

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	ポリコーム群タンパク PCGF6 の樹状細胞の活性化における役割
キーワード	① 樹状細胞、② ポリコーム群タンパク、③ 免疫賦活化

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヒラカワ マユミ 平川 真弓
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東京理科大学 研究推進機構生命医科学研究所 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	東京理科大学 研究推進機構生命医科学研究所 助教
プロフィール	博士課程はドイツのフライブルクで胸腺分化の研究を行いました。朗らかで聡明な指導教官と国際色豊かなラボメンバーのおかげで様々なことを学びました。4年前に帰国し、現在はT細胞以外の免疫細胞の研究も行っています。

1. 研究の概要

樹状細胞 (dendritic cell ; DC) は免疫細胞の一種で、体内に侵入したウイルスや細菌などの異物を感知し、T細胞を活性化する機能を持つ。DCは通常型DC(conventional DC ; cDC)と形質細胞様DC(plasmacytoid DC ; pDC)に大別される。cDCは高い抗原提示能を有し、ウイルスや腫瘍に対する免疫防御に関与するのに対し、pDCはウイルス感染時にサイトカインを大量に産生する。

ポリコーム群(Polycomb group:PcG)タンパクは代表的なエピジェネティック制御因子の一つである。PcGタンパクはポリコーム抑制複合体1(PCR1)とPCR2に大別され、PCR1はそれぞれPCGFタンパク(PCGF1-6)により、6種類の複合体に分けられる。従来型PCR1に分類されるPCGF2、PCGF4に比べて、異性型PCR1の構成要素であるPCGF1, 3, 5, 6の機能は不明なことが多い。最近、DCが活性化されるとPCGF6の発現が減少するとともに、サイトカインの産生が増加することが報告された(Boukhaled *et al.* Cell Rep., 2016)。しかしこの結果は全て培養細胞を用いた実験に基づいており、生体内DCにおけるPCGF6の機能は不明であった。

そこで申請者は、DC特異的にPCGF6を欠損させるマウス(CD11cCre-Pcgf6^{f1/f1})を作製したところ、PCGF6欠損DCは正常に分化したが、活性化マーカーであるCD80およびCD86の発現が上昇していたことから、生体においてもDCの活性化にPCGF6が関与することが示唆された。

2. 研究の動機、目的

本研究では、生体内DCにおけるPCGF6の機能を明らかにすることを目的とする。近年、DCはがん免疫療法として応用されている。しかし、末梢血や骨髄に存在するDCは非常に少なく、患者のDCの状態により治療成績は大きく異なる。本研究によって得られる知見は、単に、PCGF6によるDCの機能成熟機構の解明にとどまらず、サイトカイン産生能をより増強したDCの作製やがん細胞への特異性が高く副作用が低いという利点を持つ、DCワクチン療法への応用など医療分野に貢献することが期待できる。

3. 研究の結果

PCGF6 欠損 DC の T 細胞への抗原提示能・抗腫瘍機能の解析

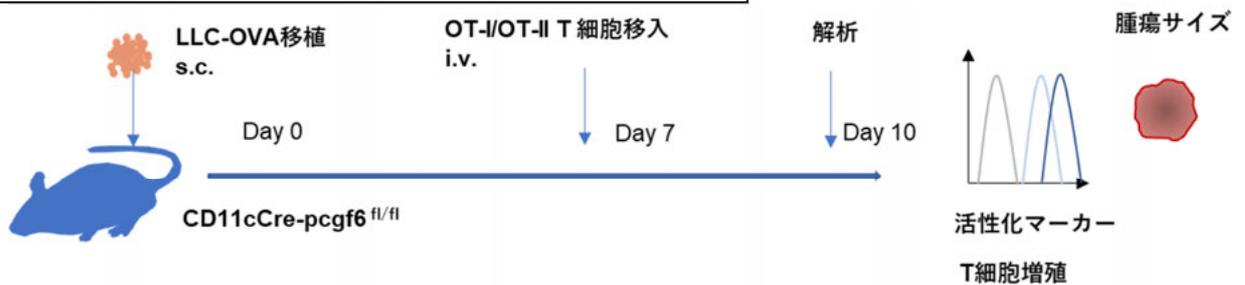


図1 PCGF6欠損DCの実験概要

PCGF6 欠損 DC の生体内における役割について、OVA を発現するルイス肺がん細胞 (LLC-OVA) をマウスの背部皮下に移植し、1週間後に OVA 特異的な OT-I マウス由来 CD8 陽性 T 細胞を CFSE でラベルした後、 2×10^5 細胞をコントロール (Pcgf6^{fl/fl}) の担がんマウスと CD11cCre-Pcgf6^{fl/fl} の担がんマウスに尾静脈移入した。T 細胞の分裂を測定することで、DC の抗原提示能を間接的に測定できるため、3 日後に腫瘍のサイズや T 細胞の分裂をフローサイトメトリーで測定した。さらにリンパ節、脾臓を酵素処理し、フローサイトメトリーで cDC の分布を調べた (図 1)。

