

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15109

研究課題名(和文) 同種造血幹細胞における免疫抑制活性の実証

研究課題名(英文) Immune suppressive function of allogeneic hematopoietic stem cells

研究代表者

大津 真(Otsu, Makoto)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30361330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植は難治性疾患の治療法として重要であるが、移植片対宿主病(GvHD)はしばしば致死的であり、その制御法の確立が望まれている。近年、間葉系幹細胞によるGvHD制御の臨床研究も行われているが、本研究では、いまだ提唱されていない「造血幹(前駆)細胞による免疫抑制作用」を実証することを目的として行った。結果、マウスモデルにおいて移植細胞由来の血球成分による抗GvHD作用が示唆される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic cell transplantation is widely recognized as an effective therapeutic measure. However, graft-vs-host disease (GvHD) remains one of major serious adverse events. This study attempted to demonstrate that hematopoietic stem (progenitor) cells (HSPCs) themselves had previously unrevealed ability to suppress GvHD. Although preliminary, established mouse models showed such effects in HSPCs after transplantation.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞 移植 移植片対宿主病

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は、血液悪性疾患のみならず先天性免疫不全症など、多くの難治性疾患を根治しうる治療法であり、今日、臍帯血という新たな移植源の普及とともに、その重要性は増すばかりである (Curr Opin Hematol. 2013;20:485)。本邦では高齢化社会の訪れと共により低毒性の治療法開発が望まれており、特に移植片対宿主病 (GvHD) を免疫抑制剤によらずに治療する、あるいは発症そのものを予防するなど、新たな改善策の検証が喫緊の課題となっている。申請者はマウスの同種移植モデルにおいて放射線照射や化学療法によらずに造血を 100%ドナー由来に置換する独自の治療法を提唱し報告してきた (日本血液学会、欧州遺伝子治療学会、論文投稿準備中)。本モデルにおいて GvHD 反応は一過性であり、薬剤投与を要せず自然に収束し、終生再燃はおこらない。この GvHD 反応の収束はドナー造血幹前駆細胞の移植とほぼ同時期より観察され、Rag2-KO 細胞でも同様に抑制がみられることから、移植細胞自身が未分化のうちに、成熟リンパ球に依らずにアロ反応性活性化 T 細胞を抑制している可能性が示唆される (未発表データ)。間質系幹細胞が免疫抑制効果を有し、実際 GvHD の治療に既に使用されていることから (Expert Opin Biol Ther. 2014;14:231)、体性幹細胞として共有する類似の細胞特性が造血幹(前駆)細胞にも備わるとの仮説を発想するに至った。

2. 研究の目的

本研究においては既にモデルは確立され発想はあるものの、技術的限界により仮説の検証が難しい状況が続いていた。すなわち造血幹前駆細胞の生体内挙動を正確に追跡し、その効果が発揮される現場を捉えることができなければ、自らの仮説に確証を得ることは困難である。近年、Scale, CLARITY, SeeDB など、組織の透明化技術に進歩がみられ、組織深部での細胞挙動を可視化することが可能になってきた (Nat Neurosci. 2013;16:1154)。申請者らは、すでにこれらの革新的技術の改良法で骨を透明化することに成功している (未発表)。究極には、移植細胞に培養や特定の分子の機能の ON/OFF 処置を加えることで、目的とする GvHD 抑制作用を強化して活用する方法を確立することが目標であるが、本申請の研究期間中には、当該モデルにおいて移植造血幹前駆細胞の挙動を骨も含めて追跡し、免疫細胞あるいはその他の責任細胞と相互作用する現場を捉えることを目指す。

3. 研究の方法

既に確立した「骨髄破壊的処置に依らずにドナー造血に置換する GvHD 自然収束マウス移植モデル」において、蛍光標識ドナー造血幹(前駆)細胞の体内挙動を追跡する。解析には

組織の透明化技術(未発表データ)と、レーザーシート顕微鏡を活用し、広範囲に深部まで組織中の被験細胞を追跡する。対照の GvHD 非収束移植モデルと比較し、収束モデルに特異的な挙動パターンにつき検討する(研究代表者)。並行して GvHD 収束に必須の因子の探索を行い(研究代表者)、ヒト移植での GvHD 重症度との相関解析に備えて臨床検体を蓄積する(分担研究者)。同時に、GvHD 収束効果増強のための体外操作法(培養条件、抗体添加など)の探索的試行、およびヒト臍帯血を免疫不全マウスに移植するヒト細胞での検証実験も進める。

