

博士論文

論文題目 **iPS** 細胞由来のマクロファージにおける
LTR 標的 **siRNA** を用いた **HIV-1** 複製抑制の解析

氏名 平尾(杉元) 理子

目次

目次 p. i

略語表 p. vi

1. 緒言 p.1

1-1. 単核食細胞について p.1

1-1-1. マクロファージとは p.1

1-1-2. 樹状細胞とは p.4

1-2. マクロファージ研究における assay 系とその問題点 p.5

1-3. ES/iPS 細胞からの骨髄球系細胞の分化誘導法 p.7

1-4. iPS 細胞から分化誘導したマクロファージの検証 p.12

1-4-1. HIV 研究におけるマクロファージ研究 p.12

1-4-2. 後天性免疫不全症候群(Acquired Immune Deficiency Syndrome
(AIDS))AIDS とその課題 p.12

1-4-3. HIV の生活環と治療法 p.13

1-4-4. 新規治療法の探索 p.15

1-4-5. HIV 感染の標的としてのマクロファージ p.16

1-5. iPS 細胞を利用した HIV 抵抗性を持つマクロファージの作成 p.18

1-5-1. HIV 抵抗性付与に関する既報 p.18

1-5-2. transcriptional gene silencing (TGS)を介した siRNA による

HIV 抵抗性の付与 p.20

2. 方法 p.23

2-1. PBMC と PBMC 中の CD14+細胞から骨髓球系細胞(MDM 及び MDCC)

への分化 p.23

2-2. iPS 細胞の樹立 p.23

2-3. SIN lentivirus ベクターと iPS 細胞への shRNA の遺伝子導入 p.24

2-4. shRNA を導入した iPS の未分化性等の確認 p.26

2-4-1. TRA-1-60, SSEA-4 のフローサイトメーター解析 p.26

2-4-2. ALP 染色 p.26

2-5. iPS 細胞から骨髓球系細胞への分化(図 2-2.) p.27

2-5-1. 樹状細胞への分化誘導 p.28

2-5-2. マクロファージへの分化誘導 p.29

2-7. iPS から分化させたマクロファージのフローサイトメーター解析 p.29

2-8. 形態観察 p.30

2-9. 5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)

T 細胞増殖アッセイ p.31

2-10. 樹状細胞とマクロファージの貪食能観察 p.32

2-11. iPS-macrophage のサイトカイン分泌能解析 p.32

2-12. iPS から分化したマクロファージの CCR5, shRNA の PCR による

発現確認 p.32

2-13. iPS 及び iPS より分化したマクロファージのゲノム DNA による

挿入遺伝子の確認 p.33

2-14. HIV-1 BaL 感染実験 p.34

2-15. p24 ELISA assay p.35

2-16. Colorimetric RT-assay p.35

2-17. HIV gag の(quantitative) qPCR p.38

2-18. HIV DNA PCR p.39

2-19. iPS-macrophage の RNA sequencing と遺伝子解析 p.40

2-20. 統計解析 p.41

3. 結果 p.42

- 3-1. iPS 細胞から骨髄球系細胞への分化誘導 p.42
- 3-2. HIV-1 感受性を持つ血球系譜への分化効率の最適化 p.43
- 3-3. iPS 細胞への shRNA の導入と遺伝子改変 iPS 細胞の未分化性検討 p.44
- 3-4. iPS-DC, iPS-macrophage の表現形と機能 p.45
- 3-5. iPS-macrophage の RNA sequencing による発現遺伝子の解析 p.48
- 3-6. iPS-macrophage のフェノタイプ解析 p.48

(サイトカイン産生能、RNA sequencing とフローサイトメトリー)
- 3-7. shRNA-PromA による off-target 効果の確認 p.50
- 3-8. iPS-macrophage, iPS-DC への HIV-1 BaL 感染実験と

shRNA-PromA の HIV-1 産生抑制の評価 p.50
- 4. 考察 p.56
 - 4-1. 本研究における成果 p.56
 - 4-2. マクロファージを安定供給する系の確立 p.57
 - 4-2-1. iPS 細胞から HIV-1 感受性を持つ血球系譜の分化効率の

最適化について p.57
 - 4-2-2. iPS-macrophage と MDM の類似性について p.61

4-3. HIV-BaL の感染実験と iPS-PromA-macrophage による HIV-1 産生抑制

p.65

4-3-1. iPS-macrophage 及び iPS-shRNA-macrophage の

HIV-1 感染実験の計画 p.65

4-3-2. iPS-macrophage の感染実験の結果 p.67

4-3-3. iPS-PromA-macrophage による HIV-1 産生抑制のメカニズム p.71

4-4. shRNA-PromA による off-target 効果についての検討 p.72

4-5. iPS-DC について p.73

5. 結言 p.75

6. 謝辞 p.80

7. 参考文献 p.82

8. 図表 p.104

略語表

5-AzaC: 5-Azacytidine

Ago: Argonaute

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

AKT: V-Akt murine thymoma ciral oncogene homolog 1

APOBEC: Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like

AZT: Azidothymidine

ARV: Antiretroviral drug

BFU-E: Burst-Forming Unit-Erythroid

CCR5: Chemokine Receptor type5

CFC: Colony-Forming Cells

CFU-GM: Colony-Forming Unit Granulocyte/Macrophage

CFU-GEMM: Colony-Forming Unit Granulocyte, Erythroid, Macrophage,
Megakaryocyte

CHART assay: Chromatin Accessibility Real Time PCR assay

CLR: C-type Lectin Receptor

cPPT: central Polypurine Tract

CSFE: 5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor type4

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin

Dig: Digoxigenin

DP T 細胞: Double Positive T 細胞

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

Flt-3L: Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand

HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HPC: Hematopoietic Progenitor Cell

HSC: Hematopoietic Stem Cell

HSPC: Hematopoietic Stem/Progenitor Cell

hES: human Embryonic Stem cell

INSTI: Integrase Strand Transfer Inhibitor

iPS-DC: iPS 細胞から分化させた樹状細胞

iPSC(s): induced Pluripotent Stem Cell(s)

iPS-macrophage: iPS 細胞から分化させたマクロファージ

iPS-shRNA-macrophage: shRNA を遺伝子導入した iPS 細胞から分化させたマ

クロファージ

LPS: Lipopolysaccharide

LTR: Long Terminal Repeat

Mφ: Macrophage

MDDCs: Monocyte Derived Dendritic Cells

MDM: Monocyte Derived Macrophage

MOI: Multiplicity Of Infection

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NNRTI: Non-Nucleoside RT Inhibitor

NOD: Non-Obese Diabetic

NRTI: Nucleoside analogue RT Inhibitor

NTP: Nucleotide Triphosphates

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PHA: Phytohaemagglutinin

POD: Peroxidase

PTGS: Post Transcriptional Gene Silencing

PI: Propidium Iodide

PI: Protease Inhibitor

RISC: RNA-Induced Silencing Complex

RNAi: RNA interference

RNAseq: RNA sequencing

SAMHD: Sterile Alpha Motif (SAM) domain and HD domain- containing protein

SSC: Side Scatter

SCF: Stem Cell Factor

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

SCT: Stem Cell Transplantation

siRNA: small interfering RNA

SIN lentivirus: Self-Inactivating lentivirus

SP T 細胞: Single Positive T 細胞

Sulfo-NHS: N-Hydroxysulfosuccinimide

TAR: Trans-Activating response Region

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

TRIM5 α : Tripartite Motif-containing protein 5 alpha

TSA: Trichostatin-A

Ubc: Ubiquitin C promoter

VCC: Virus-Containing Compartment

Vif: Viral infectivity factor

VL: Viral Load

WPREmt: mutant Woodchuck Promoter Response Element

ZFNs: Zinc-Finger Nucleases

1. 緒言

1-1. 単核食細胞について

単球、マクロファージ、樹状細胞は血球細胞のうちの単核食細胞系を構成する。単球は骨髄中の骨髄造血幹細胞(HSCs)から顆粒球マクロファージ系前駆細胞(CFU-GM)、マクロファージ系前駆細胞(CFU-M)、及び単芽球などを経て分化する。単球は末梢血液中では白血球の 3~6%存在し、血液中を数時間から数日循環した後、血管壁から組織や体腔へ遊走してマクロファージや樹状細胞へ分化する。

1-1-1. マクロファージとは

マクロファージは幅広く全組織に存在し、貪食作用と抗原提示能をその特徴とする。マクロファージは、一般的に大きさが 20~30 μm で、円形の核と広い細胞質を持ち、貪食に伴う空胞などが形態的な特徴である。その働きはサイトカイン産生を介した病原体侵入への初期応答だけでなく、死細胞の貪食を代表とする食細胞として発生 [1]、恒常性維持 [2]や組織修復 [3]など多岐に渡る。

免疫応答において、マクロファージは代表的な抗原提示細胞でもあり、抗原となる分子を貪食することで免疫応答の開始を担うだけでなく、かつそれを抗

原提示することで細胞性免疫全体に関わる。

マクロファージなどの食細胞は、捕食する抗原をパターン認識する為の様々な受容体やリガンドを発現している。これらには Toll 様受容体(Toll Like Receptors; TLRs)、スカベンジャー受容体やマンノース受容体などがあげられる。

TLRs は、種々の病原体や外来分子と結合し [4]、そのシグナルの下流で、核内因子 κ B (nuclear factor-kappaB ; NF- κ B)が活性化される [5]ことが知られている。TLRs は貪食には直接関係しないとされている。一方スカベンジャー受容体は、陰性電荷を帯びた分子と結合し、例えばリポ多糖を介した細菌の貪食に寄与する一方で、陰性荷電が増した酸化 LDL の貪食による動脈硬化に関与することが知られている [6]。スカベンジャー受容体には、SR-A I / II (Scavenger Receptor-A I / II)、SR-B1(Scavenger Receptor class B type1)や CD36 などがある [7]。マンノース受容体はカルシウムイオン依存的に糖鎖を認識し [8]、これを介した細菌の貪食などに関与する [9]。

マクロファージはその他の免疫細胞が産生するサイトカインや病原体からの刺激により M1, M2 マクロファージ(classically-activated, alternatively -activated macrophage)という機能的に異なる 2つのフェノタイプに変化する。これは CD4

陽性T細胞におけるTh1細胞、Th2細胞などの機能的サブタイプがあること [10] にならって分類された。

M1マクロファージは、主に細菌感染などでの炎症反応に関与し、TLR ligand やIFN- γ (Th1サイトカイン)刺激 [11]で誘導されてくる。M1マクロファージはTNF α 、IL-6、IL-12などの炎症性サイトカイン、Th1細胞に関与するCXCL9やCXCL10などのサイトカイン、活性酸素種や活性窒素種を産生する(Th1型の免疫反応を誘導)。このIFNに対する応答で、NF- κ Bがactivator protein 1(AP-1)、IRFs、STAT1やearly growth response(EGR)ファミリーなどに関係しているとされる。

一方で、M2マクロファージは、Th2細胞などから産生されるIL-4(Th2サイトカイン)やIL-13により活性化され、免疫抑制機能を持つ [12]。M2マクロファージは、アルギナーゼやマンノース受容体を強く発現し、組織修復、血管新生、腫瘍増殖などにも関与しているとされ、IL-12受容体は低発現で、IL-10、IL-1 decoy受容体やIL-1 RAを高発現しているという特徴やCCL22やCCL24などのサイトカインを産生するという特徴がある。しかしながら、IL-10、グルココルチコイドホルモン、アポトーシスした細胞からの分子や免疫複合体もマンノ

ースレセプターやスカベンジャーレセプターを高発現する M2 様のマクロファージを誘導することが分かっており、産生するサイトカインの種類に差があり M2 については更に細かい分類が提唱されている。

1-1-2. 樹状細胞とは

マクロファージと同様に、単球から分化してくる細胞として樹状細胞がある。樹状細胞は大きさが約 20 μ m 程度で、枝のような形の突起が発達している細胞である。樹状細胞は細胞外から主にエンドサイトーシスにより取り込んだ抗原を抗原提示して、自然免疫及び獲得免疫に関わっている。特に重要な働きとしては、MHC 拘束性にナイーブ T 細胞へ抗原を提示して、エフェクター T 細胞へ分化、活性化することができ、そのクローンを拡大することである。これは、既に分化したエフェクター、メモリー T 細胞に抗原提示するマクロファージとは異なる働きであり、このことを利用してがん治療への応用などが行われている。

樹状細胞は大きく骨髄球系樹状細胞(myeloid DC; mDC)と形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC; pDC)に分類される。mDC は抗原取り込み能が高く、活性化により IL-12 を分泌する特徴があり、もともと骨髄系造血前駆細胞に由来すると考えられていた。また pDC は形態が形質細胞に似ていることから命名され、

ウイルス産生により I 型 IFN を分泌する特徴があり、もともとリンパ系造血前駆細胞に由来すると考えられていた。現在では、pDC の中にも骨髓球系造血前駆細胞から分化する細胞があることが分かってきており、mDC を cDC(conventional DC)と呼ぶようになってきている。生体内では、mDC は CD11c, HLA-DR が陽性であり、更に mDC は CD1c(BDCA-1)陽性の mDC と CD141(BDCA-3)陽性の mDC に分類される。pDC は HLA-DR 陽性で CD11c 陰性であり、CD303(BDCA-2)を発現している。

更に cDC は danger signal と呼ばれる TLR を介した病原体からの刺激 TNF- α 、IFN などのサイトカイン刺激、CD40 を介した活性化 T 細胞からの刺激を受けて未熟樹状細胞から成熟樹状細胞に変化し、免疫応答により適した性質へと変わる。成熟 cDC では MHC クラス II 分子や CD80, CD86(共刺激分子)及び CD40, CD83(接着分子)の発現亢進が見られる。

1-2. マクロファージ研究における assay 系とその問題点

これまで述べてきたようにマクロファージ研究は大いに着目されている研究分野である。しかしながら末梢血液中に存在するマクロファージは少なく、更

に *in vitro* で培養した場合も分裂能が低いことに由来する、低い増殖能という問題があり [13]、ヒトマクロファージを研究するために十分な数のマクロファージを確保することは困難を伴う。

そのため、これまでヒトマクロファージ研究には、主に **Monocyte Derived Macrophage(MDM)**と単球系細胞株が使用されてきた。しかしながらそのいずれにおいても問題点が指摘されている。

例えば、**MDM** に関しては、実験に必要な細胞数の確保、ウイルスを用いた遺伝子導入を行った際、遺伝的に不均一な集団となる点、ドナー間のロット差などの問題などがあげられる。一般的に **MDM** は末梢血単核球分画から **CD14** 陽性細胞を回収し、*in vitro* で **GM-CSF, M-CSF** 等のサイトカイン条件下で培養して分化させる。マクロファージの元となる単球は、末梢血中に **3-6%**程度しか存在しない。このため、同一ドナー由来のマクロファージを十分量、繰り返し作成する場合、採血によるドナーへの負担も問題となる。

一方、細胞株としては主に腫瘍細胞由来のものが使用されており、**Mono Mac-1 [14], Mac-6 [15], THP-1 [16], U937 [17], HL-60 [18]**などがある。細胞株は、継代して同じ細胞株を繰り返し使用することができるため、十分な細胞数を繰

り返し得ることが可能である。しかしながら、ヒトマクロファージの性質を全て反映している訳ではないという点に注意が必要である。例えば、HIV 研究においてもマクロファージに関する研究が進んできており、細胞株を用いた実験系も多くみられるが、細胞株毎に HIV-1 感染に重要な CD4, CCR5 および CXCR4 の発現が低いという指摘 [19] や、HIV-1 の生活環における、合成されたウイルスタンパク質の集合過程とウイルス RNA の取り込み過程において、細胞株はマクロファージ特有の性質を反映していないという指摘もある [20]。

1-3. ES/iPS 細胞からの骨髄球系細胞の分化誘導法

上記問題の解決策として、近年 ES/iPS 細胞を単核食細胞に分化誘導する戦略が注目されている。これまでマウス及びヒト胚性幹細胞(Embryonic Stem cell; ES 細胞)から樹状細胞やマクロファージなど骨髄球系細胞の分化誘導法が報告されてきた [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27]。しかしながら ES 細胞は胚盤胞期の内部細胞塊から樹立されるため [28] [29]、ヒトの場合は倫理的問題から、日本においては例えば不妊治療中、体外受精して母体に戻されなかった余剰胚に限った ES 細胞の作製しか認められていない。そのため研究における利用には制限

があるという問題点や臨床応用を検討する際には拒絶反応の危険性があるという問題点などがあった。

これらを克服できる新たに作成された多能性幹細胞が **iPS** 細胞である。**iPS** 細胞は山中伸弥博士らにより **2006** 年に初めて作成された人工多能性幹細胞である。山中博士らはマウスの皮膚由来の線維芽細胞に **Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc** の **4** つの遺伝子を導入することで分化万能性をもつ **iPS** 細胞を樹立した [30]。これに改良を加えながらヒト **iPS** 細胞に関しても樹立に成功した [31]。

iPS 細胞から分化させた血球細胞については、遺伝的背景が細胞株より **primary** の細胞に近いと考えられ、かつそれが標準化されているというメリットがある。一度ドナー細胞から **iPS** 細胞を樹立すれば、遺伝的背景が同一の細胞を繰り返し使用することが可能である。更に、分化させる前の **iPS** 細胞の状態では無限増殖が可能であるため、理論的には分化系のスケールアップにより無限の数の血球細胞を何度でも確保することが可能であるというメリットもある。これまで **in vitro** の系でヒト **iPS** 細胞をマクロファージに分化する系も報告されている [32] [33] [34] 。

一般に **ES** 細胞及び **iPS** 細胞からマクロファージ、樹状細胞を含む成熟血液細

胞を分化誘導は大きく3つの段階に分けられる。第1段階はES/iPS細胞から造血前駆細胞を分化誘導する段階である。次に得られた造血前駆細胞を更に単球細胞分化誘導条件で培養を行うことで単球を誘導する。最後にマクロファージか樹状細胞への成熟を行う。造血前駆細胞の分化誘導は主に、浮遊培養からの胚葉体(Embryoid Body; EB)形成法と間質細胞との共培養法がある。EB形成法は、1985年にマウスES細胞から血球を分化させた方法として初めて報告された [35]。ES細胞、及びiPS細胞の未分化性を維持するためのサイトカインやフィーダー細胞のない状態で、浮遊培養して培養することでEBを形成させると、その内部に三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)すべての細胞が出現する。EB形成法を用いた血球系細胞は中胚葉分化を促すサイトカイン存在下での培養を経て、血球・内皮系分化誘導の培養条件にて誘導される。間質細胞との共培養法は、骨髓などの間質に由来する細胞株をフィーダー細胞としてES細胞やiPS細胞と共培養する方法で、フィーダー細胞から造血を支持するためのサイトカインが分泌されることを利用している。

更にこの間質細胞との共培養による血液細胞の分化誘導法を効率化したのが、当研究室で開発したsac法と呼ばれる方法である。sac法は、ES/iPS細胞をマ

ウス間葉系幹細胞株であるフィーダー細胞(C3H10T1/2)上に播種後、血液細胞への分化誘導を促すサイトカイン存在下で培養して囊状の構造物(sac)と造血前駆細胞を誘導する、血球系分化誘導培養法のことを指す(図 1-1.)。sac 自体も血管内皮抗原である CD31 と VEGF-R2 陽性であり、主に内皮細胞に分化した iPS 細胞由来細胞である。その内部に造血前駆細胞が分化されてくるため、造血前駆細胞が濃縮された状態で存在し、効率的に血球細胞を分化誘導することが可能である。当研究室ではこの sac 法を用いて分化誘導した造血前駆細胞から効率的に、成熟巨核球を分化誘導し、更に機能的血小板の産生まで至る系を確立した [36]。更に最近我々の研究室は、AIDS 患者の CD8 陽性 T 細胞から iPS 細胞を樹立し、この sac 法と呼ばれる方法を利用して、造血前駆細胞を経て抗原特異的 T 細胞へと分化させる系を報告した [37]。しかしながら、本分化誘導法を用いた単核食細胞系の誘導能については十分検討されていない。

iPS細胞からマクロファージへの分化に関して、既報の報告 [33] [34]では OP9 をフィーダー細胞として使用している。OP9 は単球・マクロファージ系細胞の分化・増殖に重要なサイトカイン M-CSF の遺伝子異常をもち、機能的な M-CSF を産生しない、大理石骨病モデルマウスの頭蓋冠から樹立された細胞株である。

OP9 はマウスの ES 細胞との共培養で、ES 細胞からの単球、マクロファージ系への分化を抑制し、効率的にリンパ球系細胞への分化を促進することが確認されてきた [38]。このことを利用して、当研究室においても巨核球、血小板、リンパ球系等の骨髄球系細胞以外の血液細胞への分化に OP9 及び OP9 Δ 1 を使用してきた。一方で、OP9 を使った培養系の問題点として、培養の煩雑さがあげられる。たとえば、使用する血清のロット間差は OP9 の維持培養だけでなく、ES/iPS 細胞からの血球分化誘導効率にも影響を及ぼすことが知られているため、実験間差について慎重な評価を要する [39]。一方で、ES 細胞との共培養において造血前駆細胞の誘導及び、マクロファージを含む多系統への血球分化の報告 [40]がある C3H10T1/2 は、OP9 と比較して遜色のない血液分化誘導能を示すだけでなく、維持培養も比較的容易という利点がある。

以上の背景より、私は当研究室が開発した効率的な分化誘導法として実績のある sac 法を使用して得られた造血前駆細胞を更に C3H10T1/2 上に播種する方法を最適化することにより、従来法に比べてより効率的に繰り返し実験に必要なマクロファージを得る系を構築することとした。ES 細胞や iPS 細胞から樹状細胞とマクロファージを分化誘導する系は単球相当の細胞までは共通の系を利

用することができるため、本研究にて私はマクロファージと共に樹状細胞への分化誘導についても併せて評価した。更に、分化誘導した細胞の使用応用例として、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染抵抗性を付与することが報告されている外来遺伝子を iPS 細胞の段階で導入を行い、その HIV 産生抑制効果を分化誘導したマクロファージを用いて *in vitro* HIV 感染モデルで評価した。

1-4. iPS 細胞から分化誘導したマクロファージの検証

1-4-1. HIV 研究におけるマクロファージ研究

iPS 細胞に遺伝子導入を行い、分化誘導により得られたマクロファージが実際に実験に使える系であるかを検証するために HIV 研究に着目した。

HIV 感染においてマクロファージは CD4 T 細胞と同様に初期感染の標的となるものの [41]、その経過や役割に関しては T 細胞とは異なる経過をたどるとされて、研究分野として注目されている分野である。

1-4-2. 後天性免疫不全症候群 (Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS))AIDS とその課題

AIDS に対しては、1994 年頃から 3 剤以上の抗 HIV 薬 (ARV) を組み合わせて

行う多剤併用療法(Highly Active Anti-Retroviral Therapy(HAART))の有効性が証明され、以降標準治療となった。これにより、血清中のウイルス量のコントロールが容易となり生命予後は改善を認めてきた。しかしながら、世界において未だ新規 HIV 感染者は年間 230 万人を超え、AIDS による死亡者は年間 160 万人(2012 年末)を越えている現状があり(国連合同エイズ計画 UNAIDS)、AIDS はマラリア、結核を抜いて死亡者数が最大の感染症である [42]。

また、HAART に関しても、潜伏感染には無効であるため、服薬中止に伴うウイルス量の増加や薬剤耐性ウイルス、免疫逃避ウイルスの出現が問題として残っている [43]。このため長期にわたる多くの患者への治療法として、従来の HAART では医薬経済的観点や長期的な quality of life(QOL)の観点などから不十分であると考えられる。

1-4-3. HIV の生活環と治療法

HIV-1 は一本鎖 RNA をゲノムに持つレトロウイルスであり(図 1-2.)、その生活環は 1) HIV-1 が宿主細胞に侵入する過程 : CD4 T 細胞(T-tropic)、単球・マクロファージ(M-tropic)等に感染し、それぞれ CXCR4、CCR5 のケモカインレセプターを co-receptor として CD4 と共に使用しウイルス膜と宿主細胞膜が融合

(Fusion)する過程(この時 CXCR4 を使用する HIV を X4 ウイルス、CCR5 を使用する HIV を R5 ウイルス、CCR5 と CXCR4 の両方を使用する HIV を R5-X4 ウイルスと呼ぶ)、2) 逆転写酵素(Reverse Transcriptase)により生成されたウイルス DNA がインテグラーゼ(Integrase)により宿主細胞のゲノム DNA に組み込まれる(Integration)過程、3)子孫ウイルスが増殖する過程：プロウイルスからの転写が起こり、ウイルス RNA が核外へ移行して、宿主細胞で翻訳されてタンパク質が合成される過程、合成されたタンパク質の集合(Assembly)とウイルス RNA の取り込みが起こり、最終的にウイルス粒子の遊離(Budding)する過程からなる。

上記 2)の過程において、宿主のゲノム DNA に組み込まれたウイルスの状態をプロウイルスと呼ぶが、既存の治療法ではこのプロウイルスを完全に排除できないため、治療を中断することで、プロウイルスからウイルス遺伝子が転写されウイルスの産生が再開されてしまう。そのため一定期間の治療で体内から完全にウイルスを排除する治療法や、潜伏感染が残っていたとしてもそこから治療終了後もウイルス産生が起きないように治療法などの新しい治療法の開発が望まれる。

具体的な薬物治療については、図 1-2.に示すように、現在、上記 1)に関しては、融合阻害薬(Fusion inhibitor)、CCR5 阻害薬(CCR5 inhibitor)があり、2)に関しては、核酸系逆転写酵素阻害剤(Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI))、非核酸系逆転写酵素阻害剤(Non-Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI))、インテグラーゼ阻害剤(Integrase Strand Transfer Inhibitor (INSTI))が、3)に関してはプロテアーゼ阻害剤(Protease Inhibitor (PI))などがある。しかしながらいずれの治療薬も、一度ウイルスが感染した宿主細胞内のプロウイルスを完全に排除することは難しく、治療を中止することでウイルス血症が再燃するため、根治治療とは言えない。

1-4-4. 新規治療法の探索

2007 年に HIV 感染者でありかつ急性骨髄性白血病を発症した患者に対して、HIV-1 が CD4 T 細胞に侵入する時に co-receptor として使用する CCR5 [44]のホモ接合体変異(CCR5 Δ32/Δ32)を持つ造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cells (HSC))を移植したことで、長期にわたり抗 HIV 薬の投与なく血漿中やヒト末梢血単核球細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC))中のウイルス RNA、DNA が検出感度以下に抑えられているという報告がなされた [45]。また組織マ

クロファージや Kupffer 細胞、microglia など従来の治療法では、HIV の潜伏感染における宿主となる細胞に関しても、移植後 HIV 感染のないドナー細胞に置き換わっていた。

この HIV に抵抗性のある HSC を移植して、HIV の根治に近い治療法が報告されたことにより、その後さまざまな細胞治療が検討されるようになった。その一例として同じ CCR5 を(Zinc-Finger Nuclease)ZFNs で欠損させた自身の CD4 T 細胞を細胞輸注し多くの患者で HIV DNA 量が減少したという臨床試験での報告 [46] や、CCR5 を ZFNs で人工的に欠損させたヒト CD34+ HSPCs を NOD/SCID/IL2 γ null マウスに移植し、CD4/CD8 T 細胞比の維持と、ウイルス量の低下を示した *in vivo* での報告 [47]などがある。

1-4-5. HIV 感染の標的としてのマクロファージ

マクロファージは CD4 T 細胞と並び、HIV の感染初期の標的細胞である。

先に述べたように、現在の HAART はウイルスをすべて体内から排除する根治治療ではないという問題が残る。マクロファージは感染拡大に寄与し、かつ潜伏感染の宿主となっていることから、この問題の一因となっていると考える。

マクロファージは HIV の初期感染の後、生体内の免疫による排除を回避しながら

ら [48]、かつウイルスによる細胞変性作用を余り受けなため [14] [49]、長期にわたりウイルスを産生し続ける。マクロファージは **virus-containing compartment(VCC)** と呼ばれるウイルスを濃縮した小胞を細胞質内に形成し [50] [51]、これを **cell-to-cell infection** として、成熟樹状細胞など他の細胞へ受け渡しを行い、細胞間の感染拡大に寄与しているという報告もある。更に本来ならウイルスが感染しにくい組織（中枢神経など）へマクロファージが侵入することにより [52]、組織への感染拡大にも寄与している。更に **AIDS** 脳症においては、炎症所見を伴うマクロファージの集簇が見られ、組織傷害への直接関与も考えられている [53]。これら **HIV** 感染におけるマクロファージ特有の性質に関しては、未だ十分解明が進んでいないのが現状であり、その一因が細胞資源としてヒトマクロファージが充分確保できない点にあるのではないかと考えた。

そのため **iPS** 細胞からマクロファージを分化誘導する系に対し、一つのモデルケースとして **HIV** 抵抗性を遺伝子導入した **iPS** 細胞からマクロファージを分化誘導し、作成されたマクロファージが実際に **HIV** 抵抗性を示すかということを検証することとした。

1-5. iPS 細胞を利用した HIV 抵抗性を持つマクロファージの作成

1-5-1. HIV 抵抗性付与に関する既報

次にどのような機序で HIV 抵抗性を付与するかについて検討した。HIV 抵抗性細胞の作製については、先に述べた ZFNs を用いた方法以外にも、CCR5 の RNA を標的にした RNAi を用いた方法、CCR5 の N 末端細胞外ドメインを標的にした細胞内単鎖抗体(intrabody) を用いた方法 [54]や、C 末端にリジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシンからなる、小胞体への停留シグナルを持つように改変し、新たに合成されたケモカインレセプターに結合して細胞膜への輸送を阻害する intrakine 遺伝子を導入して細胞表面のケモカインレセプター(CCR5, CCR1, CCR3 など)の発現を抑制するという方法 [55]などがある。これらは主に CCR5(R5 ウイルス)を標的としたものであるが、生体内には感染時に co-receptor として CXCR4 を単独(X4 ウイルス)、または CCR5 と CXCR4 の両者(R5-X4 ウイルス)を用いる細胞指向性を持つ HIV-1 も存在している。CXCR4 を同様に ZFNs で欠損させ CXCR4 指向性の HIV の感染が CD4 T 細胞において抑制された報告 [56]もあるが、CCR5 と CXCR4 の両方を共に欠損させた報告はない。また HIV の co-receptor としては、これ以外にも特に中枢神経のミクロ

グリアなどでは CCR3 を CCR5 と併用しているという報告 [57] もあり、これらすべてを同時に欠損させることは困難である。

他の戦略として、HIV の Tat や Rev などの遺伝子発現を hammerhead ribozyme を用いて mRNA レベルで抑制した CD34+細胞を輸注する方法も Phase 2 の臨床試験まで報告されているが、VL については優位差を認めなかった [58]。また、ウイルス RNA を small interfering RNA (siRNA) がエンドヌクレアーゼ活性を示す Argonaute などと RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex (RISC)) を形成することで、直接切断する PTGS (post transcriptional gene silencing) のメカニズムで分解し、発現を低下させたとする知見も in vivo の系について報告されている [59]。しかしながら、RNAi を用いた場合、標的としているウイルス RNA に変異が入ることによりその特異性が失われ、治療の失敗につながる危険性がある [60]。

その他、宿主防御因子である TRIM5 α (Tripartite motif-containing protein 5 alpha), APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) 3F, 3G や tetherin などに着目した治療法も検討されている。例えば、ヒト TRIM5 α に関して、遺伝子の変異によりエスケープ現象を見せる

HIV-1 に対してアカゲザルの TRIM5 α を遺伝子導入したヒト細胞(HeLa cell)で HIV-1 の感染の抑制が示されている [61]。

免疫原性の問題を回避する目的でヒト TRIM5 α を使用し、HIV-1 に対する抵抗性を獲得するためにアカゲザルの TRIM5 α に似せて B30.2 ドメインのアミノ酸をアルギニンからプロリンへ置換したキメラ(human-rhesus) TRIM5 α を使用して、やはり HIV 感染の抑制が認められた報告 [62]や、このキメラ TRIM5 α が遺伝子導入された CD34 陽性細胞をマウスに移植し、キメラ TRIM5 α を発現したヒト胸腺細胞が HIV に感染しなかったという報告 [63]もあり、一定の効果が認められている。

しかしながら、こうしたキメラタンパク質などの anti-HIV 遺伝子を導入する方法は、生成されたタンパク質が免疫原性を持つ可能性があり、慎重に評価、検討される必要がある。

1-5-2. transcriptional gene silencing (TGS)を介した siRNA による HIV 抵抗性の付与

本研究では iPS 細胞に導入する HIV 抵抗性因子として、個々の遺伝子や分子を障害するよりも、ウイルスの遺伝子転写全体を阻害するメカニズムの方が、

よりウイルスによる回避が起こりにくいと考え、shRNA による TGS を介したウイルスの遺伝子発現制御について着目した [64]。共同研究者の鈴木博士らは HIV-1 に感染している MOLT-4(T 細胞株)に shRNA をレトロウイルスで導入し、HIV 産生の抑制を報告した [65]。この shRNA は HIV の 5' Long terminal repeat (LTR)内の U3 領域にあり、配列の変異が少ないとされる [66]NF-κB 結合領域を標的とする non-coding shRNA である。その結果、ウイルス DNA は検出されるが RNA は検出されなくなること、HDAC inhibitor である Trichostatin-A(TSA)では抑制効果が認められなくなるが、DNA methyltransferase inhibitor である 5-azacytidine(5-AzaC)では抑制効果が継続すること、更に HDAC1, Ago1, H3K9me2 などに対する抗体でこれらのタンパクと結合している DNA を免疫沈降法(chromatin immunoprecipitation assays, CHIP)で選別し、LTR 領域を含む primer を用いて qPCR を行った結果から、ヒストンのメチル化を介したウイルス遺伝子のヘテロクロマチン化による転写抑制が想定された。後の報告でも、蛍光色素を用いて Ago(Argonaute)と NF-κB 結合領域に配列特異的な siRNA の局在が確認され、TGS がこの siRNA の作用機序であることを示唆している [64]。これらの報告から想定される作用機序を図 1-3.にまとめた。

以上より、HIVのプロモーター領域に TGS を介した抑制作用を持つ NF- κ B 結合領域に結合する shRNA を iPS 細胞に遺伝子導入して、HIV 抵抗性の血球細胞を作成することとした。具体的には shRNA を遺伝子導入した iPS 細胞から造血前駆細胞を経て、骨髄球系細胞（樹状細胞、マクロファージ）への分化を検討し、これらの細胞が HIV-1 抵抗性を示すかどうかを検証した。これらに関する結果を以下に示す。

2. 方法

2-1. PBMC と PBMC 中の CD14+細胞から骨髄球系細胞(MDM 及び MDDC)へ

の分化

PBMC は Cellular Technology 社から購入(Shaker Heights, OH, U.S.A.)したものと、健康ボランティアから採血してリンホセパール(Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan)を用いて分離したものを使用した。健康ボランティアからの採血に関しては、東京大学及び京都大学のガイドラインを遵守し、書面で同意を得た上で行った。

PBMC 中の CD14+細胞を anti-human CD14 Microbeads(Miltenyl Biotec , Bergisch Gladbach, Germany)を用いて選別し、RPMI 培地(Sigma, Poole, United Kingdom)で培養した。この内、マクロファージの分化誘導に関しては、50 ng/ml M-CSF(Peprotech, Rocky Hill, NJ, U.S.A.), 50 ng/ml GM-CSF(Peprotech) [67]を、樹状細胞分化の分化誘導に関しては 50 ng/ml GM-CSF(Peprotech)及び 50 ng/ml IL-4(Peprotech)を加えた。

2-2. iPS 細胞の樹立

今回、original iPS 細胞として、ヒト T 細胞からセンダイウイルスを使用して作成した iPS 細胞を使用した [37]。HIV の感染実験では、これに後述の shRNA を遺伝子導入して使用した。

2-3. SIN lentivirus ベクターと iPS 細胞への shRNA の遺伝子導入

siRNA-PromA(GGGACTTTCCGCTGCTGGGGACTT)は、CCR5 指向性の HIV-1 において NF- κ B の結合部位(GGGACTTTCCGCTGGGATTTCC)に相補的な配列を持つように設計され、siRNA-M2(GGGACTTTAAGCTGGGGACTT)は、siRNA-PromA と 2 塩基異なり、siRNA-PromA の配列特異的な作用を検証するために使用した。siRNA-JRFL は、CXCR4 指向性の HIV-1 において NF- κ B の結合部位に相補的な配列を持ち、siRNA-PromA と比べ 1 塩基だけ異なる配列を持つように設計されている。

shRNA-PromA, shRNA-M2 を含む SIN レンチウイルスは鈴木博士に提供していただいた。図 1-3. に HIV-1 の 5' LTR とそこに含まれる NF- κ B 結合領域を示す。shRNA-PromA はこの部位に対して相補的な配列を持ち、shRNA-M2 は 2 塩基違いの配列を持つ。図 2-1. に SIN lentivirus ベクターの構造を示す [68]。このベ

クターは central polypurine tract(cPPT), U6 プロモーター(U6 P), shRNA, ubiquitin C promoter(Ubc)と EGFP からなる。WPREmt(mutant woodchuck promoter response element)と改変した LTR を含むため、ウイルス遺伝子はインテグレーションするが発現はしない構造となっている。

SIN lentivirus 感染させる iPS 細胞を、マトリゲル上で培養した iPS 細胞をトリプシン処理によって単一細胞にしたものを、 5×10^5 細胞/ml の濃度で 10 μ M Rock inhibitor (Y27632, Tocris Bioscience , Bristol, UK) を添加した mTeSR1 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)に懸濁した。細胞懸濁液を 1.5 ml eppendorf tube へ移した後に、MOI 3~12 になるようウイルス液を添加し、Macsmix Tube Rotator (Millienyi Biotec)を用いて 37°C 下で 20 分間、回転混和をおこなった。その後 iPS 細胞を回収してマトリゲルでコートした 24 well plate へそれぞれ播種し、mTeSR1(Rock inhibitor を含む)で培養した。遺伝子導入は EGFP の発現で評価し、分化実験へ使用する前に 1 回または 2 回フローサイトメーターで EGFP 陽性細胞をソートした。分化実験へはこの EGFP 陽性の oligo-clonal な iPS 細胞を使用した。

本研究では、特に記載がない場合フローサイトメーターは FACS Aria II または

LSR(BD Bioscience, San Jose, CA, U.S.A.)を使用し、解析には FlowJo(TreeStar, San Carlos, CA, U.S.A.)を使用した。

2-4. shRNA を導入した iPS の未分化性等の確認

2-4-1. TRA-1-60, SSEA-4 のフローサイトメーター解析

マトリゲル上の iPS, iPS-PromA, iPS-M2 をトリプシンで剥離し、single cell にした状態で、Rock inhibitor を添加し TRA-1-60/Alexa Flour 648, SSEA-4/PE 抗体と室温 20 分間反応させた。結合していない抗体を洗浄除去しフローサイトメーターで解析を行った。

2-4-2. ALP 染色

12 well plate 上のマウス胚線維芽細胞(MEF)に播種した iPS(iPS, iPS-PromA, iPS-M2)、を D- phosphate-buffered saline (PBS)(Nakarai Tesque, Tokyo, Japan) にて 1 回洗浄し、fixative solution(100% methanol 9ml+formalin 1ml)を添加して 30 分間室温で固定した。Fixative solution を吸引除去して、Rinse buffer(0.1M Tris-HCl (pH 9.5))で 2 回洗浄したのち、staining solution(Vector Black Alkaline Phosphatase Substrate Kit II)(Vector laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)を

メーカーの推奨方法に準じて使用し、室温、遮光の状態ですべて 15 分間染色した。その後 rinse buffer にて 2 回洗浄し、PBS を加えて IX71 (Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

2-5. iPS 細胞から骨髄球系細胞への分化(図 2-2.)

