

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16585

研究課題名（和文）造血幹細胞移植後の骨髄再構築過程と生着不全における責任細胞の分子病理学的解明

研究課題名（英文）Histopathological analysis of bone marrow remodeling process after hematopoietic stem cell transplantation and identification of cells responsible for engraftment failure

研究代表者

倉重 真沙子 (Kurashige, Masako)

大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：10836422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞移植後の骨髄を組織学的に解析し、正常の生着過程では造血細胞が特有のパターンを示して増殖し、骨髄の細胞密度は移植ソースにより異なる経時の変化を示すことを明らかにした。マウスCAR細胞のhuman counterpart(hCAR細胞)は組織学的にはEBF3とCD271で同定できることを確認した上で、異性間移植後の正常生着例の骨髄でin situ キメリズム解析を行い、hCAR細胞が移植後もほぼ全てレシビエント由来であることを明らかにした。さらにhCAR細胞のin situ 遺伝子発現解析で骨髄線維症では前処置前と比較して移植後にCXCL12の発現レベルが上昇することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト造血幹細胞移植後の骨髄再構築過程を組織学的に解析した研究は極めて少なく、本研究では造血様式や細胞密度の変化のみでなく、移植ソースによる違いや組織マクロファージや造血幹細胞ニッチの主たる構成細胞であるCAR細胞のキメリズムの変化まで含めて明らかにした。また、少数例であるが骨髄線維症患者では移植後にCAR細胞のCXCL12発現レベルが上昇することを示した。これらの結果は血液病理学のみでなく移植医療においても重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Histopathological analysis of bone marrow after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) revealed that hematopoietic cells proliferate in a unique manner during the normal engraftment process. The cellularity of the bone marrow showed different secular changes depending on the hematopoietic stem cell source. After confirming that the human counterpart of mouse CAR cells (hCAR cells) can be histologically identified with EBF3 and CD271, we performed in-situ chimerism analysis of hCAR cells after HSCT in cases of normal engraftment and revealed that almost all hCAR cells after HSCT were derived from the recipient. In situ gene expression analysis of patients with myelofibrosis revealed that CXCL12 expression in hCAR cells was significantly elevated after HSCT compared with preconditioning.

研究分野：血液病理

キーワード：骨髄 ニッチ 造血幹細胞移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

移植片の生着不全は造血幹細胞移植における致命的合併症の一つである。その病態については未知の部分が多く、免疫細胞による移植片の攻撃が原因の一つとして考えられているが、これらの免疫細胞がドナー、レシipientのいずれに由来するかは明らかとなっていない。また、造血を支持する間質細胞の異常が病態に関与している可能性も考えられるが、その可能性を検討するには造血細胞や間質細胞の局在情報も含めた組織学的解析が必要である。しかし、造血幹細胞移植後の生着過程を病理組織学的に解析した研究は極めて乏しい。

2. 研究の目的

生着不全の病態解明のため、ヒト骨髓の病理組織標本を用いて、まず正常の生着過程における骨髓組織像の経時的变化を明らかにした上で、骨髓線維症などに伴う生着遅延、生着不全症例の病理組織学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒトの骨髓病理組織標本に HE 染色、ナフトール AS-D クロロアセテート・ギムザ二重染色、鍍銀染色、免疫染色などを行い、移植後の顆粒球、赤芽球、巨核球の造血様式およびリンパ球やマクロファージなどの免疫細胞の数、分布を解析する。

(2) in situ キメリズム解析

in situ キメリズム解析法は、異性間移植例の骨髓 FFPE 標本でターゲット細胞を蛍光免疫染色で同定しながら同時に異性間 FISH の性染色体シグナルを検出する方法である。我々が確立した方法では異性間移植症例であれば組織学的情報とあわせて精度の高いキメリズム解析を行うことができる¹⁾。

(3) in situ 遺伝子発現解析

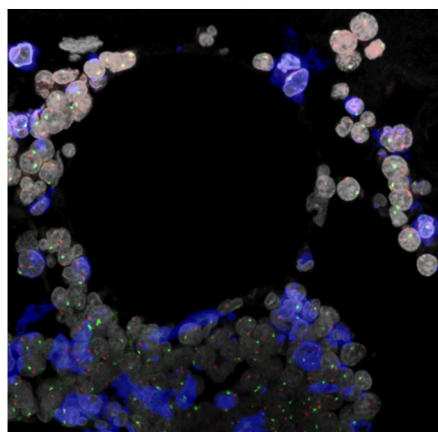
ターゲット細胞を細胞表面マーカームしくは細胞質マーカールで蛍光標識し、サイトカインやハウスキーピング遺伝子の mRNA を RNA in situ hybridization (ISH) により蛍光標識する。共焦点レーザー顕微鏡を用いて立体的に画像を取得し、画像解析ソフトを用いてターゲット細胞内に存在するサイトカインの RNA シグナルをハウスキーピング遺伝子に対して比較定量する。

