

論文の内容の要旨

論文題目：

Development of functional myeloid subsets in humanized mice

(ヒト化マウスを用いたミエロイド系細胞の分化・機能の解析)

氏名： 田中 聡

【序論】

免疫学は、20世紀後半、遺伝子組換えマウスを用いて飛躍的な発展を遂げた。その成功をもとに、マウスの研究から得られた知見をさらにヒト免疫学へと発展させ、臨床・創薬への還元を目指す試みがなされている。免疫系ヒト化マウスは、ヒトから直接得ることのできない組織（骨髄・脾臓・胸腺・リンパ節・消化管・呼吸器・皮膚など）において、ヒトの免疫細胞がどのように分化、機能するかを解析するための研究手段として開発された。

重度複合免疫不全のC.B-17-SCIDマウスを用いた1988年のSCID-huシステムの報告以来、ヒト細胞を免疫不全マウスに生着させる試みがなされてきた。SCID-huシステムでは、ヒト胎児肝臓および胎児胸腺等の同時移植が行われたが、残存するマウスの自然免疫系によりヒト造血・免疫細胞の生着はまだ僅かであった。その後、自然免疫系に障害を持つI型糖尿病モデルであるNODマウスと戻し交配したNOD/SCIDマウスを用いて、ヒト免疫細胞の分化の解析が行われた。このNOD/SCIDマウスにおいても、T細胞が分化しない、B細胞の分化や成熟に障害がみられる、ミエロイド系細胞の分化に障害が見られる、という問題が残されていた。

その後、さらにIL-2受容体 γ 鎖変異を持ちNK細胞を欠失したNOD/SCID/IL2 γ KO (NOG や NSG) マウスの開発により、より高率なヒト細胞の生着が実現した。我々は、新生仔NSGマウスに経静脈的にヒト造血幹細胞を移植するシステムを確立した。本システムにおいては、ヒト造血幹細胞からヒトT細胞やB細胞が分化・成熟し、T細胞の細胞傷害活性やヒト免疫グロブリンの産生など機能性を有している。しかしながら、これらリンパ球系細胞に関する研究と比較し、新規ヒト化マウスにおける自然免疫系、特にミエロイド系細胞の生着・分化における知見は限られたものしかない。このような背景に基づいて、私は、ヒト化マウスにおいて、多岐にわたるヒトミエロイド系細胞の中でどのサブセットが分化し、どの程度の機能を発揮するか、さらにどのような研究領域に応用できるかについて研究を行った。

【研究方法・結果】

1. ヒト化マウスの作製および造血・免疫細胞の再構成

ヒト化マウスの作製は、共同研究者の石川らが開発した新生仔 NOD/SCID/IL2 γ KO (NSG) マウスへの移植モデルを用いた。本方法ではヒト臍帯血よりフローサイトメトリーによって高度に純化した CD34⁺CD38⁻ Lineage⁻ ヒト造血幹細胞を新生仔マウスに移植することで、GVHD を誘導することなく高効率でヒト造血幹細胞を生着させることが出来ることから、長期にわたって造血・免疫細胞の分化と免疫系のダイナミクスを解析することが可能となった。私は、このヒト化マウスのシステムを用い、ヒト造血・免疫細胞の再構成においてこれまで詳細な検証のされていない、自然免疫系に属するミエロイド系細胞の分化・機能の解析を行った (図 1)。