当研究室からの報告 [69]にもあるように、iPS 細胞から血球系細胞を含む中胚葉系細胞が分化誘導できることが知られている。この方法に準じて、in vitro で造血前駆細胞を経てリンパ球系、骨髄球系細胞の分化誘導を行った。

60mm ディッシュにコンフルエントな iPS 細胞をクランプの状態ですべて 6:1 の量で 100mm ディッシュの C3H 10T1/2 フィーダー細胞上に播種し、20 ng/ml VEGF(PeproTech)存在下ですべて 7 日間 5% CO₂, 5% O₂ の低酸素条件下で培養し、その後 7 日間 20 ng/ml VEGF, 50 ng/ml SCF(PeproTech), 50 ng/ml Flt-3L(PeproTech)存在下で培養を継続した。培地交換は 3-4 日毎に行った。7 日以降の培地交換に関しては、sac 外に血球細胞が浮遊しているため、培地を一度遠心して血球を回収して新たな培地と共にディッシュへ戻した。14 日目に機械的に sac 構造を破壊して得られた培養上清を 100mm ディッシュですべて 1 時間培養

して付着細胞を除去し、浮遊している細胞のみを回収した。回収した細胞懸濁液を 40 μ m のセルストレーナーにて濾過して造血前駆細胞を回収した。これを新たな C3H 10T1/2 フィーダー細胞上に 1:1 で播種し、10 日間 50 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml M-CSF 存在下で培養した。培地交換は 3-4 日毎に行った。この段階でサイトカイン最適化のための実験の際には 20 ng/ml IL-3(PeproTech)や 50 ng/ml SCF も使用した(表 2-1.)。24 日目に、浮遊系細胞または軽度に付着している細胞を回収して樹状細胞分化に、付着系細胞をマクロファージ分化に用いた。以降、樹状細胞とマクロファージへの分化誘導には BME(Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)培地を使用した。

2-5-1. 樹状細胞への分化誘導

2-5. で得た浮遊系細胞を、低吸着 6 well プレート(Corning Costar Ultra-Low attachment multiwell culture plates) (Corning Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) に播種して 50 ng/ml GM-CSF と 10 ng/ml IL-4 存在下で培養した。5 日程度で突起を有する樹状細胞が出現した。更に成熟樹状細胞を得るためには、これらの細胞を低吸着 24 well プレート(Corning Costar Ultra-Low attachment multiwell culture plates)(Corning Costar)に播種して 10 ng/ml IL-4 と 3 μ g/ml LPS 存在下

で培養を行った。

2-5-2. マクロファージへの分化誘導

2-5. で得た付着系細胞を低吸着 6 well プレート(Corning Costar Ultra-Low attachment multiwell culture plates) (Corning Costar)に播種して 50 ng/ml GM-CSF と 50 ng/ml M-CSF 存在下で培養した。5 日程度で広い細胞質を持ちプレート底に付着するマクロファージが出現した。

2-7. iPS から分化させたマクロファージのフローサイトメーター解析

iPS から分化した樹状細胞とマクロファージに関しては、分化開始から 33-35 日目に、PBMC から分化した樹状細胞とマクロファージに関しては、分化開始から 7 日目にフローサイトメーターの解析を行った。これらの細胞に関しては Fc-receptor-blocking reagent(Miltenyi Biotec)をメーカーの推奨方法に準じて使用し Fc 受容体をブロックした。

iPS から分化した T 細胞に関しては、分化開始から 56 日目でフローサイトメーター解析を行った。

共に蛍光色素標識された抗体を 20 分間、室温にて反応させて染色し、FACS

Aria IIにて解析を行った。フローサイトメーターの機器設定には PBMC または OneComp eBeads(Affymetrix, San Diego, CA, U.S.A.)から作成したサンプルを用いた。死細胞除去には Propidium iodide(PI)を用いた。他の実験も含め抗体は anti-CD3/eflour450(clone UCHT1), anti-CD4/APC-H7 (clone RPA-T4), anti-CD5/PE-Cy7 (clone UCHT2), anti-CD7/APC(clone CD7-6B7), anti-CD8/PerCP-Cy5.5 (clone SK1), anti-CD45/v500 (clone HI30), anti-CD34/Pacific Blue (clone 581), anti-CD43/PE (clone eBio84-3C1), anti-CD 11b/PE (clone M1/70), anti-CD11c/APC-Cy7(clone Bu15), anti-CD 14 /Pacific Blue(clone HCD14), anti-CD14/PE-Cy7(clone HCD14), anti-CD1c(BDCA-1)/PE(clone AD5-8E7), anti-CD141(BDCA-3)/APC(clone AD5-14H12), anti-HLA-DR/brilliant violet 605, anti-CCR5/PerCP-Cy5.5(clone L243), anti- CD83/PE(clone HB15a) , anti-CD86/Pacific Blue(clone IT2.2)を使用した。

2-8. 形態観察

各分化細胞の形態観察には、Cytospin4 (Thermo Scientific , Hudson, NH, USA)

を用いて、プレパラート(Matsunami glass, Osaka, Japan)に細胞を単層で付着させ、Hemacolor (EMD Millipore Chemicals, Gibbstown, NJ, U.S.A.)により、固定と染色を行って顕微鏡観察を行った。

2-9. 5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CSFE) T細胞増殖アッセイ

樹状細胞による T 細胞のアロ反応性を検証するために、CSFE T 細胞増殖アッセイを行った [70]。CD3+ T 細胞は、PBMC から CD3 MicroBeads(Miltenyi Biotec)を使用して分取し、Vybrant Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA SE) Cell Tracer Kit (Invitrogen)を用いて染色した。分取した T 細胞は 96 well 丸底プレート 1 ウェルあたり 1×10^5 細胞で播種した。培養は 30 U/ml IL-2(Peprotech)を含む RPMI1640 培地(Sigma)で行った。T 細胞刺激として、1ng/ml phytohaemagglutinin (PHA)存在下で培養、または i-DCs との共培養 (CD3+ T cells : iDCs = 1:1)を 7 日間行い、3 日目と 7 日目にフローサイトメーター解析を行った。

2-10. 樹状細胞とマクロファージの貪食能観察

細胞を、BioParticles (Escherichia coli (K-12 strain) BioParticles, Alexa Flour 594 conjugate, Cat# E-23370, Life technologies)の存在下で 1 時間培養し、PBS で 3 回洗浄後、IX71(Olympus)にて観察を行った。

2-11. iPS-macrophage のサイトカイン分泌能解析

iPS-macrophage, iPS-shRNA-macrophage(分化開始より 34 日目), MDM を 96 well plate に 5×10^4 細胞/ウェルとなるように、3 ウェルずつ播種し、1. 刺激なし、2. 100 ng/ml LPS+20 ng/ml IFN- γ 、3. 20 ng/ml IL-4 存在下の 3 条件で培養を行った。24 時間培養後、培養上清 15 μ l に対して Cytometric Bead Array (CBA) Kit(BD Bioscience)を用いて培養上清中の IFN γ 、TNF- α 、IL-12、IL-10 の濃度を定量した。標準溶液の作成、測定には CBA human Soluble Protein Master Buffer Kit(BD Bioscience)、CBA human Flex Set(BD Bioscience)と、LSR(BD Bioscience)を用い、解析は FCAP array v3.0(BD Bioscience)を使用した。

2-12. iPS から分化したマクロファージの CCR5, shRNA の PCR による発現確

認

分化開始から 35 日目の iPS-macrophage を回収し、RNeasy mini (Qiagen, Chatsworth, CA, U.S.A.)をメーカーの推奨方法に準じて使用して RNA を抽出し、表 2-2. に示すプライマーを使用して PCR を行った。PCR は、Takara Ex Taq(Takara, Osaka, Japan)を用いて、Takara PCR Thermal Cycler Dice touch で行った。PCR 条件は、94°C 2分、45 サイクル(94°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒)、72°C 5 分とした。

以降全ての電気泳動では、2-Log DNA ladder(0.1-10.0kb)(図 2-3.)を使用した。

2-13. iPS 及び iPS より分化したマクロファージのゲノム DNA による挿入遺伝

子の確認

QIAmp DNA mini kit (Qiagen)をメーカーの推奨方法に準じて使用し、細胞からゲノム DNA を抽出した。挿入した shRNA の sense-loop-anti sense を確認するため、図 2-4.に示すように shRNA を挟むような形で設計した、表 2-3.に示すプライマーを使用して PCR を行った。PCR は、Go Taq G2 Hot Start Polymerase (Promega, Madison, WI, U.S.A.)を用いて、Takara PCR Thermal Cycler Dice

touch で行った。PCR 条件は、94°C 2 分、45 サイクル(94°C 10 秒、64°C 10 秒、72°C 1 分)、72°C 5 分とした。得られた PCR 産物のシーケンス解析は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)をメーカーの推奨方法に準じて使用し、96°C 1 分、25 サイクル(96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分)、70°C 5 分の条件で行った。

2-14. HIV-1 BaL 感染実験

MDM(分化開始から 7-9 日目)と iPS-DC 及び iPS-macrophage(分化開始から 33-35 日目)を 48 well plate に 1×10^5 細胞/ウェル(p24 ELISA, RT- assay, HIV group specific antigen(gag) mRNA PCR, HIV DNA PCR 用)または 6 well plate に 9×10^5 細胞/ウェル(ChIP assay 用)となるように播種した。播種後 4 日目に HIV-1 BaL の感染を MOI 0.01(1ng p24 virus)にて行った。コントロールのため、PM-1、THP-1 を同時に感染させた。それぞれ 30 分毎に遠心操作を加えながら(付着細胞はプレートのまま遠心、浮遊系細胞はチューブに回収して遠心)、2 時間ウイルス液と共培養し、ウイルス液を培地で洗浄して除去し、培養を行った。

MDM における HIV-1 の複製、増殖については、組織マクロファージとある程

度同等であることが分かっている [71]。また MDM において感染実験を行うと、HIV-1 の発現が時間経過にほぼ比例して線形的に増加し、感染後 14 日程度で最大となること [72]や、unspliced と multiply spliced HIV RNAs も線形的に増加し感染後 10 日程度で最大になり、プラトーとなることなどが報告 [73]されている。これらの知見を元に、我々もまず初めに p24 ELISA assay にて感染後 14 日間のデータを見てから感染実験のスケジュールを検討することとした。

実験結果から最終的に決定した感染及びサンプル回収のスケジュールを図 2-5.に示す。

2-15. p24 ELISA assay

上清内のウイルス量を評価するための p24 ELISA assay は、培養液 500 μ l(1 ウェル 750 μ l で培養)を、4、7、11、14、21 日目に回収し、HIV Type1 p24 Antigen ELISA(p6 determinations)(Zeptomatrix, Buffalo, NY, U.S.A.)を使用して、iMARK MPM System(BioRad, Hercules, CA, U.S.A.)で計測した。

2-16. Colorimetric RT-assay

上清中の逆転写酵素活性(RT)の測定には、吸光度測定による **Colorimetric RT-assay** を鈴木博士らの報告に準じて行った [74]。

原理を図 2-6 に示す。poly-A を結合したプレートに **complete cocktail** 溶液を入れ、培養上清を加えることで、**complete cocktail** 中の **Triton X-100** が HIV-1 ウイルス外壁を破壊して RT が溶液中に放出される。この状態で一晚(16 時間)培養を続けると、RT 活性により poly-A を鋳型にして **oligo-dT** の 3'末端から **Digoxigenin(Dig)-dUTP** が取り込まれながら poly-T の伸長が起きる。反応時間内に取り込まれる **Dig-dUTP** 量は溶液中の RT 活性に比例する。翌日、溶液中の結合していない **Dig-dUTP** を洗淨、除去し **Peroxidase (POD)**標識抗 Dig 抗体と 30 分間反応させる。取り込まれなかった **POD** 標識抗 Dig 抗体を洗淨除去し、取り込まれた抗 Dig 抗体上の **POD** と **3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)**と反応させ、**450nm** の吸光度を測定し、検量線よりサンプル中の RT 活性が定量できる。

試薬の調整を下記のように行った。**Poly-A plate** の作成として、**7 mg/ml N-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS)**(Funakoshi, Tokyo, Japan) 溶液 **50 ml** に **4 mg/ml poly-A** (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)溶液 **1ml** を加え、振とう攪拌した。この溶液を **96 well plate(Nunc CovaLink NH Modules)**の各ウ

エルに 50 μ l ずつ分注し、更に 50 mg/ml の 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)を各ウェルに 50 μ l ずつ加えた。プレートシート(住友ベークライト株式会社, Tokyo, Japan)をプレートにかけて、溶液を振とう混和させ、共有結合反応を起こさせるために一晩暗所で保管した。以降の保管は 4 $^{\circ}$ Cで行った。使用直前に各セルを wash buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5、0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.01% Tween20(Sigma))で洗浄した。

RT 活性の定量は、サンプル(培養上清)と同時に、活性の分かっている遺伝子組み換え HIV-1 逆転写酵素(HIV Reverse Transcriptase, Recombinant, *E. coli* (Merck Millipore, Guyancourt, France))の希釈系列を用いておこなった。希釈系列としては、10 mU/ μ l 活性溶液の stock solution から 4 倍の段階希釈を行い、8 点の希釈系列を使用した。逆転写酵素反応は 10 μ l のサンプル(培養上清)と 8 点の希釈系列を、poly-A が結合したウェル上に分注した 50 μ l の complete cocktail(50mM Tris-HCl, 168mM KCl, 12.5mM MgCl₂, 5.6mM DTT, 0.44mM EDTA, 0.29% Triton X-100, 5.2 μ M dTTP, 1.1 μ M Dig-dUTP)に加えることによっで行った。反応時間は 37 $^{\circ}$ C、一晩(16 時間)とした。

翌日、poly-A プレート wash buffer (10mM Tris-HCl, 0.01% Tween-20)で 3 回

洗浄し、BSA(Sigma)溶液(5% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl) で 5000 倍希釈した POD 標識抗 Dig 抗体(Roche) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、37°C、30 分間反応させた。Poly-A プレートを wash buffer で 6 回洗浄し、TMB 基質(Sigma)100 μ l を加えて、37°C、15 分間反応させた。1M リン酸溶液(Wako, Osaka, Japan) を各ウェル 50 μ l ずつ加えて、反応を停止し、プレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した。

2-17. HIV gag の(quantitative) qPCR

HIV-1 BaL 感染細胞における、HIV-1 gag 遺伝子の発現を定量する目的で、感染後 11 日目の細胞に RNeasy Micro Kit (Qiagen)の RLT buffer を加えて溶解し、回収した。HIV-1 gag 領域の mRNA の発現は 1 ステップ RT-PCR 用のキット (PrimerScript One Step RT-PCR, (Takara)) を使用して行った。プライマーと Taqman probe は表 2-4.に示した。One-step RT-PCR は、50°C 15 分、95°C 2 分、45 サイクル(95°C 7 秒、60°C 30 秒)とし、QuantiStudio Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。

サンプルの HIV-1 gag mRNA 発現量の定量には、HIV-1 molecular clone

plasmid (pNL4-3, Cat No. 114, NIH AIDS Reagent Program) を使用した。この molecular clone Plasmid を用いて $2 \text{ copy}/\mu\text{l} \sim 2 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}$ の 8 点の検量線を使用してサンプルの中に含まれる HIV-1 gag mRNA 発現量の定量をおこなった。サンプル間の比較は、各サンプルに含まれる GAPDH の mRNA の発現量を測定して HIV-1 gag mRNA の発現を標準化することによっておこなった。

GAPDH の定量は、GAPDH の PCR で増幅された DNA を pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を用いてクローニングし作成した Plasmid を用いて作成した $2 \text{ copy}/\mu\text{l} \sim 2 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}$ の 8 点の検量線を用いておこなった。

2-18. HIV DNA PCR

感染してから 24 時間後に感染細胞を回収し、QIAamp DNA blood mini kit(Qiagen)を用いて DNA を抽出した。PCR 反応は、SentiFAST probe kit (Bioline Inc.)を使用し最終濃度 250nM 上述の HIV-gag primer set を使用して HIV-1 molecular clone plasmid (pNL4-3, Cat No. 114, NIH AIDS Reagent Program) の $2 \text{ copy}/\mu\text{l} \sim 2 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}$ の 8 点の検量線を使用し、定量した。

2-19. iPS-macrophage の RNA sequencing と遺伝子解析

iPS-macrophage、iPS-PromA-macrophage、iPS-M2-macrophage、MDM において RNeasy mini(Qiagen)で mRNA を抽出し、Rneasy TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit(Illumina)を使用し、HiSeq2500(Illumina, San Diego, CA, U.S.A.)を用いてシングルリード法(100 サイクル)でシーケンスを行った。FASTQ の作成は BCL2FASTQ Conversion Software 1.8.4 in the CASAVA 1.8.2 pipeline で行い、マッピングは Tophat v2.0.8b で hg19(UCSC human genome 19) を reference 配列として使用して行った [75]。RPKM の算出、GO 解析はそれぞれ RPKMforGenes [76]と David v6.7 [77]で行った。

主に以下の 4 点について遺伝子解析を行った。1. MDM と iPS-macrophage の発現遺伝子の類似性の検証、2. iPS-macrophage, iPS-PromA-macrophage, iPS-M2-macrophagen 発現遺伝子の類似性の検証、3. iPS-macrophage, iPS-PromA-macrophage, iPS-M2-macrophage について、off-target 効果の有無の検証(NF- κ B driven genes(表 2-5.)の発現検証)、4. Macrophage フェノタイプ (M1, M2 関連遺伝子(表 2-6.) [78]の発現)の検証。

2-20. 統計解析

統計解析は GraphPad Prism version 6.0(GraphPad software, La Jolla, CA, U.S.A.)を用いて行い、有意差検定は one way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests において有意水準 α を 0.05 として行った。

3. 結果

3-1. iPS 細胞から骨髄球系細胞への分化誘導

造血前駆細胞への分化方法として、高山博士らの報告 [36]にある sac 法を利用し、造血前駆細胞から骨髄球系細胞への分化方法として千住博士らにより報告された [33]iPS 細胞から骨髄球性細胞への分化誘導法に基づき、分化誘導を試みた。

ヒト T 細胞由来で未分化状態が維持されている iPS 細胞をマウス間葉系幹細胞株であるフィーダー細胞(C3H 10T1/2)上に播種し、VEGF(血管内皮新生因子)を含む血球分化培地で 14 日間培養した。播種された iPS 細胞は、播種直後は平坦なコロニー状であるが、数日かけてコロニー周囲から全体にかけて囊状に隆起してくる。この囊状の構造を sac と呼ぶ。sac 内部に血球細胞の分化が認められた(図 3-1. A.)。分化開始 14 日目に sac から回収された血球細胞はフローサイトメトリー解析において CD34 陽性もしくは CD43 陽性の幼弱な血球細胞であることが確認され、CD34+CD43+の造血前駆細胞は 42.8%認められた(図 3-1. B.)。

この造血前駆細胞を新たな C3H 10T1/2 上に播種し、GM-CSF 及び M-CSF 存

在下で培養し、10 日目に細胞をトリプシン処理してその吸着性でフィーダー細胞と分けた上で、回収した細胞を 7~10 日間、更に低い吸着性を持つ細胞については GM-CSF 及び、IL-4 存在下で樹状細胞へ分化誘導し、高い吸着性を持つ細胞については GM-CSF 及び M-CSF 存在下でマクロファージへ分化誘導できた。

3-2. HIV-1 感受性を持つ血球系譜への分化効率の最適化

造血前駆細胞への分化過程において、TPO 濃度により feeder free にするステップ(図 2-2. Step3 の 24 日目)における付着系細胞(単球相当の分化細胞)の数に有意差を認めなかった(TPO 0 ng/ml と TPO 2 ng/ml、TPO 0ng/ml と TPO 20ng/ml、TPO 2ng/ml と TPO 20ng/ml において全て p 値 >0.99)(図 3-2. A.)。最終的に得られたマクロファージでは、フローサイトメーターの解析において、CCR5 の発現が、TPO 存在下の方が非存在下に比べて高い傾向が見られた (図 3-2. B.)。

骨髓球系細胞への分化(造血前駆細胞を回収後、10 日間の分化過程)に関しては、GM-CSF+M-CSF、GM-CSF+M-CSF+SCF、GM-CSF+M-CSF+SCF+IL-3 と

GM-CSF+M-CSF+IL-3 の 4 つの組み合わせを設定し比較した(表 2-1.)。

その結果、GM-CSF と M-CSF だけに比べ、SCF または IL-3 を加えることで収量の改善がみられた(図 3-3.)。更にフローサイトメトリー解析で iPS-macrophage においては CCR5 の発現は変わらず、かつ iPS-DC においては CD141+CD1c 陽性の樹状細胞について HLA-DR は各サイトカイン条件で 99% 以上発現していたのに対して、CCR5 の発現は SCF を加えることで高い傾向を示した(図 3-4. A-B.)。

このプロトコールを使用し、iPS-macrophage においては、Step2 で使用した 100mm ディッシュあたり、 $2.0 \times 10^5 \pm 8.7 \times 10^4$ 細胞得られた(図 3-5.)。以降の実験はこれらの最適化プロトコールを用いて行った。

3-3. iPS 細胞への shRNA の導入と遺伝子改変 iPS 細胞の未分化性検討

先行論文 [68]に従い作成された SIN レンチウイルスベクターを用いて iPS 細胞に shRNA の導入を行った。

マトリゲル上で培養した iPS 細胞に、図 2-1.のウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 3 日目から蛍光顕微鏡で EGFP の蛍光が観察

され(図 3-6. A)、8 日目に行ったフローサイトメーターにおいて、iPS-PromA, iPS-M2 でそれぞれ 99.6%, 98.3%の EGFP 陽性率が確認された(図 3-7. A.)。

これらの iPS 細胞について、未分化性を確認するために、アルカリホスファターゼ染色を行い、細胞表面に発現している未分化マーカーである SSEA-4 [79] と TRA-1-60 [80]の発現をフローサイトメーターで評価した。その結果、アルカリホスファターゼ染色(図 3-8. A.)が陽性で、SSEA-4, TRA-1-60 も 95%以上で陽性であり(図 3-8. B.)、shRNA 導入後も未分化性が維持できていたことが確認された。

挿入遺伝子の確認のために、iPS細胞のゲノム DNA について、挿入した shRNA を含むような primer(表 2-3.)で PCR を行い、電気泳動で 900bp のバンドを認めた(図 3-9. A.)。

3-4. iPS-DC, iPS-macrophage の表現形と機能

図 3-10. A. に示すように、iPS-DC は細胞質が突起状に伸びる特徴的な形態が認められたが、PBMC から分化させた monocyte derived DC に比べると、細胞が大きかった。またそれ以外に膨化したような細胞が一部に認められるなど、

より形態的にヘテロな集団であった。

マクロファージについても(図 3-10. B.)全体としてみれば **iPS-macrophage** も **MDM** と同様の広い細胞質を持った付着系のマクロファージ様の形態を示した。個々の細胞においては円盤状に広い細胞質を持つものや、突起状に長い細胞質を持つものなどが混在しており、より形態的にヘテロな集団であった。また **shRNA** を導入した **iPS-DC**, **iPS-macrophage** では、遺伝子導入の際マーカーとして使用した **EGFP** の発現を、**iPS-DC** については **80%**以上、**iPS-macrophage** については **99%**以上が保たれていた(図 3-13.,図 3-14.)。蛍光顕微鏡でもほぼ全ての分化細胞に於いて **EGFP** の蛍光を確認することができた(図 3-10. C,D)。

分化開始から **32** 日目の浮遊系細胞(**iPS-DC**)と付着系細胞(**iPS-macrophage**)のサイトスピンを行った。全体としてヘテロな集団であったが、主体をなす細胞について図に示した(図 3-11. A-B.)。樹状細胞においては長い突起を有する細胞が、マクロファージにおいては広い細胞質に空胞や **debris** などを有する特徴的な形態が確認された。**Original iPS** 細胞から分化させた細胞と、**shRNA** を遺伝子導入した **iPS** 細胞から分化させた細胞で、特に形態的な違いは認められなかった。

フローサイトメーターにて、MDM(図 3-12.)、iPS-DC(図 3-13.)および、iPS-macrophage(図 3-14.)の表面マーカーを確認した。iPS-DC においては CD45+HLA-DR+で CD1c(BDCA-1)と CD141(BDCA-3)を double positive で発現している myeloid DC として矛盾しない細胞集団が認められた。iPS-macrophage においては、MDM と同様に、CD11c+CD11b+CD14+HLA-DR+のマクロファージとして矛盾しない細胞集団が認められた。更に HIV-1 の感染に必要な CD4 の発現をフローサイトメトリーで確認し iPS-PromA-macrophage において iPS-macrophage に比べて発現が低くないことを確認した(図 3-15.)。HIV-1 が感染する際、co-receptor として使用する CCR5 に関しては、フローサイトメーターに加えて RT-PCR を行い、RNA レベルの発現にも差がないことを確認した(図 3-16.)。

分化細胞の機能として iPS-DC に関しては、T 細胞へのアロ刺激について CSFE 染色を利用して検証し、iPS-DC が T 細胞をアロ刺激することで、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の両方で T 細胞の活性化を示す分裂が起きていることが示された(図 3-17. A.)。また、shRNA-PromA, shRNA-M2 を遺伝子導入した iPS 細胞から分化させた iPS-DC についても、T 細胞の分裂が示された(図 3-17. B-C.)。

マクロファージにおける貪食能に関しては、MDMと同様に iPS-macrophage, iPS-shRNA-macrophage を不活化した大腸菌成分を蛍光標識(Alexa Flour 549) した bioparticle と共培養し、これが貪食されることを確認した(図 3-18. A-B.)。

3-5. iPS-macrophage の RNA sequencing による発現遺伝子の解析

iPS-macrophage と MDM の同等性、更に shRNA 導入による影響を評価する目的で RNA sequencing 解析を行った。検出された遺伝子数を表 3-1.に示す。また、各遺伝子にマップされたリード数の相関関係を Pearson Correlation Matrix で示す(図 3-19. A.)。iPS-macrophage, iPS-PromA-macrophage, iPS-M2-macrophage と MDM は極めて高い相関を示した。

発現遺伝子のヒートマップを図 3-19. B.に、fold change(FC) 2 倍以上の遺伝子数を表 3-2.に示す。この FC 2 倍以上の遺伝子に関して GO 解析を行い、上位 5 位までを表 3-3.に示す。

3-6. iPS-macrophage のフェノタイプ解析(サイトカイン産生能、RNA sequencing とフローサイトメトリー)

MDM と同様に iPS-macrophage および iPS-shRNA-macrophage においては M1 マクロファージ誘導刺激(100 ng/ml LPS+20 ng/ml IFN- γ)を受けた細胞で M1 サイトカイン濃度が上昇するという傾向が認められた。一方、M2 刺激(20 ng/ml IL-4)に対しては MDM も含め、全てのマクロファージで IL-10 の上昇は認められなかった(図 3-20.)。

フローサイトメーター解析に関しては、CD45+CD68+のマクロファージ表現型を持つ集団について、M2 マクロファージのマーカースとして CD163(スカベンジャー受容体)、CD206(マクロファージマンノースレセプター)を、M1 マクロファージのマーカースとして CD86(免疫グロブリンスーパーファミリーに所属)を調べた。

その結果、各分化細胞で死細胞除去後の CD45+CD68+陽性細胞は、MDM で 87.8%、iPS-macrophage で 60.1%、iPS-PromA-macrophage で 87.8%、iPS-M2-macrophage で 95.9%となっており、これらの集団はマクロファージと確認された。M1 マクロファージマーカースの CD86 陽性細胞は 87.6%、95.4%、95.0%、99.1%であり、CD86 陽性かつ M2 マクロファージマーカースの CD163+CD206+ double positive である細胞がそれぞれ 99.9%、98.8%、98.5%、

99.6%を占めていた(図 3-21. A.)。

RNA sequencing 解析においても M1, M2 遺伝子の発現に一定の傾向を認めることはできなかった(図 3-22. A-B.)。具体的には、M1 マクロファージに発現の高い IFN γ R、M2 マクロファージに発現の高い IL4R, CHIT1 が高値であった。

3-7. shRNA-PromA による off-target 効果の確認

今回使用した siRNA はプロウイルスの状態の 5'末端の LTR にある、NF- κ B 結合領域に作用する。ヒトゲノムにおいて、完全に相補的な配列はないが、homology の高い配列は存在している。そのため off-target 効果の有無を確認する目的で NF- κ B 関連の遺伝子発現について RNA sequencing 解析を行った。

NF- κ B driven gene については、MOLT-4 を使用した先行論文 [81]に準じ、84 個の遺伝子について RNA sequencing で発現を比較したところ、細胞間で発現に差があるものでも 2 倍以内の差しか認めなかった。図 3-23. A-C.に発現の高い遺伝子から順にその差をプロットした結果を示す。

3-8. iPS-macrophage, iPS-DC への HIV-1 BaL 感染実験と shRNA-PromA の

HIV-1 産生抑制の評価

iPS-shRNA-macrophage のゲノム DNA について、iPS 細胞と同様に挿入した shRNA を含むような primer で PCR を行い、電気泳動で 900bp 付近にバンドを確認した(図 3-9. B.)

iPS-macrophage への HIV-1 感染実験においては、単球、マクロファージ指向性(M-tropic)で CD4 と共に CCR5 を感染時使用する HIV-1 BaL を使用した。

siRNA-PromA はこの HIV-1 BaL の NF- κ B 結合領域に相補的な配列を持つ。感染実験では、感染後 11 日目までの位相差顕微鏡による観察において、感染後のマクロファージに膨化などの明らかな形態的变化を認めなかった(図 3-24.)。

HIV-1 の感染が成立しているかを確認するために、感染細胞の DNA を抽出し HIV gag を qPCR で定量した。

感染が成立していることを確認後、shRNA-PromA による HIV-1 産生抑制効果の評価するために、感染細胞からの HIV-1 産生を HIV-1 core protein の一つである p24 を検出する ELISA assay、ウイルス内の逆転写酵素活性を測定する reverse transcriptase(RT) –assay、HIV-1 gag mRNA を測定する HIV gag qPCR を行った。

感染細胞の DNA において、HIV gag を定量したところ、iPS-macrophage、iPS-PromA-macrophage 及び、iPS-M2-macrophage 全てで HIV DNA が検出された。iPS-macrophage と iPS-PromA-macrophage では有意に iPS-PromA-macrophage で HIV gag DNA 量が少なかった(p 値 $0.016 < \alpha = 0.05$)。iPS-macrophage と iPS-M2-macrophage、iPS-PromA-macrophage と iPS-M2-macrophage 間は有意差を認めなかった(それぞれ p 値 0.123, 0.453 $> \alpha = 0.05$) (図 3-25.)。

p24 ELISA assay は簡便な操作で、タンパク質レベルでのウイルス量を測定できる。しかし宿主細胞がウイルスにより破壊された時に細胞質内に存在するタンパク質が上清中に出た場合に、その p24 も検出されてしまうため、ウイルス産生量が少なくても、死細胞が多い場合は p24 が高値になってしまうという欠点がある。これに対して RT-assay は、ウイルス内の活性型逆転写酵素のみを反映するためより正確である。

更にウイルス産生が mRNA レベルで抑制されているかどうかを確認するために HIV gag qPCR を行った。感染実験のスケジュールとしてはまず p24 発現を ELISA assay にて測定して決めていった。Aquaro らの報告 [73]通り、MDM

について同様に 10 日前後で p24 発現のピークが認められ、感染系として成立することが確認できた。また iPS-(shRNA-)macrophage についても、感染後 7-10 日程度でピークに達しており、以降は大きな変化が認められなかったことから、以降 RT-assay や HIV gag 発現については、感染後 11 日までを測定することとした。

p24 ELISA assay では(図 3-26. A.)、iPS-macrophage で感染 4 日目から p24 の上昇が認められた。これに対して iPS-PromA-macrophage では、感染後 4 日目で iPS-macrophage に比べ約 1/20、iPS-M2-macrophage に比べ約 1/15 に p24 が抑制されていた。

感染後 4 日目から 11 日目にかけて iPS-PromA-macrophage では p24 の上昇が認められるが、それ以降はほぼ一定の値で 21 日目まで推移し、iPS-macrophage と比べて約 1/3、iPS-M2-macrophage と比べて約 1/6 に抑制されていた。

RT-assay(図 3-27.)については、p24 ELISA assay と比べより明確に、iPS-macrophage で MDM と同程度の RT 活性上昇が、感染後 11 日目までの経過で認められた。更に iPS-M2-macrophage でも同程度の RT 活性上昇が認められた。