4. 研究成果

(1) 骨髓破壊的前処置後に正常に生着した約 30 症例の骨髓病理組織標本(HE 標本や免疫染色標本等)を光学顕微鏡下に観察し、造血幹細胞移植後生着期から day100 前後までの骨髓の細胞密度や造血様式の経時的变化を調べた。その結果、移植後 day14 前後の標本では、顆粒球、赤芽球、巨核球に特有の造血様式がみられ、特に臍帯血移植では day28 前後の標本まで確認された。また、細胞密度については移植ソースにより異なるパターンの経時的变化が認められた。

(2) 骨髓破壊的前処置後に正常に生着した 9 症例の骨髓病理組織標本で、マクロファージのマーカールとして CD163 を用いマクロファージの in situ キメリズム解析を行った。CD163 陽性細胞はマクロファージと考えられる大型細胞も含んでおり、全症例移植後約 1 か月程度でその 90%程度がドナー由来細胞により置き換わっていた(図 1)。

図 1
レシipient女性 CD163/X/Y/DAPI



骨髓の造血微小環境は様々な細胞から構成されるが、我々は CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12)-abundant reticular cell/leptin receptor-expressing cell(CAR/LepR+細胞)に着目した。CAR 細胞はマウスを使った実験で長澤丘司らにより発見された骨髓の間葉系幹細胞であり、造血幹細胞ニッチの主な構成細胞である²⁾。CAR 細胞は造血幹細胞の維持・分化に必須のサイトカインである CXCL12 や stem cell factor(SCF)を多量に産生する。我々は CAR 細胞の異常が移植後の造血不全に関与している可能性を考え、ヒトの骨髓組織標本で CAR 細胞の分布や数、キメリズム、造血支持能が移植前後で変化するかを調べた。

(3)本研究の開始時にはマウス CAR 細胞と同等の形態と機能を有する human counterpart に相当す

る細胞は同定されておらず、そのマーカーも不明であった。我々は長澤研との共同研究によりヒトの骨髄組織における CAR 細胞の同定を試みた*3。ヒト骨髄中に存在する細胞を FACS や PrimeFlow 法、多重蛍光免疫染色、RNA in-situ hybridization と蛍光免疫染色を組み合わせた方法等により、ヒト骨髄の間葉系幹細胞のマーカーとして知られていた CD271*4 に陽性となる細胞は骨芽細胞・骨内膜細胞および CXCL12 を高発現する細胞のみであること、

マウスを使った研究で、early B-cell factor 3 (EBF3) が CAR 細胞の骨芽細胞への分化を抑制する転写因子であることと報告されたが*5、ヒト骨髄でも CXCL12 を高発現する細胞は EBF3 mRNA を高発現すること、培養実験で、ヒト骨髄で CXCL12 を高発現する細胞は脂肪生成、軟骨形成、骨形成システムに分化しうることを、組織学的に CD271 に共陽性になる細胞がマウス CAR 細胞と同様に細網状の形態を示し(図 2)、骨髄髓腔内では網目状に分布して CXCL12 を高発現すること(図 3)、ヒトにおいても、CXCL12 を発現する EBF3 陽性細胞が LepR を高発現していることを明らかにした(図 4)。

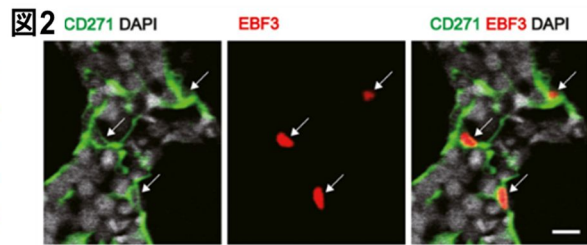
(4)上記の研究でヒトの CAR 細胞が EBF で同定可能であることが明らかになったため、次に造血幹細胞移植により CAR 細胞が移植されるかを、EBF3 をマーカーとした in-situ キメリズム解析により検討した。骨髄破壊的前処置後に異性間移植を受け正常に生着した 7 症例の移植後 day14, day28 前後の骨髄病理組織標本で検討した。EBF3 は CAR 細胞の核に陽性となるため、EBF3 をマーカーとした in-situ キメリズム解析で CAR 細胞の由来を高精度に判定することができた。結果は、EBF3 陽性細胞は全ての症例のどの時点においても 99%以上がレシピエント由来であった(図 5)。つまり、骨髄破壊的前処置を行ってもドナー由来の CAR 細胞はほぼ生着しないことが明らかになった。

