

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591240

研究課題名（和文） ヒトリンパ球分化機構の解明と移植療法への応用

研究課題名（英文） Understanding of mechanism of human lymphopoiesis and clinical application to cell therapy

研究代表者

大石 晃嗣（OHISHI KOHSHI）

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00397506

研究成果の概要（和文）：我々は、hTERT 遺伝子導入不死化ヒト骨髄由来ストローマ細胞が、ヒト造血前駆細胞から、CD19⁺CD10⁺cyCD79a⁺CD20⁺VpreB⁻ proB と CD7⁺CD45RA⁺CD56⁻cyCD3⁻ T/NK リンパ球系前駆細胞の生成を支持することを見出し、この培養系を用いて flt3L が両方のリンパ球系前駆細胞の生成において、中心的な役割を果たしていることを明らかにした。これらのリンパ球系細胞の分化には、ストローマ細胞との接着は必ずしも必要でなかった。さらに、Notch ligand Delta をストローマ細胞に遺伝子導入し、T 細胞分化への作用、および、細胞移植療法への応用を検討した。

研究成果の概要（英文）：

Telomerized human bone marrow stromal cells supported the simultaneous generation of CD19⁺CD10⁺cyCD79a⁺CD20⁺VpreB⁻ proB and CD7⁺CD45RA⁺CD56⁻cyCD3⁻ early T/NK cell precursors from human hematopoietic progenitors. The generation of both lymphoid precursors was promoted by flt3 ligand. Early B and T/NK development could occur without direct contact with stromal cells. We also examined the role of Delta ligand expression on the stromal cells in T cell differentiation and clinical application to T cell therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：Tリンパ球 Bリンパ球 分化 ストローマ細胞

1. 研究開始当初の背景

再発・難治性の造血器腫瘍に対しては、造血幹細胞移植が行われることが多くなっているが、特に、臍帯血移植の成績は未だ十分ではない。その理由として、リンパ球系細胞を含む血液細胞の回復が遅いこと、Graft-versus-leukemia (GVL) 効果が高く

ないことが考えられる。しかしながら、ヒトリンパ球系細胞の分化・増殖制御機構は、未だ十分には明らかになっておらず、GVL 効果を高める方法も確立されていない。

今日に至るまで、B 細胞系分化は、MS-5 などのマウス由来の骨髄ストローマ細胞との共培養系により、T 細胞系分化は、Notch

ligand Delta-1 を発現するマウス OP-9 ストローマ細胞との共培養により、別々に行われており、包括的に解析する培養システムは確立されていない。また、これらのマウスストローマ細胞を用いた培養系から得られる知見は、実際のヒト造血系での分化とは異なる可能性がある。さらに、これらのマウスストローマ細胞を使った培養系を用いて T 細胞を生成しても、マウス由来の細胞からの潜在的なウイルス感染の可能性があり臨床応用は難しい。そこで研究代表者は、これまでヒト造血前駆細胞から骨髄球系細胞への分化・増殖を支持することが報告されている Human telomerase catalytic subunit (hTERT) 遺伝子導入による不死化ヒト骨髄由来ストローマ細胞に注目し、このストローマ細胞が、ヒト造血前駆細胞からのリンパ球系細胞の分化・増殖を支持するか研究を開始した。

近年、腫瘍特異的 T cell receptor (TCR) を T 細胞に遺伝子導入した免疫療法の有効性が示された。この方法を、アロの造血幹細胞移植で用いる場合を想定すると、ドナーの T 細胞に遺伝子導入された TCR は、ドナーの HLA のタイプに関係なく、レシピエントの HLA に提示されるペプチドを認識するはずであり、HLA ミスマッチ移植の多い臍帯血移植において極めて有効な治療戦略となると考えられる。しかし、従来の末梢血中の成熟 T 細胞に TCR を遺伝子導入する方法では、① TCR の発現が内因性 TCR と競合し減弱する ② 成熟 CD8⁺T 細胞の寿命は短く効果は一時的 ③ 内因性 TCR との間でキメラ TCR を形成し自己抗原への反応を獲得する危険がある ④ 臍帯血から十分な数の成熟 T 細胞は得られない、などの問題がある。そこで、内因性 TCR を発現していない造血前駆細胞に腫瘍特異的 TCR を遺伝子導入し、ある程度 T 細胞系細胞に分化させてから移植することにより、寿命が長く腫瘍特異的 TCR を高く発現している T 細胞が生成され、高い抗腫瘍効果を持続させることができるのではないかと考え西川博嘉博士 (研究分担者) と共同研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、ヒト B および T リンパ球系細胞の分化・増殖を同時に解析できる培養系を確立し、その培養系を用いて、造血因子などによる制御機構を明らかにし、移植後のリンパ球系細胞の回復を促進する方法を見出すことである。さらに、この培養系を改良し、新たな移植免疫療法の開発をめざすことである。