しかしながら、それに比べ iPS-PromA-macrophage では感染後 0 日から感染後 11 日目において、RT 活性は $5.5 \times 10^{-4} \mu\text{U/ml}$ と $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{U/ml}$ とほぼ上昇を認めず、11 日目の RT 活性の値も iPS-macrophage, iPS-M2-macrophage, MDM が 10^{-1} order まで上昇していたのに対して 10^{-3} order と 2 Log 程度の抑制を見せた。

4 日目において iPS-macrophage と iPS-PromA-macrophage、iPS-PromA-macrophage と MDM、iPS-PromA-macrophage と iPS-M2-macrophage の間で有意に iPS-PromA-macrophage は低い RT 活性を示していた(p 値はそれぞれ 0.0037、0.0061、 $0.0023 < \alpha = 0.05$)。7 日目においては各細胞間で有意な差は認められなかったが、11 日目においては iPS-macrophage と iPS-PromA-macrophage、iPS-PromA-macrophage と MDM の間で有意に iPS-PromA-macrophage は低い RT 活性を示し(p 値はそれぞれ 0.0034、 $0.0009 < \alpha = 0.05$)、iPS-M2-macrophage と MDM においても有意に iPS-M2-macrophage が低い RT 活性を示していた(p 値 $0.0233 < \alpha = 0.05$)。

更に HIV gag の発現を GAPDH で標準化した qPCR においても、RT-assay と同様に iPS-PromA-macrophage では、感染後 4 日目から 11 日目で HIV gag の発現は他の細胞に比べて抑制されていた。11 日目においては、

iPS-PromA-macrophage における、HIV gag の発現量は iPS-macrophage, MDM に対してそれぞれ 1.89%、0.53%、iPS-M2-macrophage に比べ 5%に抑制されていた(図 3-28.)。検定において iPS-PromA-macrophage は他のマクロファージに比べ、感染後 4 日目、11 日目で共に HIV gag mRNA 量は iPS-PromA-macrophage で有意に少なかった (iPS-macrophage, iPS-M2-macrophage, MDM との比較において感染後 4 日目 p 値 0.001, <0.0001, <0.0001 $\alpha = 0.05$、感染後 11 日目 p 値 <0.0001, 0.0073, <0.0001 $\alpha = 0.05$) が、他の iPS-macrophage と iPS-M2-macrophage、iPS-macrophage と MDM、iPS-M2-macrophage と MDM の比較においても有意差を認めていた(各々感染後 4 日目 p 値 0.0002, <0.0001, <0.0001 $\alpha = 0.05$、感染後 11 日目 p 値 0.002, <0.0001, 0.0005 $\alpha = 0.05$)。

一方、iPS-DC についても iPS-macrophage とほぼ同様のプロトコールで HIV-1 BaL の感染実験を行い、p24 ELISA assay を行った。positive control として T-細胞株ながら、マクロファージ指向性である HIV-1 BaL を含む広範囲の HIV-1 strain での感染性がある PM-1 [82]を設定し、p24 の上昇を認めた。しかしながら iPS-DC では p24 の上昇は検出されなかった(図 3-26. B.)。

4. 考察

4-1. 本研究における成果

本研究では、iPS 細胞からマクロファージへと分化誘導させる既報の系に対し、造血前駆細胞を分化誘導するまでのステップで sac 法を用い、その後の骨髄球系細胞への分化にはフィーダー細胞として C3H 10T1/2 を使用した上でサイトカインの最適化を行い、HIV 実験を含む医学的研究に繰り返し十分量のマクロファージを安定供給する系の確立を行った。更に HIV-1 産生抑制を示す shRNA を iPS 細胞に遺伝子導入し、その発現を維持したまま樹状細胞とマクロファージへ分化させ得ることを示した。特に、マクロファージに関しては、実際に HIV-1 BaL の感染実験を実施して、iPS 細胞から分化させたマクロファージでも HIV-1 の感染が成立することを示した。その上で、HIV-1 産生抑制効果を持つ shRNA を導入した iPS 細胞である iPS-PromA から分化させた iPS-PromA-macrophage において、HIV-1 産生を抑制する可能性があることを、p24 タンパク量、RT 活性に加え、HIV gag mRNA 発現量で示した。これらより、iPS 細胞から分化させたマクロファージが HIV 実験にも利用できることを示すことができたと考える。

4-2. マクロファージを安定供給する系の確立

4-2-1. iPS 細胞から HIV-1 感受性を持つ血球系譜の分化効率の最適化について

今回私は、iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導の系に関して、既報の方法 [33]を一部改変し、この系の最適化を試みた。

まず当研究室で効率的な血球分化誘導の方法として開発された sac 法 [36]を利用して分化誘導を行った。sac と呼ばれる袋状の構造物中で、濃縮された状態で造血前駆細胞が効率的に分化してくる手法である。

OP9 をフィーダー細胞とする、hES 細胞から血球細胞への分化誘導の研究から、CD43 は CD45 より幼弱な段階で CD34 に次いで発現し、CD34+CD43-KDR+CD31+の内皮系細胞から造血前駆細胞を区別するための良いマーカーになるとされている [83]。本実験においても、C310T1/2 上で 14 日間培養後、sac より回収された細胞には CD34+CD43+の造血前駆細胞が確認され、sac 法により幼弱な造血前駆細胞が確かに分化誘導されていることが確認できた。

更に私はこのステップに引き続き、マクロファージ細胞への分化過程においてもマクロファージ分化に抑制的に働く既報の OP9 を避け、フィーダー細胞と

して **C3H 10T1/2** を使用し最終的にマクロファージ及び樹状細胞が分化してくることを確認した。

OP9 は、脂肪へ分化する性質を持ち、脂肪細胞のモデルに使われることもある細胞である。脂肪へ分化するプロトコールには細胞密度の高い状態で血清を分化用のものに置換したり、インスリンとオレイン酸を培地に加えたり、**3T3-L1** 細胞(マウス線維芽細胞)でも報告されている [84]2 種類の培地を順に使用して培養したりする方法があり、これらの方法により **OP9** は細胞質にトリグリセリドを蓄え、脂肪細胞の形態に変形し、アディポネクチンやグルコーストランスポーター4(Glucose Transporter 4; GLUT4)など、脂肪細胞のマーカーを発現することが知られている [85]。更に、**OP9** は細胞密度が高いコンフルエントな状態であるだけでも脂肪滴が見られるようになり、脂肪細胞へ分化する [86]ため、維持培養を含め細胞調整に関しては、**OP9** より **C3H 10T1/2** の方が容易である。このことから **OP9** ではなく **C3H 10T1/2** を用いた系でマクロファージ分化ができることには意義があると考えた。

更にフィーダー細胞自体を用いない系も考えられる。フィーダー細胞の調整が不要である点や、**xeno free** にすればその系を利用して分化誘導した細胞を臨

床で応用することも可能な点は望ましいが、医学研究の中でも基礎的な研究を行う場合には、コストの面で負担が大きくなる可能性がある。今回は、基礎実験で繰り返し十分量のマクロファージを得る系を検討したことから、目的から反すると考えた。

sac 法及び C3H 10T1/2 をフィーダー細胞とするこの手法で機能的なマクロファージが分化誘導されてくることを確認できたため、更にサイトカイン条件の検討を行った。造血前駆細胞の維持や各種血球系細胞への分化誘導にはサイトカインが重要な働きを担っている [87] ことから、造血前駆細胞への分化過程(分化開始、7 日目から 14 日目まで)と、骨髄球系細胞への分化過程(造血前駆細胞を回収してから 10 日間)のサイトカインに関して、最適化を行った。

以前の報告で c-Mpl の転写が、巨核球や血小板の他、CD34 陽性細胞においても検出されたことから、TPO が CD34 陽性細胞の増殖に関与していることが指摘され [88]、更に granulocyte-macrophage(GM) コロニー形成実験において、TPO が SCF 単独、IL-3 単独、また SCF と IL-3 の組み合わせに対して加えて使用することで、より多くのコロニーを形成するということが [89] や、SCF, TPO, Flt-3L の組み合わせが CD34+細胞のヒト造血前駆細胞の活性化に有効であると

ということ [90]が示されていたため、造血前駆細胞への分化過程に関して c-Mpl リガンドである TPO の追加を検討した。特に Kobayashi [89]らの報告においては、TPO は 0, 1, 10, 50, 100 ng/ml でコロニー数を検討しており、GM コロニーにおいては SCF と TPO を使用した場合、TPO 1 ng/ml と比べ TPO 10 ng/ml で有意に増加し、かつ 10 ng/ml 以上に高い濃度で使用しても(50, 100 ng/ml で検討)、10 ng/ml の場合と有意差がなかったことから、今回 TPO を 0, 2, 20 ng/ml で検討した。

また 骨髓球系細胞への分化(造血前駆細胞を回収後、10 日間の分化過程)に関しては、既報の論文 [33]で使用されていた GM-CSF, M-CSF に、更にサイトカインを加えることを検討した。この骨髓球系細胞への分化の過程において顕微鏡観察を行うと、一部フィーダー細胞に混じり造血活性があると考えられる細胞がこの過程でも新たに分化してくる様子が見られた。このため造血前駆細胞を維持する働きを持つ SCF を加えることや SCF が BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM のコロニー形成について併用で数を増加させる IL-3 [91]を加えることとした。SCF と IL-3 に関して、Bernstein らの報告では、CD34+lin-細胞を液体培地で培養し colony-forming cells(CFC)の形成について SCF と IL-3 を併用し

た場合の titration 実験を行っている。その際、CFC の最大形成時の濃度として SCF は 50 から 100 ng/ml, IL-3 は 10 から 100 ng/ml であった。これを参考に 50 ng/ml SCF と 20 ng/ml IL-3 を加えて表 2-1. の 4 つの条件を設定した。

特に最終的に得られる骨髄球系細胞において HIV 実験において重要な co-receptor である CCR5 の発現上昇が認められたことから、本実験では TPO、SCF を各ステップに加えて分化誘導することとした。この系を使用して、以降 60mm ディッシュにコンフルエントな iPS 細胞を 6:1 で 100mm ディッシュの 10T1/2 に播種し、その 100mm ディッシュあたり $2.0 \times 10^5 \pm 8.7 \times 10^4$ 細胞のマクロファージが繰り返し確保できる系が確立できた。

分化誘導に必要であった日数に関しても、iPS 細胞が造血前駆細胞へ分化するまで 14 日間、そこから単球相当の細胞へ分化するまでが 10 日間、最終のマクロファージや樹状細胞へ分化するまでが約 5 日間であり、従来の OP9 との共培養法で分化させている方法に比べ [33] 少ない系となった。

4-2-2. iPS-macrophage と MDM の類似性について

本研究では、今後医学研究に利用できる、MDM と同様の性質を持つマクロファージを、iPS 細胞から繰り返し、十分量、分化誘導することを目的としていた。

これにより高率に目的遺伝子を導入、発現させた状態のマクロファージを、MDMより十分な細胞数を確保できる利点があると考えた。

MDM との比較において、iPS-macrophage は MDM と同様の貪食能、一般的なマクロファージの表面マーカーの発現を示した。しかしながら RNA sequencing で発現差のあった遺伝子に関する GO 解析と、M1, M2 フェノタイプ解析においては両者で異なることが明らかとなった。

まず RNA sequencing においては iPS-macrophage において、MDM より発現が低くかつマクロファージの機能に関係する GO として、antigen processing and presentation, antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II などがあげられる。これらは今回の実験で検証した HIV-1 の感染自体には直接関係しないと考えられるが、今後 iPS-macrophage を用いて抗原提示の機能を利用する場合などに、詳細な検証が必要となる。

更に iPS-macrophage を MDM と比較するためにマクロファージのフェノタイプ解析を行った。

マクロファージでは、M1, M2 活性化は病原体に対する感受性や抗原提示につ

いて変化させること [92] [93]が分かっている。in vitro の系で、M1, M2 活性化を受けた MDM について、M1 活性化 MDM では細胞表面の CD4 発現を低下させたり、CCR5 結合サイトカインの産生を抑制したりすることでウイルス複製の初期の段階でウイルス産生の抑制を示すことや、M2 活性化 MDM では HIV-1 ゲノムが宿主細胞のゲノムに組み込まれた後での抑制が示唆されている [19]。また抗原提示に必要なステップとなるファゴサイトーシスに関しても、MDM に与えるサイトカイン刺激で調整されること [94] [95]が分かっている。そのため本研究でも、作成した iPS-macrophage について M1, M2 刺激に対する反応が MDM と同様であるかを検証した。

今回私は単球(または単球相当の分化細胞)から GM-CSF と M-CSF を用いてマクロファージを誘導した。

iPS-macrophage に関して、M1 マクロファージ、M2 マクロファージに特徴的な遺伝子群の発現や分子マーカーの発現を調べた(図 3-21.)が、特定の分化傾向を認められずに、双方のマーカーを発現する細胞が確認された。このことは MDM と同様の傾向であった。これらのマクロファージは IFN γ R(M1), IL4R(M2), CHIT1(M2)が高発現し、やはり M1, M2 フェノタイプ特定の傾向を持つ細胞で

はなかった。M1 マクロファージを誘導する GM-CSF は、JAK2 を通じて STAT5、signal-regulated kinase(ERK)と V-Akt murine thymoma ciral oncogene homolog 1 (AKT)を活性化させ、NF- κ B を核内へ移動させる [96]。GM-CSF の刺激で単球やマクロファージは M-CSF, TNF をはじめとする様々なサイトカインを産生する。本研究では MDM を誘導する際に GM-CSF を使用した点と上述の報告を考慮すると、現在の分化系において明確に M1 マクロファージ、または M2 マクロファージに区別できる細胞へ分化させることは困難である事が考えられる。

そこで iPS-macrophage が M1, M2 マクロファージの両方へ分化できるような前駆段階の分化細胞である可能性を検討するために、M1, M2 マクロファージへの分化を誘導し産生されるサイトカインや遺伝子発現について調べることにした。具体的には、M1, M2 マクロファージを活性化するための特異的な LPS+ IFN- γ 刺激(M1), IL-4 刺激(M2)を加えて誘導した iPS-macrophage を用いて発現プロファイルを解析した。その結果、iPS-macrophage, iPS-shRNA-macrophage では M1 刺激を受けた細胞で M1 サイトカインである IFN- γ 、TNF- α 、IL-12 の濃度が上昇しており、これは MDM と同様の傾向であったが、TNF- α や IL-12 では細胞間で最大 20 倍の差が認められていた。これに関しては、今後データ数を増

やして検討したいと考えている。

一方 20 ng/ml IL-4 の M2 刺激を受けた細胞では、MDM も含め全ての細胞で IL-10 の上昇を認めなかった。既報では iPS 細胞から誘導したマクロファージに M2 刺激を行った際、IL-10 の上昇が確認されている [97]が、我々の系では MDM が M2 分化能を示さなかった。iPS-macrophage のフローサイトメーター解析では、M2 マクロファージの表面マーカーである CD163, CD206 の発現が MDM 同様に認められていることから M2 分化能が全くないとは言えないため、刺激方法が適切でなかったのだと考える。刺激方法に関しては、IL-4 だけでなく IL-4 に IL-10 と TGF- β を加えた M2 刺激でより IL-10 産生能の高い M2 マクロファージが誘導される報告 [98]もあり、これらを参考に M2 誘導への刺激を最適化していきたい。現在、タンパク質レベルでは IL-10 が検出されなかったが、RNA レベルでのマクロファージ誘導能を確認するため、M1, M2 刺激を加えた各細胞の RNA sequencing も解析中である。

4-3. HIV-BaL の感染実験と iPS-PromA-macrophage による HIV-1 産生抑制

4-3-1. iPS-macrophage 及び iPS-shRNA-macrophage の HIV-1 感染実験の計画

まず iPS-macrophage が HIV-1 感染実験において使用され実績のある MDM と同等の感染を示すかどうかということを検証し、次に iPS-shRNA-macrophage の HIV-1 産生抑制を評価することとした。

HIV-1 には、感染する細胞の種類から二つの系統が確認されていた。一つ目はヘルパーT 細胞への指向性を持つ T tropic virus であり、二つ目は単球、マクロファージへの指向性を持つ M tropic virus である [99] [100]。

その後、これらは宿主細胞へ侵入する際に CD4 と共に使用するサイトカインレセプター(co-receptor)によるものと分かり、T tropic virus は CXCR4 [101]を、M tropic virus は CCR5 [102] [103]を使用する。今回我々は、M tropic virus であり、siRNA-PromA と NF-κB 結合領域の配列が相補的である HIV-1 BaL strain を用いた。

感染後最大 11 日までの顕微鏡観察において、iPS-macrophage は MDM と同様、細胞質の膨張などの形態変化は示さず死細胞も少なかった。この点も既知のマクロファージは HIV-1 による細胞変性効果を示しにくく [104]、in vitro での感染後、数日以内に死んでしまう CD4 T 細胞 [105]と異なりマクロファージでは長期にわたり生存し続けるという特徴を再現していた。

4-3-2. iPS-macrophage の感染実験の結果

iPS-macrophage と MDM への HIV-1 の感染と感染後のウイルス産生に関して、まず p24 ELISA assay を行った。その結果、MDM においては感染後 4 日目から 21 日目にかけて p24 濃度が上昇していくという傾向が認められた。それに対して iPS-macrophage においては感染後 4 日目の時点から既に MDM と比べ約 10 倍の p24 濃度を示しており、4 日目から 21 日目にかけてほぼ同程度の p24 濃度 ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ pg/ml) を示していた。p24 の上昇が検出されている点では、iPS-PromA-macrophage でも HIV の感染が成立していることが示唆されたが、MDM と同程度であるかはこれだけでは評価できなかった。

iPS-macrophage においても HIV の感染が成立しているかを検討するために感染マクロファージ中の HIV DNA 量を定量した。その結果、iPS-macrophage においても HIV DNA を検出したため、感染自体は成立しているのではないかと考えた。

一方 iPS-PromA-macrophage は iPS-macrophage より有意に HIV gag DNA が少ないという結果であった。しかしこのことは以下に述べる理由から、iPS-PromA-macrophage において HIV の産生が少なくなった直接の理由ではな

く、iPS-PromA-macrophage においても他のマクロファージと同程度の初期 HIV 感染があったのではないかと推察している。

一般的に多くのウイルス cDNA は、宿主細胞のゲノムに挿入されていない状態で存在していることが知られている [106] [107] [108] [109]。逆転写酵素により産生された直鎖 cDNA は、自己組み込み、組み換えや宿主因子により環状 DNA として宿主細胞に存在する [110]ため、今回行った qPCR においては、HIV-1 cDNA、 integrated DNA、2LTR DNA 及び 1LTR DNA を全て検出している。

そのためこの検出系では、完全に標準化された(細胞あたりの)integrated DNA 量だけを推測する事は難しい。より厳密に評価するために、インテグレーション アッセイ [111]を行う予定である。

また感染後 24 時間で感染細胞を回収し、HIV DNA を測定したが、24 時間後では初回に感染した HIV が宿主細胞のゲノムに挿入され、更にそこから新しいウイルスが産生されていると考えられる。そのためウイルス産生が進む iPS-macrophage 及び、iPS-M2-macrophage において、これら HIV-1 cDNA、2LTR DNA、1LTR DNA の 3 つの DNA の影響が高く出ていると解釈できる。

p24 ELISA assay において、iPS-PromA-macrophage は MDM や

iPS-macrophage に比べて全体としてウイルス産生量が低いことが示唆された。

p24 は HIV-1 のコアを構成するカプシドタンパク質であり、前駆体(Gap p55) から HIV-1 のプロテアーゼによりスプライシングを受けて生成される。これはウイルスの増殖に必須のタンパク質 [112]であり、臨床でもその測定が HIV-1 感染初期から利用される。in vitro での実験系でも感染の確認に利用できるが、宿主細胞がウイルス毒性で細胞死した場合も p24 が培養液中に放出されかつ、ELISA assay で検出されてしまうという問題点がある。今回、shRNA-PromA を遺伝子導入した iPS から分化させた iPS-PromA-macrophage の集団内には、shRNA の発現がない、または低い細胞が少ないながらも存在する。これらの細胞に感染した HIV-1 の p24 が転写されて細胞死に伴い培養液中に放出されたことにより、MDM や iPS-macrophage と比較した場合 p24 での評価が厳密には iPS-PromA-macrophage の HIV 抵抗性を定量的に評価できないのではないかと考えた。

この問題点を回避するために、次に RT-assay を行った。HIV-1 の逆転写酵素 (RT)は、p66 と p51 のサブユニットからなるヘテロダイマーで最も安定し [113] [114]、酵素活性を持つ [115]。RT のヘテロダイマーは細胞外の培養液中では解

離して失活するため、RT-assay で酵素活性を測定する場合 p24 ELISA assay より正確に培養液中に産生された HIV-1 ウイルス量を反映する。

この RT-assay においても、iPS-macrophage は HIV への感染感受性を示し、かつ iPS-PromA-macrophage は、MDM や iPS-macrophage に比べて 10~100 倍以上のウイルス産生の抑制効果が認められた。今回、感染後 4 日目と 11 日目に関しては、iPS-PromA-macrophage は iPS-macrophage 及び、MDM と比べウイルス産生が有意に低下していた。7 日目に関して統計学的有意差がでなかったことに関しては、今後データ数を増やして検証する必要がある。一方、11 日目の iPS-M2-macrophage と MDM では iPS-M2-macrophage からのウイルス産生は低下していたが、iPS-M2-macrophage と iPS-PromA-macrophage との比較では産生に差がなかったことや、iPS-macrophage と MDM からのウイルス産生は統計学的有意差を認めなかったことから、iPS 細胞から分化させたマクロファージである iPS-M2-macrophage でも MDM よりウイルス産生が少なかったというのではなく、遺伝子導入した shRNA-M2 自体の影響が考えられるため、その検討が必要である。shRNA-M2 が低い親和性ながら NF- κ B 結合領域に結合して、HIV 遺伝子の発現を抑制している可能性も残る。更に多くの数の塩基配列が異なる

shRNA や、shRNA-PromA と同じ塩基からなり、配列だけが異なるような shRNA を用いて同じ実験を行い shRNA の HIV 抑制作用に関して配列特異性があるのかどうかも検討している。

更に実験に用いた HIV-1 BaL strain を含む、R5 ウイルスの感染に必要となる CD4, CCR5 についても、iPS-PromA-macrophage において、iPS-macrophage に比べ低いという事はなかった。従って、 siRNA-PromA による HIV-1 の産生抑制は、CCR5 や CD4 の発現低下など、感染効率に影響を与える他の因子に由来するものではないということが示された。

4-3-3. iPS-PromA-macrophage による HIV-1 産生抑制のメカニズム

今回使用した siRNA-PromA が HIV-1 遺伝子の転写抑制を行うメカニズムに関しては、細胞株を用いた先行論文で ChIP assay や CHART assay の結果、PTGS ではなく、TGS を介していると報告されている [116] [64]。具体的には ChIP assay においては、siRNA-PromA を導入した細胞株において特異的に、LTR 領域に Ago1, HDAC1, H3K9me2 などが結合していることが示されている。更に HIV 遺伝子の転写が活性化されている時に Nuc-1 の位置がより下流に近くなり、転写開始部位(R)の下流 20 塩基部位での制限酵素による切断が可能となること

を利用して CHART assay(図 4-1.)を行うと、siRNA-PromA を導入した細胞株では配列特異的に切断が抑制されることが示されている。今回 HIV-1 BaL の感染実験で HIV-1 産生の抑制を示した iPS-PromA-macrophage に関しても、細胞株と同様にヘテロクロマチン化による HIV 遺伝子転写の抑制が今回のマクロファージにおいても背景にあると考えられた。

4-4. shRNA-PromA による off-target 効果についての検討

今回導入した shRNA は、HIV-1 の LTR に存在する NF- κ B 結合領域に結合することから NF- κ B driven genes の発現変動の有無を確認することにした。

RNA sequencing による NF- κ B driven genes の発現比較において、発現に差がある遺伝子は認められたが、2 倍以下の差でありその差は shRNA-PromA における HIV-1 産生抑制効果(RT-assay などでは Log10 スケールでの抑制を示していた)に比べて著しく小さく、shRNA の NF- κ B driven genes 発現への明らかな影響はないと考えられた。

更には、shRNA-M2(PromA と 2 塩基違い)との比較において、shRNA-PromA の配列特異的な HIV-1 産生抑制から、今回の標的に対する siRNA の作用として

最低でも 19 塩基以上の相補鎖が必要でかつその配列が 2 塩基の違いもないものである必要が示唆された。

4-5. iPS-DC について

iPS から分化を行った iPS-DC に関しては、表面マーカーで myeloid DC であること、および貪食能や CSFE 染色を用いた T 細胞のアロ刺激の結果から機能的であることは確認できた。しかしながら HIV-1 BaL の感染実験に関しては、p24 ELISA assay で p24 の上昇を検出することができなかった。

一般的に、樹状細胞は C-type lectin receptor(CLR)(dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin; DC-SIGN など)が高発現しているために、HIV-1 を細胞質内に取り込むことなく T 細胞に提示する経路があり、その分 CD4 や CCR5 を通じて HIV-1 が膜融合して細胞内に感染する率が低いと考えられている [117]。

生体内では主に粘膜内の未熟樹状細胞が HIV-1 に感染する。そのため、解析対象として、分化の段階としては LPS や TNF- α で刺激する前の未熟樹状細胞に相当する iPS-DC を誘導していた。しかし、培地中のサイトカインやエンドトキ

シンなどの物質や物理刺激 [118]等により感染実験前に成熟化が進行することが多く、実際フローサイトメーターでの解析においても成熟化を示す **CD80**、**CD83** や **CD86** などの発現を示す細胞集団が混在していた。

樹状細胞の成熟化により、例えば細胞表面の **CCR5** が減少してしまうこと [119]で更に感染効率が下がると考えられる。今回の系では、分化開始から **33** 日前後のフローサイトメーター解析において、感染が成立した **iPS-macrophage** と比較し、**iPS-DC** での明らかな **CCR5** 発現低下は認められなかったが、**HIV-1 BaL** の感染の際に更に成熟化が進むことで **CCR5** の発現が低下し感染が成立しなかった可能性はある。

今後は、分化誘導の過程や感染実験で使用する培地中でのフェノールレッド、**FBS**、サイトカインや培養中の操作による物理的刺激についての再検討などが必要と考えられる。

これらの検討により、**HIV-1** がまず **in vitro** で感染するような **iPS-DC** が分化できるようになれば、**virological-synapse** を介した、**T** 細胞への **cell-to-cell** 感染 [120]のモデルなどに応用できる可能性がある。

5. 結言

本研究では、iPS 細胞からマクロファージを分化誘導する既報の方法に対して、**sac** 法、フィーダー細胞の変更、サイトカイン条件の調整を行い、同一ドナー由来の遺伝的背景が均一なマクロファージが繰り返し分化誘導できる系を確立した。更にこの系で分化誘導されたマクロファージが実際の実験に利用できるかどうかを検証するために、**HIV-1** の遺伝子転写を **TGS** のメカニズムを介して抑制するような **shRNA** を導入した **iPS** 細胞から血球細胞の分化誘導を試みた。その結果として **iPS** 細胞の段階で遺伝子導入した **EGFP** や **shRNA** が分化細胞においても維持されていることを確認することができた。特にマクロファージにおいては **HIV-1 BaL** の感染実験を行い、**shRNA** による **HIV-1** の産生を抑制する可能性があることを確認でき、今回の系が実際に機能し得ることを示した。

これまで **HIV-1** の研究領域においても、分裂能の低いマクロファージは細胞数の確保や遺伝子導入の面から **primary** の細胞を実験に用いることが難しく、主に **MDM** や細胞株を用いられることが多かった。しかしながら、今回のように **iPS** 細胞から **MDM** に近い性質を持つマクロファージを分化させることによりこれらの問題を克服することが可能となる。

一方、今回分化誘導して得られた **iPS-macrophage** においては、**MDM** と同様のフェノタイプを示すものの、**M1**、**M2** 刺激への反応性に関しては課題が残った。また **RNAsequencing** では、**iPS-macrophage** で **MDM** と比べて、抗原提示に関係する遺伝子の発現が低いことが示された。今後、**M2** 刺激の方法を検討し **M2** マクロファージへの分化誘導が可能かどうか検証することや、実際に抗原提示能やそれに伴う **T** 細胞の活性化能についての評価を抗原特異的な **iPS** 細胞から **iPS-macrophage** や **iPS-DC** を分化誘導させて検証することが必要だと考える。

また **T** 細胞と比較してマクロファージに特徴的な現象として、細胞質内にウイルスを濃縮することで長期にわたる感染に関与したり [121]、**virological synapse** を介した、**cell-to-cell infection** による感染の拡大に関与したり [122] という点がありこれらの点を、**iPS-macrophage** に関しても電子顕微鏡による観察や、**HIV-1** に感染した **iPS-macrophage** を未感染の **T** 細胞と共培養することで再現できるかどうかを検討していけると考えている。

またマクロファージは **host restriction factor** としてシチジン脱アミノ化酵素である **APOBEC3G**、ヌクレオチド三リン酸(**Nucleotide Triphosphates(NTP)**)をヌクレオシドとリン酸に変換する酵素である **SAMHD1** や、**APOBEC3G** とウイ

ルス粒子を繫留する tetherin [123] [124] [125]を持っていたり、核内膜に存在しウイルス DNA のインテグレーションに関与するとされる emerin [126]を持っていたりという固有の特徴を有している。本研究で分化誘導した iPS-macrophage においてもこれらの host restriction factor が存在し、機能するかどうかについて検証したい。

HIV の複製過程を阻害する APOBEC3G は、HIV-1 では Viral infectivity factor(Vif)タンパクを産生し、この Vif タンパクが APOBEC3G に作用し、ユビキチン化をおこし APOBEC3G を分解することで対抗している [127]が、HIV-1 が感染すると、MDM において APOBEC3G の発現が減少していることが示されている。iPS-macrophage でも APOBEC3G が発現しているかどうか、更に MDM と同様に HIV-1 感染によりその発現が低下するのであれば、それが iPS-PromA-macrophage において低下がみられなくなるのか、などを調べることで iPS-macrophage が host restriction factor の面でも MDM と同様に実験に使用できるかが検討できる。

他にも、HIV-1 感染において iPS-macrophage が MDM と同様に使用できる性質を持つことが確認されれば、細胞数の確保や遺伝子導入などの面から

iPS-macrophage を今後積極的に使用できることが示せるだろう。

今回 HIV-1 の感染が成立しなかった樹状細胞に関しても、成熟段階を詳細に調べ、感染に感受性のある分化段階に最適化することで、HIV-1 感染初期に見られる樹状細胞から他の血球細胞へのウイルスの受け渡しなどについてもモデルを作成することが可能となり、更なるメカニズム解析につながると考える。

また、今回の HIV-1 の産生を抑制する shRNA を導入したマクロファージや他の血球細胞が治療薬の開発や治療への応用の可能性も示すことができた。

現在は、抗 HIV 薬の効果や副作用を評価するために、一部単球系細胞株が使用されている。しかしながら、例えば U937 細胞株を核酸逆転写阻害薬の一つである AZT(azidothymidine)の評価に用いた際、この細胞株では細胞内のリン酸化レベルが低かったためか [128] [129]、HIV 感染抑制が見られなかったという報告もあり [130] [131]、必ずしも細胞株での評価法は完全ではない。今後 iPS-macrophage が薬剤の評価にも応用できるかについても検討が必要である。

また in vivo の系で、PBMC に同様の shRNA を遺伝子導入し、NOJ マウスに移植する実験で血漿中の HIV-1 の RNA が減少し、CD4+/CD8+ T 細胞の比が有意に上昇したという [68]報告があり、shRNA を導入した細胞の治療への応用も

期待できる。

CD34+の造血前駆細胞での感染は、進行した AIDS 患者において認められるという報告 [132]があることから、宿主細胞の根絶という意味でも、また CCR5 変異型の骨髄を移植された患者の例 [133]に倣うという点でも、今回の shRNA を導入した iPS 細胞から造血前駆細胞を分化させ、これを骨髄移植するという方法が根治療法になる可能性もある。

本研究においては、無限増殖能を持つ iPS 細胞から MDM に近い性質をもつマクロファージを分化誘導した。分化誘導したマクロファージは、これまで医学研究において MDM や細胞株を用いる際に問題となっていた細胞数や遺伝的不均一性を克服するための解決策となると考えられる。また今後 HIV 抵抗性を持つ iPS 細胞から分化誘導した機能的な造血幹細胞を用いた細胞治療の開発や、マクロファージをはじめとする成熟血液細胞を用いた研究成果が、HIV 患者に新たな治療法を提供することが期待される。

6. 謝辞

本研究を遂行し、学位論文にまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野教授

中内啓光博士に心よりお礼申し上げます。研究を進めるにあたりご指導、ご助言を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 金子研究室 准教授 金子新博士に感謝の意を表します。また研究を行うにあたってご協力いただいた The Kirby Institute, UNSW Australia 鈴木一雄博士、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症分野准教授 立川(川名)愛博士、京都 iPS 細胞研究所 山中研究室渡辺グループ(ゲノム・エピゲノム解析コアファシリテイ)助教 渡辺亮博士、共通機器管理室 助教 光永佳奈枝博士(コアラボ)に感謝申し上げます。

本研究をとりまとめるにあたり、貴重なご助言を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門 皆様、京都 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 金子研究室 皆様、臨床応用研究部門 江藤研究室 皆様、臨床応用研究部門 中畑研究室 皆様をはじめとした、京都 iPS 細胞研究所 皆様に、お礼申し上げます。

最後に、私の研究生生活を様々な面で支えてくれた友人と家族に心より感謝致します。

7. 参考文献

- [1] Jeffrey W. Pollard, "Trophic macrophages in development and disease.," *Nature Reviews Immunology*, 2009; 9: 259-270.
- [2] Hotamisligil GS, "Inflammation and metabolic disorders.," *Nature*, 2006; 444: 860-7.
- [3] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP, "Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair.," *J Clin Invest*, 2005;115: 56-65.
- [4] O. Takeuchi, S. Akira, "Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function," *Microbes Infect*, 2002; 4: 887-95.
- [5] Kawai T, Akira S., "Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.," *Trends Mol Med.*, 2007; 13: 460-9.
- [6] Joseph L. Goldstein, Y. K. Ho, Sandip K. Basu, Michael S. Brown, "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.," *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 1979; 76: 333-7.
- [7] Monty Krieger and David M. Stern, "Series Introduction: Multiligand receptors and human disease.," *J Clin Invest.*, 2001; 108: 645-47.
- [8] L. East, C.M. Isacke, "The mannose receptor family.," *Biochim Biophys Acta.* , 2002; 1572: 364-86.
- [9] Susanne Zamze, Luisa Martinez-Pomares, Hannah Jones, Philip R. Taylor, Richard J. Stillion, Siamon Gordon and Simon Y. C. Wong, "Recognition of Bacterial Capsular Polysaccharides and Lipopolysaccharides by the Macrophage Mannose Receptor.," *The Journal of Biological Chemistry*,, 2002; 277: 41613-23.
- [10] Biswas SK, Mantovani A., "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm.," *Nat Immunol.*, 2010; 11: 889-96.
- [11] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA., "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.," *J Leukoc Biol.*, 2004; 75:

- 163-89.
- [12] Siamon Gordon, "Alternative activation of macrophages," *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3: 23-35.
 - [13] Cassol E, Alfano M, Biswas P, Poli G., "Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence.," *J. Leukoc. Biol.*, 2006; 80:1018–30.
 - [14] Gendelman HE, Orenstein JM, Martin MA, Ferrua C, Mitra R, Phipps T, Wahl LA, Lane HC, Fauci AS, Burke DS, Meltzer MS, "Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes.," *J Exp Med*, 1998; 167:1428–1441.
 - [15] Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G., "Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes.," *Int.J.Cancer*, 1988; 41: 456-461.
 - [16] Auwerx, J., "The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation.," *Experientia*, 1991; 47: 22-31.
 - [17] Sundstrom, C., Nilsson, K., "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).," *Int. J. Cancer*, 1976; 17: 565-577.
 - [18] Collins, S. J., "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression.," *Blood*, 1987; 70: 1233-1244.
 - [19] Edana Cassol , Luca Cassetta , Chiara Rizzi, Massimo Alfano, Guido Poli, "M1 and M2a Polarization of Human Monocyte-Derived Macrophages Inhibits HIV-1 Replication by Distinct Mechanisms," *J Immunol.*, 2009; 182: 6237-46.
 - [20] Carol A. Carter, Lorna S. Ehrlich, "Cell Biology of HIV-1 Infection of Macrophages.," 2008; 62: 425-443.
 - [21] Kathryn J. Moore, Rosalind P. Fabunmi, Lorna P. Andersson, Mason W. Freeman, "In Vitro–Differentiated Embryonic Stem Cell Macrophages A

