子発現プロファイルを持ち、且つ、pDC の遺伝子発現プロファイルを持つことが示された(図 5)。遺伝子発現プロファイルからも B と pDC は共通の前駆細胞由来であることが明らかとなった。さらに single cell RNA-seq 解析の新しい解析方法により、LFA-1 が pDC の分化と関連していることが示唆されている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keiki Nagaharu, Kohshi Ohishi, Naoyuki Katayama
2. 発表標題 Novel lymphoid pathway of human dendritic cells
3. 学会等名 The 10th JSH international symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永春圭規、南博仁、大石晃嗣、片山直之
2. 発表標題 ヒト形質細胞様樹状細胞の分化におけるストローマ細胞の役割
3. 学会等名 第10回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiki Nagaharu, Kohshi Ohishi, Naoyuki Katayama
2. 発表標題 Novel lymphoid pathway of human dendritic cells
3. 学会等名 The 10th JSH international symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永春 圭規、大石 晃嗣、片山 直之
2. 発表標題 A close relationship between B and plasmacytoid dendritic cells in human lymphoid differentiation
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	野阪 哲也 (Nosaka Tetsuya) (30218309)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
連携研究者	小埜 良一 (Ono Ryoichi) (40422414)	三重大学・医学系研究科・講師 (14101)	
連携研究者	鈴木 圭 (Suzuki Kei) (40585171)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------