

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17856

研究課題名（和文）MSC由来細胞外小胞のT細胞急性リンパ芽球性白血病に対する治療応用の基礎的検討

研究課題名（英文）Basic investigation of therapeutic application of MSC-derived extracellular vesicles to T-cell acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

藤井 紀恵 (Fujii, Sumie)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：50834058

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）：多数株・多系統の細胞株にMSC-EVを添加したところ、T-ALL細胞株で特異的に増殖抑制効果を認め、AML細胞株やB-ALL細胞株では増殖は抑制されなかった。MSC-EVのT-ALL細胞に効果を示す分子メカニズムを細胞周期や抗アポトーシス分子の発現などをflow cytometry法やimmunoblot法を用いて検討したところ、がん関連遺伝子の抑制によりMSC-EVが増殖性抑制効果を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T-ALL/T-LBLは、高率に縦隔腫瘍と骨髄浸潤を伴い若年男性に好発する疾患である。既存の治療法での治癒率は約50%であり、標準的な治療法に反応しない難治例や、再発・再燃例の予後はきわめて不良であり、臨床現場では従来の治療法を上回る新しい治療法が熱望されていた。MSCは有効性においても骨髄由来MSCが本邦初の他家由来再生医療等製品（細胞性医薬品）として認可され、日常診療においてGVHDに対して投与されている。臨床展開を視野に入れた場合、MSCやMSCの放出したEVを生体内に投与することについては、他の細胞由来生理活性物質を利用することと比較してアドバンテージがあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：When MSC-EV was added to multilineage cell lines, a growth-inhibiting effect was observed specifically in T-ALL cell lines, but growth was not inhibited in AML cell lines or B-ALL cell lines. MSC-EV investigated the molecular mechanisms by which EVs exert their effects on T-ALL cells, including the cell cycle and the expression of anti-apoptotic molecules, using flow cytometry and immunoblotting, and found that MSC-EVs proliferate by suppressing oncogenes.

研究分野：血液内科

キーワード：間葉系幹細胞 細胞外小胞 T細胞急性リンパ芽球性白血病 T細胞リンパ芽球性リンパ腫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

T-ALL/T-LBL (以下 T-ALL) は急性リンパ性白血病の約 20% 占める。分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害剤の登場で B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (B-ALL)、特にフィラデルフィア染色体陽性症例で治療成績がめざましく進歩した。その一方で、T-ALL の治療は進歩が見られず、約 10 年前に Nelarabine の有効性が示されたが、治療上の課題として不可逆的な神経毒性が存在するといった課題がある (DeAngelo DJ, et al. *Blood* 109:5136, 2007)。多剤併用化学療法や同種造血幹細胞移植の治療に反応しない難治例や再発・再燃例では予後は極めて不良であり、T-ALL の根絶には新規治療法の開発が臨床上の重要課題である。

EV は直径 100 nm 程度の生体粒子で、タンパクや核酸分子などを内包している。細胞から分泌された EV は標的細胞に取り込まれ、様々な生理活性物質を伝搬することから、細胞間コミュニケーションツールとして機能する (Pitt JM, et al. *J Clin Invest* 126:1139, 2016)。悪性疾患では、ガン細胞が分泌する EV は周囲の線維芽細胞や血管内皮細胞に作用し転移や高悪性化に関与することが報告されており、EV を標的としたガンの治療や診断が探索されている (Ochiya T et al. *Drug Delivery System* 29-2:125, 2014)。一方、樹状細胞に作用すると抗腫瘍効果が増強するという報告もある (Zitvogel L, et al. *Nat Med* 5:594, 1998)。このように、EV は physiological にも pathological にも細胞間の双方向のコミュニケーションを制御し、生体の様々な局面において重要な役割を果たしている。

我々はこれまでに、MSC の移植片対宿主病 (GVHD) に対する効果は MSC が分泌する EV によって再現されることを見だし、マイクロアレイ法を用いた網羅的解析によって EV 中の重要なエフェクター分子である microRNA が T 細胞受容体シグナルを抑制するという興味深い知見を得た (*Stem Cells* 36:434, 2018)。本研究課題では、「MSC が分泌する EV が T-ALL 細胞の増殖を抑制するか？」を学術的「問い」とした基礎的検討を行う。

2. 研究の目的

MSC-EV による T-ALL 細胞の増殖抑制効果のメカニズムを解明するとともに、難治性疾患である T-ALL への治療応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

