

cCLP の増殖維持に関わる支持細胞由来因子の同定

河野洋平

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 分子免疫学分野

【研究の背景】

免疫チェックポイント阻害剤の劇的な成功により、免疫細胞が感染防御だけでなく、がん抑制に重要であることが証明されたことから、ますます免疫研究が活発となっていくことが期待されるが、研究材料となる免疫細胞の資源は十分でない。申請者はこの度、あらゆる免疫細胞に成長できる希少なマウス免疫前駆細胞の長期大量培養に成功し¹⁾、新たな免疫細胞資源となりうる。

【目 的】

これまでこの培養リンパ系前駆細胞(cCLP)の増殖および未分化性維持にはサイトカインである Flt3L、IL7 のほか支持細胞が必須であるが、どの因子が重要なのか不明である。本研究では cCLP 増殖および免疫細胞未分化維持に必須な支持細胞由来因子の同定を目的とした。

【方 法】

阻害剤実験から支持細胞である OP9 由来ケモカイン CXCL12 が cCLP 増殖に関与する可能性があるため、CRISPR/Cas9 による CXCL12 欠損 OP9 細胞(OP9^{ΔCXCL12})を作製し、cCLP 増殖の影響を調べた。また OP9 の長期継代培養により、cCLP 増殖を支持できない OP9 サブクローン(OP9zero)を樹立した。さらに cCLP 増殖を支持できない ST2 細胞を準備し、cCLP 増殖支持の可否の違いを分子レベルで明らかにするため、RNA-seq を用いた各 OP9 亜集団および ST2 細胞における網羅的遺伝子発現解析を行った。

【結 果】

OP9^{ΔCXCL12}では CXCL12 産性の消失を確認し、コントロール OP9 (Ct) に比べて cCLP は増殖しなかったことから CXCL12 は cCLP 増殖因子の一つと考えられた。しかしながら RNAseq 解析から、cCLP 増殖支持能のない OP9zero および ST2 においても十分なレベルの CXCL12 (OP9zero:1194, ST2:2080, Ct:2394) が発現していることから、CXCL12 以外の分子も cCLP 増殖に寄与することが考えられた。そこで発現変動遺伝子の抽出作業を行い、候補分子の一つとして Dlk1 に注目した。

【考 察】

これまでに OP9 存在下での抗 Dlk1 抗体添加、および OP9 非存在下での DLK1-Ig コーティングにおける cCLP 増殖を調べたところ、いずれも DLk1 の関与は認められていない。しかしながら抗 Dlk1 抗体の阻害能力や DLK1-Ig コーティングなど実験系が正しく動いていることを証明していないため、結論はまだ得られていない。今後 CRISPR/Cas9 による DLk1 欠損 OP9、またそのカウンターパートとして cCLP 上に発現している Notch1 を阻害したり Notch1 欠損 cCLP を作製し、cCLP 増

殖の影響を調べることで Dlk1 の関与を明らかにしていく必要がある。また今回得られた cCLP 増殖可否に関する支持細胞の RNAseq データは Dlk1 以外にも候補となる分子を見つけ出していくのに非常に有益な情報資源であり、これを入手できた価値は非常に高い。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究によって cCLP 増殖および免疫細胞未分化維持に必要な支持細胞由来因子が明らかになった場合、支持細胞を必要とせず、完全組成のわかった人工的な微小環境プラットフォームによる制御可能な方法で、分化能を保持した cCLP の培養が可能となる。これは将来的にヒト cCLP の開発へもつながる発展性の高い研究となる。ヒト cCLP の大量培養に成功した場合、ヒト cCLP から分化する免疫細胞の利用方法は、がん、感染症、自己免疫疾患、アレルギーなどさまざまな疾患を対象とした医薬品、治療・検査法の開発など医療シーズの創出にも有用であると想定される。本研究はその開発基盤となる重要な位置を占めており、臨床への貢献度は非常に高い。

【参考・引用文献】

1. Kawano Y, Petkau G, Stehle C, Durek P, Heinz GA, Tanimoto K, Karasuyama H, Mashreghi MF, Romagnani C, Melchers F. Stable lines and clones of long-term proliferating normal, genetically unmodified murine common lymphoid progenitors. *Blood*. 2018 Mar 23; 131(18):2026-2035.