- Model System for Studying Atherosclerosis-Associated Macrophage Functions,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , 1998;18:1647-1654.
- [22] Guillemot JC, Kruskal BA, Adra CN, Zhu S, Ko JL, Burch P, Nocka K, Seetoo K, Simons E, Lim B., “Targeted disruption of guanosine diphosphate-dissociation inhibitor for Rho-related proteins, GDID4: normal hematopoietic differentiation but subtle defect in superoxide production by macrophages derived from in vitro embryonal stem cell differentiation.,” *Blood*, 1996; 88: 2722-31.
- [23] Lindmark H, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bruder CE., “Gene expression profiling shows that macrophages derived from mouse embryonic stem cells is an improved in vitro model for studies of vascular disease.,” *Exp Cell Res.*, 2004; 300: 335-44.
- [24] Nakano T, Kodama H, Honjo T., “Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture.,” *Science*, 1994; 265: 1098-101.
- [25] Zhan X, Dravid G, Ye Z, Hammond H, Shablott M, Gearhart J, Cheng L., “Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro.,” *Lancet.*, 2004; 364: 163-71.
- [26] Odegaard JI, Vats D, Zhang L, Ricardo-Gonzalez R, Smith KL, Sykes DB, Kamps MP, Chawla A., “Quantitative expansion of ES cell-derived myeloid progenitors capable of differentiating into macrophages.,” *J Leukoc Biol.*, 2007; 81: 711-9.
- [27] Senju S, Suemori H, Zembutsu H, Uemura Y, Hirata S, Fukuma D, Matsuyoshi H, Shimomura M, Haruta M, Fukushima S, Matsunaga Y, Katagiri T, Nakamura Y, Furuya M, Nakatsuji N, Nishimura Y., “Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function.,” *Stem Cells.*, 2007; 25: 2720-9.
- [28] Evans M, Kaufman M, “Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos.,” *Nature*, 1981; 292; 154-6.
- [29] “Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.,” *Science*, 1998; 282: 1145-7.
- [30] Takahashi K, Yamanaka S., “Induction of pluripotent stem cells from

- mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.,” *Cell*, 2006; 126: 663-76.
- [31] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S., “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.,” *Cell*, 2007; 131: 861-72.
- [32] Kyung-Dal Choi, Maxim A. Vodyanik and Igor I. Slukvin, “Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell–derived lin–CD34+CD43+CD45+ progenitors.,” *J Clin Invest.*, 2009; 119: 2818-29.
- [33] S Senju, M Haruta, K Matsumura, Y Matsunaga, S Fukushima, T Ikeda, K Takamatsu, A Irie, “Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy.,” *Gene Therapy*, 2011; 18: 874-883.
- [34] Amal Kambal, Gaela Mitchell, Whitney Cary, William Gruenloh, Yunjoon Jung, Stefanos Kalomoiris, Catherine Nacey, Jeannine McGee, Matt Lindsey, Brian Fury, Gerhard Bauer, Jan A Nolta and Joseph S Anderson, “Generation of HIV-1 Resistant and Functional Macrophages From Hematopoietic Stem Cell–derived Induced Pluripotent Stem Cells,” *Molecular Therapy*, 2011; 19: 584-93.
- [35] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R., “The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium.,” *J Embryol Exp Morphol.*, 1985; 87: 27-45.
- [36] Naoya Takayama, Hidekazu Nishikii, Joichi Usui, Hiroko Tsukui, Akira Sawaguchi, Takashi Hiroyama, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, “Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors.,” *Blood*, 2008; 111: 5298-5306.
- [37] Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto

- A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H., "Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation," *Cell Stem Cell.*, 2013; 12: 114-26.
- [38] Nakano T, Kodama H, Honjo T., "Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science.," *Science*, 1994;265:1098–1101..
- [39] Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II., "Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures.," *Blood*, 2006; 108: 2095-105..
- [40] Hiroyama T, Miharada K, Aoki N, Fujioka T, Sudo K, Danjo I, Nagasawa T, Nakamura Y., "Long-lasting in vitro hematopoiesis derived from primate embryonic stem cells.," *Exp Hematol.* , 2006; 34: 760-9.
- [41] PernoCF,SvicherV,ScholsD,PollicitaM,BalzariniJ,StefanoA., "Therapeutic strategies towards HIV-1 infection in macrophages.," *Antiviral Res.*, 2006; 71: 293-300.
- [42] WHO, "The top ten causes of death.," *Fact sheet*, 2008; 310.
- [43] Trono D, Van Lint C, Rouzioux C, Verdin E, Barré-Sinoussi F, Chun TW, Chomont N., "HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals.," *Science.*, 2010; 329:174-80.
- [44] ZackJA, "The CCR5 and CXCR4 coreceptors—central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection.," *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004; 20: 111-126.
- [45] T. Schneider, "Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation.," *Blood*, 2011; 117: 2791-9.
- [46] June CH, "Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV.," *N Engl J Med.*, 2014; 370 :901-10.
- [47] Michael C Holmes & Paula M Cannon, "Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo," *Nature Biotechnology*, 2010; 28: 839-847.
- [48] VeraniA,GrasG,PancinoG., "MacrophagesandHIV-1:dangerousliaisons.," *Mol.Immunol.*, 2005; 42: 195–212.

- [49] Carter CA, Ehrlich LS, "Cell biology of HIV-1 infection of macrophages.," *Annu Rev Microbiol*, 2008; 62: 425–443.
- [50] Tan J, Sattentau QJ, "The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche?," *Trends Microbiol*, 2013; 21: 405–412.
- [51] Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE, "Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study.," *J Virol*, 1998; 62: 2578–2586.
- [52] Gavegnano C, Schinazi RF, "Antiretroviral therapy in macrophages: implication for HIV eradication.," *Antivir Chem Chemother*, 2009; 20: 63–78.
- [53] Bradford A. Navia MD, Eun-Sook Cho MD, Carol K. Petito MD, Dr Richard W. Price MD, "The AIDS dementia complex: II. Neuropathology," *Annals of neurology*, 1986; 19: 525-535.
- [54] Swan C.H., Bühler B., Steinberger P., Tschan M.P., Barbas C.F., Torbett B.E., "T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery.," *Gene Ther.*, 2006; 13: 1480-1492.
- [55] Schroers R., Davis C.M., Wagner H.-J., Chen S.-Y., "Lentiviral transduction of human T-lymphocytes with a RANTES intrakine inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection.," *Gene Ther.*, 2002; 9: 889–897.
- [56] Wilen C.B., Wang J., Tilton J.C., Miller J.C., Kim K.A., Rebar E.J., Sherrill-Mix S.A., Patro S.C., Secreto A.J., Jordan A.P.O., et al., "Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases.," *PLoS Pathog.*, 2011; 7: e1002020.
- [57] He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D., "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia.," *Nature.*, pp. Feb 13;385(6617):645-9., 1997.
- [58] Mitsuyasu, R.T., Merigan, T.C., Carr, A., Zack, J.A.;Winters, M.A., Workman, C., Bloch, M., Lalezari, J., Becker, S., Thornton, L., et al., "Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+

- cells.," *Nat. Med.*, 2009; 15: 285–292.
- [59] Jacque, JM, Triques, K and Stevenson, M, "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.," *Nature*, 2002; 418: 435–438.
- [60] Das, AT, Brummelkamp, TR, Westerhout, EM, Vink, M, Madiredjo, M, Bernards, R et al., "Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition.," *J Viol*, 2004; 78: 2601–2605 .
- [61] Matthew Stremlau, Christopher M. Owens, Michel J. Perron, Michael Kiessling, Patrick Autissier, Joseph Sodroski, "The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys," *Nature*, 2004; 427: 848-853.
- [62] Yuan Li, Xing Li, Matthew Stremlau, Mark Lee, and Joseph Sodroski, "Removal of Arginine 332 Allows Human TRIM5 α To Bind Human Immunodeficiency Virus Capsids and To Restrict Infection," *J. Virol.*, 2006; 80: 6738.
- [63] Joseph Anderson, Ramesh Akkina, "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Restriction by Human–Rhesus Chimeric Tripartite Motif 5 α (TRIM 5 α) in CD34+ Cell-Derived Macrophages In Vitro and in T Cells In Vivo in Severe Combined Immunodeficient (SCID-hu) Mice Transplanted with Human Fetal Tissue," *Human Gene Ther.*, 2008; 19: 217-228.
- [64] Ahlenstiel CL, Lim HG, Cooper DA, Ishida T, Kelleher AD, Suzuki K, "Direct evidence of nuclear Argonaute distribution during transcriptional silencing links the actin cytoskeleton to nuclear RNAi machinery in human cells.," *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 1579-95.
- [65] Yamagishi M1, Ishida T, Miyake A, Cooper DA, Kelleher AD, Suzuki K, Watanabe T., "Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription.," *Microbes Infect.*, 2009; 11: 500-8.
- [66] Ranjbar S, Tsytsykova AV, Lee SK, Rajsbaum R, Falvo JV, Lieberman J, Shankar P, Goldfeld AE., "NFAT5 Regulates HIV-1 in Primary Monocytes via a Highly Conserved Long Terminal Repeat Site," *PLoS Pathog.*, 2006; 2: e130.

- [67] Frank A. W. Verreck , Tjitske de Boer, Dennis M. L. Langenberg, Marieke A. Hoeve , Matthijs Kramer, Elena Vaisberg, Robert Kastelein, Arend Kolk, René de Waal-Malefyt, Tom H. M. Ottenhoff, “Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria,” *PNAS*, 2003; 101: 4560-5.
- [68] Kazuo Suzuki, Shinichiro Hattori, Katherine Marks, Chantelle Ahlenstiel, Yosuke Maeda, Takaomi Ishida, Michelle Millington, Maureen Boyd, Geoff Symonds David A Cooper, Seiji Okada and Anthony D Kelleher, “Promoter Targeting shRNA Suppresses HIV-1 Infection In vivo Through Transcriptional Gene Silencing,” *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2013; 2: e137.
- [69] N Takayama, S Nishimura, S Nakamura, T Shimizu, R Ohnishi, H Endo, T Yamaguchi, M Otsu, K Nishimura, M Nakanishi, A Sawaguchi, R Nagai, K Takahashi, S Yamanaka, H Nakauchi, K Eto, “Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells,” *JEM*, 2010; 13: 2817-30.
- [70] J. P. Robinson, Ed, “Current Protocols in Cytometry,” 1998, pp. 9.11.1-9.11.9..
- [71] S Crowe, T Zhu, WA Muller, “The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection.,” *J Leukoc Biol.*, 2007; 74: 635-41.
- [72] P Bagnarelli, A Valenza, S Menzo, R Sampaolesi, P E Varaldo, L Butini, M Montroni, C F Perno, S Aquaro, D Mathez, J Leibowitch, C Balotta and M Clementi, “Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in vivo.,” *J. Virol.*, 1996; 11: 7603-7613.
- [73] Aquaro S, Calìò R, Balzarini J, Bellocchi MC, Garaci E, Perno CF., “Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir.,” *Antiviral Res*, 2002; 55: 209-25.
- [74] Suzuki K, Craddock BP, Okamoto N, Kano T, Steigbigel RT., “Poly A-linked colorimetric microtiter plate assay for HIV reverse transcriptase.,” *J Virol Methods.*, 1993; 44: 189-98.

- [75] Daehwan Kim, Geo Pertea, Cole Trapnell, Harold Pimentel, Ryan Kelley, Steven L Salzberg, "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.," *Genome Biol*, 2013; 14; R36..
- [76] "Ramskold, D., et al., An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data.," *PLoS Comput Biol*, 2009; 5: e1000598.
- [77] Huang da, W., B.T. Sherman, R.A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.," *Nat Protoc*, 2009; 4: 44-57.
- [78] Atsushi Nakamura, Risa Ebina-Shibuya, Ari Itoh-Nakadai, Akihiko Muto, Hiroki Shima, Daisuke Saigusa, Junken Aoki, Masahito Ebina, Toshihiro Nukiwa, Kazuhiko Igarashi, "Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function," *J Exp Med*, 2013; 210: 2191-204.
- [79] Fox NW, Damjanov I, Knowles BB, Solter D., "Stage-specific embryonic antigen 3 as a marker of visceral extraembryonic endoderm.," *Dev Biol.*, 1984; 103: 263-6.
- [80] Badcock G, Pigott C, Goepel J, Andrews PW., "The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan.," *Cancer Res.*, 1999; 59: 4715-9.
- [81] Kazuo Suzuki, Takaomi Ishida, Makoto Yamagishi, Chantelle Ahlenstiel, Sanjay Swaminathan, Katharine Marks, Daniel Murray, Erin M McCartney, Michael R Beard, Marina Alexander, Damian FJ Purcell, David A Cooper, Toshiki Watanabe, Anthony D Kelleher, "Transcriptional gene silencing of HIV-1 through promoter targeted RNA is highly specific," *RNA Biol.*, 2011; 8: 1035-46.
- [82] Lusso P, Cocchi F, Balotta C, Markham PD, Louie A, Farci P, Pal R, Gallo RC, Reitz MS Jr., "Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with

- cell-line-tropic HIV-1.," *J Virol.*, 1995; 69: 3712-20.
- [83] Maxim A. Vodyanik, James A. Thomson, and Igor I. Slukvin, "eukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures.," *Blood*, 2006; 108: 2095–2105.
- [84] Student AK, Hsu RY, Lane MD., "Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes.," *J Biol Chem.*, 1980; 255: 4745-50.
- [85] Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Park C, Choi K, Bickel PE., "OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis.," *J Lipid Res.*, 2006; 47: 450-60.
- [86] Yamane T, Kunisada T, Hayashi S., "Embryonic stem cells as a model for studying osteoclast lineage development.," *Methods Mol Biol.*, 2002 ; 185: 97-106.
- [87] Jun Seita and Irving L. Weissman, "Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation," *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, 2010; 2: 640-653.
- [88] N Methia, F Louache, W Vainchenker, F Wendling, "Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis," *Blood*, 1993; 82: 1395-401.
- [89] M Kobayashi, JH Laver, T Kato, H Miyazaki, and M Ogawa, "Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3," *Blood*, 1996; 88: 429-36.
- [90] Steven P. Zielske, Stanton L. Gerson, "Cytokines, Including Stem Cell Factor Alone, Enhance Lentiviral Transduction in Nondividing Human LTCIC and NODSCID Repopulating Cells," *Molecular Therapy*, 2003; 7: 325-33.
- [91] ID Bernstein, RG Andrews, and KM Zsebo, "Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin- cells

- cultured with IL-3, GCF or GM-CSF," *Blood*, 1991; 77: 2316-21.
- [92] Gobeil LA, Lodge R, Tremblay MJ., "Differential HIV-1 endocytosis and susceptibility to virus infection in human macrophages correlate with cell activation status.," *J Virol.*, 2012; 86: 10399-407.
- [93] Pai RK, Askew D, Boom WH, Harding CV., "Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator.," *J Immunol.*, 2002; 169: 1326-33.
- [94] Ruby Fernandez-Boyanapalli, Kathleen A. McPhillips, S. Courtney Frasch, William J. Janssen, Mary C. Dinauer, David W. H. Riches, Peter M. Henson, Aideen Byrne, Donna L. Bratton, "mpaired Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages in Chronic Granulomatous Disease Is Reversed by IFN- γ in a Nitric Oxide-Dependent Manner," *J. Immunol.*, 2010; 185: 4030-41.
- [95] Luis J. Montaner, Rosangela P. da Silva, Junwei Sun, Shaheen Sutterwala, Michael Hollinshead, David Vaux, Siamon Gordon, "Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10.," *J. Immunol.*, 1999; 162: 4606-4613.
- [96] Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N., "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses.," *Nat Immunol*, 2011; 12: 231-8.
- [97] Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK, "Robust and Highly-Efficient Differentiation of Functional Monocytic Cells from Human Pluripotent Stem Cells under Serum- and Feeder Cell-Free Conditions," *PLoS ONE.*, 2013; 8: e59243.
- [98] S. Mia, A. Warnecke, X.-M. Zhang, V. Malmstrom R. A. Harris, "An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype," *Experimental Immunology*, 2014; 79: 305-314.
- [99] Dalgleish AG , Beverley PC , Clapham PR , Crawford DH , Greaves MF ,

- Weiss RA, "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus," *Nature*, 1984; 312: 763-7.
- [100] Klatzmann D , Champagne E , Chamaret S , Gruest J , Guetard D , Hercend T , Gluckman JC , Montagnier L, "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV," *Nature*, 1984; 312: 767–768.
- [101] Feng Y , Broder CC , Kennedy PE , Berger EA, "HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor," *Science*, 1996; 272: 872–877.
- [102] J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D., "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia," *Nature*, 1997; 385: 645–649.
- [103] Dragic T , Litwin V , Allaway GP , Martin SR , Huang Y , Nagashima KA , Cayanan C , Maddon PJ , Koup RA , Moore JP, "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5," *Nature*, 1996; 381, 667 - 673.
- [104] Kedzierska K, Crowe SM., "The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection.," *Curr Med Chem.*, 2002; 9: 1893-903.
- [105] Hoxie JA, Alpers JD, Rackowski JL, Huebner K, Haggarty BS, Cedarbaum AJ, Reed JC., "Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV.," *Science.*, 1986; 234: 1123-7.
- [106] Sharkey ME, Teo I, Greenough T, Sharova N, Luzuriaga K, Sullivan JL, Bucy RP, Kostrikis LG, Haase A, Veryard C, Davaro RE, Cheeseman SH, Daly JS, Bova C, Ellison RT 3rd, Mady B, Lai KK, Moyle G, Nelson M, Gazzard B, Shaunak S, Stevenson M., "Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy.," *Nat Med.*, 2000; 6: 76-81.
- [107] Pang S, Koyanagi Y, Miles S, Wiley C, Vinters H, Chen I, "High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients.," *Nature*, 1990; 343: 85-89.

- [108] Teo I, Veryard C, Barnes H, An S, Jones M, Lantos P, Luthert P, Shaunak S, "Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS.," *J Virol*, 1999; 71: 2928-33.
- [109] Bukrinsky M, Stanwick T, Dempsey M, Stevenson M, " Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection.," *Science*, 1991; 254: 423-27.
- [110] Richard D Sloan, Mark A Wainberg, "The role of unintegrated DNA in HIV infection," *Retrovirology*, 2011; 8: 52.
- [111] O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH., "A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration.," *J Virol.*, 2002; 76: 10942-50.
- [112] Eric O. Freed, "HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle," *Virology*, 1998; 231: 1-15.
- [113] Lowe DM, Aitken A, Bradley C, Darby GK, Larder BA, Powell KL, Purifoy DJ, Tisdale M, Stammers DK., "HIV-1 reverse transcriptase: crystallization and analysis of domain structure by limited proteolysis.," *Biochemistry*, 1988; 27: 8884-9.
- [114] B Müller, T Restle, S Weiss, M Gautel, G Sczakiel and R S Goody, "Co-expression of the subunits of the heterodimer of HIV-1 reverse transcriptase in *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 13975-13978.
- [115] T Restle, B Müller and R S Goody, "Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention.," *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 8986-88.
- [116] Suzuki K, Juelich T, Lim H, Ishida T, Watanebe T, Cooper DA, Rao S, Kelleher AD, "Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region.," *J Biol Chem*, 2008; 283: 23353-63.
- [117] Carl G. Figdor, Yvette van Kooyk. Gosse J. Adema, "C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells.," *Nature Reviews*

Immunology, 2002; 2: 77-84.

- [118] Aimin Jiang, Ona Bloom, Satoru Ono, Weiguo Cui, Juli Unternaehrer, Shan Jian, J. Andrew Whitney, John Connolly, Jacques Banchereau, Ira Mellman, "Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation," *Immunity*, 2007; 27: 610–624..
- [119] Federica Sallusto. Patrick Schaerli, Pius Loetscher. Christoph Schaniel, Danielle Lenig, Charles R. Mackay, Shixin Qin and Antonio Lanzavecchia, "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation," *Eur. J. Immunol.*, 1998; 28: 2760–2769.
- [120] Garcia E, Pion M, Pelchen-Matthews A, Collinson L, Arrighi JF, Blot G, Leuba F, Escola JM, Demaurex N, Marsh M, Piguet V., "HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse.," *Traffic*, 2005; 6: 488-501.
- [121] Sharova N, Swingler C, Sharkey M, Stevenson M., "Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans.," *EMBO J.*, 2005; 24: 2481-9.
- [122] Jolly C, Sattentau QJ., "Retroviral spread by induction of virological synapses.," *Traffic*, 2004; 5: 643-50.
- [123] Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH, "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.," *Nature*, 2002; 418: 646–650.
- [124] Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD, "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.," *Nature*, 2008; 451: 425–430.
- [125] Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn MP, Skowronski J, "Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein.," *Nature*, 2011; 474: 658–661.
- [126] Jacque JM, Stevenson M, "The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity.," *Nature*, 2006; 441: 641-5..
- [127] John P. Donahue,^a Michael L. Vetter,^b Nizar A. Mukhtar, Richard T. D'Aquila, "The HIV-1 Vif PPLP Motif is Necessary for Human APOBEC3G

- Binding and Degradation.," *Virology*, 2008; 377: 49-53.
- [128] Mukherji, E., Au, J. L., Mathes, L. E., "Differential antiviral activities and intracellular metabolism of 3-azido-3-deoxythymidine and 2,3-dideoxyinosine in human cells.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994; 38: 1573-9.
- [129] Vazquez-Padua, M. A., Mayol, N., Lopez, M., "Uptake and distribution of 2',3'-dideoxyinosine and its derivatives in a human monocytoïd cell line.," *Cell. Mol. Biol.*, 1995; 41: S113-9.
- [130] Dubreuil, M., Sportza, L., D'Addario, M., Lacoste, J., Rooke, R., Wainberg, M. A., Hiscott, J., "Inhibition of HIV-1 transmission by interferon and 3-azido-3-deoxythymidine during de novo infection of promonocytic cells.," *Virology*, 1990; 179: 388-94.
- [131] Uherova, P., Schmidtmayerova, H., Mayer, V., "Failure of azido-thymidine to inhibit human immunodeficiency virus (HIV) replication in a promonocytic cell line (U937).," *Acta Virol.*, 1991; 35: 357-64.
- [132] Stanley, S. K., Kessler, S. W., Justement, J. S., Schnittman, S. M., Greenhouse, J. J., Brown, C. C., Musongela, L., Musey, K., Kapita, B., Fauci, A. S., "CD34+ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals.," *J. Immunol.*, 1992; 149: 689-97.
- [133] Gero Hütter, M.D., Daniel Nowak, M.D., Maximilian Mossner, B.S., Susanne Ganepola, M.D., Arne Müßig, M.D., Kristina Allers, Ph.D., Thomas Schneider, M.D., Ph.D., Jörg Hofmann, Ph.D., Claudia Kücherer, M.D., Olga Blau, M.D., Igor W. Blau, M.D., et al, "Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation," *New England Journal of Medicine*, 2009; 360: 7.
- [134] "CDC. Pneumocystis pneumonia," *Los Angeles. MMWR*, 1981; 30: 250-2.
- [135] Michael Worobey, Marlea Gemmel, Dirk E. Teuwen, Tamara Haselkorn, Kevin Kunstman, Michael Bunce, Jean-Jacques Muyembe, Jean-Marie M. Kabongo, Raphaël M. Kalengayi, Eric Van Marck, M. Thomas P. Gilbert, Steven M. Wolinsky, "Worobey M et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960.," *Nature*, 2008; 455: 661-4.

- [136] Mette, MF, Matzke, AJ and Matzke, MA, "Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing.," *Curr Biol*, 2001; 11: 1119-23.
- [137] Wassenegger, M, "RNA-directed DNA methylation.," *Plant Mol Biol*, 2000; 43: 203-220.
- [138] Roberts, TC, Andaloussi, SE, Morris, KV, McClorey, G and Wood, MJ, "Small RNA-Mediated Epigenetic Myostatin Silencing.," *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012; 1: e23.
- [139] "Novina, CD, Murray, MF, Dykxhoorn, DM, Beresford, PJ, Riess, J, Lee, SK et al.," *Nat Med*, 2002; 8: 681-686.
- [140] Boden, D, Pusch, O, Lee, F, Tucker, L and Ramratnam, B, "Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference.," *J Virol*, 2003; 77: 11531-11535.
- [141] von Eije, KJ, ter Brake, O and Berkhout, B, "Human immunodeficiency virus type 1 escape is restricted when conserved genome sequences are targeted by RNA interference.," 2008; 82: 2895-2903.
- [142] Westerhout, EM, Ooms, M, Vink, M, Das, AT and Berkhout, B, "HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome.," *Nucleic Acids Res*, 2005; 33: 796–804.
- [143] Shah, PS, Pham, NP and Schaffer, DV, "HIV develops indirect cross-resistance to combinatorial RNAi targeting two distinct and spatially distant sites.," *Mol Ther*, 2012; 20: 840–848.
- [144] Olivier ter Brake, Pavlina Konstantinova, Mustafa Ceylan and Ben Berkhout, "Silencing of HIV-1 with RNA Interference: A Multiple shRNA Approach.," *Moll Ther*, 2006; 14: 883-92.
- [145] Miller, V and Larder, BA, "Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure.," *Antivir Ther*, 2001; 6: 25-44.
- [146] Klenerman, P, Wu, Y and Phillips, R, "HIV: current opinion in escapology.," *Curr Opin Microbiol*, 2002; 5: 408-13.
- [147] M.S. Weinberg, L.M. Villeneuve, A. Ehsani, M. Amarzguioui, L. Aagaard,

- Z.X. Chen, A.D. Riggs, J.J. Rossi, K.V. Morris, "The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells," *RNA*, 2006; 12: 256-262.
- [148] D.H. Kim, L.M. Villeneuve, K.V. Morris, J.J. Rossi, "Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006; 13: 793-97.
- [149] Turner, AM, Ackley, AM, Matrone, MA and Morris, KV, "Characterization of an HIV-targeted transcriptional gene-silencing RNA in primary cells.," *Hum Gene Ther*, 2012;23: 473–483.
- [150] Van Coppernolle S, Verstichel G, Timmermans F, Velghe I, Vermijlen D, De Smedt M, Leclercq G, Plum J, Taghon T, Vandekerckhove B, Kerre T., "Functionally mature CD4 and CD8 TCRalpha cells are generated in OP9-DL1 cultures from human CD34+ hematopoietic cells.," *J Immunol.*, 2009; 183: 4859-70.
- [151] Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa K, Satoh R, Shibano-Satoh A, Kominami R, Katsura Y, Kawamoto H., "An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage.," *Science*, 2010; 329: 93-6.
- [152] Maxim A. Vodyanik, James A. Thomson, Igor I. Slukvin, "Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures," *Blood*, 2006; 108: 2095-2105.
- [153] R. M., "Professional and non-professional phagocytes: an introduction.," *Trends Cell Biol.*, 1995; 5: 85-7.
- [154] Isabelle Kamga, Sandrine Kahi, Leyla Develioglu, Miriam Lichtner, Concepción Marañón, Christiane Deveau, Laurence Meyer, Cécile Goujard, Pierre Lebon, Martine Sinet, Anne Hosmalin, "Type I Interferon Production Is Profoundly and Transiently Impaired in Primary HIV-1 Infection," *The Journal of Infectious Diseases*, 2005; 192: 303-310.
- [155] Herbein G, Khan KA., "Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease?," *Trends Immunol.*, 2008; 29: 61-7.
- [156] Aukrust P, Liabakk NB, Müller F, Lien E, Espevik T, Frøland SS., "Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF

- receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection--correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters.," *J Infect Dis.*, 1994; 169: 420-4.
- [157] Christopher M Coleman, Li Wu, "HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs," *Retrovirology*, 2009; 6: 51.
- [158] Evelyn M Kilareski, Sonia Shah, Michael R Nonnemacher, Brian Wigdahl, "Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage," *Retrovirology*, 2009; 6: 118.
- [159] Gordon S, "Alternative activation of macrophages.," *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 23-35.
- [160] Benoit M, Desnues B, Mege JL., "Macrophage polarization in bacterial infections.," *J Immunol*, 2008; 181: 3733-9.
- [161] Goldmann O, von Köckritz-Blickwede M, Höltje C, Chhatwal GS, Geffers R, Medina E., "Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program.," *Infect Immun*, 2007; 75: 4148-57.
- [162] Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S, "Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion.," *Blood*, 2010; 115: 353-62.
- [163] Ogden CA, Pound JD, Batth BK, Owens S, Johannessen I, Wood K, Gregory CD, "Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma.," *J Immunol*, 2005; 174: 3015-23.
- [164] Mahlknecht U, Herbein G, "Macrophages and T-cell apoptosis in HIV infection: a leading role for accessory cells?," *Trends Immunol.*, 2001; 22: 256-60.
- [165] Yu JY, Taylor J, DeRuiter SL, Vojtek AB, Turner DL, "Simultaneous inhibition of GSK3alpha and GSK3beta using hairpin siRNA expression vectors.," *Mol Ther.*, 2003; 7: 228-36.
- [166] Erwei Song, Sang-Kyung Lee, Jie Wang, Nedim Ince, Nengtai Ouyang,

- Jun Min, Jisheng Chen, Premlata Shankar, Judy Lieberman, "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis," *Nature Medicine*, 2003; 9: 347-51.
- [167] Carpenter AC, Bosselut R., "Decision checkpoints in the thymus.," *Nat Immunol.*, 2010; 11: 666-673.
- [168] Blue ML, Daley JF, Levine H, Schlossman SF., "Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry.," *J Immunol.*, 1985; 134: 2281-6.
- [169] De Rossi, A., M. L. Calabro, M. Panozzo, D. Bernardi, B. Caruso, G. Tridente, and L. Chieco-Bianchi., "n vitro studies of HIV-1 infection in thymic lymphocytes: a putative role of the thymus in AIDS pathogenesis.," *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 1990; 6: 287-98.
- [170] Imlach S, McBreen S, Shirafuji T, Leen C, Bell JE, Simmonds P, "Activated peripheral CD8 lymphocytes express CD4 in vivo and are targets for infection by human immunodeficiency virus type 1.," *J Virol.*, 2001; 75: 11555-11564.
- [171] Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, Kuruppu J, Yazdani J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA., "T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis.," *J Virol.*, 2004; 78: 1160-8.
- [172] Kitchen, S. G., Y. D. Korin, M. D. Roth, A. Landay, and J. A. Zack., "Costimulation of naive CD8+ lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection.," *J. Virol.*, 1998; 72:9054-9060.
- [173] Brooks, D. G., S. G. Kitchen, C. M. Kitchen, D. D. Scripture-Adams, and J. A. Zack., "Generation of HIV latency during thymopoiesis.," *Nat. Med.*, 2001; 7: 459-464.
- [174] A. JE., "Autofluorescence of viable cultured mammalian cells.," *J Histochem Cytochem.*, 1979; 27: 36-43.
- [175] Hulspas R, O'Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR., "Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow

- cytometry.," *Cytometry B Clin Cytom.*, 2009; 76: 355-64.
- [176] M. M., "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications.," *Biotechnol Annu Rev.*, 2005; 11: 227-56.
- [177] Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH., "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages.," *PLoS One.*, 2010; 13: e8668.
- [178] Njoroge JM, Mitchell LB, Centola M, Kastner D, Raffeld M, Miller JL., "Characterization of viable autofluorescent macrophages among cultured peripheral blood mononuclear cells.," *Cytometry.*, 2001; 44: 38-44.
- [179] Umino T, Sköld CM, Pirruccello SJ, Spurzem JR, Rennard SI., "Two-colour flow-cytometric analysis of pulmonary alveolar macrophages from smokers.," 1999; 13: 894-9.
- [180] Pankow W, Neumann K, Rüschoff J, von Wichert P., "Human alveolar macrophages: comparison of cell size, autofluorescence, and HLA-DR antigen expression in smokers and nonsmokers.," *Cancer Detect Prev.*, 1995; 19: 268-73.
- [181] Karim Vermaelen, Romain Pauwels, "Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights," *Cytometry Part A*, 2004; 61A: 170-7.
- [182] Yi, Y., Rana, S., Turner, J. D., Gaddis, N., Collman, R. G., "CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1," *J. Virol.*, 1998; 72: 772-9.
- [183] Simmons, G., Reeves, J. D., McKnight, A., DeJucq, N., Hibbitts, S., Power, C. A., Aarons, E., Schols, D., DeClercq, E., Proudfoot, A. E., Clapham, P. R., "CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages," *J. Virol.*, 1998; 72: 8453-7.
- [184] Verani, A., Pesenti, E., Polo, S., Tresoldi, E., Scarlatti, G., Lusso, P., Siccardi, A. G., Vercelli, D., "CXCR4 is a functional coreceptor for infection

- of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates," *J. Immunol.*, 1998; 161: 2084-8.
- [185] Collman RG, Yi Y, Liu QH, Freedman BD., "Chemokine signaling and HIV-1 fusion mediated by macrophage CXCR4: implications for target cell tropism.," *J Leukoc Biol.*, 2000; 68: 318-23.
- [186] Katherine Kedzierska, Suzanne M. Crowe, Stuart Turville, Anthony L. Cunningham, "The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages," 2003; 13: 39-56.
- [187] Helena Schmidtmayerova, Massimo Alfano, Michael Bukrinsky, "Human Immunodeficiency Virus Type 1 T-Lymphotropic Strains Enter Macrophages via a CD4- and CXCR4-Mediated Pathway: Replication Is Restricted at a Postentry Level," *J Virol.*, 1998; 72: 4633-42.
- [188] Jacqueline D. Reeves, Robert W. Doms, "Human immunodeficiency virus type 2.," *J Gen Virol*, 2002; 83: 1253-1265.
- [189]
- [190] Edana Cassol , Luca Cassetta, Massimo Alfano, Guido Poli , "Macrophage polarization and HIV-1 infection.," *Journal of Leukocyte Biology*, 2010; 87: 599-608.
- [191] Mark S. Diamond, Michelle Kinder, Hirokazu Matsushita, Mona Mashayekhi, Gavin P. Dunn, Jessica M. Archambault, Hsiaoju Lee, Cora D. Arthur, J. Michael White, Ulrich Kalinke, Kenneth M. Murphy, Robert D. Schreiber, "Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors.," *J. Exp. Med*, 2011; 208: 1989-2003.
- [192] Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. , " Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells.," 2011; 208: 2005-16.
- [193] MF Pittenger, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, Robin Douglas, Joseph D. Mosca, Mark A. Moorman, Donald W. Simonetti, Stewart Craig, Daniel R. Marshak, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.," *Science* , 1999; 284: 143-147 .

- [194] Frederick R. Appelbaum, "Hematopoietic-Cell Transplantation at 50.," *N Engl J Med*, 2007; 357: 1472–1475.
- [195] James A. Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, Jeffrey M. Jones, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.," *Science*, 1998; 282: 1145-1147.
- [196] Anna M. Wobusa, Gerd Wallukatb, Jürgen Hescheler, "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers," *Differentiation*, 1991;48:173-82.
- [197] Zhaohui Ye, Huichun Zhan, Prashant Mali, Sarah Dowey, Donna M. Williams, Yoon-Young Jang, Chi V. Dang, Jerry L. Spivak, Alison R. Moliterno, and Linzhao Cheng, "Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders.," *Blood*, 2009; 114: 5473-5480.
- [198] Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK., "A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors.," *PLoS One.*, 2011; 6: e22261.
- [199] Wai Feng Lim, Tomoko Inoue-Yokoo, Keai Sinn Tan, Mei I Lai and Daisuke Sugiyama, "Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells.," *Stem Cell Research & Therapy*, 2013, 4:71.

