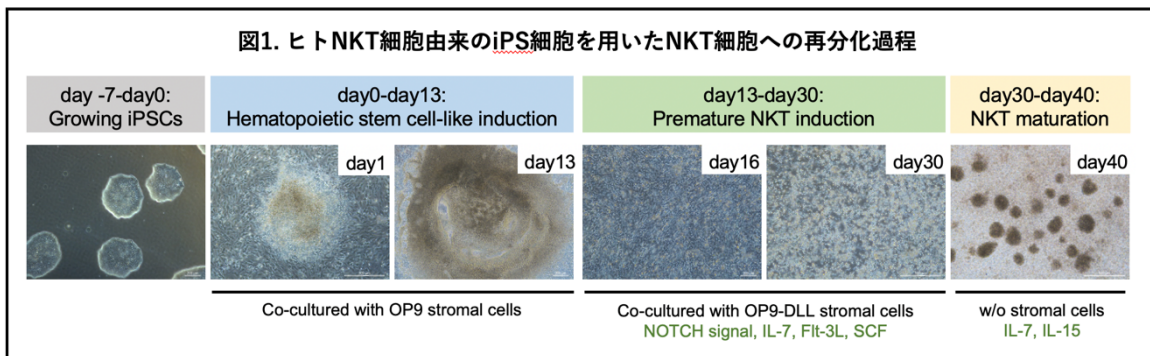


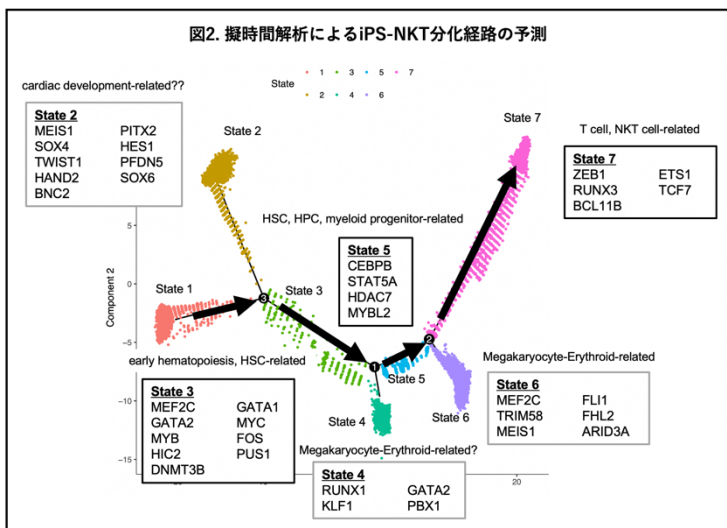
## 細胞系譜追跡による NKT 特異的エンハンサーの探索

理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成研究チーム  
薬師寺 那由他

リンパ球の一つであるナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、他の免疫細胞を活性化することで高い抗腫瘍効果をもたらす。がん免疫治療法への利用が期待されるが、ヒト末梢血中には0.01-0.1%しか存在せず、試験管内で治療に必要な細胞数まで増殖させることは困難である。私が所属する研究室では、ヒトNKT細胞由来iPS細胞を再度NKT細胞へと分化させることでこの問題に取り組んできており、これまでにマウス生体内に移植したヒトiPS細胞由来NKT細胞が腫瘍細胞の増殖を抑制することを報告した (Yamada et al., Stem Cells. 2016)。しかし、40日間にわたる現行のフィーダー細胞を用いた分化誘導法で作製できるNKT細胞の数は多くはないのが現状である (図1)。がん免疫治療法の実施に向けて、十分な細胞量を安定的に、かつ迅速に供給するためには、工程期間の短縮と誘導効率の改善が大きな課題であると考えた。そこで私は、現行の分化誘導過程において、(項目1) どのような細胞が増殖し、NKT細胞へと最終分化しているのかをまず明らかにし、次にそれらの細胞群を用いて、(項目2) NKT細胞への分化運命を規定する発現制御領域 (エンハンサー) を同定、その制御機構を解明したのち、(項目3) 分化誘導期間の短縮と高い誘導効率を兼ね備えた次世代の分化誘導法の開発に着手することを研究課題の最終到達点として設定し、研究を開始した。