1) T・B リンパ球系細胞の分化支持能: 不死化ストローマ細胞が、造血前駆細胞から、B のみならず、T リンパ球系細胞分化を支持す

るか、もし支持するとしたら、どの分化段階まで分化を支持するか検討する。

2) リンパ球系細胞の生成に関与する造血因子を明らかにする:

ヒト造血前駆細胞からリンパ球系細胞の生成にどのような造血因子がどのような役割を果たしているか、この培養系を用いて、明らかにする。

3) Delta-1 あるいは Delta-4 を遺伝子導入した不死化ストローマ細胞の T 細胞分化への作用を検討する: Delta-1 を発現した M-CSF 欠損マウス由来のストローマ細胞は、ヒトの造血前駆細胞から成熟 T 細胞までの分化を支持する。ヒト不死化ストローマ細胞は、Delta-1 や Delta-4 の mRNA を少量発現している。そこで、Delta-1 や Delta-4 をヒト不死化ストローマ細胞に遺伝子導入し、ストローマ細胞が発現する Delta ligand の T 細胞分化における役割を明らかにする。

4) 腫瘍特異的 TCR 遺伝子の T 前駆細胞への遺伝子導入の有用性: がん抗原の一つである MAGE-A4 を認識する TCR を造血前駆細胞に遺伝子導入した後に T 細胞へ分化させることにより、内因性の TCR を発現しない T 前駆細胞を生成しうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 不死化ストローマ細胞での B/T リンパ球系細胞の分化・増殖の解析

不死化ストローマ細胞は、12.5% FCS 12.5% horse serum α -MEM 培地で継代する。臍帯血造血前駆細胞を種々の造血因子を含む 20%FCS α MEM で培養し、3 週間後の主に B、T リンパ球系細胞の生成の有無と分化段階について、FACS を用いて検討する。次に、これらのリンパ球系細胞の分化・増殖を促進する造血因子を明らかにする。生成されたリンパ球系細胞の性格をさらに明らかにするために、T cell receptor や免疫グロブリンの再構成、lineage 特異的な遺伝子の発現などを PCR 法で検討する。

2) Delta-1 あるいは Delta-4 を発現するヒト骨髄由来不死化ストローマ細胞の作製と T 細胞分化支持能の検討

Delta-1 や Delta-4 の full length cDNA を、野阪哲哉博士 (連携研究者) の開発した pMXs-IG ベクター (pMX-IRES-EGFP) に挿入し、レトロウイルスパッケージ細胞 (PlatA) にトランスフェクションした後、Delta1/Delta-4-IRES-GFP を発現する組み換えレトロウイルスベクターを不死化ストローマ細胞に遺伝子挿入する。