8. 図表

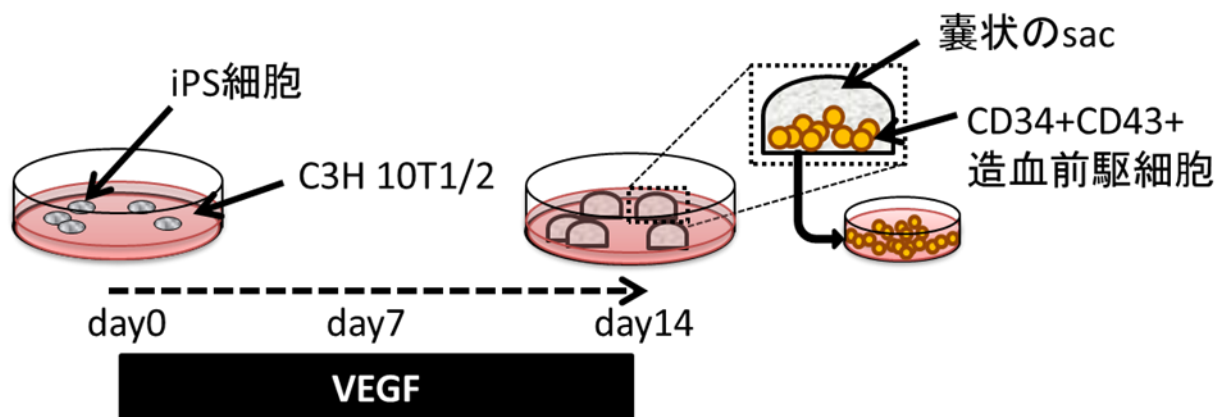


図1-1. sac法を用いたiPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導

増殖を止めたC3H 10T1/2上に、ヒトiPS細胞をクランプの状態で播種し、VEGF存在下で培養すると、囊状のsacと呼ばれる構造ができ、その内部に造血前駆細胞が分化してくる。ピペッティングなど機械的刺激によりこのsac構造を破壊し、造血前駆細胞を回収する。

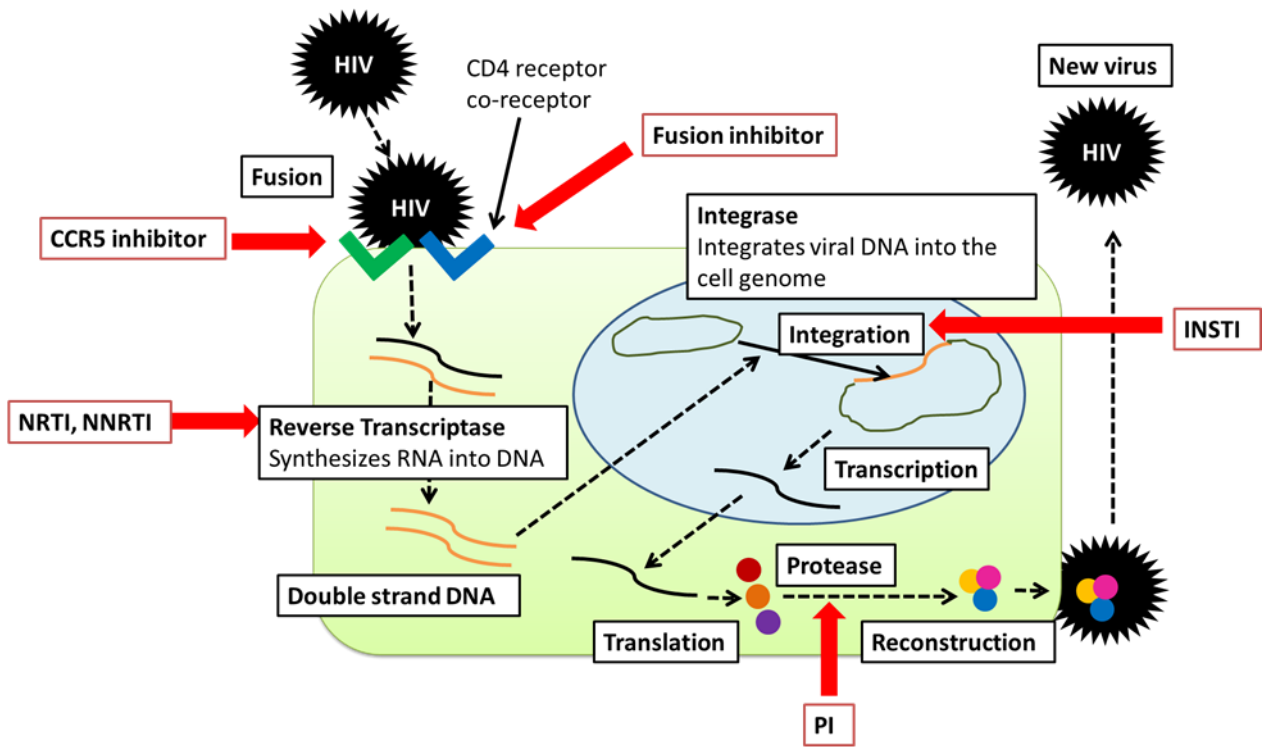


図1-2. HIV-1の生活環と治療薬の作用部位

HIV-1は一本鎖RNAをゲノムに持つレトロウイルスである。HIV-1の生活環は、1) HIV-1が宿主細胞に侵入する過程で、CD4陽性Tリンパ球(T-tropic)、単球・マクロファージ(M-tropic)等に感染し、それぞれCXCR4, CCR5のケモカインレセプターをco-receptorとしてCD4と共に使用しウイルス膜と宿主細胞膜が融合(Fusion)する過程、2) 逆転写酵素(Reverse Transcriptase)により生成されたウイルスDNAがインテグラーゼ(Integrase)により宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれる(Integration)過程、3) 子孫ウイルスが増殖する過程からなる。

これらの各過程に対して、主に次のような治療薬が存在する：1) 融合阻害薬(Fusion inhibitor)、CCR5阻害薬(CCR5 inhibitor)、2) 核酸系逆転写酵素阻害剤(Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI))、非核酸系逆転写酵素阻害剤(Non-Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI))、インテグラーゼ阻害剤(Integrase Strand Transfer Inhibitor (INSTI))、3) プロテアーゼ阻害剤(Protease Inhibitor (PI))。

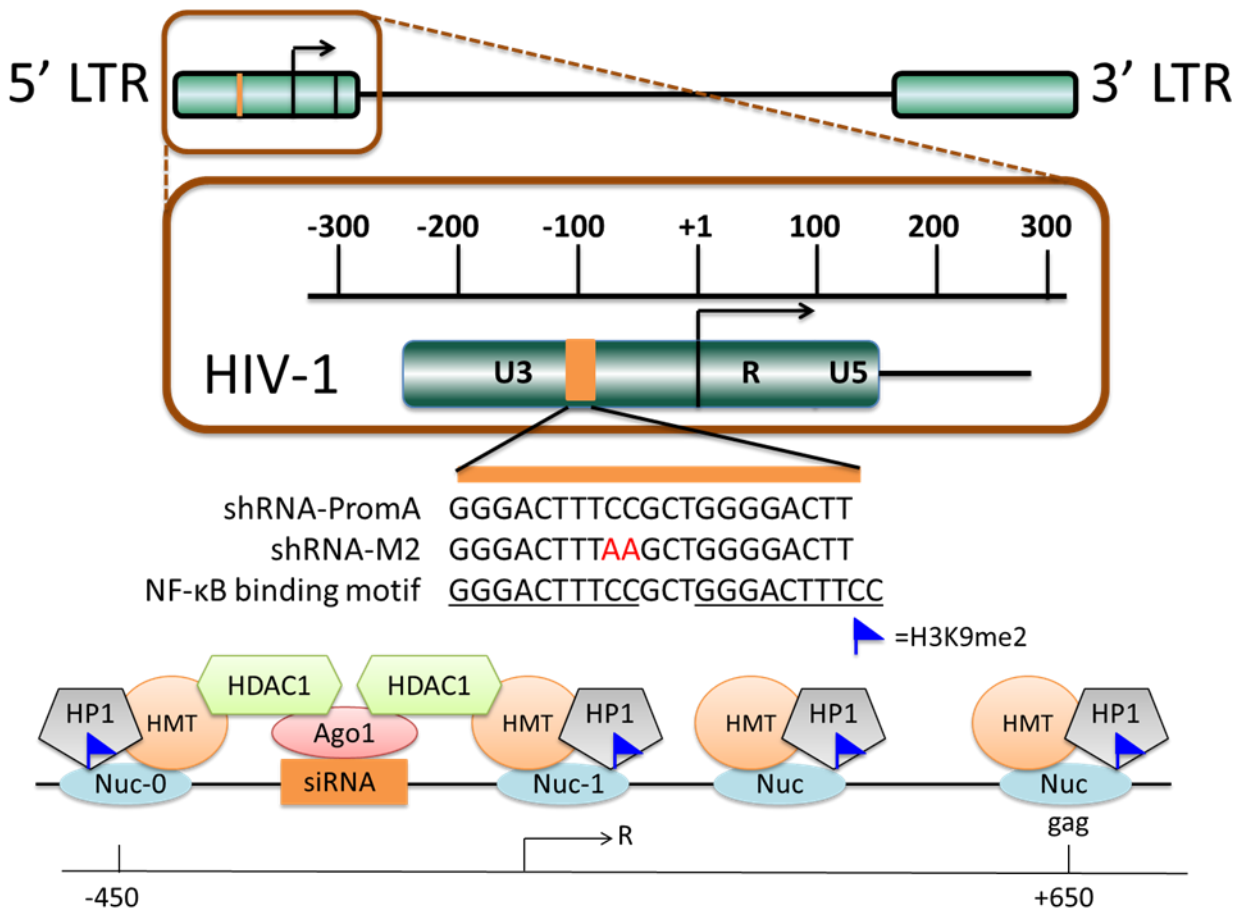


図1-3. shRNAの配列とその作用機序モデル

Nuc: Nucleosome, HDAC: Histone deacetylase, Ago: Argonaute, HMT: Histone methyltransferase, HP: Heterochromatin protein

上段の図ではHIV-1の5' long terminal repeat(LTR) 領域内にあるNF-κB 結合部位を橙色で示し、その結合部位の配列 (NF-κB binding motif)とそれに相補的な配列を持つ shRNA-PromA、shRNA-PromAから2塩基不一致のshRNA-M2の配列を示す。矢印(R)は HIV-1の転写開始部位を示している。

下段の図はプロモーター領域に結合するsiRNA-PromAによるヘテロクロマチン形成モデルを示している。siRNAはAgo1に結合し、RNA-induced transcriptional silencing(RITS) complexを形成し、ヘテロクロマチン形成がこれより上流と下流領域(近接するプロモーター領域やmRNA coding領域を含む)に伸展する。Histone deacetylase(HDAC1)、histone methyltransferase(HMT)がH3K9me2(青い旗印)を誘導し heterochromatin protein 1(HP1)をsiRNAの結合部位周辺にリクルートする。これらにより、HIV-1遺伝子の転写を抑制すると考えられている。数字は転写開始部位からの塩基数を示す。

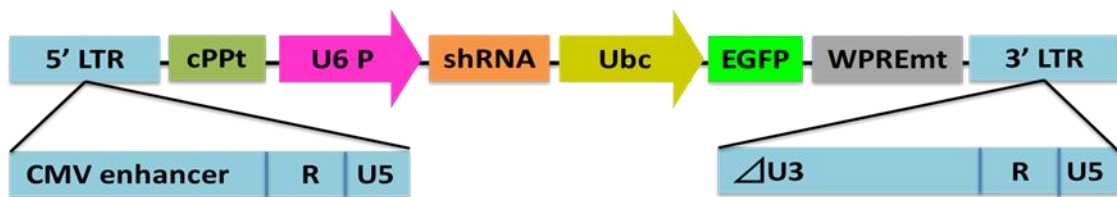


図2-1. shRNA遺伝子導入のためSIN vector構造

SIN vectorは、central polypurine tract(cPPT)、U6 promotor(U6 P)、short hairpin RNA(shRNA)、ubiquitin C promoter(Ubc)とenhanced green fluorescent protein(EGFP)からなる。Mutant woodchuck promoter response element(WPREmt)と改変したLTRによりウイルス遺伝子のインテグレーションは起きるが、発現はしない構造になっている。

表 2-1. 骨髄球系細胞への分化過程におけるサイトカイン条件

条件1	50 ng/ml GM-CSF+50 ng/ml M-CSF
条件2	50 ng/ml GM-CSF+50 ng/ml M-CSF+50 ng/ml SCF
条件3	50 ng/ml GM-CSF+50 ng/ml M-CSF+50 ng/ml SCF+20 ng/ml IL-3
条件4	50 ng/ml GM-CSF+50 ng/ml M-CSF+20 ng/ml IL-3

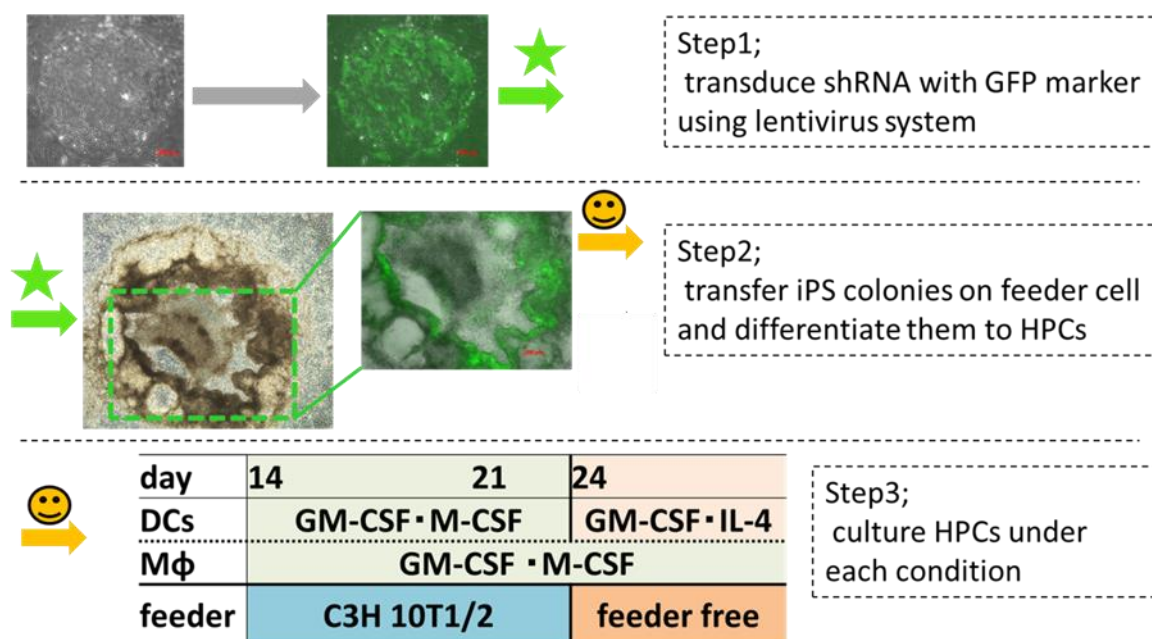


図2-2. iPS細胞からマクロファージと樹状細胞への分化

shRNAを導入していないiPSの分化に関しては、Step1を省略して行った。Step2に関しては、前半7日間は低酸素条件下で培養し、後半7日間は通常の酸素条件下で培養し、CD34+もしくはCD43+の造血前駆細胞に分化させる。またStep2の14日間は、前半と後半でそれぞれサイトカインの内容を変えて培養している。Step3では細胞毎に異なるサイトカインを用いて分化させている。

表 2-2. iPS-macrophageにおけるCCR5発現確認のためのPCR プライマー

プライマー	
Primer forward	5'-TAGGGCAAGGAGACCACCAACAGC -3'
Primer reverse	5'-CCTCCCTCCTTCCCATCCTTACGA-3'

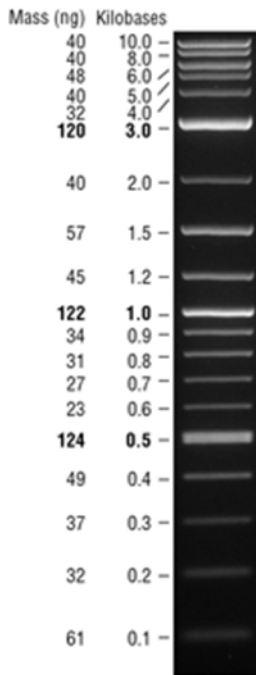


図2-3. 2-Log DNA ladder (0.1-10.0kb)

本研究において、PCR産物の電気泳動においては2-Log DNA ladder(0.1-10.0kb)を使用した。

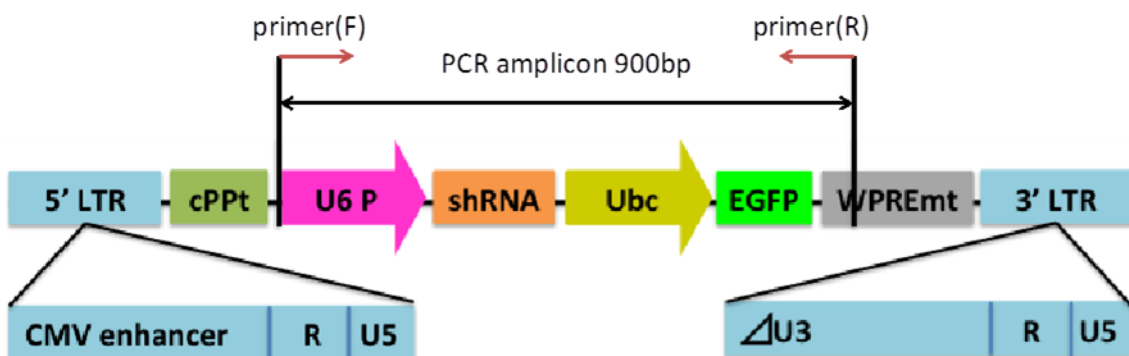


図2-4. shRNA挿入部分の確認PCR (プライマーの設定)

挿入されたshRNAを確認するため、上記のようにshRNA配列を挟むような形で設計されたprimerを用いてPCRを行った。増幅されたPCR産物は900bpとなる。

表 2-3. shRNA挿入部分の確認PCR用プライマー

プライマー	
Primer forward	5'-CACCGAGGGCCTATTTCCCATGA-3'
Primer reverse	5'-ACCTTGTTTCAACGACCTCACAGC-3'

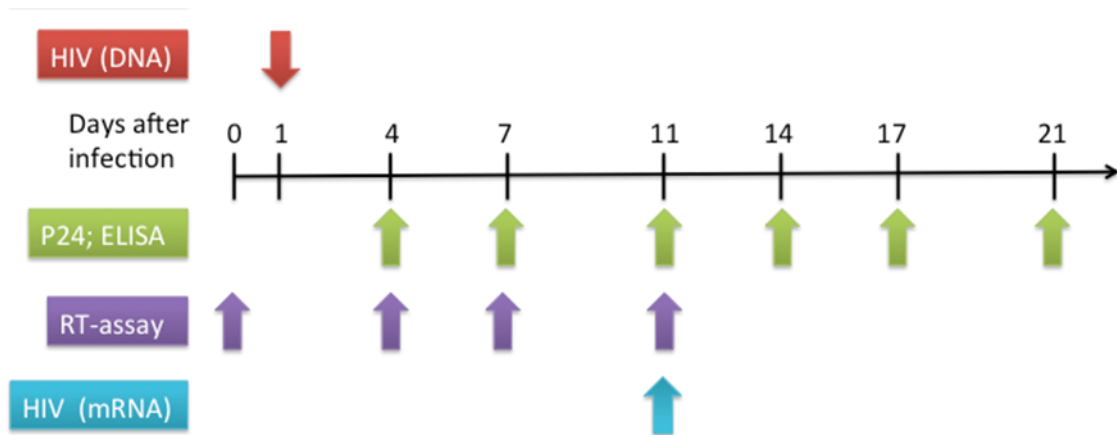


図 2-5. HIV-1 BaL感染実験におけるサンプル採取のスケジュール

感染を行った日をday0として、24時間後(day1)にHIV DNA用のサンプルを回収した。また、p24 ELISA assay、RT-assay用の培養上清の回収はそれぞれ、day4, 7, 11, 14, 17, 21とday0, 4, 7, 11に行った。

表 2-4. HIV gagの(quantitative) qPCRに用いた Taqman probeとプライマー

HIV gag region	forward	5'- AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT-3
	reverse	5'-TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACTTCC-3
	Taqman probe	5'FAM-ATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG-BHQ1
GAPDH	forward	5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAG-3'
	reverse	5'-TCGACAGTCAGCCGCATCTT-3',
	Taqman probe	5'FAM-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCGT-BHQ1

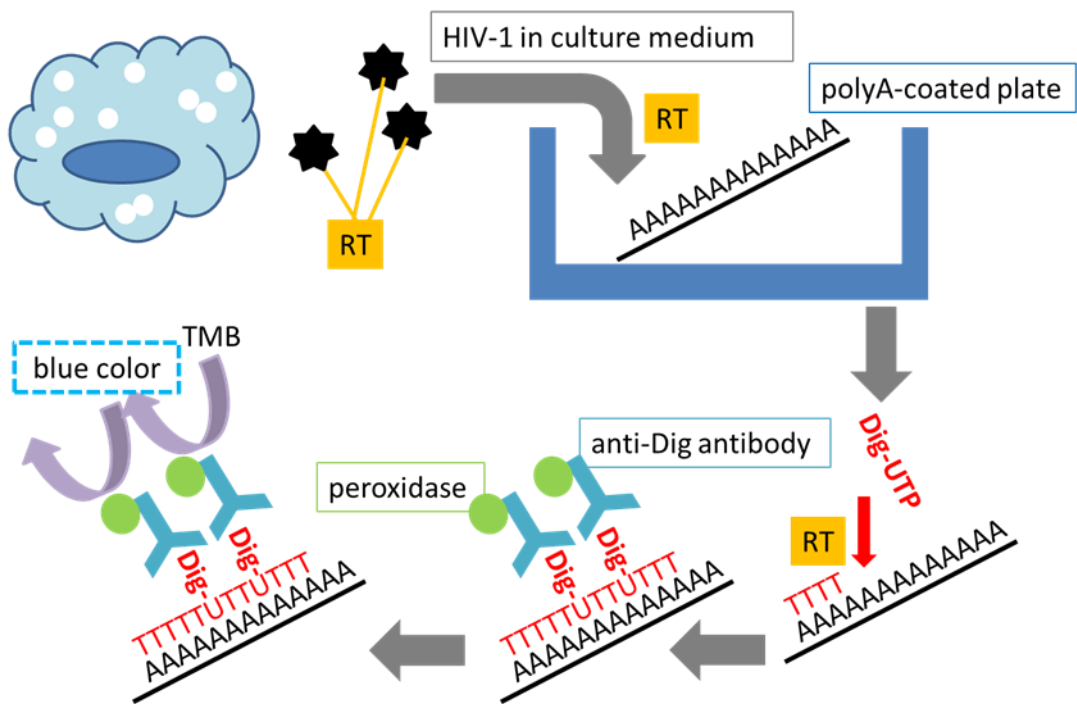


図2-6. coloric RT-assayの原理

polyAを結合させたプレートに、complete cocktailを入れ、そこに培養上清を加える。complete cocktailにはHIV-1の外壁を破壊し、ウイルス粒子中の活性型reverse transcriptase(RT)を溶液中に放出させるTriton Xが入っている。一晩の反応時間でRT活性によってoligo-dTの3'末端からpolyAを鋳型としてpolyTが伸長されるが、この時RT活性に比例して一定の割合でdigoxigenin-11-dUTP(Dig-dUTP)が取り込まれる。反応後プレートを洗淨して取り込まれなかったDig-dUTPを除去し、peroxidase(POD)標識Dig抗体と反応させる。取り込まれなかったPOD標識Dig抗体を除去し、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)基質と反応させる。反応を停止させたのち、450nmの吸光度を測定してサンプル中のRT活性を定量する。

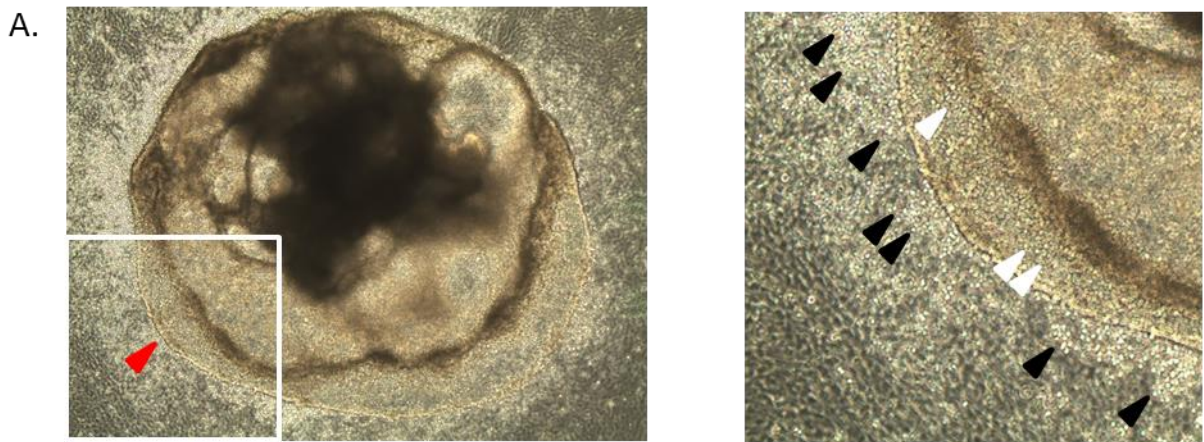
表 2-5. RNA sequencingで検証したNF-κB driven genes

NF-κB pathway	Ligands and Receptors	Downstream Signaling	Cytoplasmic Sequestering/ Releasing of NF-κB
	CD27 (TNFRSF7)	BIRC2 (c-IAP2)	BCL3
	CD40 (TNFRSF5)	FADD	CHUK (IKKa)
	EGFR	IRAK1	IKKB
	F2R	IRAK2	IKBKE
	FASLG (TNFSF6)	IRF1	IKBKG
	IL10	MYD88	NFKBIA
	IL1A	RIPK1	NFKBIB (TRIP9)
	IL1B	TBK1	NFKBIE
	IL1R1	TICAM1 (TRIF)	
	IL8	TICAM2	Transcription Factors
	LTBR	TNFAIP3	NFKB1
	NOD1 (CARD4)	TRADD	NFKB2
	TLR1	TRAF2	REL
	TLR2	TRAF3	RELA
	TLR3	TRAF6	RELB
	TLR4		
	TLR6		
	TLR9		
	TNF		
TNFRSF1A			
TNFRSF10A			
TNFRSF10B			
TNFSF10			
TNFSF14			

NF-κB responsive genes	Immune Response	Other Factors	Kinase
	CCL2 (MCP-1)		AKT1
	CCL5 (RANTES)		MAP3K1
	CSF1 (MCSF)		RAF1
	CSF2 (GM-CSF)		
	CSF3 (GCSF)		Transcription Factors
	ICAM1		ATF1
	IFNA1		EGR1
	IFNG		ELK1
	IL8		FOS
	LTA (TNFB)		JUN
	TNF		STAT1
	Apoptosis		Other Genes
	AGT		BCL10
	BCL2A1 (BCL-X)		CARD11
	BCL2L1		CASP1(ICE)
	BIRC3 (c-IAP1)		CASP8
			CFLAR(CASPER)
			HMOX1
	MALT1		
	PSIP1		
	RHOA		
	TIMP1		

表 2-6. RNA sequencing で検証したM1, M2 macrophage phenotype related genes

M1 related	M2 related
CXCL9	IL10
INPP5D	MRC1
RELA	STAT6
NOS2	C-MAF
IFNGR1	CHIT1
INF	IRF4
IL12A	RETNLB
IL12B	ARG1
CXCL10	
IL1B	
IFNGR2	
IL6	



B.

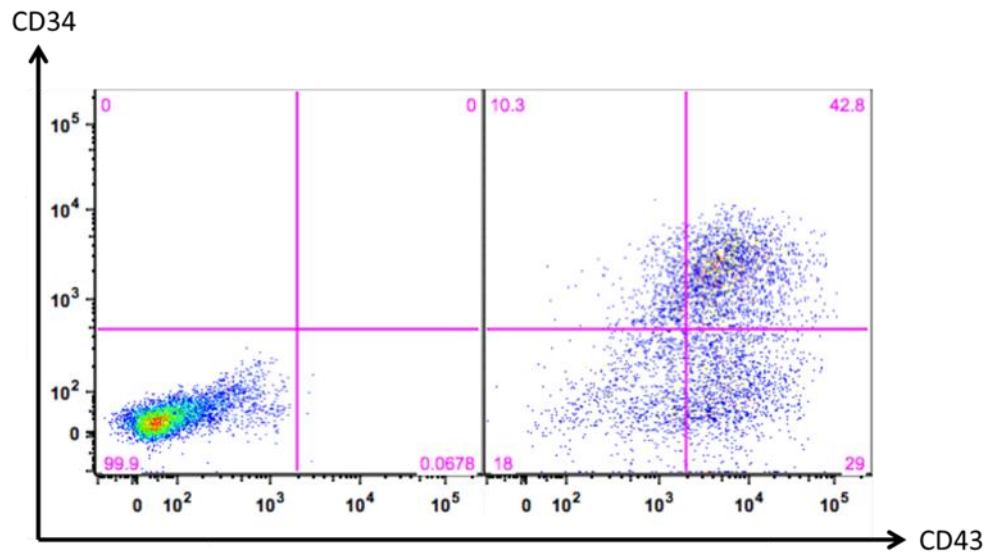


図3-1. iPS細胞から骨髓球系細胞への分化誘導

- A. iPS細胞をC3H10T1/2上に播種し、VEGFを含む血球分化培地で14日間培養すると囊状のsacが認められた(赤印)。その内部には造血前駆細胞が産生されており(白印)、その一部はsacの外にも出てきていた(黒印)。
- B. 分化誘導14日目にsacから回収した造血前駆細胞のフローサイトメリー解析。CD34+CD43+の幼弱な血球が42.8%認められた。

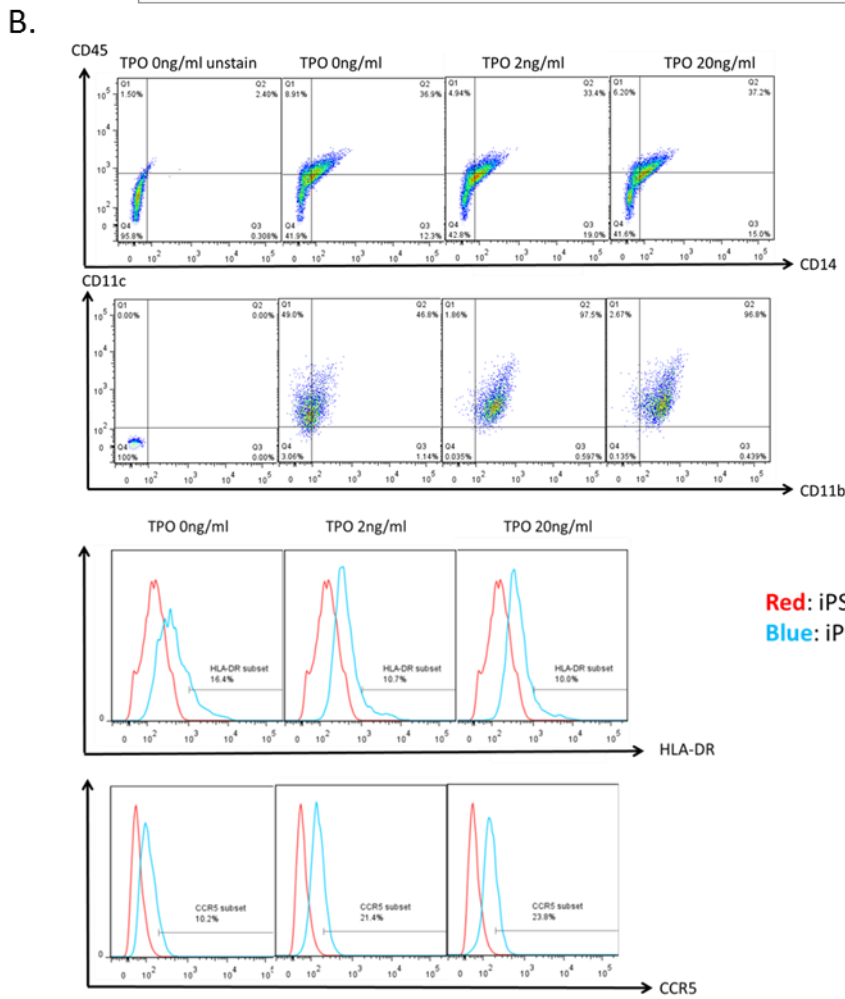
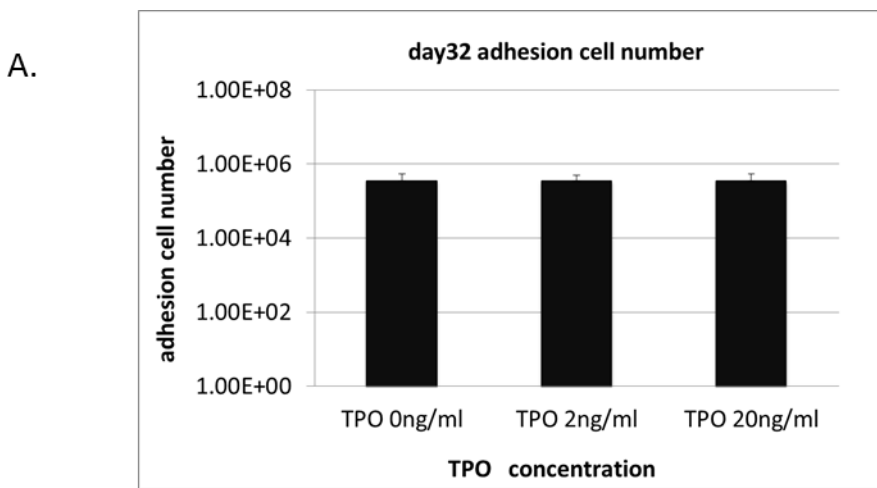


図3-2. 骨髓球系細胞の分化におけるサイトカインの最適化

A. TPO濃度による収量の検討 (original iPS細胞で検証)

iPS細胞から造血前駆細胞に分化させた後の10日間の培養(図 2-2. Step2)において、SCF, Flt-3L存在下でTPOを0 ng/ml, 2 ng/ml, 20 ng/mlと3種類の濃度で加えて培養し、feeder freeにするステップ(図2-2. Step3の24日目)における付着系細胞の細胞数を示す。細胞数に有意差を認めなかった(全ての細胞間で $p > 0.99$)。(n=3, singleにて実施。)

B. 上記A.の条件下で培養し、最終的に得られたマクロファージ(分化開始から33日目)をフローサイトメーターにて解析した。TPOを加えなかった条件に比べて、TPOを加えた条件でCD11c, CD11bの発現が多く、かつCCR5の発現が上昇する傾向が認められる。

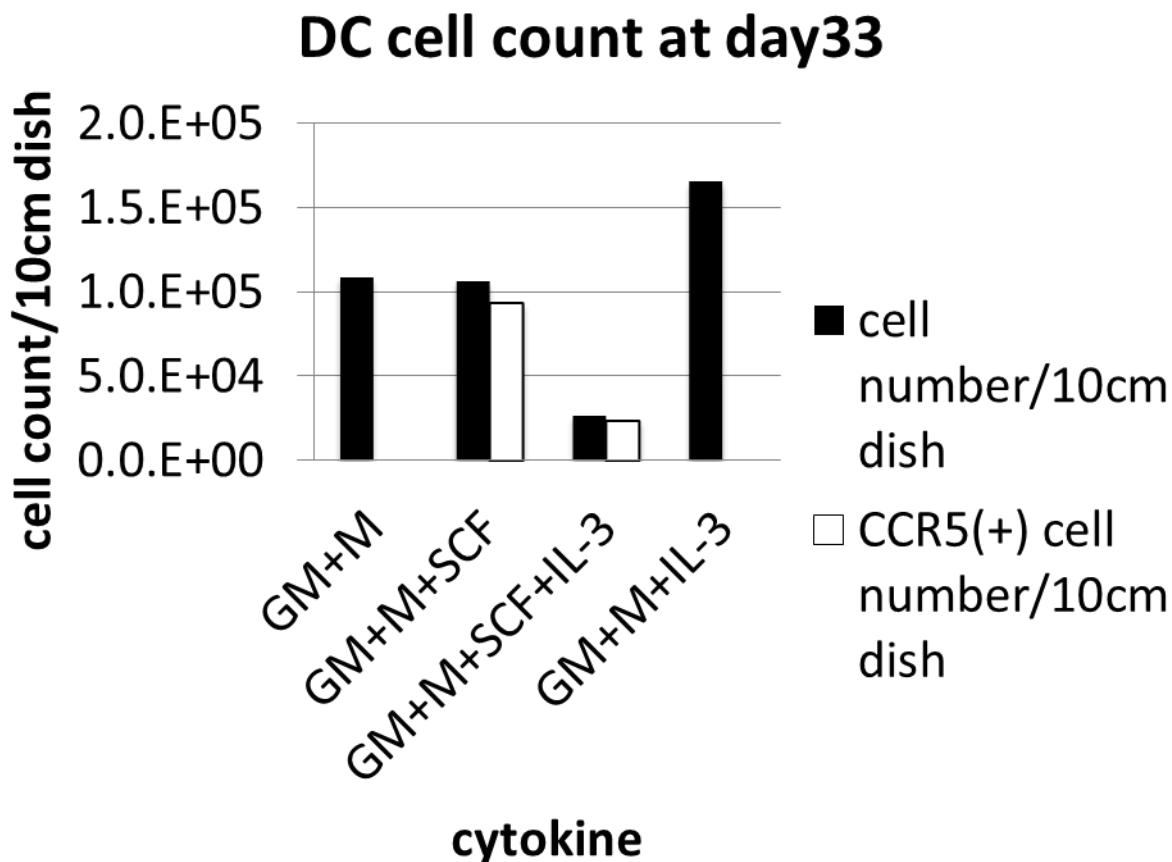
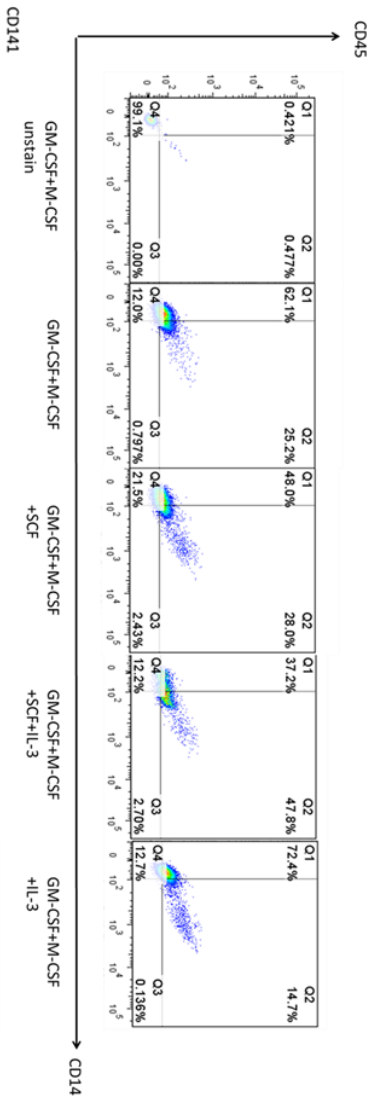


図3-3. IL-3, SCFの追加による収量の検討

各サイトカイン条件下でのiPS-DCの細胞数(分化開始から33日目) feeder freeとしてのステップ (図 2-2. Step3の24日目以降)において、既報の GM-CSF, M-CSFにSCF, IL-3の追加を行い、分化開始から33日目における樹状細胞数を数えた。細胞数を標準化するために、図 2-2. Step2でCD34+もしくはCD43+の造血前駆細胞への分化の際に使用する10cm dishを基準に、その1枚当たりの細胞数で示している。更に図3-4. の解析で得られたCCR5の陽性率を使用し、同じ10cm dish 1枚当たりのCCR5発現細胞数 (樹状細胞) を算出した。これにより、HIV-1感染に必要なCCR5を発現しているiPS-DCの細胞数の観点から、SCFを追加した場合、収量がよいことが示唆された。このため以降の分化実験においては、GM-CSF, M-CSF, SCFのサイトカインを使用することとした。iPS-macrophageについてはCCR5の発現に影響を与えなかった。(n=1, singleにて実施。)

A.