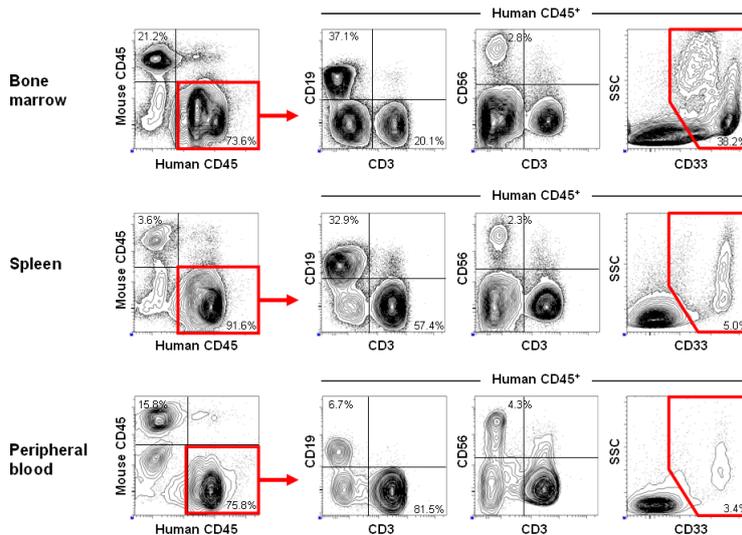


図 1. ヒト化マウスにおけるヒト造血・免疫細胞の再構成

2. マルチカラー解析系の確立によるミエロイドサブセットの同定

ミエロイド系細胞には、好中球、好酸球、好塩基球、単球/マクロファージ、古典的樹状細胞 (conventional dendritic cell : cDC)、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC)、および、マスト細胞等のサブセットが含まれる。まず、ヒト化マウスにおいて、表面抗原に基づくヒトミエロイド系細胞の同定方法を 10 カラーフローサイトメトリーによって検討した。その結果、NSG マウスにおいて、移植されたヒト造血幹細胞より分化したミエロイド系細胞を微量サンプルより同定し、かつ、単離することを可能とした (表 1)。

表.1 ミエロイドサブセット同定に用いる表面マーカー

Analysis panel	Fluorescence dyes for 488nm Blue laser					for 633nm Red laser			for 405nm Violet Laser	
	1 FITC or Alexa Fluor 488	2 PE	3 PI	4 PerCP-Cy5.5 or 7AAD	5 PE-Cy7	6 APC or Alexa Fluor 647	7 Alexa Fluor 700	8 APC-H7 or APC-Cy7	9 V450 or Pacific Blue	10 V500 or Pacific Orange
1. Multi lineage (T, B, NK, Myeloid)	CD56	CD33	-	7AAD	CD19	huCD45	-	msCD45	CD3	-
2. Myeloid (Mono, cDC, pDC)	BDCA-1/3	BDCA-2	PI	CD123	CD33	CD11c	CD14	HLA-DR	huCD45	msCD45
3. Myeloid (Neu, Baso, Mast)	FceR1	CD203c	PI	CD117	CD33	CD15	CD14	HLA-DR	huCD45	msCD45

次に、実際にヒト化マウスの骨髄、脾臓における、ヒトミエロイド系細胞の分化を解析した (図 2A)。骨髄では、脾臓や末梢血と比較して、ヒトミエロイド系細胞が高頻度に分化していることが確認された。それらヒトミエロイド系細胞の構成を比較すると、骨髄においては CD33^{low}CD15⁺ HLA-DR⁻の好中球系の細胞が多く、一方、脾臓には多くの CD33⁺CD203c⁺HLA-DR⁻のマスト細胞の存在が判明するなど、これらはヒトの生理的分化を再現していると考えら

れた。また、これら表面マーカーに基づき骨髄細胞のソーティングを行い、単離した細胞をメイギムザ染色することにより、形態的にもヒト化マウスにおいてミエロイド系細胞が再構成されていることが確認された(図 2B)。