(5)正常生着例の移植前後における CAR 細胞の CXCL12 発現レベルの変化を調べた。移植前処置前、移植後 14 日前後の骨髄病理組織標本を用いて、CAR 細胞における CXCL12 の in situ 遺伝子発現解析を行ったが有意差は認められなかった。また、移植前後の CAR 細胞の密度や増殖能の変化についても、EBF3 の免疫染色および MIB-1 と EBF3 の共染色等で検討したが、有意差は認められなかった。

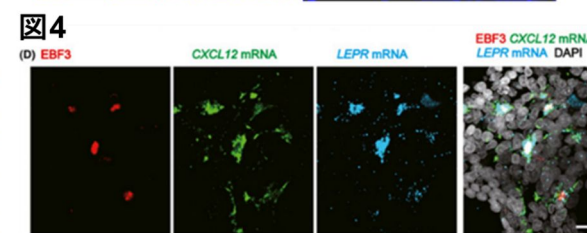
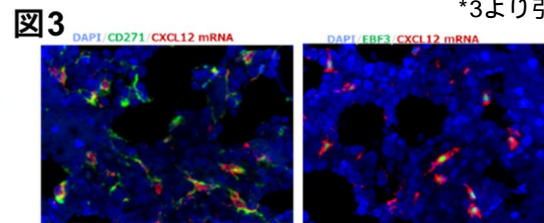
(6)移植後に生着遅延がみられた骨髄増殖性腫瘍関連骨髄線維症症例 2 例で検討したところ、前処置前と比較して移植後 1 か月以内に CXCL12 発現レベルの有意な上昇が認められた。さらに、異性間移植を受けた骨髄線維症患者 1 名の生検標本で in situ キメリズム解析を行ったところ、移植後 day100 までのどの時期においても、EBF3 陽性細胞は全てレシピエント由来であった。骨髄線維症症例については、今後症例数を増やしてさらに検討する予定である。

< 引用文献 >

1. Kurashige M, Kohara M, Ohshima K, et al. Commun Biol. 2018;1:131.
2. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, et al. Immunity. 2006;25(6):977-988.
3. Aoki K*, Kurashige M*, Ichii M, et al. *co-first. Br J Haematol. 2021;193(3):659-668.
4. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, et al. Exp Hematol. 2002;30(7):783-791.
5. Seike M, Omatsu Y, Watanabe, et al. Genes Dev. 2018;32(5-6):359-372.

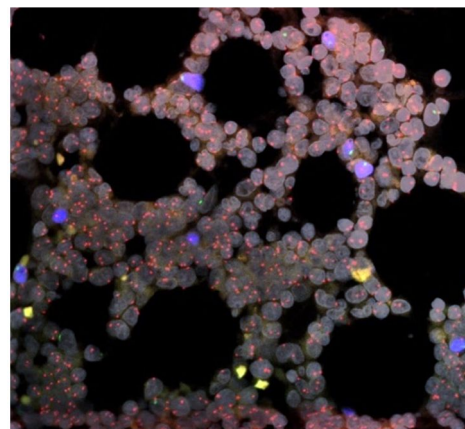


*3より引用



*3より引用

図5
レシピエント男性 EBF3/X/Y/DAPI



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aoki Kazunari, Kurashige Masako, Ichii Michiko, Higaki Kei, Sugiyama Tatsuki, Kaito Takashi, Ando Wataru, Sugano Nobuhiko, Sakai Takashi, Shibayama Hirohiko, Takaori Kondo Akifumi, Morii Eiichi, Kanakura Yuzuru, Nagasawa Takashi, HANDAI Clinical Blood Club	4. 巻 193
2. 論文標題 Identification of CXCL12 abundant reticular cells in human adult bone marrow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 659 ~ 668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17396	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉重 真沙子, 伊藤 雅文, 長澤 丘司, 森井 英一
2. 発表標題 Morphology of hematopoietic system reconstruction following hematopoietic stem cell transplantation
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉重 真沙子
2. 発表標題 骨髓の病理:基礎から病理診断まで 骨髓造血を病理医が理解するための骨髓病理
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------