4. 研究成果

造血幹細胞移植は難治性疾患の根治療法として重要であるが、同種移植における移植片対宿主病(GvHD)はしばしば致死性であり、その制御法の確立は大きな課題である。近年、間質系幹細胞による免疫抑制作用が明らかにされ、GvHD 制御の臨床研究も行われている。本研究は、概念としていまだ提唱されていない「造血幹(前駆)細胞による免疫抑制作用」を実証し、その分子メカニズムの解明と、GvHD 予防・治療に適した免疫抑制作用の増強培養法を開発することを究極の目標として掲げ、本挑戦的萌芽研究として、必要な技術的基盤を確立することを目的として行った。はじめに基本 GvHD モデルを最適化すべく、C57Bl/6-Ly5.2 (B6-5.2) マウスをドナー、B6 x DBA2 F1(BDF1)マウスをレシピエントとする移植系を用い、放射線照射用量、脾臓 T 細胞数の調整を行った。結果、3 Gy の照射と 5×10^6 個の純化 T 細胞の組み合わせにより、汎血球減少と緩やかな体重減少を伴う GvHD モデルを確立したが、均質な反応を得るには非常に高い T 細胞の純度が要求されることが明らかとなり、十分な数の高純度 T 細胞を分離する方法をあわせて確立した。次に、抗 GvHD 反応の被験細胞として高度に純化した B6-Ly5.2 (B6-5.1) マウス由来造血幹細胞を用いた検討を行った。上記の GvHD モデルを用いて、移植する細胞数、タイミングを変えて造血幹細胞を移植し、末梢血中の白血球数、貧血、血小板数とともに、体重を経時的に追跡した。結果、移植後早期 (< day 3) に造血幹細胞を移植した群においてわずかながら体重減少の鈍化が観察され、移植細胞に由来する血球成分による抗 GvHD 作用が示唆される結果を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Yokoi K, Akiyama K, Kaneshiro E, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Akiyama M, Otsu M, Nakauchi H, Ohashi T, Ida H. Effect of donor chimerism to reduce the level of

glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(2):333-40.10.1007/s10545-014-9800-x 査読有り

Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, Imai K, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of drugs to treat 8p11 myeloproliferative syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells with fusion gene CEP110-FGFR1. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120841.10.1371/journal.pone.0120841 査読有り

Toriumi T, Takayama N, Murakami M, Sato M, Yuguchi M, Yamazaki Y, Eto K, Otsu M, Nakauchi H, Shirakawa T, Tsokawa K, Honda MJ. Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomed Res*. 2015;36(1):31-45.10.2220/biomedres.36.31 査読有り

Takeuchi Y, Takeuchi E, Ishida T, Onodera M, Nakauchi H, Otsu M. Curative haploidentical BMT in a murine model of X-linked chronic granulomatous disease. *Int J Hematol*. 2015;102(1):111-20.10.1007/s12185-015-1799-8 査読有り

Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res*. 2015;36(3):179-86.10.2220/biomedres.36.179 査読有り

Otsu M, Yamada M, Nakajima S, Kida M, Maeyama Y, Hatano N, Toita N, Takezaki S, Okura Y, Kobayashi R, Matsumoto Y, Tatsuzawa O, Tsuchida F, Kato S, Kitagawa M, Mineno J, Hershfield MS, Bali P, Candotti F, Onodera M, Kawamura N, Sakiyama Y, Ariga T. Outcomes in two Japanese adenosine deaminase-deficiency patients treated by stem cell gene therapy with no cytoreductive conditioning. *J Clin Immunol*. 2015;35(4):384-98.10.1007/s10875-015-0157-1 査読有り

Otsu M. Perspectives on stem cell gene therapy for genetic disorders. *ISBT Science Series*. 2015;10(S1):231-4. 査読有り

Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, Goto F, Watanabe N, Maekawa T, Ishiguro A, Okuyama T, Otsu M, Yamada M, Hershfield MS, Ariga T, Onodera M. Effects of enzyme replacement therapy on immune function in ADA deficiency patient. *Clin Immunol*. 2015;161(2):391-3.10.1016/j.clim.2015.06.011 査読有り

Lin HT, Masaki H, Yamaguchi T, Wada T, Yachie A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakauchi H, Otsu M. An assessment of the effects of ectopic

gp91phox expression in XCGD iPSC-derived neutrophils. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2015;2:15046.10.1038/mtm.2015.46 査読有り

Ishida T, Yamazaki S, Nakauchi H, Higashihara M, Otsu M. Reactive oxygen species in hematopoietic stem cells affect culture outcomes under inflammatory conditions. *Open J Hematol*. 2015;6:7. 査読有り

[学会発表](計 15 件)

Ishida T, Takahashi S, Chen-Yi Lai, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Proof of Benefit in Multiple-Cord Blood Transplantation Evidenced By Early Hematopoietic Reconstitution. 57th American Society of Hematology 2015 Annual Meeting, Dec 5-8, Orlando, FL.