3) TCR の T 前駆細胞への遺伝子導入。

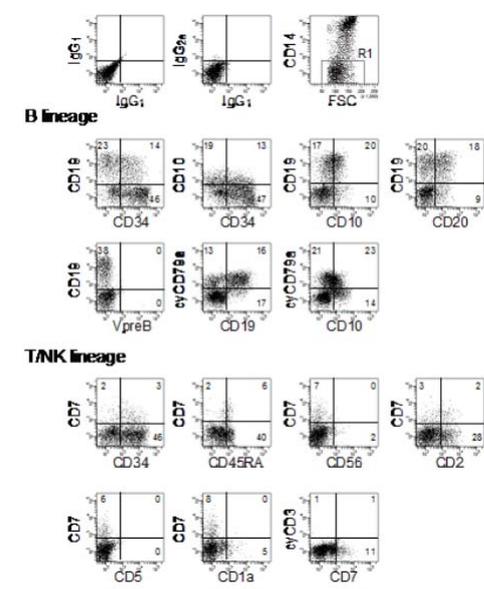
以上の実験で、CD7⁺T 前駆細胞が効率よく生

成できる培養系が確立したならば、次に、T前駆細胞にTCRを遺伝子導入する。当大学ワクチン治療部ではHLA A2402を持ちMAGE-A4を発現する多発性骨髄腫の患者の末梢血T細胞に、HLA-A2402拘束性にMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁を認識するTCRのレトロウイルスベクターを導入する臨床治験の準備をしており、テトラマーや機能解析システムが整っているため、まずこのTCRを造血前駆細胞に遺伝子導入する。Delta-1/Delta-4発現ヒストローマ細胞や、すでに成熟T細胞まで分化を支持することが確認されているDelta-1発現OP-9ストローマ細胞存在下でFlt3LとIL-7と共に培養し、CD8⁺T細胞まで分化させる。このCD8⁺T細胞におけるTCRが、遺伝子導入したTCR由来か、内因性のポリクローナルなものを、遺伝子解析により明らかにする。

4. 研究成果

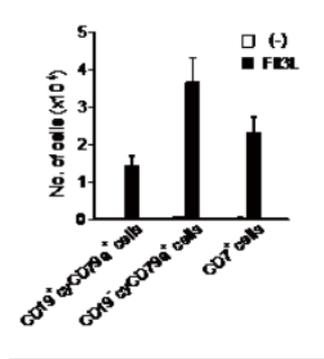
CD34⁺CD38^{lo/-}CD19⁺CD10⁺CD7⁻ヒト造血前駆細胞を、hTERT 遺伝子導入不死化ヒト骨髄由来ストローマ細胞と3週間共培養したところ、CD19⁺proB、CD7⁺CD56⁺CD45RA⁺T/NKリンパ球系前駆細胞の生成を支持することを見出した(図1)。

図1



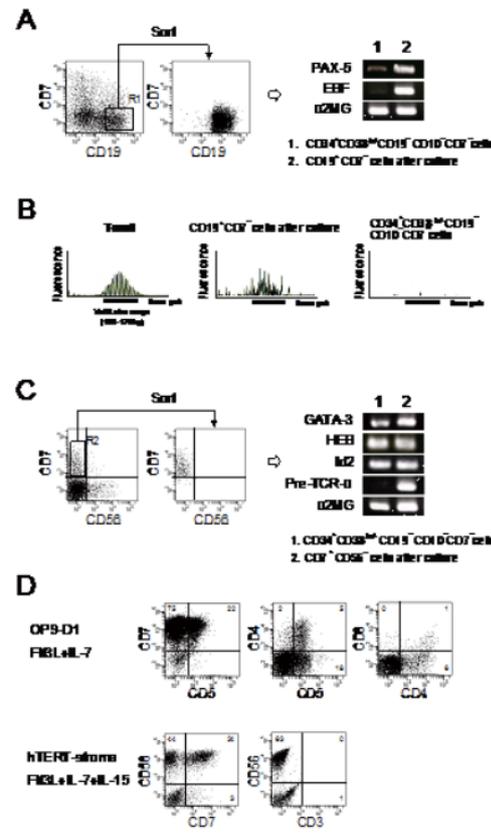
この培養系に、flt3Lを添加すると、B・T両方のリンパ球系前駆細胞の生成を促進した(図2)。

図2



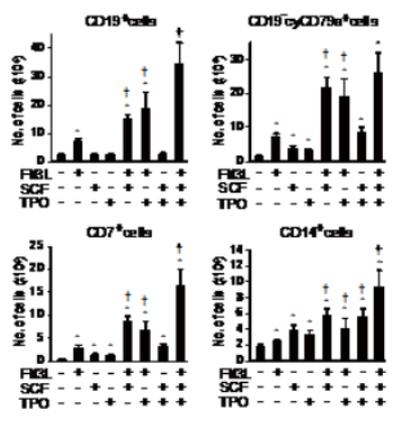
生成されたCD19⁺細胞は、B lineage細胞に特異的に発現するPAX5やEBFを発現し(図3A)、免疫グロブリンVDJ鎖のポリクローナルな再構成がみられた(図3B)。一方CD7⁺細胞は、T/NK lineage細胞に特異的なHEB、ID2、Pre-TCR- α 遺伝子を発現しており(図3C)、NKおよびT細胞への分化を促す培養系で各細胞への分化がみられた(図3D)。