B.

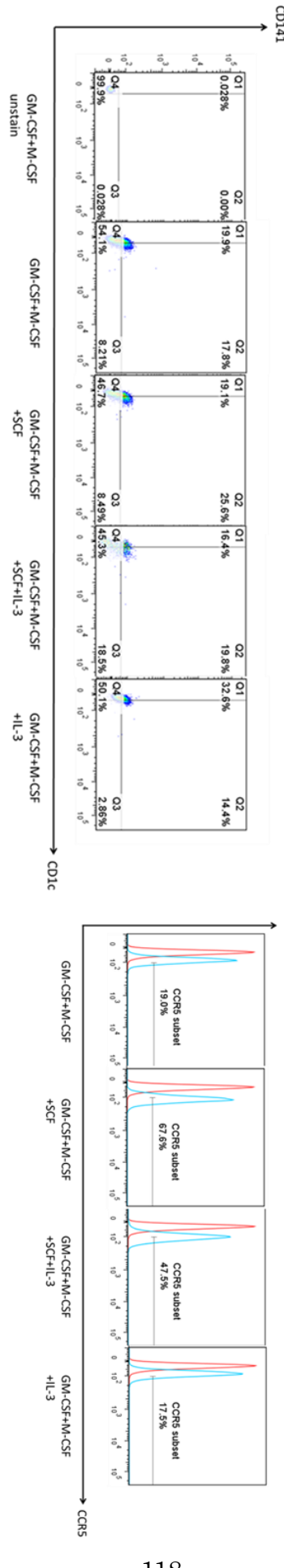


図3-4. IL-3, SCFの追加によるHLA-DRとCCR5発現の検討

iPS-DClについて分化開始から33日目以降にフローサイトメーターにて解析を行った。

A. PlIにて死細胞除去後、CD45、CD14で展開し、CD45+CD14-の細胞集団に対して、CD141とCD1cにて展開した。

B. AIにおいてCD141+CD1c陽性の樹状細胞について、HLA-DRについては各サイトカイン条件で発現量は99%以上であったが、CCR5についてはSCFを加えた条件の方において発現量が多い傾向が認められた。

縦軸はcell countを示す。

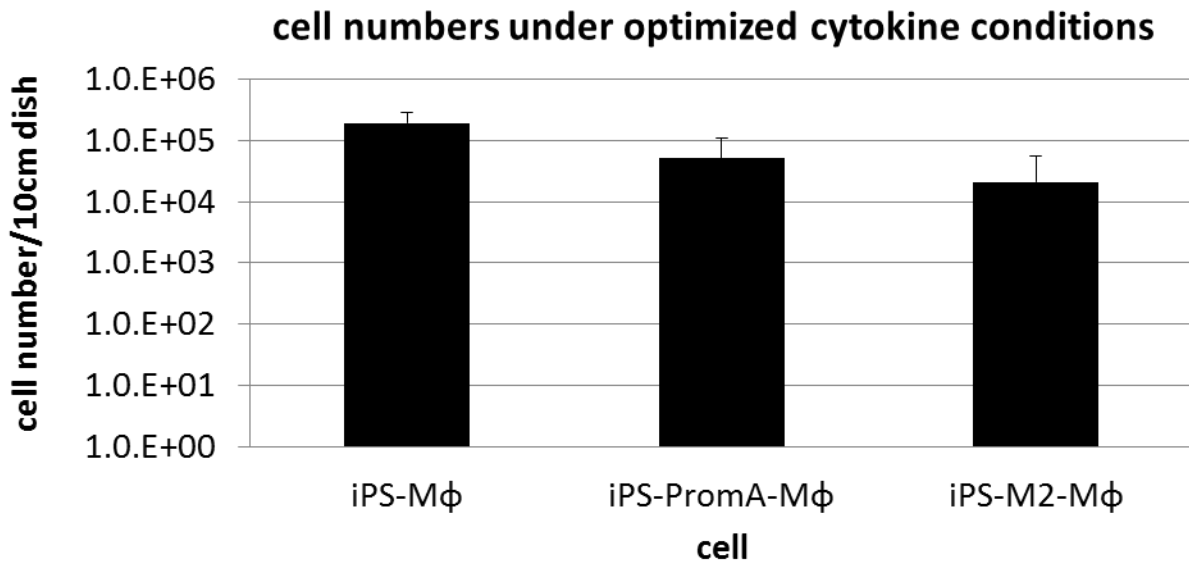


図3-5. サイトカイン最適後のiPS-macrophageの細胞数

サイトカイン最適化後のiPS-macrophageの細胞数(分化開始から33日目から35日目) feeder freeとしてからのステップ (図 2-2. Step3の24日目以降)において、GM-CSF, M-CSF, SCFを用いて分化させて得られたiPS-macrophageの細胞数。Step2で用いる10cm dish 1枚あたりの細胞数で示している。

(合計7回の分化実験で、計95枚の10cm dishを使用。各分化実験で最終的に得られたマクロファージの細胞数を10cm dishあたりで標準化し、標準化した後は分化実験ごとに区別はせず統計処理した。)

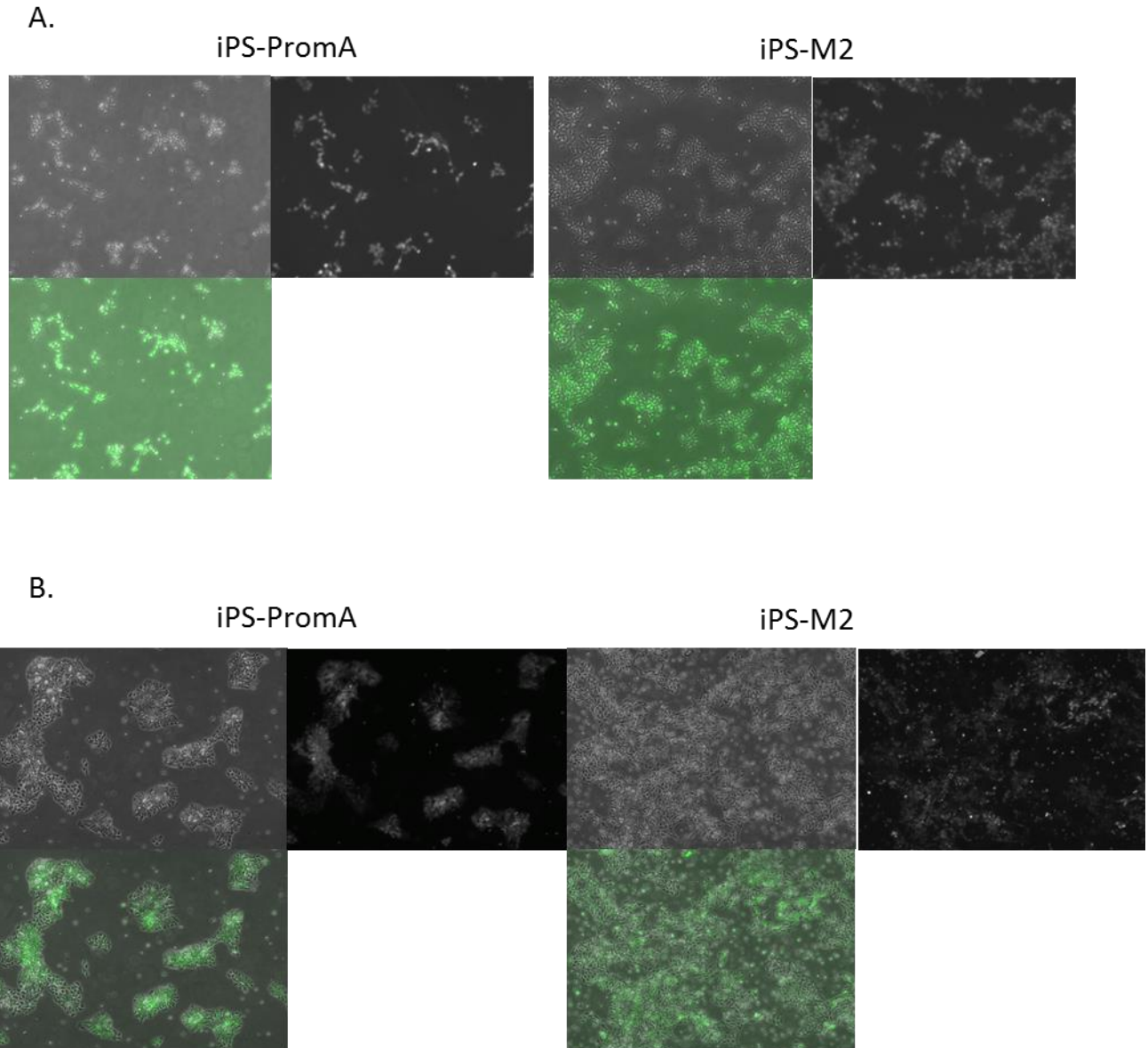
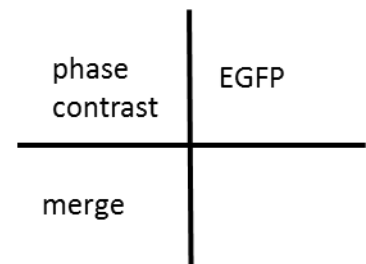


図3-6. 遺伝子導入前と導入後3日目、5日目の蛍光顕微鏡観察

A. 遺伝子導入後3日目の蛍光顕微鏡観察(マトリゲル上)
 B. 遺伝子導入後5日目の蛍光顕微鏡観察(マトリゲル上)
 (x50位相差、EGFP蛍光、mergeの順で表示している)



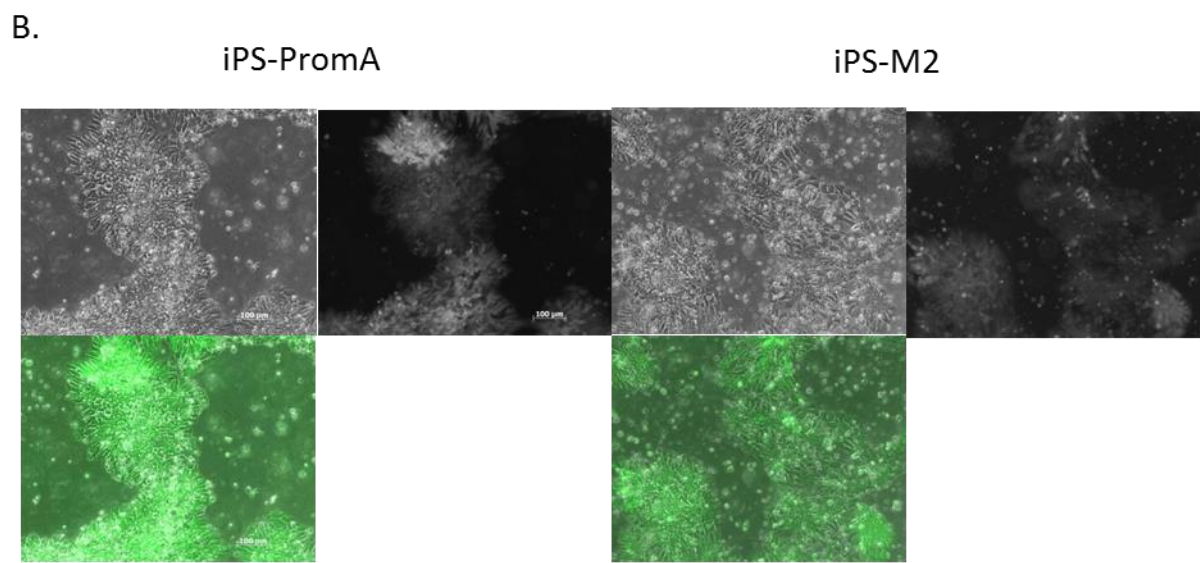
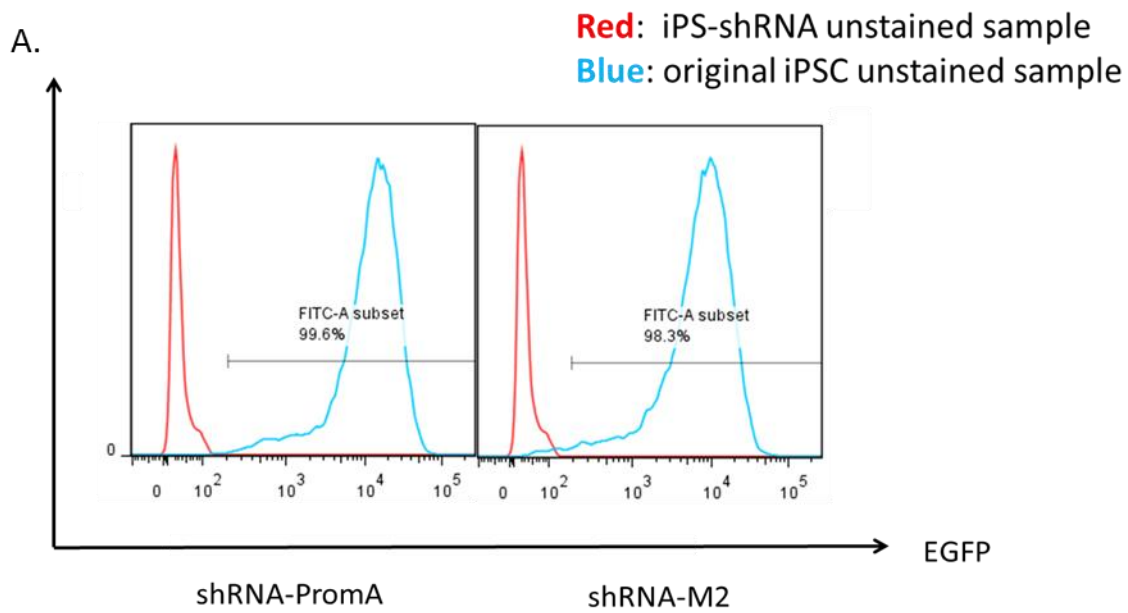


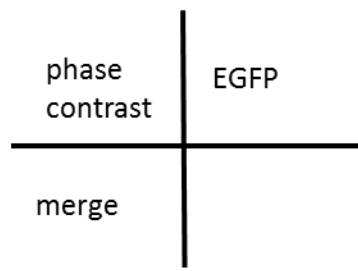
図3-7. 遺伝子導入後8日目のフローサイトメーターと蛍光顕微鏡写真

A. フローサイトメーター

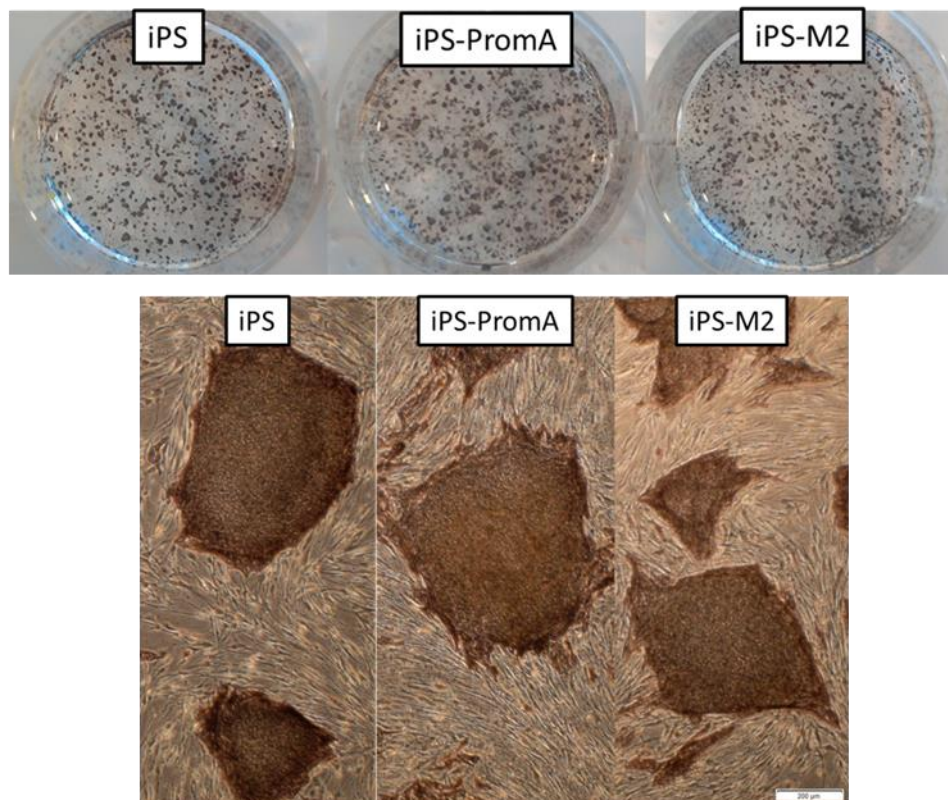
青のヒストグラムはshRNA導入前のoriginal iPS細胞を示し、赤のヒストグラムはshRNAとEGFPを導入したiPS-shRNA細胞のEGFP蛍光を示す。

B. 蛍光顕微鏡観察

(x200位相差、EGFP蛍光、mergeの順で表示している)
EGFPの発現に強弱があるが、以降の実験はこのoligo-clonalな細胞集団で行った。



A.



B.

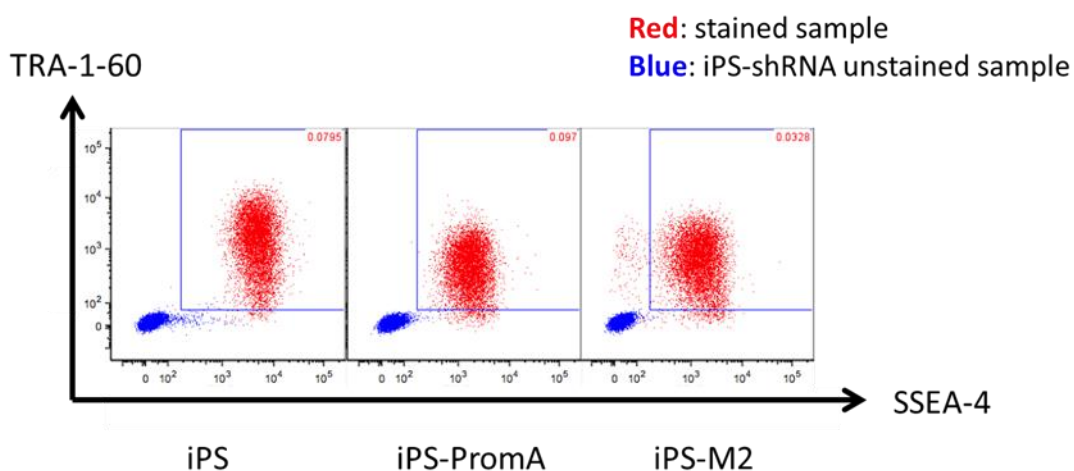


図3-8. 遺伝子導入したiPS細胞の未分化性の検証

A. アルカリホスファターゼ染色

上段: iPS細胞中の6cm dishを撮影したもの、下段: 位相差顕微鏡で上段の細胞を観察し撮影したもの。

肉眼的観察及び顕微鏡観察において、各shRNAの導入前後で未分化性を示すアルカリホスファターゼ染色に差を認めない。

B. 未分化マーカーのフローサイトメーター解析

マトリゲル上で培養した各iPS細胞を、TRA-1-60/APC, SSEA-4/PE抗体で染色し、フローサイトメーター解析を行った。shRNAを導入したiPS細胞においても、TRA1-60、SSEA-4ともに陽性を示している。

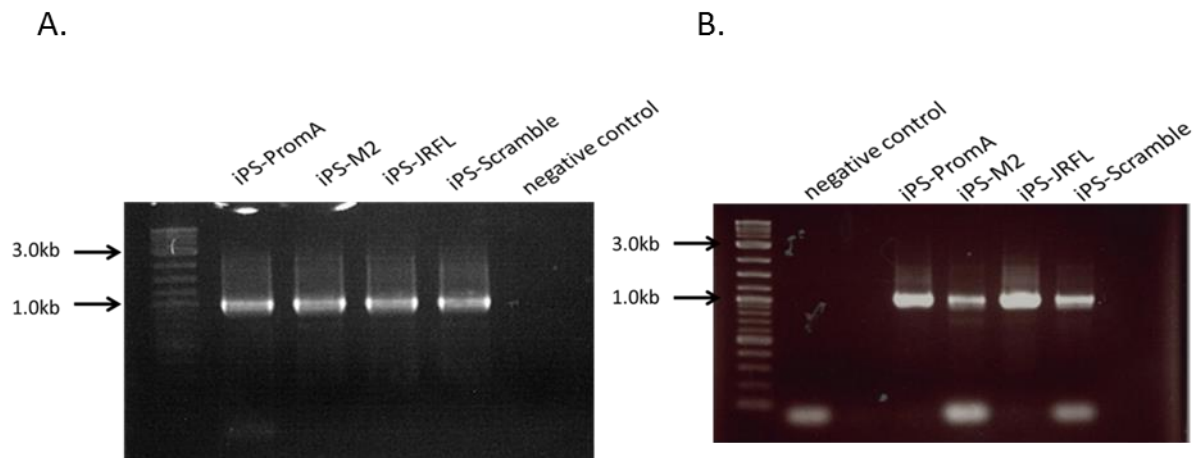


図3-9. iPS-shRNA細胞およびPS-shRNA-macrophageでの挿入遺伝子の確認

A. shRNAを遺伝子導入したiPS細胞 (DNA) のshRNA挿入部位に関するPCR産物の電気泳動

左側から、ラダー(図2-3を使用)、iPS-PromA, iPS-M2, iPS-JRFL(JRFL strainに指向性を持つHIV-1のLTR中のNF- κ B結合領域に相補的な配列のsiRNA-JRFLを遺伝子導入したiPS細胞)、iPS-Scramble(siRNA-PromAと同じ塩基をランダムに配列したHIV-1産生抑制効果に対してnegative control用のsiRNA-Scrambleを遺伝子導入したiPS細胞)、negative control(DNA抜き)を示す。shRNAを遺伝子導入したiPS細胞では、900bp付近にPCR産物のバンドが確認できる。

B. shRNAを遺伝子導入したiPS細胞から分化したマクロファージ (DNA) のPCR電気泳動

左側から、ラダー(図2-3を使用)、negative control(DNA抜き)(1レーン空けて)、iPS-PromA, iPS-M2, iPS-JRFL, iPS-Scrambleを示す。shRNAを遺伝子導入したiPS細胞から分化させたマクロファージでは900bp付近にPCR産物のバンドが確認できる。

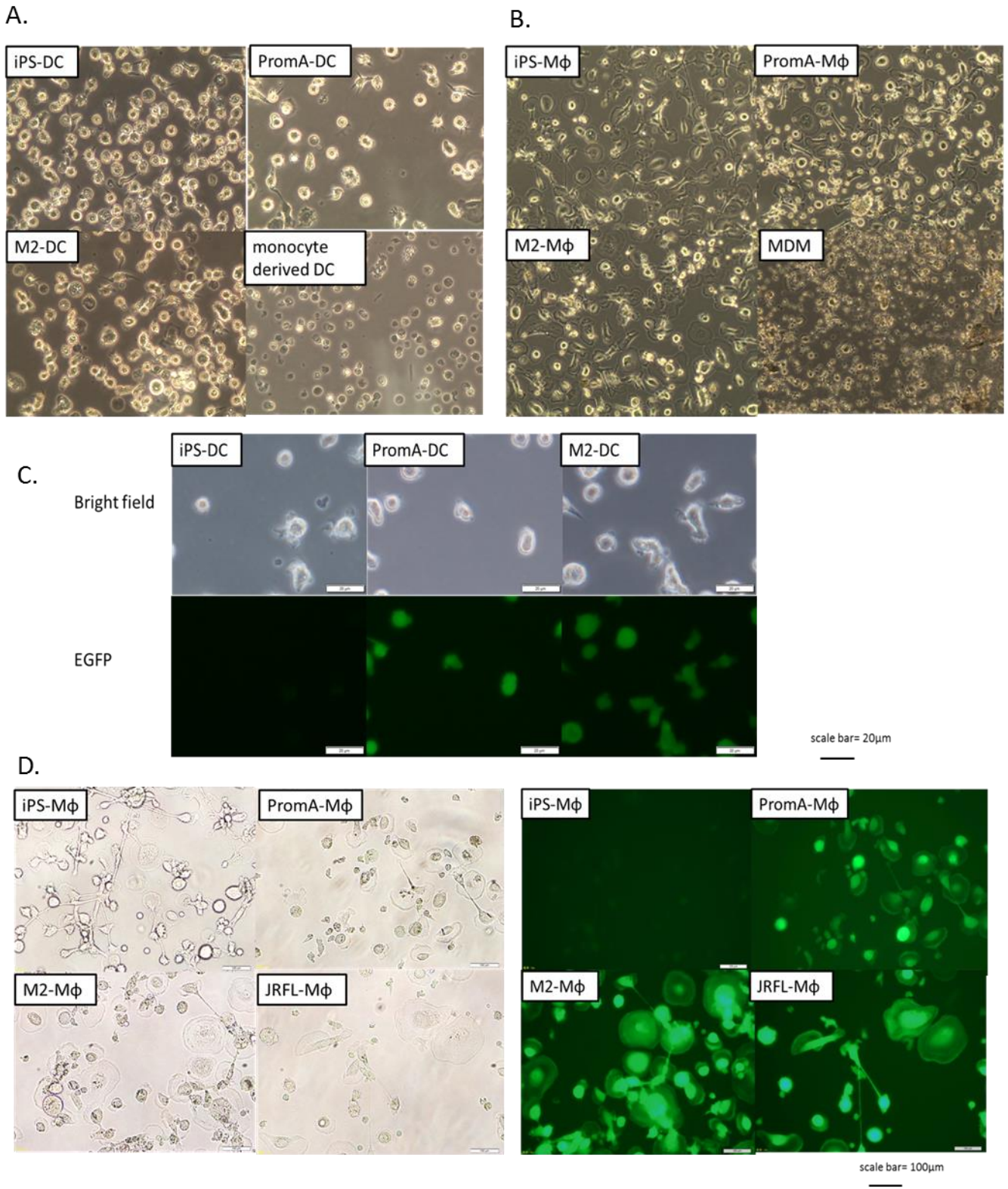
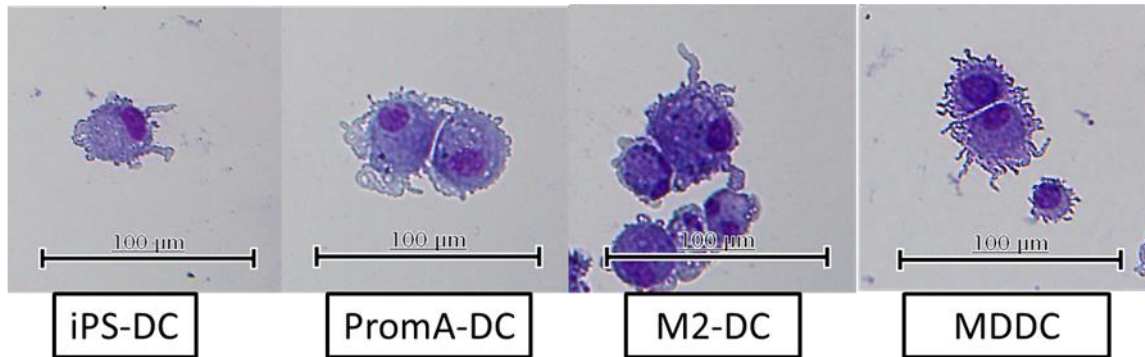


図3-10. iPS-macrophage及びiPS-DCの顕微鏡による形態観察と蛍光観察

- A. iPS-DC(x200)とMDDCの位相差顕微鏡による形態観察
 - B. iPS-macrophage(x100)とMDMの位相差顕微鏡による形態観察
 - C. iPS-DCの蛍光顕微鏡による観察 上: 明視野、下: EGFP蛍光
 - D. iPS-macrophageの蛍光顕微鏡による観察 左: 明視野、右: EGFP蛍光
- これらの結果から、shRNAを導入したiPS細胞から分化させた樹状細胞、マクロファージにおいては、マーカーであるEGFPが確認された。

A.



B.