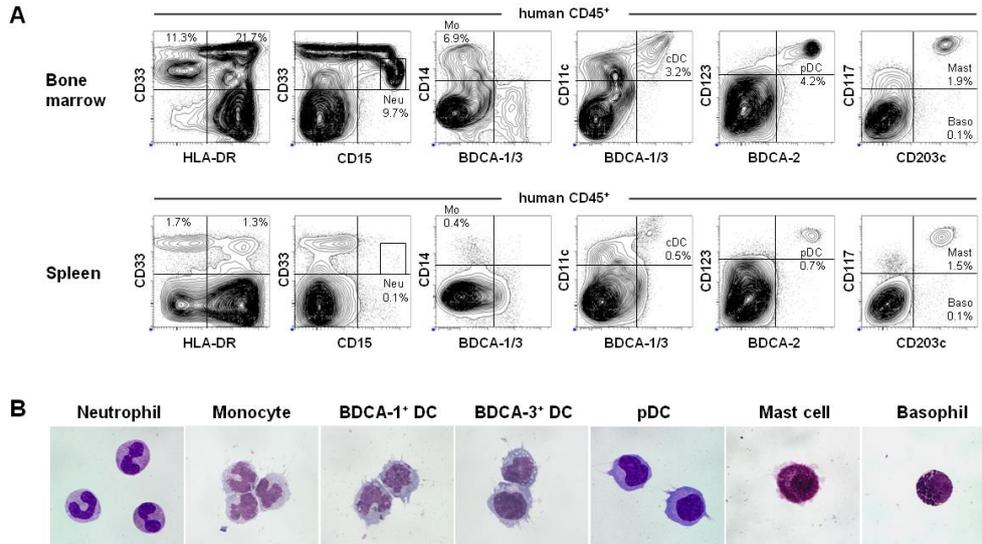


図 2. ヒト化マウスにおけるヒトミエロイド系細胞の再構成

さらに、これまでの当研究室の実績に基づいて、呼吸器系粘膜免疫の再構築について検討を加えた。その結果、肺組織におけるミエロイド系細胞においては、マクロファージおよび樹状細胞が主要サブセットであることが確認された(図 3A, B)。肺においては、肺胞マクロファージおよび樹状細胞が外界に対峙して働く細胞として多くの侵入物に対する免疫系の最前線であり、ヒト化マウスにおいても呼吸器系粘膜免疫の再構成を確認できたことで、感染免疫などの研究領域へ応用が期待される結果を得ることができた。

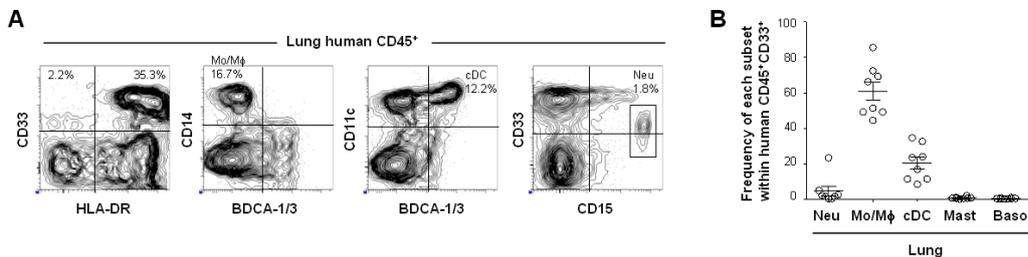


図 3. ヒト化マウスにおける呼吸器粘膜免疫系の再構成

3. ヒト化マウスにおけるミエロイド系細胞の機能解析

以上のように、ミエロイド系細胞の分化および再構成を確認したことから、私はさらにヒト免疫細胞の機能解析を行った。

まず、マウス体内で造血幹細胞から分化したヒトミエロイド系細胞のサイトカインに対する反応性を解析した。ミエロイド系細胞に作用するサイトカインとして G-CSF, GM-CSF, IFN- γ などが知られており、これらサイトカインによる単個細胞レベルでのシグナル伝達分子のリン酸化をフローサイトメトリーにて評価した。その結果、*in vitro*でのサイトカイン刺激によるミエロイド系細胞の応答として、IFN- γ による Stat1, 3, 5 のリン酸化シグナル、G-CSF および GM-CSF による Stat3, 5 のリン酸化シグナルの活性化が示唆された(図 4A)。さらに、*in vivo*における動態としては、G-CSF 投与により骨髄で分化したヒトミエロイド細胞の末梢血への動員が確認され、細胞・個体レベルにおいて的確なサイトカイン応答を示すことが確認された(図 4B)。

