

## 論文の内容の要旨

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

マクロファージは貪食作用と抗原提示能を特徴とし、その働きは免疫細胞として病原体侵入への初期対応をするだけでなく、食細胞として、発生、恒常性維持や組織修復などにも及ぶ。さらに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、主に炎症反応に関与する **M1** マクロファージと、主に免疫抑制に関与する **M2** マクロファージ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とが知られている。

それ自体の機能が多岐にわたることや、ヒト免疫不全ウイルスなどの感染症や酸化 **LDL** の貪食による動脈硬化など様々な疾患との関係が指摘されていることから、マクロファージ研究は大いに注目されている分野であると言える。しかしながら、研究のためのヒトマクロファージ確保には、末梢血中に存在するマクロファージの数が少ないことやその分裂能が低いことなどから困難を伴う。

そのため、これまでのヒトマクロファージ研究には、主に **Monocyte Derived Macrophage(MDM)**や腫瘍細胞由来の単球系細胞株が使用されてきたが、**MDM** においては細胞数の確保、ウイルスを用いた遺伝子導入の際遺伝的に不均一な集団となることやドナー間のロット差などの問題があり、細胞株においてはヒトマクロファージの性質を完全に反映しているものではないという問題がある。

これらの問題に対する解決策として近年 **ES/iPS** 細胞を単核系食細胞に分化誘導する戦略が注目されている。特に山中伸弥博士らにより報告された人工多能性幹細胞(**induced Pluripotent Stem cell; iPS 細胞**)は、**ES** 細胞における倫理的な問題を回避することができ、一度ドナーから樹立すれば、理論的に無限増殖能をもつため、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。そのため **iPS** 細胞から分化誘導した血球細胞に関しても、遺伝的背景が均一な、無限の数の血球細胞を繰り返し確保することが可能である。

**In vitro** の系でヒト **iPS** 細胞からマクロファージへと分化誘導する系も報告されており、その方法として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。当研究室では間質細胞との共培養法において、造血前駆細胞を分化する過程で **sac** 法という方法を用いて効率的な分化誘導を行ってきた実績がある。これは、**ES/iPS** 細胞をマウス間葉系幹細胞株であ

る 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嚢状の構造物(sac)と造血前駆細胞を誘導する方法である。sac 内部に造血前駆細胞が濃縮された状態で存在することで、効率的な分化が可能となっていると考えられている。これまでこの系を用いて成熟巨核球を分化誘導し、機能的な血小板産生にまで至る系や、抗原特異的な T 細胞へ分化させる系を報告した。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こなかった。

また、iPS 細胞からマクロファージ分化に関して、既報の報告ではその多くが OP9 をフィーダー細胞として用いている。OP9 は機能的な M-CSF を産生しない、大理石骨病のモデルマウスの頭蓋冠から樹立された細胞株であり、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いる。このため、必ずしもマクロファージ分化へは適していない可能性が残る。さらに OP9 に関してはその培養において、ロット間差が OP9 の維持培養だけでなく、ES/iPS 細胞からの血球分化誘導の際の効率にも影響を及ぼすことが知られているため、マクロファージを含む多系統への血球分化の報告がある C3H 10T1/2 は、培養においても比較的容易であると考えた。

以上の背景から、より効率的なマクロファージの分化誘導法を検討するため、当研究室で実績のある sac 法を使用して得られた造血前駆細胞を、更に C3H 10T1/2 上に播種する方法を用いて最適化することにより、従来法に比べてより効率的なマクロファージを得る系を構築することとした。最終的にこの分化誘導した細胞の使用応用例として、HIV 産生抑制効果を示す siRNA を含む shRNA を iPS 細胞の段階で遺伝子導入し、その HIV 産生抑制効果を分化誘導したマクロファージを *in vitro* HIV 感染モデルで評価した。

ヒト iPS 細胞をマウス間葉系幹細胞である C3H 10T1/2 上に播種し、VEGF を含む血球分化培地で 14 日間培養した。この際、60mm ディッシュにコンフルエントな iPS 細胞を 1/6 量、100mm ディッシュ上の C3H 10T1/2 へ播種した。クランプ状にして播種された iPS 細胞は数日かけて嚢状に隆起し、その内部に血球細胞の分化が認められた。sac から回収されたこの細胞は CD34+CD43+ の造血前駆細胞であり、これを新たな C3H 10T1/2 上に播種し、GM-CSF 及び、M-CSF 存在下で培養した。10 日目に細胞をトリプシン処理し、吸着性でフィーダー細胞と分離して GM-CSF 及び M-CSF 存在下で培養してマクロファージへ分化誘導できた。