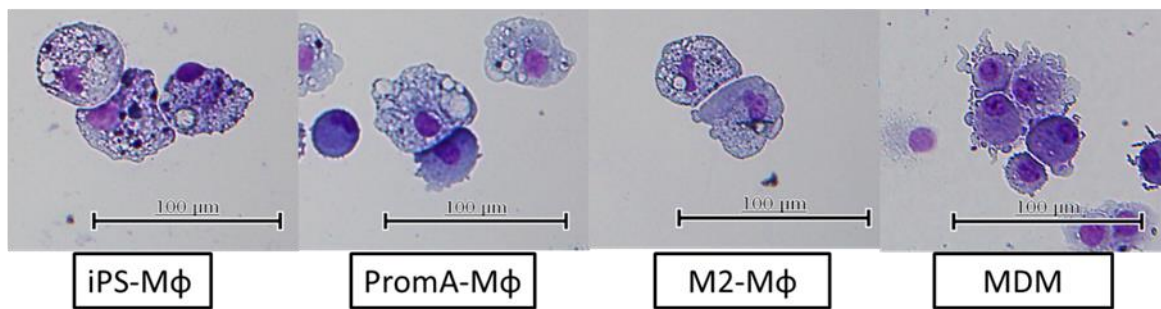


図3-11. iPS-DC, iPS-macrophageのサイトスピンによる形態観察

A. iPS-DCのサイトスピンによる形態観察

樹状細胞に特徴的な細胞質の突起を示す細胞が認められた。

B. iPS-macrophageのサイトスピンによる形態観察

マクロファージに特徴的な広い細胞質を有し、細胞質には空胞が認められた。

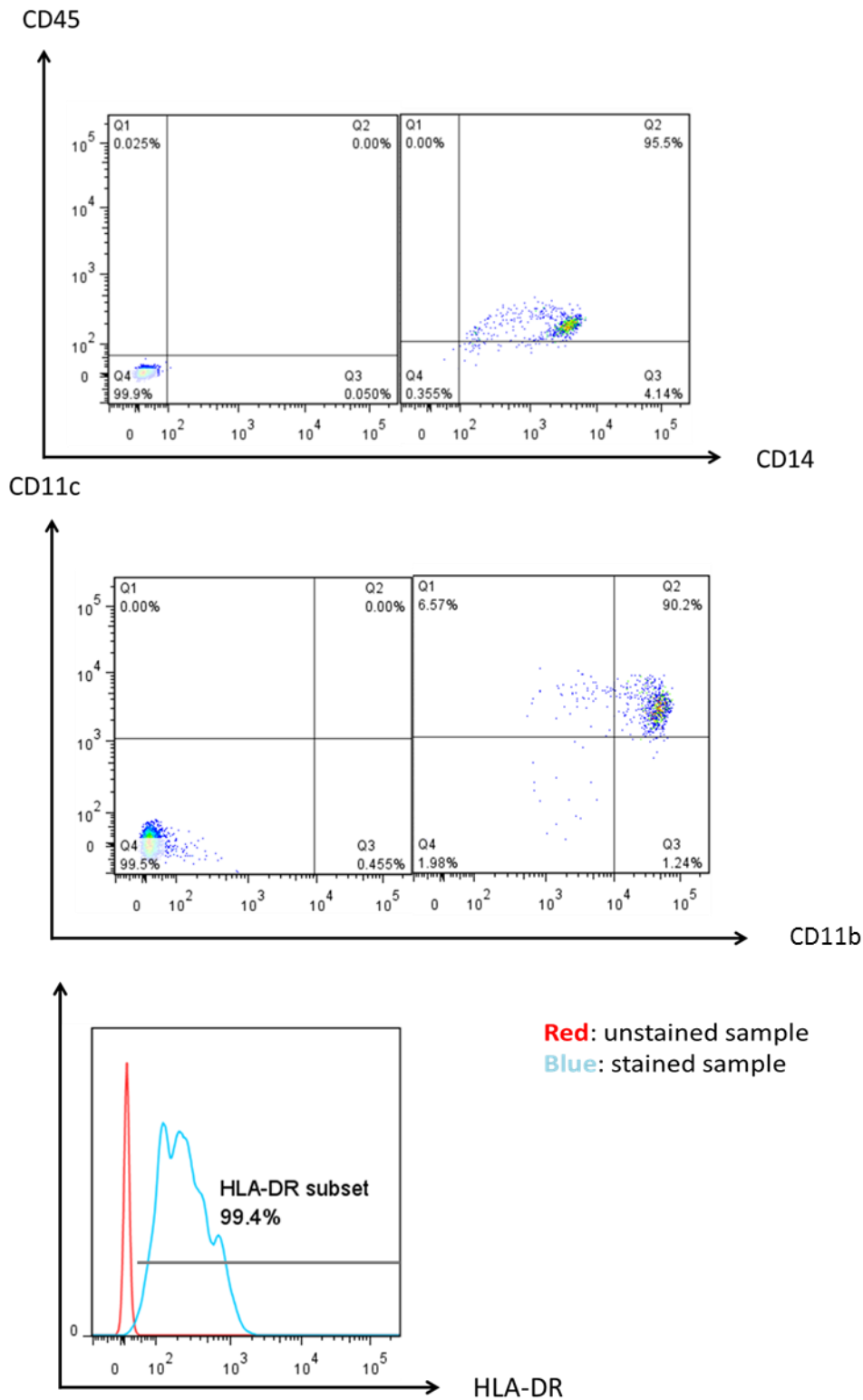


図3-12. MDMにおける表面マーカーの解析

赤のヒストグラムが各細胞のunstainサンプルを示し、青のヒストグラムが各細胞のstainサンプルを示す。分化開始から8日目に解析している。ヒストグラムでは縦軸はcell countを示す。

PIにて死細胞除去後、CD45+CD14+でgatingし、更にCD11c+CD11b+でgatingした。この集団をHLA-DRに関してヒストグラムで示した。

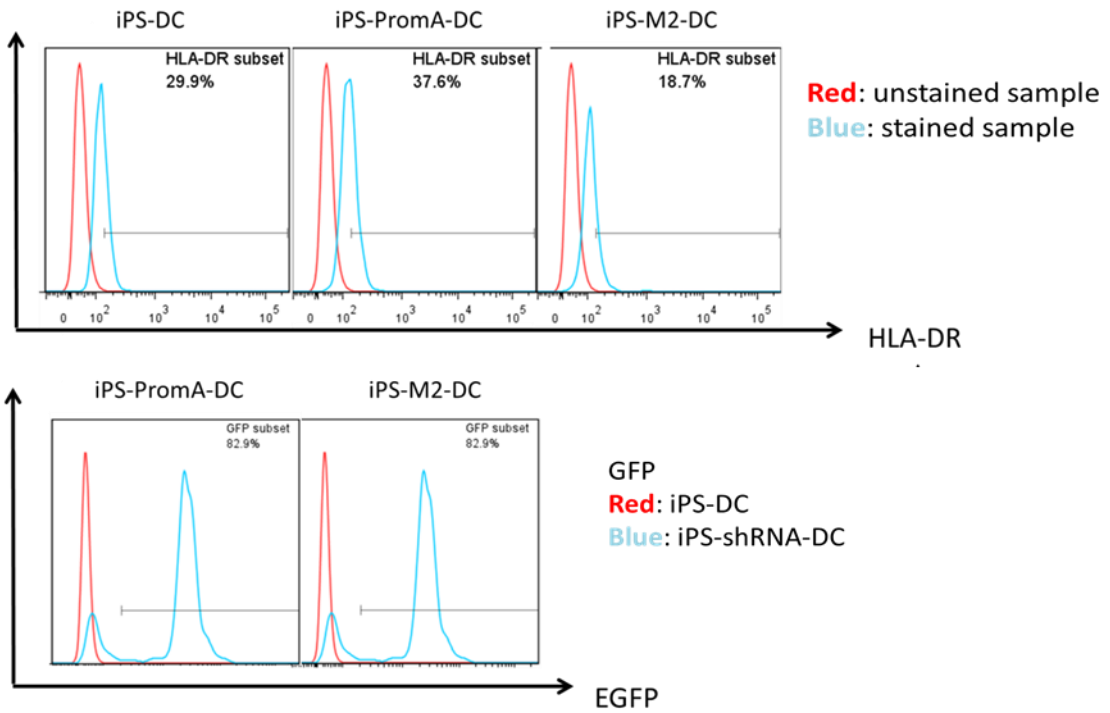
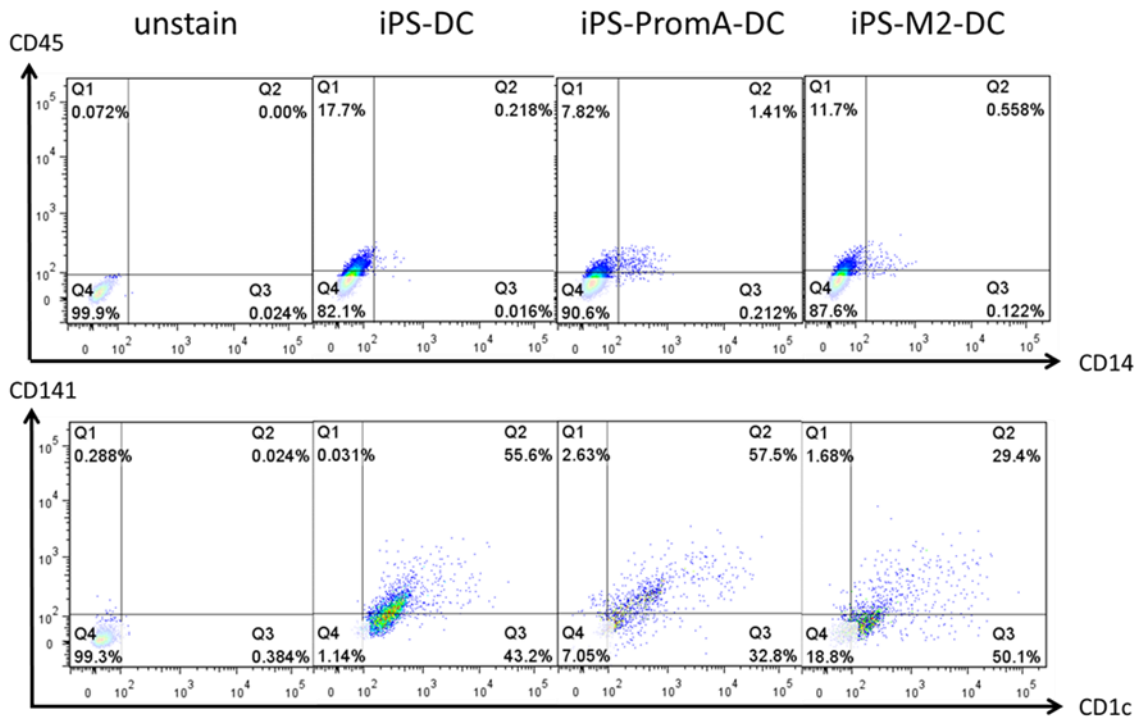


図3-13. iPS-DCにおける表面マーカーの解析

赤のヒストグラムが各細胞のunstainサンプルを示し、青のヒストグラムが各細胞のstainサンプルを示す。分化開始から32日目に解析している。ヒストグラムでは縦軸はcell countを示す。

PIIにて死細胞除去後、CD45+CD14-でgatingし、更にCD141+CD1c+でgatingした。この集団をHLA-DR, EGFPに関してヒストグラムで示した。iPS-DC及び、iPS-shRNA-DCにおいてHLA-DRの発現は同程度であり、iPS-shRNA-DCにおいてEGFPは80%以上の陽性率を維持している。

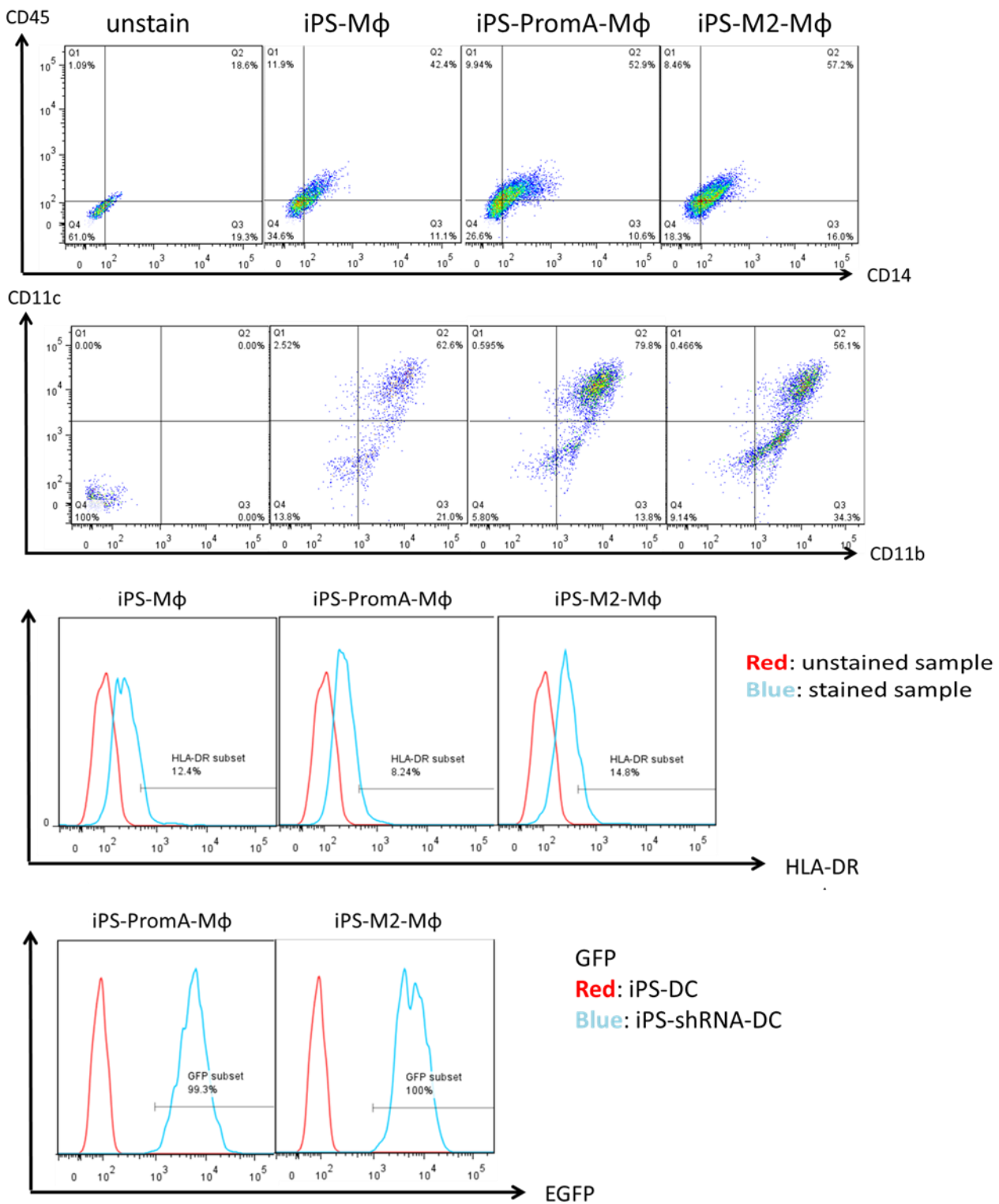


図3-14. iPS-macrophageにおける表面マーカーの解析

赤のヒストグラムが各細胞のunstainサンプルを示し、青のヒストグラムが各細胞のstainサンプルを示す。分化開始から32日目に解析している。ヒストグラムでは縦軸はcell countを示す。

PIIにて死細胞除去後、CD45+CD14+でgatingし、更にCD11c+CD11b+でgatingした。この集団をHLA-DR, EGFPに関してヒストグラムで示した。iPS-macrophage及び、iPS-shRNA-macrophageにおいてHLA-DRの発現は同程度であり、iPS-shRNA-macrophageにおいてEGFPは100%の陽性率を維持している。

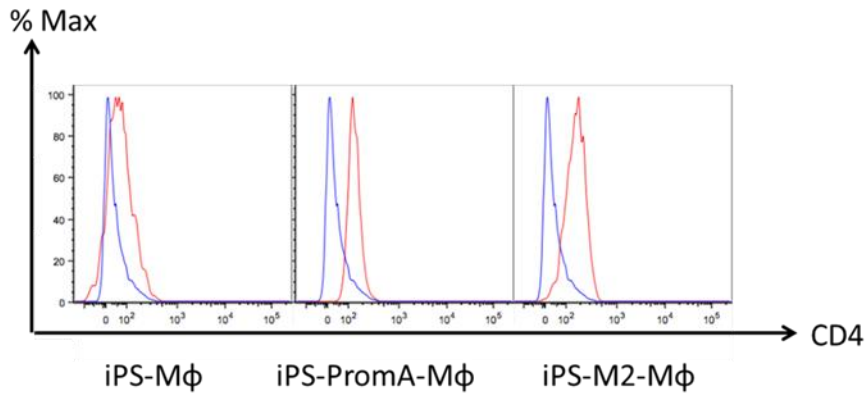


図3-15. iPS-macrophageにおけるCD4の解析

CD4の発現はiPS-PromA-macrophageとiPS-M2-macrophageとの比較で大きな差を認めない。

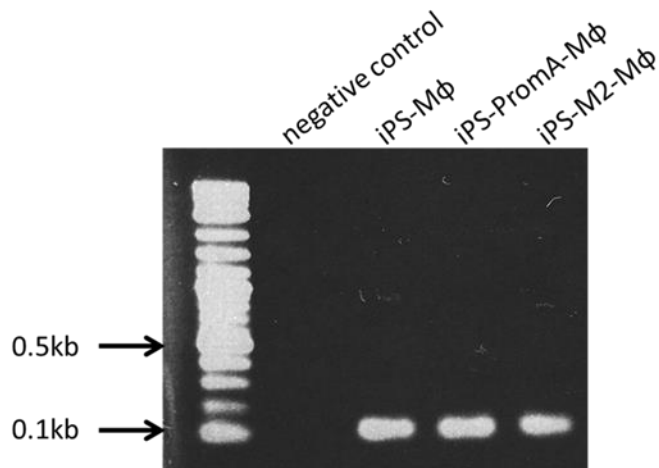
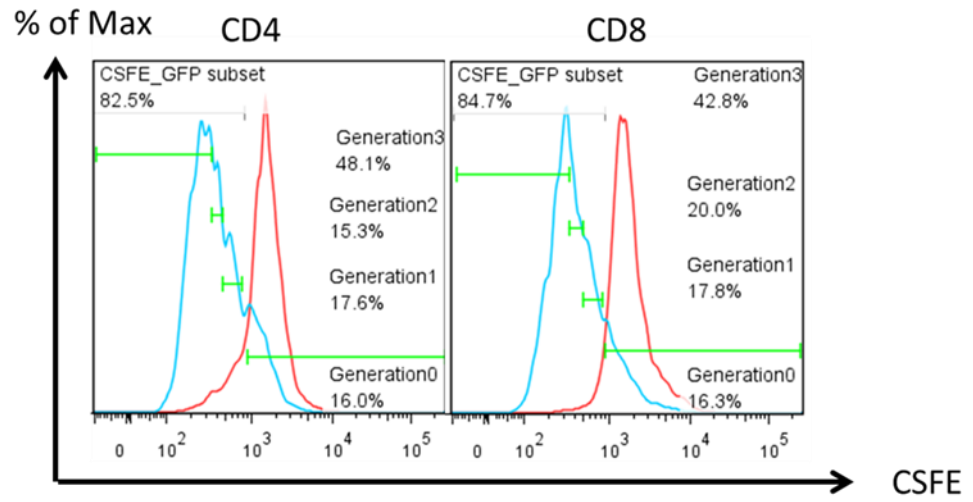


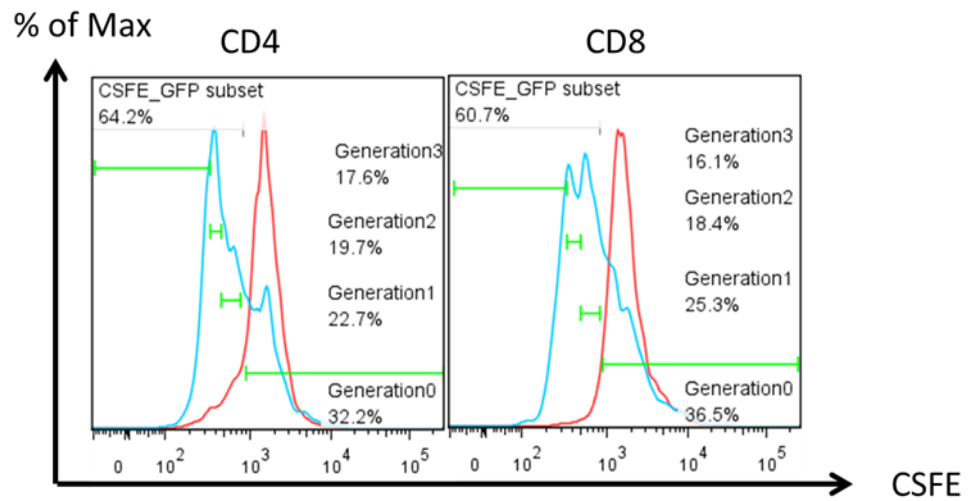
図3-16. iPS-macrophageのCCR5発現についてのPCR産物の電気泳動

フローサイトメーター解析においては自家蛍光などの影響も考えられる為、CCR5の発現についてPCRにおいても確認を行い、114bp付近にPCR産物のバンドを認めた。

A. iPS-DC



B. iPS-PromA-DC



C. iPS-M2-DC

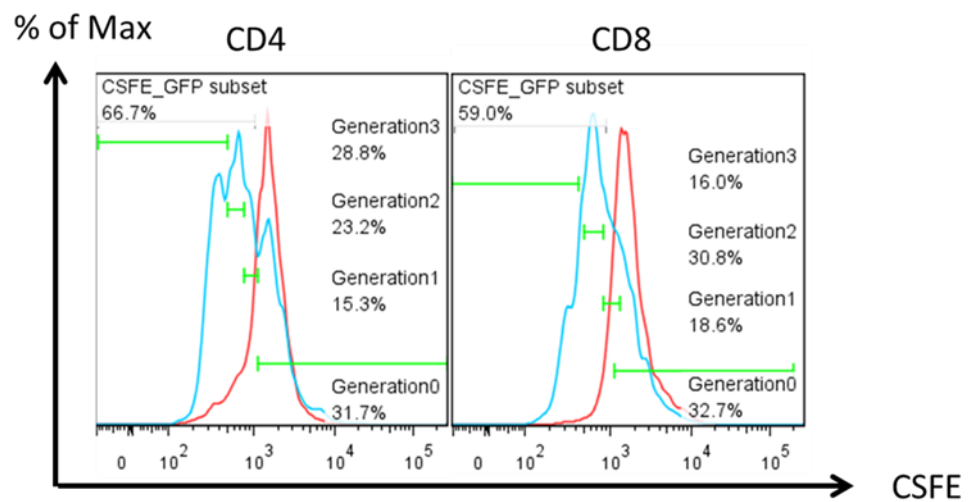


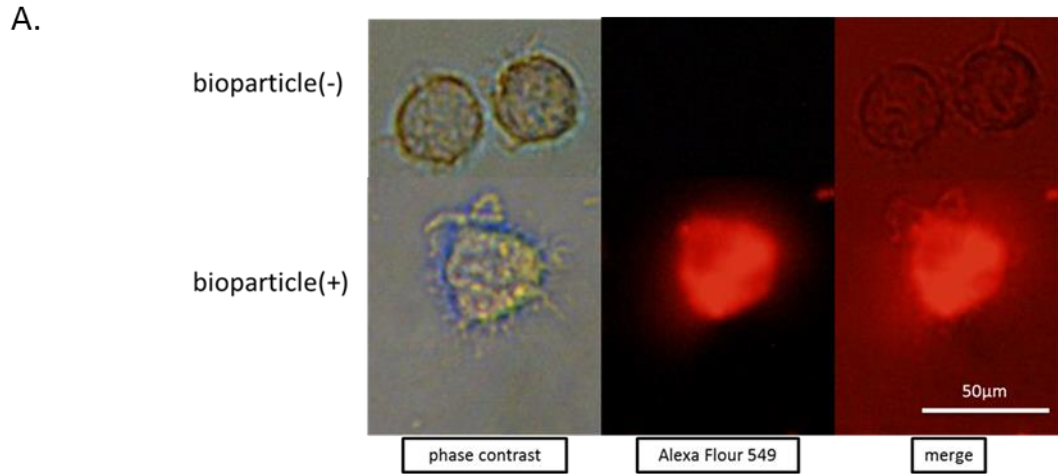
図3-17. iPS-DCによるCD3+ T細胞活性化(CSFE staining)

A. iPS-DCによるCD3 T細胞の活性化

B. iPS-PromA-DCによるCD3 T細胞の活性化

C. iPS-M2-DCによるCD3 T細胞の活性化

PBMCから得られたCD3陽性T細胞と、iPS細胞から分化させた樹状細胞を共培養し、3日目にフローサイトメーターでCSFEの解析を行いヒストグラムに示した。いずれのiPS-DCにおいても同程度にT細胞を活性化することが確認できた。左：CD4 T cell, 右：CD8 T cell



B.

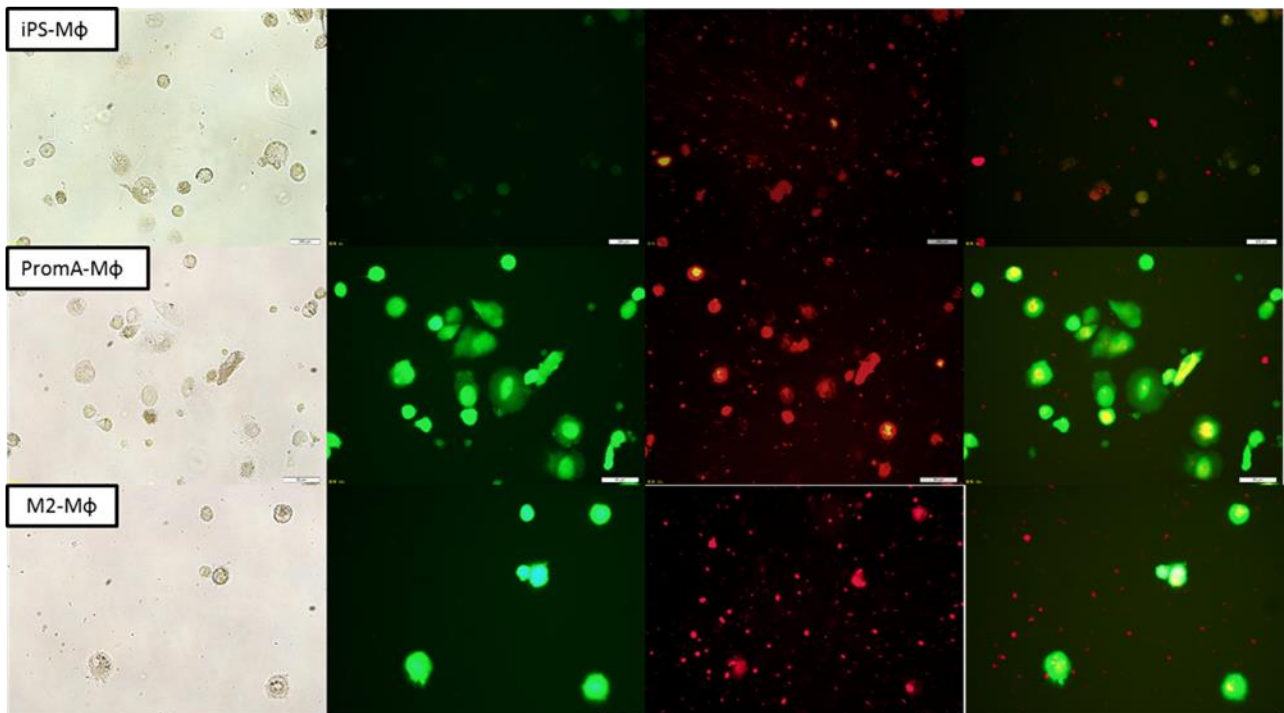


図3-18. iPS-shRNA-macrophageによるbioparticleの貪食

A. MDMにおける貪食能の確認

左側より、明視野、Alexa Flour549(bioparticle)蛍光、merge。bioparticleを貪食して赤く発色するMDMが認められた。

B. iPS-Mφにおける貪食能の確認

各段左側より、明視野、EGFP蛍光、Alexa Flour 549(bioparticle)蛍光、merge。shRNAを導入したiPS-Mφはbioparticleを貪食し、黄色に示していた。

表3-1. RNA sequencingで検出された総遺伝子数

Sample Name	number of Detected Gene
iPS-macrophage	18082
iPS-PromA-macrophage	17862
iPS-M2-macrophage	18125
MDM	16171

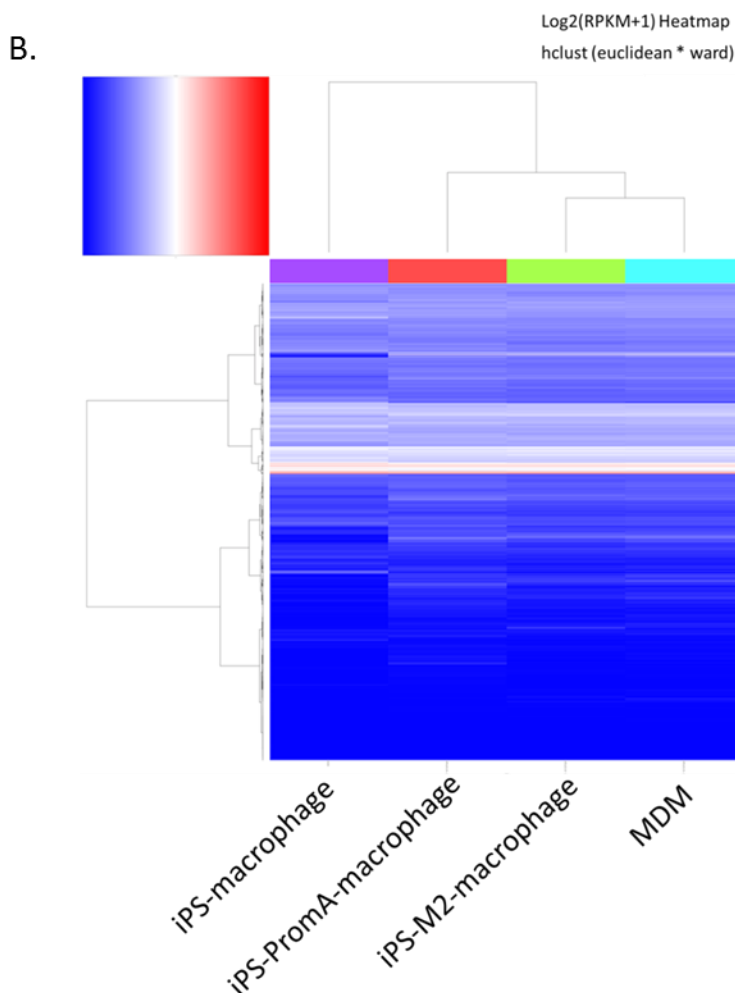
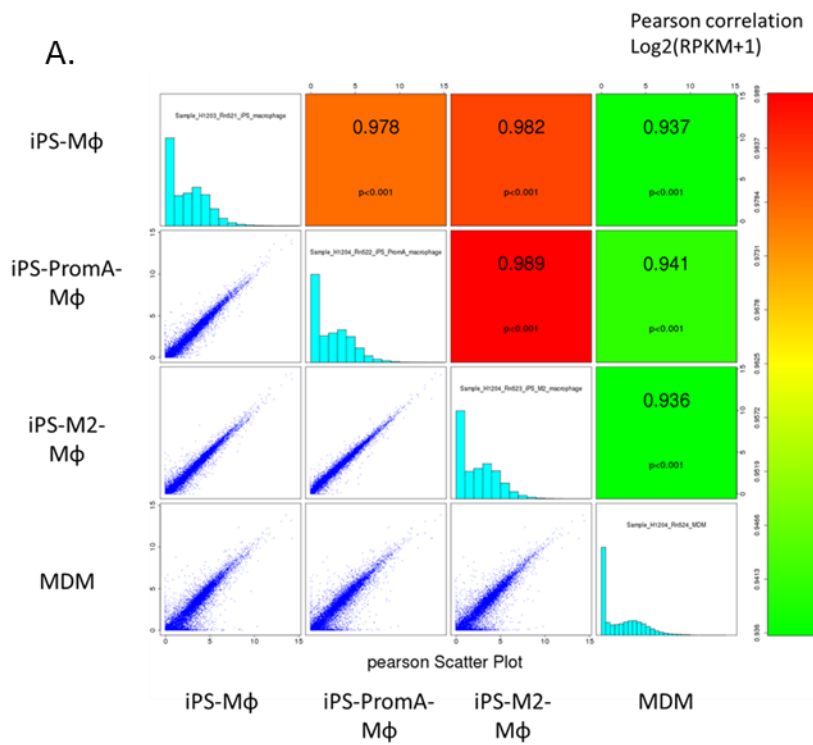


図3-19. RNA sequencingによるiPS-macrophage及びMDMの解析

A. Pearson Correlation Matrix

B. 発現遺伝子のヒートマップ

各細胞で発現している遺伝子に関して、青から赤になるにつれ発現量が多いことを示す。

表3-2. MDMとiPS-macrophageの発現遺伝子でFC 2倍以上の遺伝子数

FC>=2	total	MDM < iPS-macrophage	MDM > iPS-macrophage
	2680	2160	520

表3-3. FC 2倍以上の遺伝子についてのGO解析

gene expression; iPS-macrophage<MDM (FC>2)	
GO accession number~GO term	p-value
GO:0019882~antigen processing and presentation	1.73E-12
hsa05322:Systemic lupus erythematosus	6.99E-11
GO:0002504~antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	1.08E-09
GO:0006952~defense response	4.38E-09
hsa04612:Antigen processing and presentation	7.32E-08

gene expression; iPS-macrophage>MDM (FC>2)	
GO accession number~GO term	p-value
GO:0007155~cell adhesion	9.30E-22
GO:0022610~biological adhesion	9.90E-22
hsa04512:ECM-receptor interaction	2.11E-12
GO:0043062~extracellular structure organization	4.69E-12
GO:0001501~skeletal system development	1.36E-11

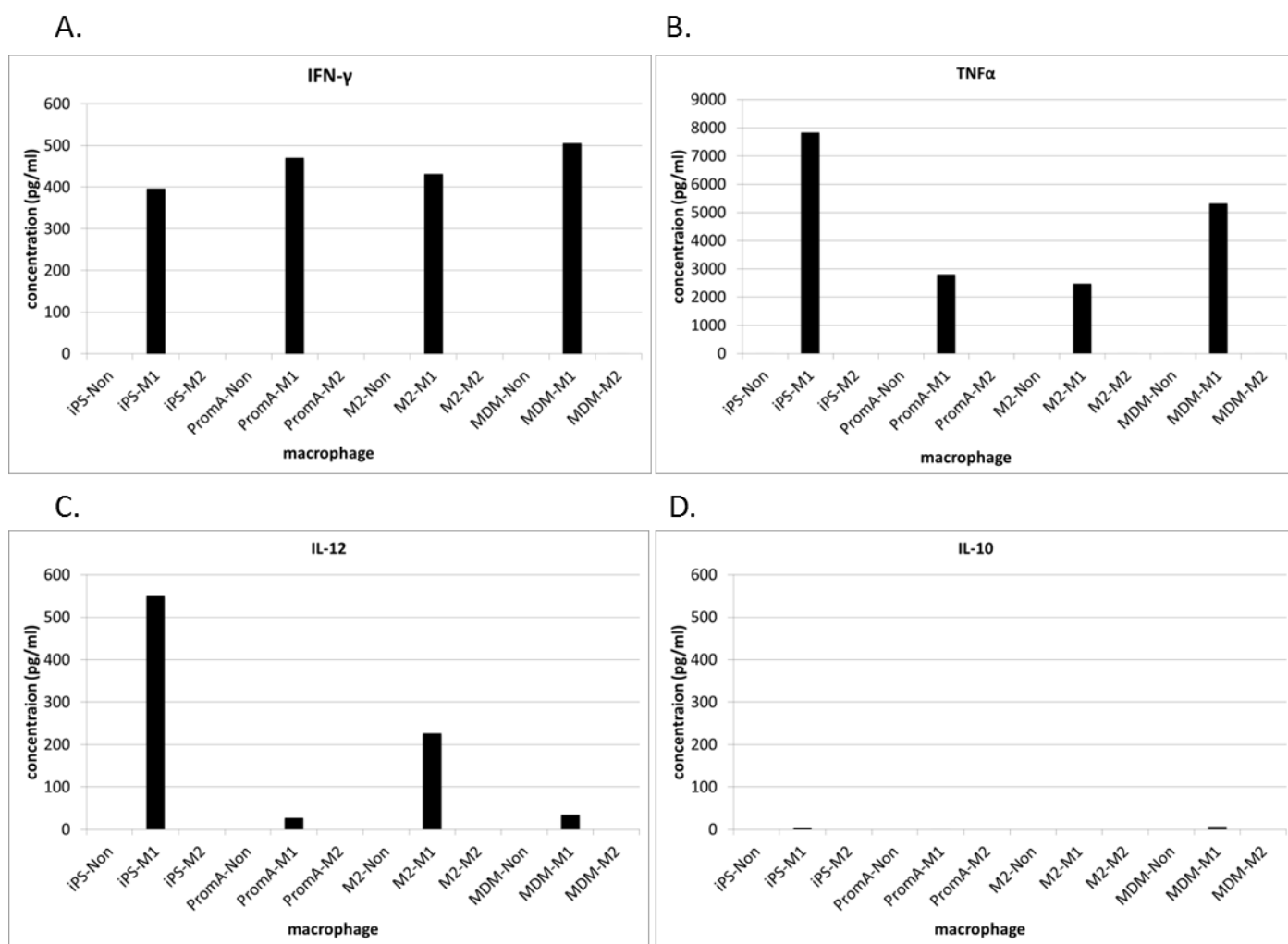


図3-20. iPS-macrophageのサイトカインアッセイ

iPS-Non: iPS-macrophageの1.刺激なし群、iPS-M1: iPS-macrophageの2. M1刺激群、iPS-M2: iPS-macrophageの3. M2刺激群、PromA-Non: iPS-PromA-macrophageの1.刺激なし群、PromA-M1: iPS-macrophageの2. M1刺激群、PromA-M2: iPS-macrophageの3. M2刺激群、M2-Non: iPS-M2-macrophageの1.刺激なし群、M2-M1: iPS-M2-macrophageの2. M1刺激群、M2-M2: iPS-M2-macrophageの3. M2刺激群、MDM-Non: MDMの1.刺激なし群、MDM-M1: MDMの2. M1刺激群、MDM-M2: MDMの3. M2刺激群を示す。

分化開始35日目のiPS-macrophage, iPS-shRNA-macrophage及びMDMを96 well plateに、 5×10^3 cell/well播種し、1.刺激なし、2.100 ng/ml LPS+20 ng/ml IFN- γ (M1刺激)、3. 20 ng/ml IL-4 (M2刺激)を加えて培養した。24時間後上清を回収し、マクロファージが産生したIFN- γ 、TNF α 、IL-12(M1マクロファージ)、IL-10(M2マクロファージ)の濃度を測定した。特にM1マクロファージより産生されるIFN- γ 、TNF α 、IL-12がiPS-macrophage, iPS-shRNA-macrophageのM1刺激群で分泌されており、MDMと同じ傾向を示していた。M2マクロファージより産生されるIL-10についてはMDM含め、iPS-macrophage, iPS-PromA-macrophageにおいて分泌は認めなかった。(n=1, singleにて実施。)