図3



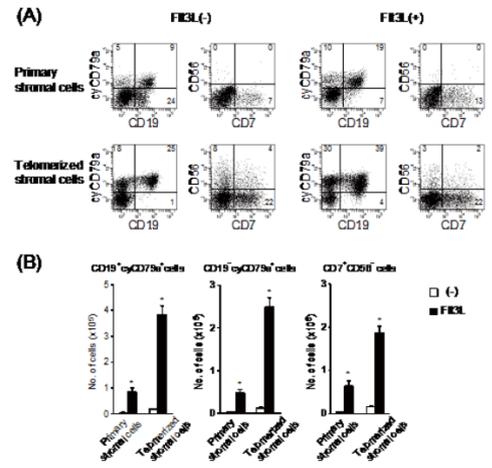
また、SCF や TPO は、単独ではB・Tリンパ球系前駆細胞の生成に影響を与えないものの、flt3L 存在下にて、両方のリンパ球系前駆細胞の生成を促進した (図4)。

図4



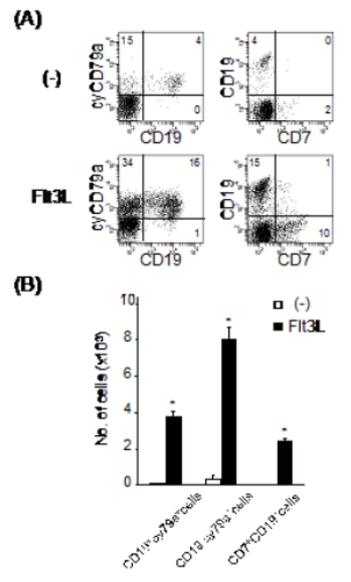
不死化ストローマ細胞との共培養でみられたBおよびT細胞系分化の支持や、flt3L によるこれらの細胞の生成の促進作用は、正常骨髄由来のストローマ細胞との共培養でも観察された (図5A, B)。

図5



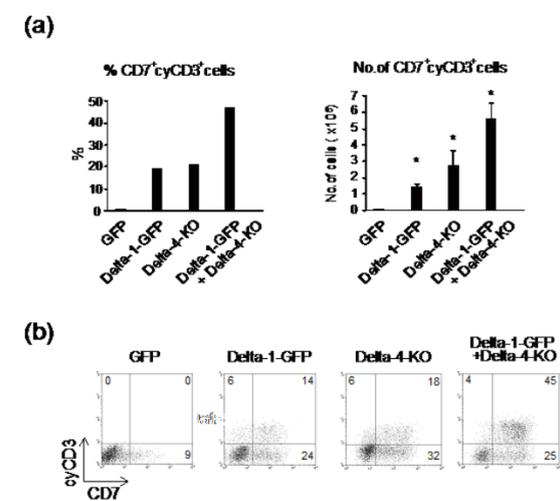
興味深いことに、これらのBおよびTリンパ球系細胞の分化は、造血前駆細胞とストローマ細胞との接着を insert plate で阻害してもみられた。これらのデータから、T・Bリンパ球系細胞の初期分化には、ストローマ細胞との直接の接着は、必ずしも必要でないことが示唆された (図6a, b)。

図6



さらに、このストローマ細胞に、Notch ligand Delta-1 あるいは Delta-4 を発現させると、CD7⁺cyCD3⁺CD1a⁻ preT 細胞への生成が促進され、B 細胞分化は抑制された。Delta-1 と Delta-4 を共発現させると、preT 細胞の生成は、相加的に促進した (図7 a, b)。