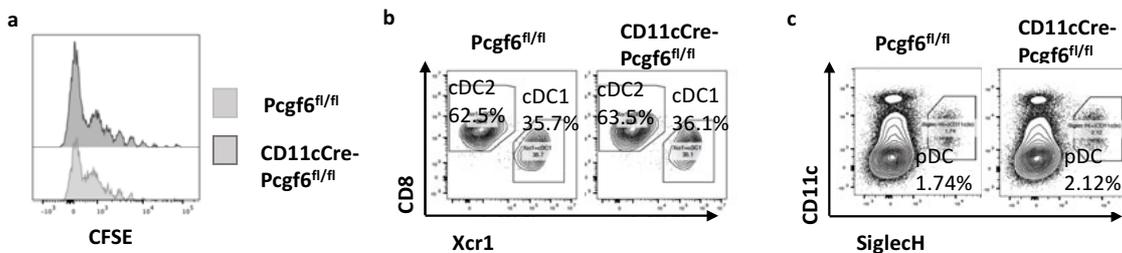


図2 実験結果

- 所属リンパ節におけるCFSEラベルしたCD8陽性細胞の増殖
- 所属リンパ節におけるcDC1とcDC2の割合
- 脾臓におけるpDCの割合

結果、コントロールと CD11cCre-Pcgf6^{fl/fl} マウスで腫瘍のサイズに差はなく、所属リンパ節における CD8 陽性 T 細胞の増殖能に変化が見られなかった (図 2a)。さらに、XCR1⁺cDC1、XCR1⁻cDC2 の割合についても、リンパ節、脾臓において差が見られなかった (図 2b)。さらに脾臓における pDC の割合についても変化が見られなかった (図 2c)。

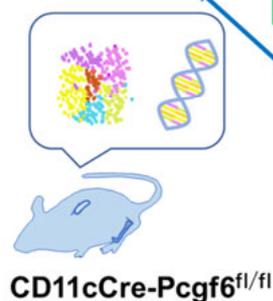
上記の抗腫瘍活性の実験を 3 回 (各回コントロール 3 匹、CD11cCre-Pcgf6^{fl/fl} 3 匹) 実施したが、CFSE ラベルした OT-I マウス由来の CD8 陽性 T 細胞の細胞数が十分量を確保できていなかったため、十分な T 細胞の生着がなく活性が計測できなかったマウスもあった。技術面での改良と実験の精度向上が必要である。さらに、CD11cCre-Pcgf6^{fl/fl} は PCGF6 のノックアウトのタイミングが CD11c を発現してからであるため、成熟 DC の分化に影響はない。Boukhaled たちの論文では骨髄細胞を用いて PCGF6 をノックダウンしており、初期の分化段階、すなわち造血幹細胞から PCGF6 欠損の影響を考慮することで、DC の活性が増強されるか確認する実験が必要と思われる。造血幹細胞特異的に PCGF6 を欠損させる ERT2Cre-Pcgf6^{fl/fl} マウスで検討を重ねたい。具体的には、C57BL/6 (CD45.2) 背景のコントロールマウス (ERT2-Cre;Pcgf6^{+/fl})、ERT2-Cre;Pcgf6^{fl/fl}、の骨髄細胞を、C57BL/6 (CD45.1) マウスに尾静脈移植し骨髄キメラを作製する。移植 4 週間後にタモキシフェンを腹腔内投与 (i. p.) した後、8 週間後に DC の分化、活性状態を CD80 や CD86 の発現をフローサイトメトリーで調べる。

さらに、ヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹・前駆細胞を特定のサイトカインを添加して培養し DC に分化させる。申請者らはすでに、マウス及びヒト造血前駆細胞から未分化 DC や成熟 DC を誘導する培養系を確立している。さらに、ヒト臍帯血の CD34 陽性造血幹・前駆細胞を、rhGM-CSF を添加した培養条件で DC へ分化誘導すると、CD11c 陽性 HLA-DR 陽性の DC が産生されること

を確認している。現在、DCの培養条件の最適化を行っている。

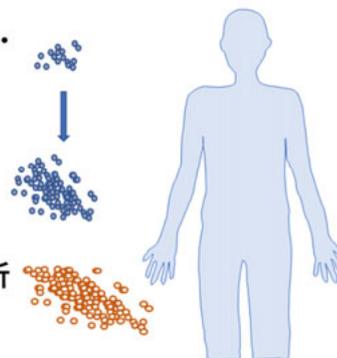
次に、CRISPR/Cas9システムを用いて、分化したDCのPCGF6を欠損させる。このPCGF6を欠損したDCを用いて機能解析を行う。具体的には、フローサイトメトリーを用いて活性化マーカー、サイトカイン産生を正常なDCと比較する。このようにして、マウスと同様にヒトDCの活性化にもPCGF6が重要かどうかを明らかにする。

PCGF6欠損DCのvivo
での機能解析
DCの遺伝子発現の解析



比較

①ヒト幹細胞
からDCを培養・
増幅し
PCGF6を
ノックアウト
する



②DCの機能解析
遺伝子発現

4. 研究者としてのこれからの展望

たくさん学ぶことがあり、面白い研究を次世代に伝えてつなげていけたらと思います。免疫細胞がおりなす様々な現象を見出し、解明する研究を続けていきたいです。今まで基礎研究を行っていますが、将来、医療応用し役立てるようにこれからも精進いたします。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究課題に対して助成いただき大変励みになりました。予定通りに実験は進まないところがありましたが、これからも上記の研究の実験方法の見直し、研究を続けていきます。本助成に対し、支援いただいたことに心から感謝を申し上げます。