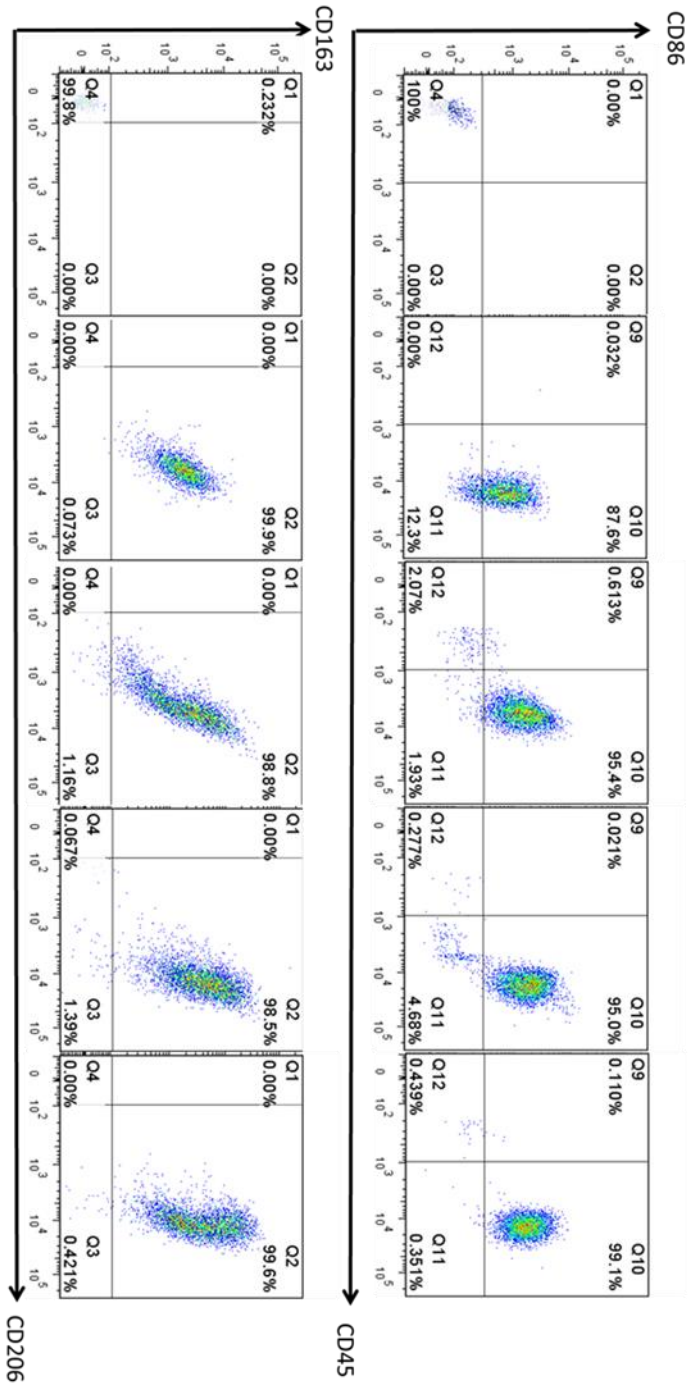


図3-21. iPS-macrophageのphenotype解析

フローサイトメーターによる表面マーカーの解析

PIにて死細胞除去後、CD68とCD45で展開し、CD45+CD68+ double positive細胞についてCD163とCD206、CD86とCD206について展開したものと、EGFP陽性率を示したものである。

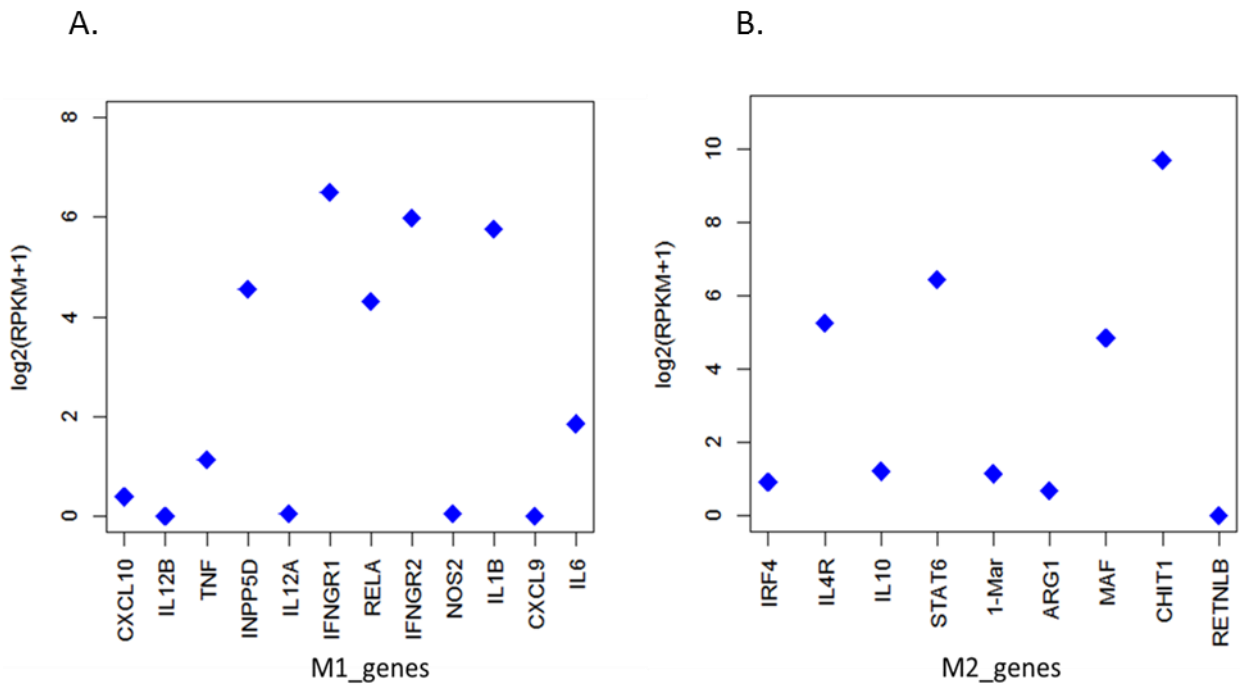
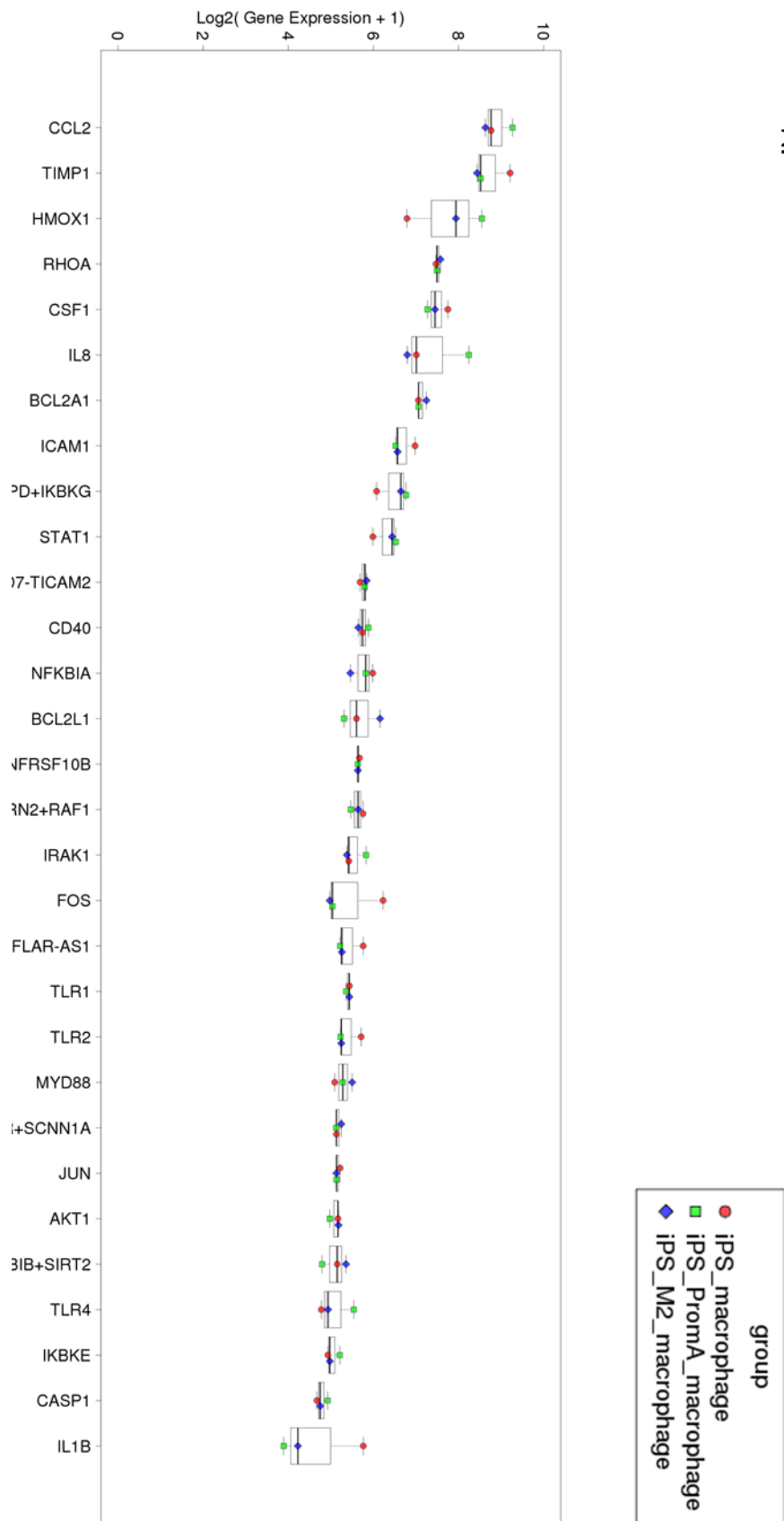


図3-22. iPS-macrophageのphenotype解析

A. M1_genes: M1マクロファージ関連遺伝子

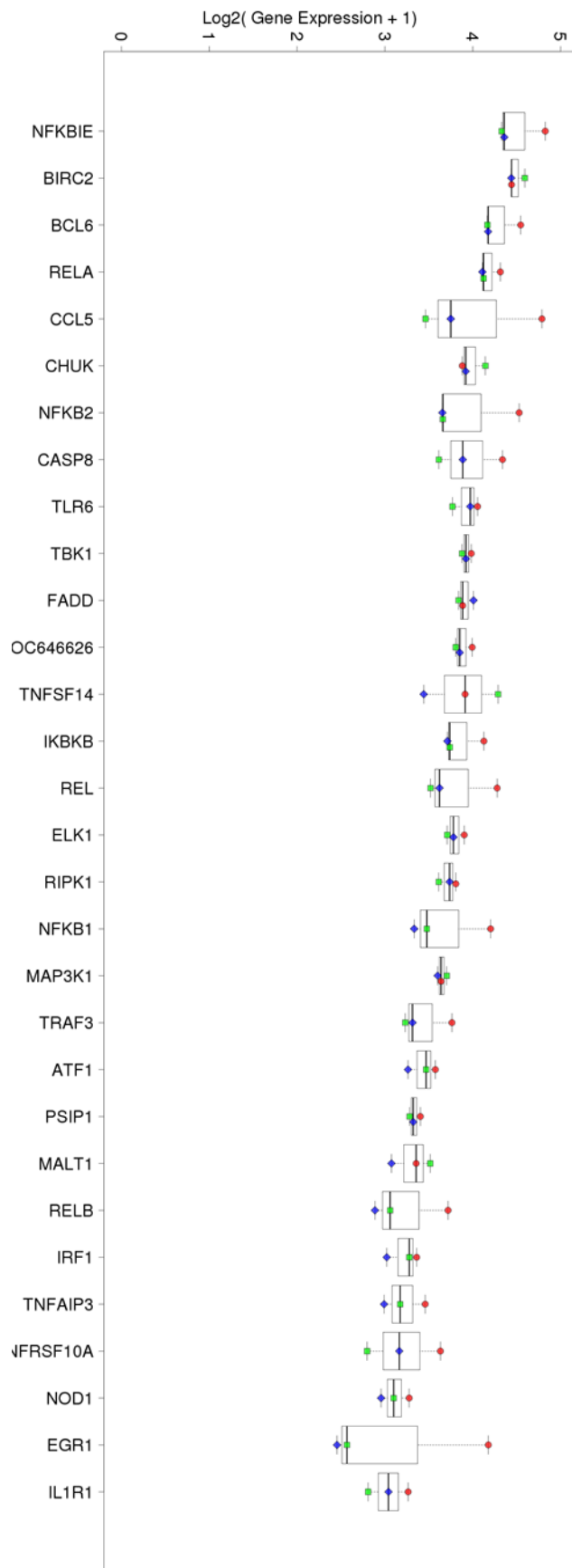
B. M2_genes: M2マクロファージ関連遺伝子

上記A-B. より、phenotype関連遺伝子に関して、その発現に一方のphenotypeへの偏りは認められなかった。



A.

B.



C.

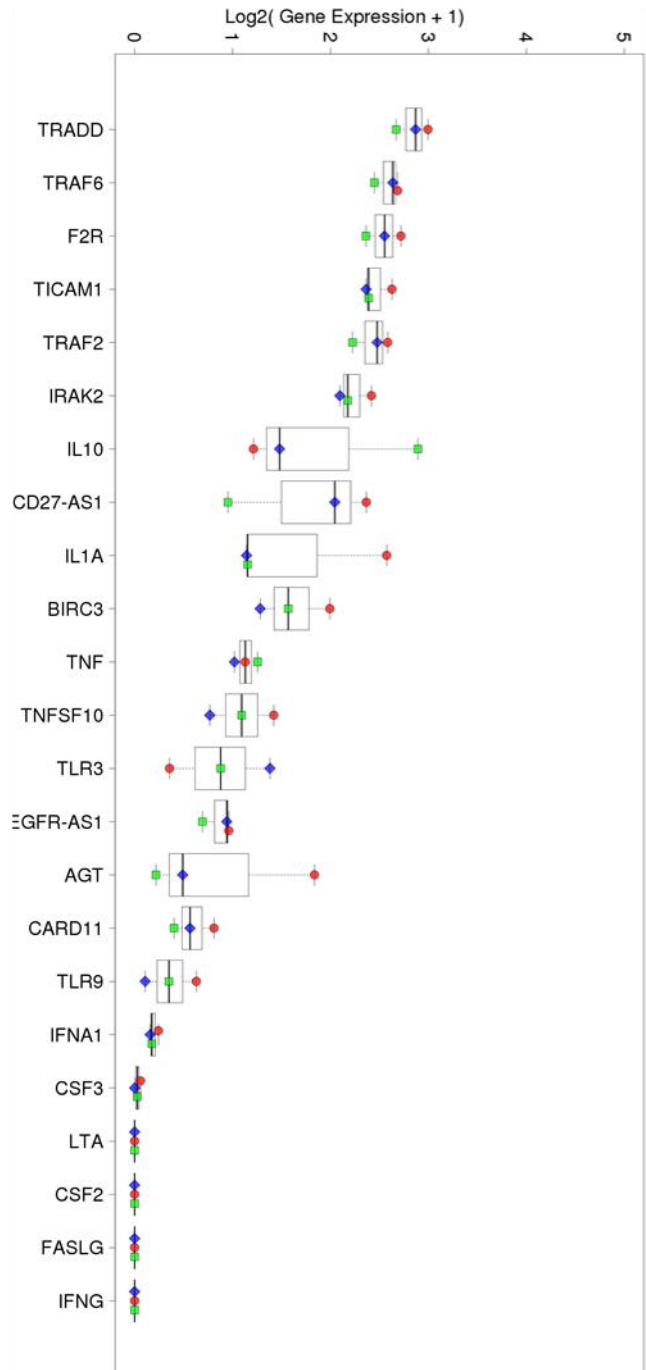


図3-23. iPS-macrophage, iPS-Proma-macrophage, iPS-M2-macrophage のRNA sequencingによるNF- κ B関連遺伝子の発現の比較

発現の高い遺伝子から順にボックスプロットにて表示している。

- A. 1-30位
- B. 31-60位
- C. 61-84位

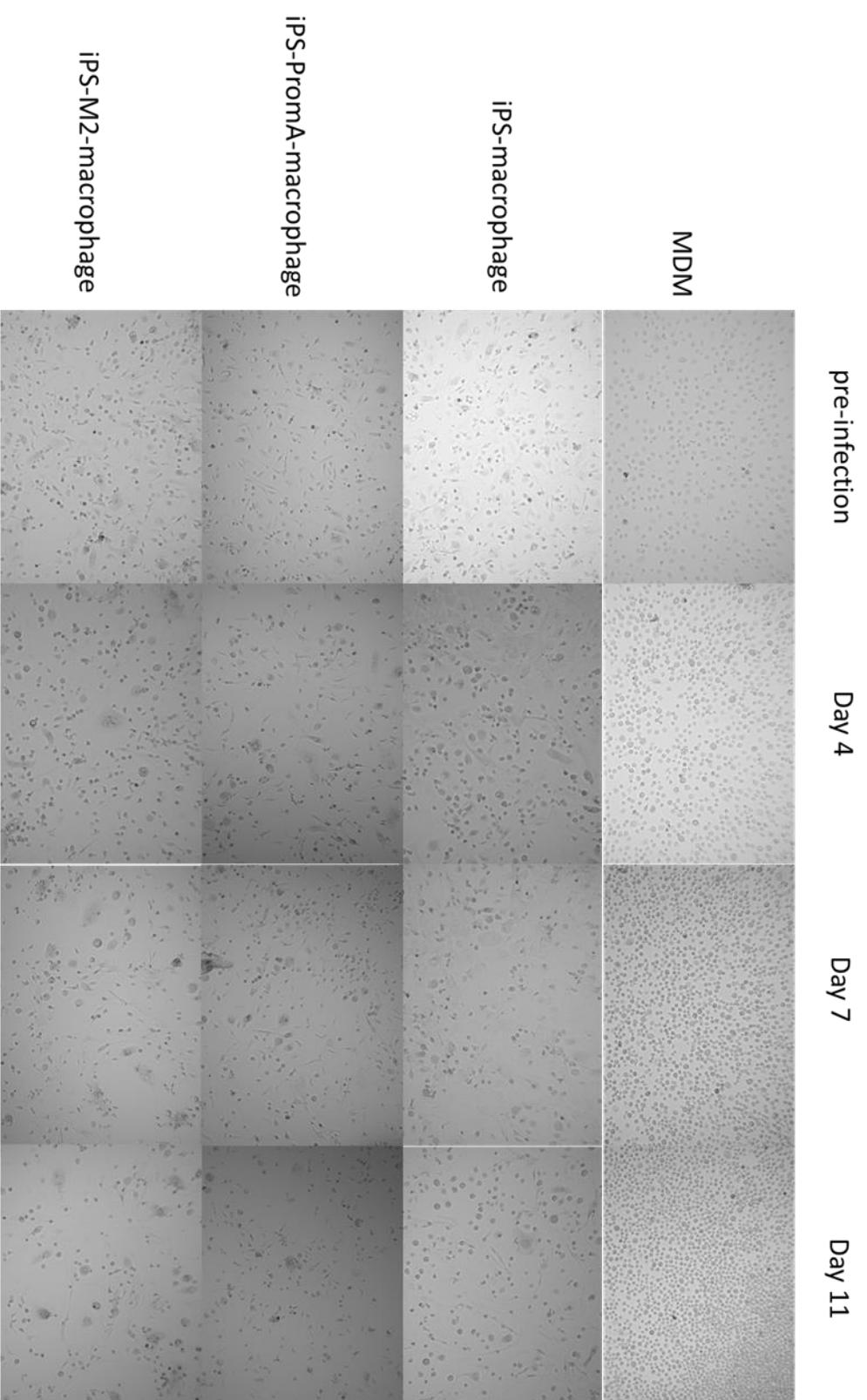


図3-24. 位相差顕微鏡による感染実験中の細胞の形態観察

感染前(pre-infection)から感染後11日目(day11)までマイクロブレードの剥離や膨化などの形態変化を認めない。

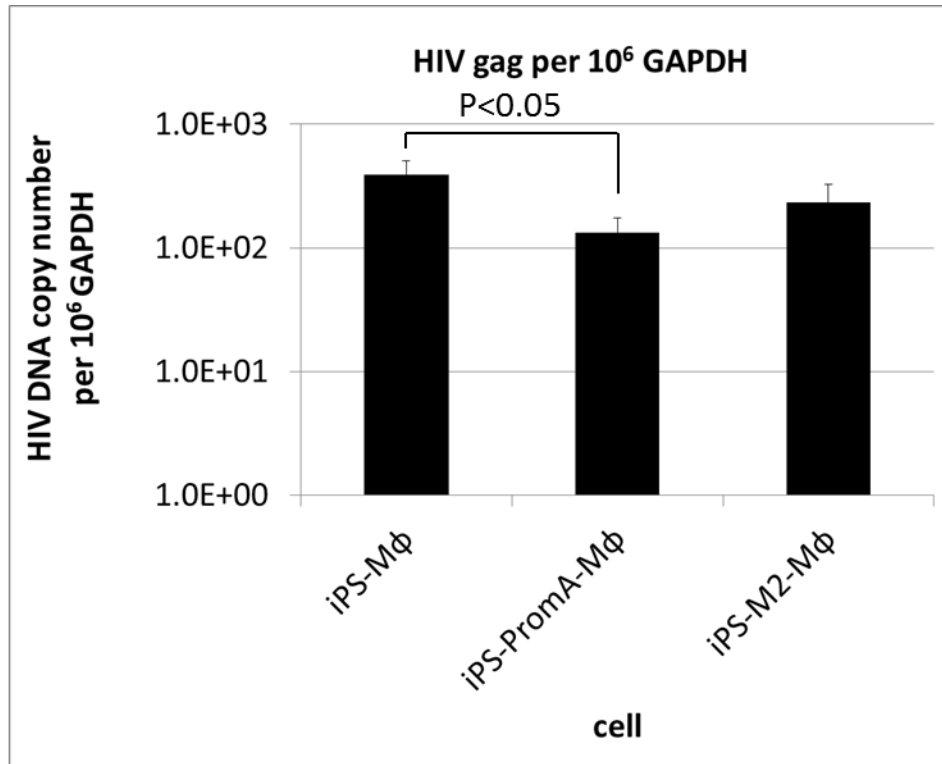
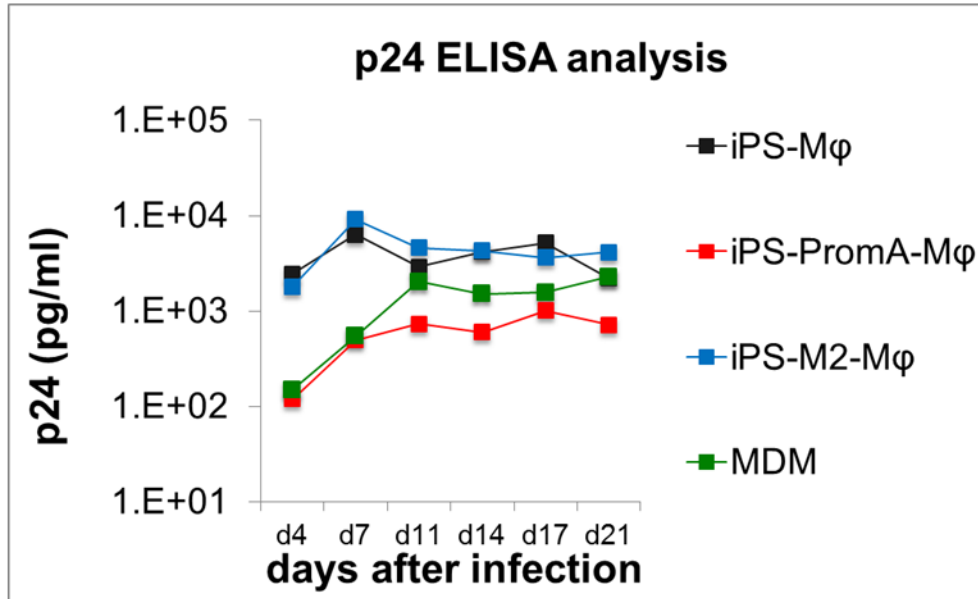


図3-25. HIV感染細胞のDNAにおけるHIV gagについてのqPCR

感染細胞のDNAにおいてHIV gagを測定し、それをGAPDHで標準化して示している。iPS-macrophage、iPS-PromA-macrophage及び、iPS-M2-macrophage全てでHIV DNAが検出された。iPS-macrophageとiPS-PromA-macrophageでは有意にiPS-PromA-macrophageでHIV gag DNA量が少なかった(p値 $0.016 < \alpha = 0.05$)。iPS-macrophageとiPS-M2-macrophage、iPS-PromA-macrophageとiPS-M2-macrophage間には有意差を認めなかった(それぞれp値 0.123, 0.453 $> \alpha = 0.05$)。

n=1, triplicateにて実施した。

A.



B.

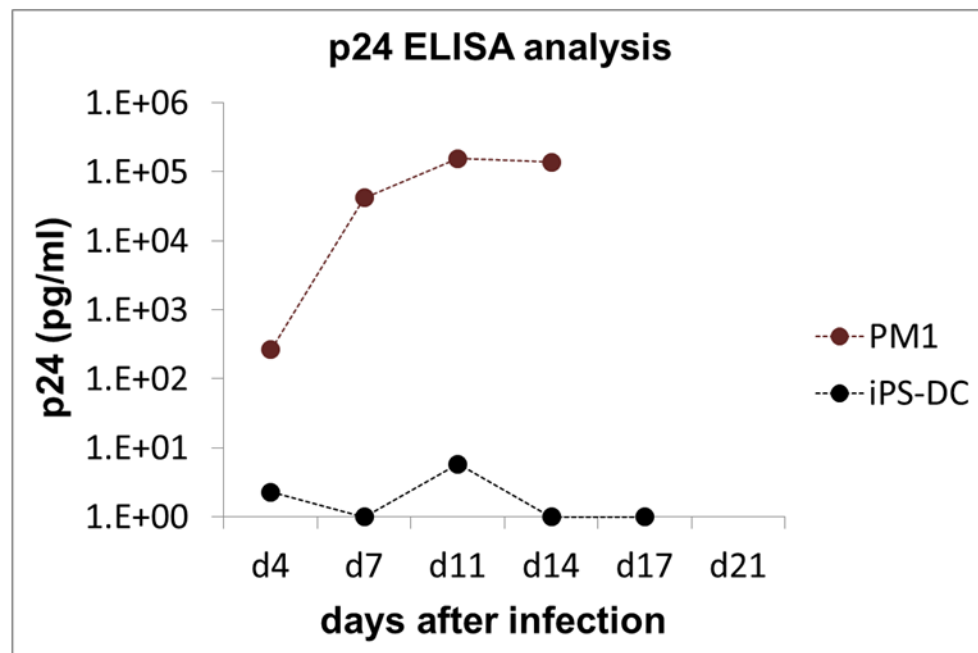


図3-26. HIV-1 感染実験におけるp24 ELISA analysis

d=感染からの日数(day)

A. iPS-macrophage, MDM p24 ELISA assayによる産生ウイルス量の測定
n=1, duplicateにて実施した。

B. iPS-DC, PM1: p24 ELISA assayによる産生ウイルス量の測定
positive controlとして使用したPM1において、p24の上昇が認められたのに対して、iPS-DCではp24の上昇が認められず、感染は不成立であると考えられた。
n=1, duplicateにて実施した。

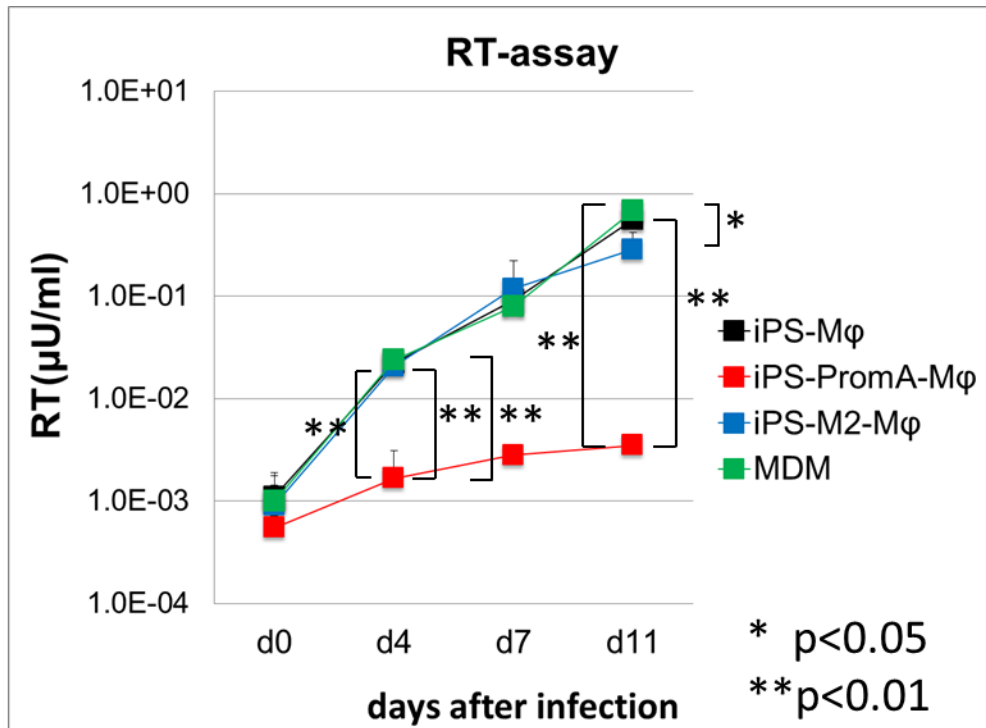


図3-27. HIV-1 感染実験におけるRT-assay

d=感染からの日数(day)

感染後4日目からiPS-PromA-macrophageにおいてRT活性が抑制されている傾向が認められた。

感染後4日目においてiPS-macrophageとiPS-PromA-macrophage、iPS-PromA-macrophageとMDM、iPS-PromA-macrophageとiPS-M2-macrophageとの比較で有意にiPS-PromA-macrophageは低いRT活性を示していた(p値はそれぞれ0.0037、0.0061、0.0023 α = 0.05)。

7日目においては各細胞間で有意な差は認められなかったが、11日目においてはiPS-macrophageとiPS-PromA-macrophage、iPS-PromA-macrophageとMDMの間で有意にiPS-PromA-macrophageは低いRT活性を示し(p値はそれぞれ0.0034、0.0009 α = 0.05)、iPS-M2-macrophageとMDMにおいても有意にiPS-M2-macrophageが低いRT活性を示していた(p値0.0233 α = 0.05)。*はp値 < 0.05、**はp値 < 0.01を示す。

n=1, それぞれtriplicateにて実施した。

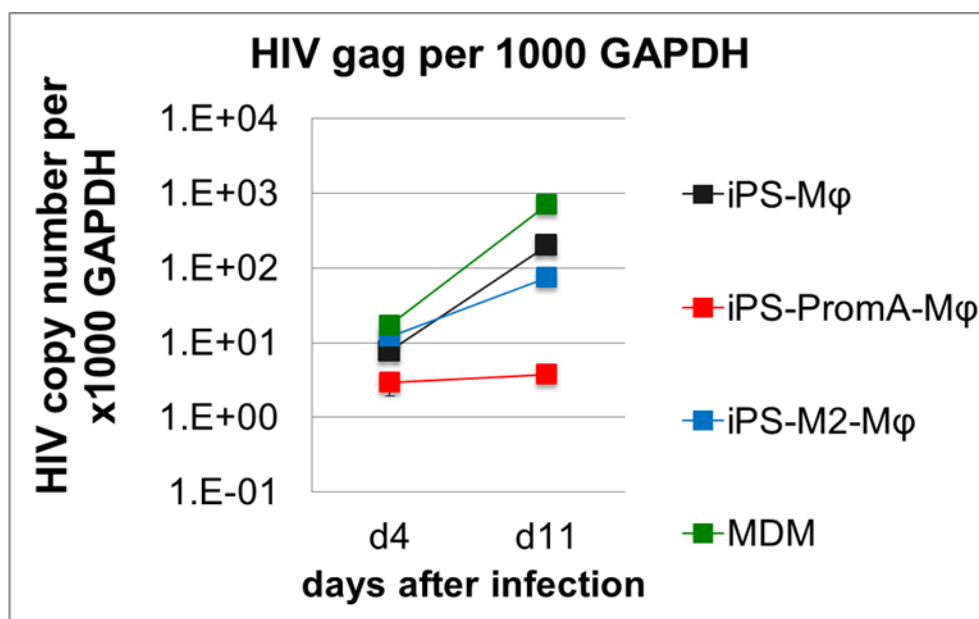


図3-28. HIV-1 感染実験におけるHIV gag発現についてのqPCR

d=感染からの日数(day)

iPS-PromA-macrophageは他のマクロファージに比べ、感染後4日目、11日目で共にHIV gag mRNA量はiPS-PromA-macrophageで有意に少なかった(iPS-macrophage, iPS-M2-macrophage, MDMとの比較において感染後4日目 p値 0.001, <0.0001, <0.0001 $\alpha = 0.05$ 、感染後 11日目 p値 <0.0001, 0.0073, <0.0001 $\alpha = 0.05$)が、他のiPS-macrophageとiPS-M2-macrophage、iPS-macrophageとMDM、iPS-M2-macrophageとMDMの比較においても有意差を認めていた(各々感染後4日目 p値 0.0002, <0.0001, <0.0001 $\alpha = 0.05$ 、感染後11日目 p値 0.002, <0.0001, 0.0005 $\alpha = 0.05$)。

n=1, triplicateにて実施した。

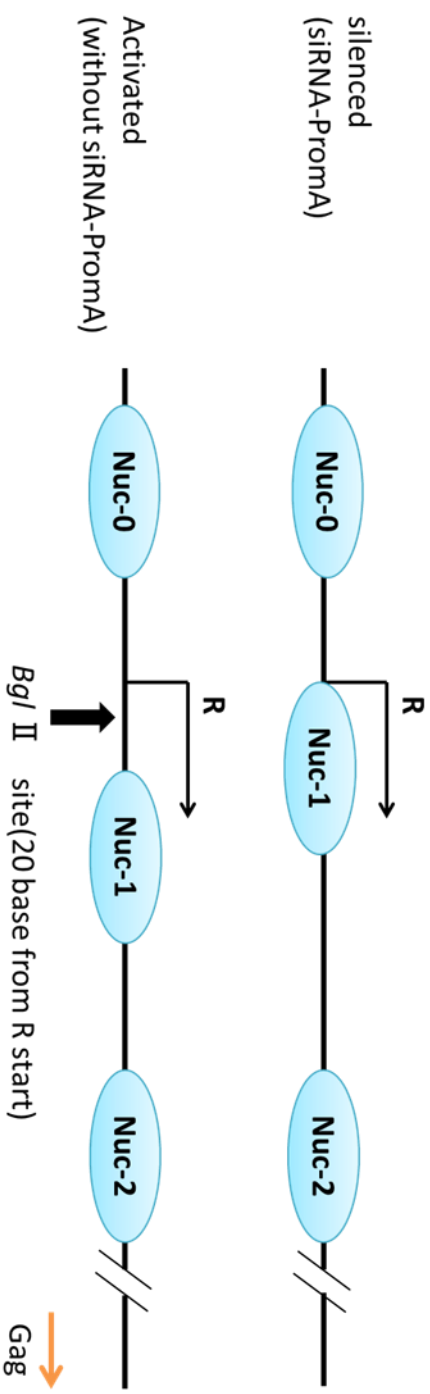


図 4-1. Chromatin Accessibility Real Time PCR (CHART) Assay

R: 転写開始部位、Nuc: nucleosome

HIV-1転写が行われている時、Nuc-1は転写開始部位からより下位の位置に近づくように移動している。そのためHIV 遺伝子の転写が抑制されている潜伏感染時には制限酵素(*Bgl II*)では切断ができないが、転写が活性化されている状態では上記の部位での切断が可能になる。このことを利用して、shRNA-PromAを遺伝子導入している細胞に関してCHART assayを行いTGSを介した転写抑制が認められることが示されている。