### どのような細胞が増殖し、NKT細胞へと最終分化しているのか？

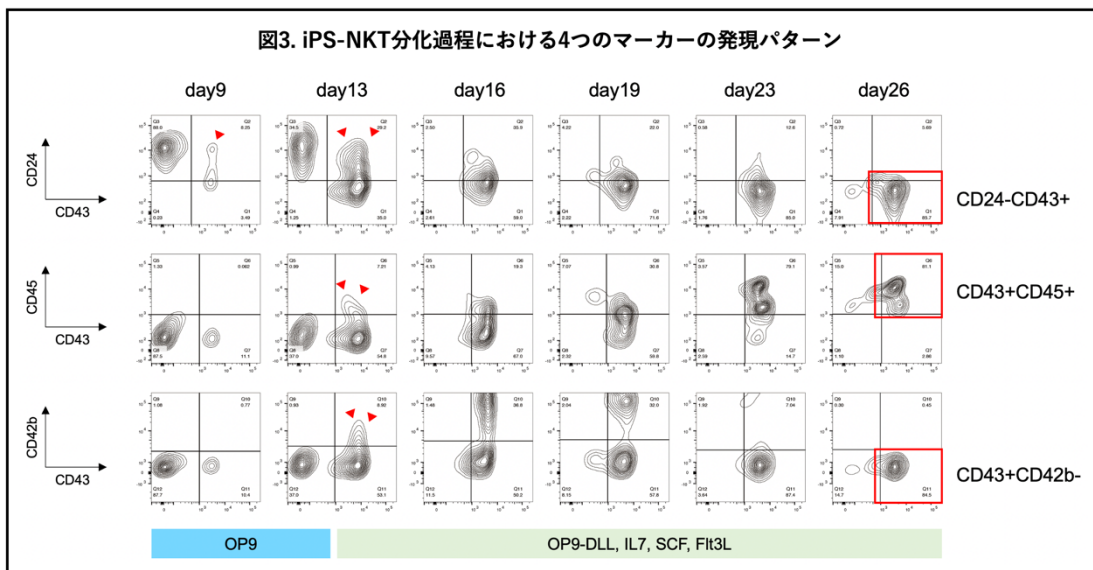


iPS-NKT分化誘導過程において、NKT細胞へと分化する前駆細胞を同定するため、シングルセル遺伝子発現の経時解析を実施した。この結果をもとに、分化経路の推定、NKT前駆細胞のマーカー候補の同定、そしてマーカーの発現をもとに単離した細胞集団を使ったNKT分化能の評価、の順で研究を進めた。

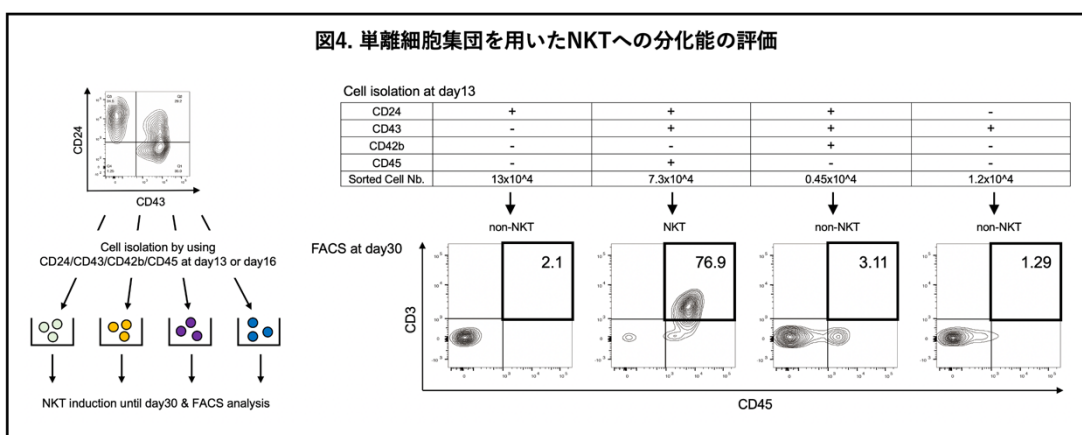
シングルセル遺伝子発現解析の結果をもとに擬時間解析による分化経路推定を行ったところ、iPS-NKT分化誘導過程は7つのstateに分けられることがわかった (図2)。各stateで強く発現している転写因子を調べたところ、state3, 5, 7では造血幹細胞関連および、NKT細胞に関連した遺伝子

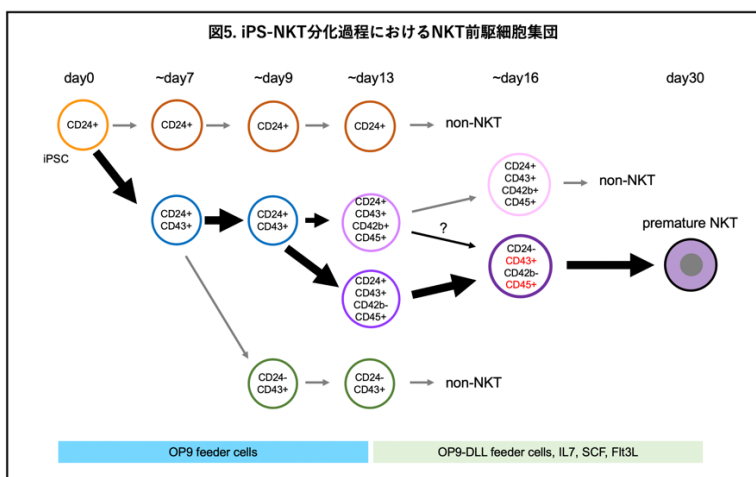
が強く発現した(図2)。それに対して、state2, 4, 6では心臓発生関連、あるいはmegakaryocyte-erythroid関連の遺伝子の強い発現がみとめられた。これらの結果から、iPSからNKTへの分化過程はstate1-3-5-7を経ており、state2-4-6はNKTへの分化には寄与しない分岐点であることが示唆された。