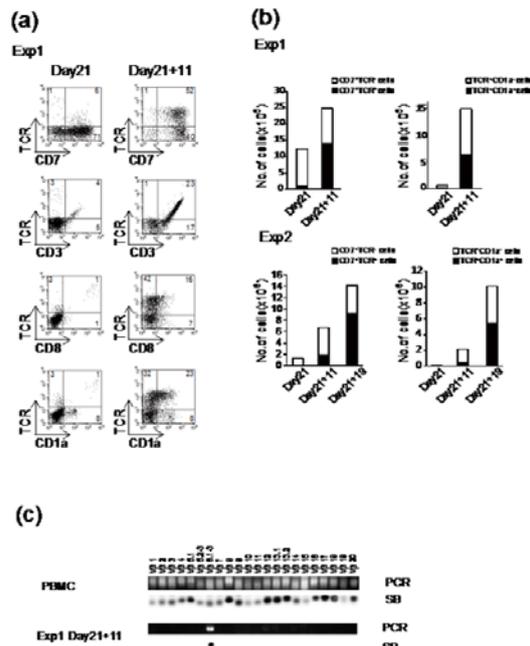
図7



ヒト CD34⁺細胞に、MAGE-A4 を認識する T cell receptor (TCR) を遺伝子導入し、Delta-1 と Delta-4 の両方を発現する不死化ストローマ細胞と共培養すると、CD7⁺CD3⁺TCR⁺CD1a⁻ preT が生成された (図 8a, b: Day21)。これらの培養細胞を、成熟 T 細胞への分化を支持する Delta-1 発現 OP-9 ストローマ細胞で IL-7+flt3L 存在下で培養すると、CD7⁺CD1a⁺CD8⁺ T 細胞への分化・増殖がみられた (図 8a, b: Day 21+11)。TCR の免疫グロブリンの再構成を検査したところ、TCR は、遺

伝子導入した TCR 由来であった (図 8c)。

図 8



前半の部分 (図 1-6) は、Br J Haematol 157 (6):674-86, 2012 に報告し、後半 (図 7, 8) は、近く投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Nakamori Y, Liu B, Ohishi K, Suzuki K, Ino K, Matsumoto T, Masuya M, Nishikawa H, Shiku H, Hamada H, Katayama N. Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: A principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. Br J Haematol. 157(6):674-86, 2012 (査読有)
2. Liu B, Ohishi K, Yamamura K, Suzuki K, Monma F, Ino K, Nishii K, Masuya M, Sekine T, Heike Y, Takaue Y, Katayama N. A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis. Exp Hematol 38:685-695, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Nakamori Y, Ohishi K, Liu B, Masuya M, Hamada H, Katayama N. Evaluation of Role for flt3L in Human Early B and T/NK Lymphopoiesis in a Novel Stromal Cell Culture System.

53rd ASH annual Meeting and Exposition, Poster, December 10-13, 2011 San Diego, USA

2. 中森良樹 大石晃嗣 劉冰 榊屋正浩 濱田洋文 片山直之

Evaluation of role for flt3 ligand in human lymphopoiesis with telomerized human stromal cells.

第 73 回日本血液学会学術集会 一般口演 平成 23 年 10 月 15 日 名古屋

3. Liu B, Ohishi K, Masuya M, Hamada H, Katayama N.

Important role for flt3 Ligand in the generation of early B and T cell precursors from human primitive hematopoietic progenitors, revealed by telomerized human stromal cells.

54nd American Society of Hematology Meeting, Poster, December 5, 2010, Orland, FL, USA

4. Ohishi K, Liu B, Masuya M, Heike Y, Takaue Y, Katayama N.

Evaluation of potential role for Valproic Acid in IL-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis in serum-free and serum-containing cultures.

51st ASH Annual Meeting. Poster, December 5-8, 2009 New Orleans, LA, USA

5. Liu B, Ohishi K, Suzuki K, Masuya M, Hamada H, Nishikawa H, Shiku H, and Katayama N. Crucial role of flt3 ligand in human early B/T lymphopoiesis revealed by telomerized stromal cells.

第 71 回日本血液学会学術集会 平成 21 年 10 月 24 日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 晃嗣 (OHISHI KOSHI)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00397506

(2) 研究分担者

西川 博嘉 (NISHIKAWA HIROYOSHI)
大阪大学・免疫フロンティア研究センター・特任准教授
研究者番号: 104444431

(3) 連携研究者

野阪 哲也 (NOSAKA TETSUYA)
研究者番号: 30218309