Ishida T, Suzuki S, Chen-Yi Lai, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Protection of Transplanted Hematopoietic Stem Cells from Inflammatory Recipient Marrow Environment through Specific TNF-Signal Blockade. 57th American Society of Hematology 2015 Annual Meeting, Dec 5-8, Orlando, FL.

大津 真:特別講演「人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた血液・免疫研究」第4回小児免疫不全症セミナー, 金沢, Feb 2, 2015

大津 真:教育講演「血液・免疫疾患へのiPS細胞の応用」第11回北関東小児がんセミナー, 高崎, May 9, 2015

大津 真:教育講演「人工多能性幹細胞(iPS細胞)の疾患研究への応用」第21回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会, 松本, Mar 6-7, 2015

大津 真:シンポジウム「iPS細胞の今後の展開 先天性免疫不全症におけるiPS細胞の活用」第25回日本サイトメトリー学会, 東京, July 11-12, 2015.

大津 真, 石田 隆:シンポジウム「造血幹細胞研究の最前線 骨髄炎症環境における造血幹細胞保護法の確立」第25回日本サイトメトリー学会, 東京, July 11-12, 2015.

大津 真:教育研修講演「幹細胞iPSのABC」第59回日本リウマチ学会総会, 名古屋, Apr 23-25, 2015.

大津 真:特別講演「遺伝性難病におけるiPS細胞による疾患モデルの活用」第20回日本ライソゾーム病研究会, 東京, Oct 2-3, 2015

長谷川 久紀, 川畑 仁人, 高木 春奈, 大津 真, 上阪 等:ヒト人工多能性幹細胞由来の筋細胞は再生筋線維と同様のサイトカイン産生能をもつ. 第43

回日本臨床免疫学会, 兵庫, Oct 22-24, 2015.

長谷川 久紀, 川畑 仁人, 高木 春奈, 大津 真, 上阪 等: ヒト iPS 細胞由来筋細胞は筋芽細胞同様に筋炎を増悪し得るサイトカインを産生能する. 第 59 回日本リウマチ学会総会, 名古屋, Apr 23-25, 2015.

佐野 秀人, 大津 真, 岩城 孝行, 伊熊 ことみ, Tomasz Brzoska, 鈴木 優子, 金山 尚裕, 浦野 哲盟: PAI-1 欠損患者由来 iPS 細胞を用いた血管内皮細胞機能の解析. 第 37 回日本血栓止血学会, 甲府, May 21-23, 2015.

石田 隆, 鈴木 幸恵, Chen-Yi Lai, 角田 茂, 岩倉 洋一郎, 野島 正寛, 竹内 康雄, 東原 正明, 中内 啓光, 大津 真: 骨髄炎症下における造血幹細胞保護. 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 東京, July 17-18, 2015.

Chen-Yi Lai, Satoshi Yamazaki, Masafumi Onodera, Shigeru Kakuta, Yoichiro Iwakura, Makoto Otsu, and Hiromitsu Nakauchi. Roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow repopulation. 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 東京, July 17-18, 2015.

Huan-Ting Lin, Makoto Otsu. Estimation of vector copy number states by droplet digital PCR. 第 21 回日本遺伝子治療学会, 大阪, July 24-26, 2015

〔図書〕(計 3 件)

Otsu M. Patient-derived iPS cells as a tool for gene therapy research. Rinsho Ketsueki. 2015 Aug; 56(8): 1016-24.

大津 真. iPS 細胞を用いた免疫難病の治療戦略. 炎症と免疫 2015 Oct; 23(6): 544-50.

大津 真: 造血幹細胞 疾患特異的 iPS 細胞を利用した造血研究. Annual Review 血液 2016, 14-20, 2016 Jan

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称:造血幹細胞移植用の組合せ細胞製剤および生着促進剤並びにこれらの製造方法
発明者:大津 真, 中内 啓光, 高橋 聡, 石田 隆
権利者: 国立大学法人東京大学
種類: 特許
番号: 特開 2015-74639 (特願

2013-213024)

出願年月日: 2015 年 4 月 20 日

国内外の別: 国内

名称:造血幹細胞移植を補助することに用いるための医薬組成物およびその製造方法

発明者:大津 真, 中内 啓光, 高橋 聡, 石田 隆, 頼 貞儀, 笹本 賢一

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-80141

出願年月日: 2015 年 4 月 9 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 真 (OTSU, Makoto)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 30361330

(2) 研究分担者

高橋 聡 (TAKAHASHI, Satoshi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 60226834

(3) 研究協力者

頼 貞儀 (LAI, Chen-Yi)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号: 30739925

(4) 研究協力者

石田 隆 (ISHIDA, Takashi)

北里大学・医学部・客員研究員