- MSC-EV が T-ALL 細胞に対して特異的に増殖抑制効果を持つことを明らかにする
- MSC-EV の網羅的解析を行いその分子生物学的特徴を明らかにする
- MSC-EV が T-ALL 細胞に効果を示す分子メカニズムを明らかにする

4. 研究成果

1. 多数株・多系統の細胞株に MSC-EV を添加したところ、NALM-6 や BALL-1 (B 細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株)、HEL や K562 (急性骨髄性白血病細胞株) では増殖は抑制されなかったが、T-ALL 細胞株である Jurkat および Molt4 において特異的に増殖抑制効果を認めた。
2. 以前は MSC-EV をポリマー沈殿法により分離していたが、EV の分離のゴールデンスタン

ダードの方法は超遠心法であり，さらに生体に投与できるグレードの EV を精製するため，超遠心法による EV 精製を行った。一般的に知られているようにポリマー沈殿法と比較し超遠心法で得られた EV の収量は少なかった。また，透過型電子顕微鏡では MSC-EV の小型膜小胞の存在が確認できた。さらに，qNano による小胞のサイズ分布と粒子濃度の定量を行ったところ，100nm 程度を中心としたサイズ分布を認めた。

3. さらに増殖抑制効果のメカニズムを明らかにするために細胞周期や抗アポトーシス分子の発現解析を行ったところ，アポトーシスアッセイにおいて MSC-EV によるアポトーシス誘導効果が確認できた。さらにはメイギムザ染色においても細胞形態に変化が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Fujishiro Aya, Iwasa Masaki, Fujii Sumie, Maekawa Taira, Andoh Akira, Tohyama Kaoru, Takaori-Kondo Akifumi, Miura Yasuo	4. 巻 112
2. 論文標題 Menatretrenone facilitates hematopoietic cell generation in a manner that is dependent on human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 316～330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02916-8	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Fujishiro Aya, Iwasa Masaki, Fujii Sumie, Maekawa Taira, Andoh Akira, Tohyama Kaoru, Takaori-Kondo Akifumi, Miura Yasuo	4. 巻 112
2. 論文標題 Correction to: Menatretrenone facilitates hematopoietic cell generation in a manner that is dependent on human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 599～602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02993-9	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 三浦 康生、藤井 紀恵	4. 巻 61
2. 論文標題 ヒト間葉系幹細胞を応用した急性GVHD治療の展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 953～958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.953	査読の有無 有
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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小嶋隼人, 松浦秀哲, 足立奈緒子, 小栗あずさ, 加藤七海, 杉浦緑, 藤井紀恵, 三浦康生
2. 発表標題 カラム凝集法ウラ検査におけるIgG抗体による凝集増強の影響
3. 学会等名 第52回藤田学園医学会学術発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木良佳, 松浦 秀哲, 杉浦縁, 荒川章子, 松野 貴洋, 及川彰太, 白木真理, 坂本悠斗, 林由芽, 藤井紀恵, 三浦康生
2. 発表標題 稀血患者の危機的出血への輸血部対応
3. 学会等名 第52回藤田学園医学会学術発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井紀恵、藤城綾、前川平、高折晃史、三浦康生
2. 発表標題 さい帯血由来間葉系幹細胞が分泌する細胞外小胞はT細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川彰太, 松浦秀哲, 杉浦縁, 林由芽, 坂本悠斗, 白木真理, 松野貴洋, 西垣亮, 加藤友理, 太田貴江, 荒川章子, 藤井紀恵, 三浦康生
2. 発表標題 新生児における移行抗体の検討
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川田聖也、松浦秀哲、杉浦縁、荒川章子、西垣亮、及川彰太、松野貴洋、白木真理、坂本悠斗、林由芽、藤井紀恵、三浦康生
2. 発表標題 低出生体重児に対する予防的血小板輸血と予後に関する後方視的研究
3. 学会等名 第51回藤田学園医学会学術発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井紀恵
2. 発表標題 臍帯血を細胞治療へ応用する基盤開発
3. 学会等名 第2回 藤田医科大学病院輸血細胞治療セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 貴江 松浦 秀哲 鈴木 良佳 磯部 凌輔 林 由芽 坂本 悠斗 白木 真理 松野 貴洋 及川 彰太 藤木 翔太 西垣 亮 加藤 友理 荒川 章子 杉浦 縁 藤井 紀恵 三浦 康生
2. 発表標題 当院における輸血副作用について後方視的検討
3. 学会等名 第74回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会
4. 発表年 2020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
---------	---------