次に、分化途中のNKT前駆細胞を単離できるようなマーカーの探索を行った。NKT細胞へと寄与しないstate4およびstate6は、megakaryocyteやplateletのマーカーとしてよく知られているCD42bを発現する細胞が非常に多いことから、ネガティブマーカーとしてCD42bが使用できることが示唆された。さらに別の擬時間解析を行い、NKT細胞へと寄与する可能性をもった細胞集団に着目し、それらの集団を単離できそうなマーカーとしてCD24, CD43, CD45を見出した。CD24は未分化マーカーあるいはB細胞のマーカーとして、また、CD43およびCD45については造血細胞のマーカーとして非常によく知られているものである。CD42bとあわせて、これら4つのマーカーの発現がiPS-NKT分化誘導過程においてどうなっているのかをFACS解析で調べた。その結果、分化誘導後9日目までにCD24+細胞からCD24+CD43+細胞が出現し、さらに分化誘導後13日目までにこのCD24+CD43+細胞からCD45+およびCD42b+細胞が出現することが明らかとなった。さらに分化が進むにつれ、分化誘導後23日目頃までには、CD24およびCD42bの発現は完全に消失し、CD43+CD45+細胞が大部分を占めることを見出した。



さらに、NKT progenitorを含む細胞集団の単離にこれらの4つのマーカーの組み合わせが有効かどうか、その検証を行った。具体的には、分化誘導後13日目あるいは16日目において、4つのマーカーの発現の組み合わせで単離してきた細胞を30日目まで培養し、それらがNKT細胞へと分化しているかどうかを調べた。ここではその一例を示すが(図4)、分化誘導後13日目まで単離した細胞群でNKT細胞へと主に分化していたのは、CD24+CD43+CD42b-CD45+の集団であることがわかった。興味深いことに、誘導後16日目と同様の実験を行うと、13日目でNKT細胞への分化能を示したCD24+CD43+CD42b-CD45+の細胞集団はもはやNKT細胞へと分化せず、CD24-CD43+CD42b-CD45+の集団がNKT細胞への分化能を示していた。これは13日目から16日目までCD24の発現低下がNKTへの分化に重要であることを示唆する。以上の結果から、これら4つのマーカーを組み合わせることで、NKT前駆細胞を含む細胞集団の捕捉が可能であることが示された。





シングルセル遺伝子発現解析とFACSおよびソーティングを組み合わせた培養実験から、NKT前駆細胞を補足するマーカーの同定に成功し、分化過程においてNKT前駆細胞を追跡することが可能となった(図5)。本研究結果から、フィーダー細胞を用いた現行の分化誘導法においては、NKT前駆細胞は誘導後7日目頃までにCD24+CD43+集団に含まれており、誘導後13日目頃までにはCD24+CD43+CD42b-CD45+の集団に多く存在することが明らかとなった。また、誘導後13日目以降からDLLおよびサイトカインの刺激が加わり、分化が進むことでCD24の発現減少が促進され、その結果と

して、NKT前駆細胞はCD24-CD43+CD42b-CD45+の集団に多く含まれるようになってきていると予想している。

今後はNKT前駆細胞を含む集団とそれ以外の細胞集団を単離し、それらを用いてクロマチン解析を行うことで、NKT細胞への分化を制御するようなエンハンサー領域を同定するとともに、それらの制御機構の解明を進めていく予定である。これらの研究成果は、アニマルフリー条件の新規分化誘導法の開発へと寄与するものであり、今後の免疫細胞治療の発展につながると期待している。

#### 共同研究者・謝辞

本助成により帰国後の研究を円滑に行うことが出来ましたこと、貴研究会および関係者の皆様には心から御礼申し上げます。また本研究の共同研究者は、理化学研究所生命医科学研究センター古関明彦チームリーダー、小林美登里氏、清田純チームリーダー、遠藤高帆博士、University of Luxembourg, Prof. Antonio del Sol Mesa, Satoshi Okawa博士、千葉大学川上英良教授、吉原正仁准教授、大瀧夏子博士です。本計画の遂行にあたり、共同研究者の方からは多大なご支援を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

#### 文献

1) Yamada D, Iyoda T, Vizcardo R, Shimizu K, Sato Y, Endo TA, Kitahara G, Okoshi M, Kobayashi M, Sakurai M, Ohara O, Taniguchi M, Koseki H, Fujii SI. Efficient Regeneration of Human V $\alpha$ 24+ Invariant Natural Killer T Cells and Their Anti-Tumor Activity In Vivo. *Stem Cells*. 2016 Dec;34(12):2852-2860. doi: 10.1002/stem.2465. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27422351