

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 平尾(杉元) 理子

マクロファージは、免疫細胞としてサイトカイン産生を介した病原体侵入への初期応答を担うだけでなく、その貪食能などから、発生、恒常性維持、組織修復などの働きを持つ。そのためマクロファージ研究は医学研究において、大いに注目されている分野であるが、増殖能が低いことなどから実験に用いるためのヒトマクロファージを十分量確保することは困難である。一般的には末梢血中の単球を *in vitro* でマクロファージに分化させた **Monocyte Derived Macrophage(MDM)**や主に腫瘍細胞由来の単球系細胞株を実験に用いてきた。しかし、MDM においては細胞数の確保、遺伝子導入を行った際、不均一な集団となる可能性やドナー間のロット差の問題があり、細胞株においてはヒトマクロファージの性質を全て反映しているわけではなく、かつ臨床への応用が困難であるという問題がある。

そのため、本研究は医学研究に繰り返し十分量、均一な遺伝的背景を持つマクロファージを供給するために **induced Pluripotent Stem cell(iPS 細胞)**からマクロファージへの分化誘導の系を改良すること、さらにその系で得られたマクロファージが実際に実験に使用できるかを、HIV-1 の LTR を標的とした siRNA を用いて検証することを目的として行い、以下の結果を得た。

1. iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導に関する既報の報告を一部改変し、当研究室で効率的な分化誘導法として報告された **sac** 法を用いて造血前駆細胞を分化誘導し、さらに得られた造血前駆細胞を単球相当の血球細胞へと分化誘導する過程において、フィーダー細胞としてマウス間葉系幹細胞株である **C3H 10T1/2** を用い、マクロファージが分化誘導できることを確認した。
2. 1.で得られた分化誘導の系に対して、さらに造血前駆細胞への分化誘導においては **TPO** を、造血前駆細胞から単球相当の血球細胞への分化誘導においては **SCF** を加えることで、最終的に得られるマクロファージ及び樹状細胞で **CCR5** の発現が高くなる傾向を示した。また 1.及び 2.の結果を反映したプロトコールにおいて、60mm ディッシュにコンフルエントな iPS 細胞を 1/6 量播種した 100mm ディッシュ 1 枚当たり $2.0 \times 10^5 \pm 8.7 \times 10^4$ 細胞が繰り返し得られた。
3. 2.で得られたマクロファージは特徴的な形態を示し、フローサイトメーターによる表面マーカー解析で、**CD11c+CD11b+CD14+HLA-DR+CCR5+** を示し、**bioparticle** との共培養で貪食能を示した。
4. さらにマクロファージの **M1, M2** フェノタイプを調べるためにフローサイトメーターによる表面マーカーの解析及び、**RNA sequencing** による **M1, M2** 関連遺伝子の

発現解析を行ったが、CD86(M1 マクロファージ)、CD163, CD206(M2 マクロファージ)を全て発現し、IFN γ R(M1 マクロファージ)や IL-4R, CHIT1(M2 マクロファージ)などが高値である細胞集団であり、M1, M2 両方のフェノタイプを合わせ持つことが示された。

5. iPS 細胞に HIV の 5'-Long Terminal Repeat(LTR)にある NF- κ B 結合領域を標的とし、HIV-1 の複製抑制を示すことが細胞株の研究から示されている siRNA を含む shRNA を、レンチウイルスを用いて iPS 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後もアルカリホスファターゼ染色が陽性で未分化マーカーである TRA-1-60, SSEA-4 の発現がフローサイトメーターで確認され iPS 細胞の未分化性が示された。
6. shRNA を遺伝子導入した iPS 細胞を 2.の系でマクロファージまで分化できることを、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、貪食能の解析で示した。iPS 細胞で遺伝子導入した shRNA がマクロファージにおいても維持されていることを、蛍光マーカー及び DNA PCR で確認した。
7. iPS 細胞から分化誘導したマクロファージ(iPS-macrophage)及び 6.で得られた shRNA を遺伝子導入した iPS 細胞から分化誘導したマクロファージ(iPS-shRNA-macrophage)に HIV-1 BaL の感染実験を行い、iPS-macrophage に HIV が感染する可能性、及び iPS-shRNA-macrophage で HIV の産生が抑制されている可能性が HIV gag DNA qPCR、p24 ELISA assay、Reverse Transcriptase(RT)-assay 及び HIV gag mRNA qPCR により示唆された。

以上、本論文はヒト 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、造血前駆細胞を C3H10T1/2 をフィーダー細胞として SCF 存在下で単球相当の血球細胞に分化誘導し、最終的にマクロファージまで分化できることを示した。これにより、理論的に無限増殖能をもつ iPS 細胞から、遺伝的背景が均一な十分量のマクロファージを供給できる系を示した。またこの系で得られたマクロファージを実際に HIV-1 の LTR を標的としてその複製を抑制する siRNA を用いて検証し、HIV の産生を抑制する傾向を認めることを示した。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問題となっていた、マクロファージの細胞数確保や遺伝的不均一性などの問題を克服するための解決策になると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。