この系に関して、更に造血前駆細胞への分化過程において TPO を、造血前駆細胞から単球相当の分化細胞への分化過程において SCF を加えることで、最終的に分化したマクロファージや樹状細胞で CCR5 の発現が改善する傾向が認め

られた。

以上 **sac** 法の使用、**C3H 10T1/2** を用いた系に、サイトカインの最適化を行い、**iPS** 細胞から繰り返し、遺伝的背景が均一なマクロファージを繰り返し分化誘導することができ、**sac** を分化誘導する 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。

得られた分化細胞は形態的に広い細胞質を持った付着系細胞で、フローサイトメーター解析で、**CD11c+CD11b+CD14+HLA-DR+CCR5+** を示し、**bioparticle** との共培養で貪食能を示した。

分化誘導したマクロファージのフェノタイプを解析するために、フローサイトメーター解析(**CD86**, **CD163** 及び **CD206**)、**RNA sequencing** による **M1**, **M2** 関連遺伝子の発現解析、及び **Lipopolysaccharide** 及び **IFN- $\gamma$**  刺激(**M1** 活性化)と **IL-4** 刺激(**M2** 活性化)に対する **TNF  $\alpha$** 、**IFN- $\gamma$** 、**IL-10** 及び **IL-12** の産生解析を行った。これらの解析で **M1**、**M2** のいずれかのフェノタイプに確定することは出来なかったが、いずれの解析においても分化誘導したマクロファージは **MDM** と同様の活性化傾向を示すことを確認した。

更に、**iPS** 細胞の段階でレンチウイルスを用いて、**HIV-1** の **5'-LTR(Long Terminal Repeat)** を標的とした **siRNA** を含む **shRNA** を遺伝子導入して上記の系でマクロファージまで分化誘導し、蛍光マーカーの発現や挿入遺伝子に対する **DNA polymerase chain reaction(PCR)** により、挿入遺伝子が維持されていることを確認した。この **shRNA** を遺伝子導入したマクロファージを用いて、マクロファージ指向性を持ち、本研究で使用している **siRNA** に完全に対応する **NF- $\kappa$ B** 結合領域を持つ **HIV** 株である **HIV-1 BaL** の感染実験を行った。**HIV** の感染及び、感染細胞からの **HIV** 産生は、**p24 ELISA assay**、**Reverse Transcriptase-assay**、宿主細胞の **DNA** 及び **RNA** における **HIV gag** 遺伝子に対する **qPCR (quantitative PCR)** 法で評価した。その結果、**iPS** 細胞から分化させたマクロファージは **HIV** に感染し得ること、かつ **shRNA** を導入して分化させたマクロファージにおいて **HIV** 産生が抑制されていることが示唆された。この **shRNA** は細胞株を用いた研究において、**ChIP assay** の結果などから **HIV-1** の **5'-LTR** 中のプロモーター領域に存在する **NF- $\kappa$ B** 結合領域に直接結合して、**H3K9me2** などを生じてヘテロクロマチン化を誘導し、**HIV** の遺伝子発現を抑制することが示されており、本実験系においても同じ **Transcriptional Gene Silencing** を介した機序が想定された。

本研究において私は、**iPS** 細胞から **sac** 法を用いて **TPO** 存在下で造血前駆細胞を分化誘導し、更に造血前駆細胞からの分化過程においてマウス間葉系幹細胞である **C3H 10T1/2** をフィーダー細胞として用い **SCF** 存在下で単球相当への血球細胞への分化誘導を行った。最終的に得られた細胞は、形態観察、フローサイトメーターによる表面マーカーの解析によりマクロファージであると考え

られた。更に **iPS** 細胞に **HIV** のプロモーター領域を標的とした **siRNA** を含む **shRNA** を遺伝子導入し、この系で分化誘導して得たマクロファージを実際に **HIV** の感染実験に用いて、この系が医学研究に応用できるものであることを示した。

これまで医学研究におけるマクロファージの研究において、初代培養マクロファージは分裂能が低いため細胞数の確保や遺伝子導入の面から実験に用いることが難しく、主に細胞株が用いられることが多かった。本研究成果は無限増殖能を持つ **iPS** 細胞から **MDM** に近い性質を持つマクロファージを分化誘導できたことから、上記の問題点への解決策となることが考えられる。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。