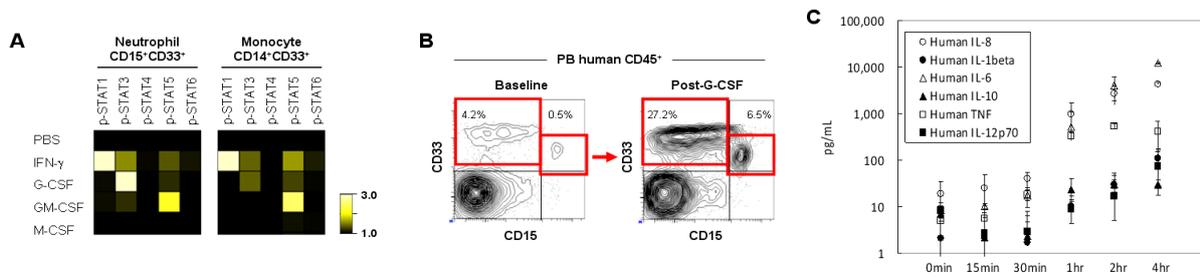


図4. ヒト化マウスにおいて分化したヒトミエロイド系細胞の機能

次に、自然免疫系細胞において、微生物に由来する抗原を認識するセンサーとなる Toll like 受容体 (TLR) の発現を解析した。TLR2, TLR4 のタンパクレベルでの発現をフローサイトメトリーによって解析し、ヒト化マウス体内で分化した単球や樹状細胞等においてもこれら受容体の発現が確認された。TLR4 に対するアゴニストである LPS をヒト化マウスに投与したところ、TNF、IL-6、IL-8 などヒトの炎症性サイトカインが血清中で上昇することが確認された (図 4C)。従って、ヒト化マウスのミエロイド系細胞の再構築が、ヒトの炎症性疾患、感染性疾患の研究に応用できる可能性が示唆された。

さらに、マクロファージの貪食能について、蛍光標識粒子を用いて解析を進めた。ヒト化マウスの骨髄および肺より採取した細胞を、 $1\mu\text{m}$ または $2\mu\text{m}$ の蛍光標識粒子とともに培養することで、ヒト $\text{CD45}^+\text{CD33}^+$ ミエロイド細胞は、効率よく蛍光粒子を取りこむことが確認された (図 5A)。また、それら蛍光粒子は共焦点イメージングでの解析により、確かにヒトマクロファージの細胞内に取り込まれていることが示された (図 5B)。これら貪食能を用いた感染実験において、ヒト化マウスの骨髄で分化したヒトマクロファージは、 $\text{IFN-}\gamma$ の刺激により、貪食したサルモネラ菌に対する殺菌能を向上させることが確認された (図 5C)。

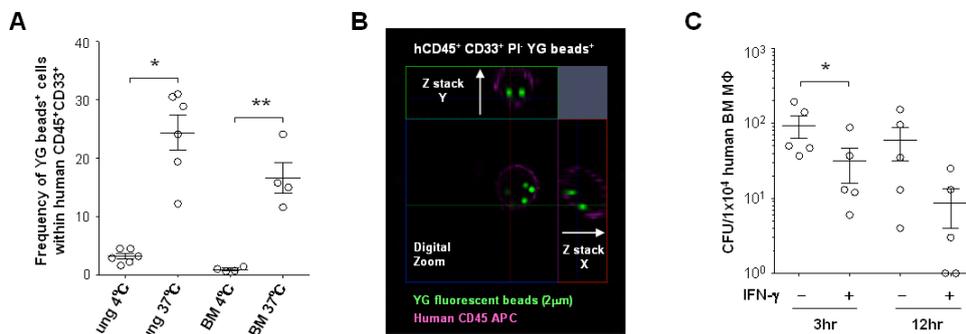


図5. ヒト化マウス (骨髄) ミエロイドサブセットにおける貪食能の解析

【結論】

本研究では、ヒト化マウスという *in vivo* の評価系を用いることで、マウスという実験動物体内において、ヒト造血幹細胞からリンパ球系だけでなく、様々なミエロイド系細胞が分化できることを証明した。また、骨髄、脾臓、肺における解析より、マウス体内においてもヒトミエロイド系細胞が組織特異的に再構成されることを確認した。これらヒトミエロイド系細胞は、表面抗原や形態学的な特徴を維持するだけでなく、サイトカインによる特異的なリン酸化シグナル応答や貪食能を持つことを実験的に証明した。また、ヒトミエロイド細胞の TLR の発現とその応答や感染制御反応の解析から、ヒト化マウスが、ヒトの粘膜免疫や自然免疫応答、*in vivo* 感染モデルの解析において、分子レベル、細胞レベル、そして個体レベルにおける免疫機構の解明を可能とする有用なシステムであることを示唆することができた。