

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25年 6月12日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590372

研究課題名（和文） 同種造血幹細胞移植マウスを用いた非侵襲性の新しい生体内蛍光イメージング

研究課題名（英文） Non-invasive *in vivo* fluorescence imaging in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mouse model

研究代表者

五十嵐 美德（IKARASHI YOSHINORI）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：70280782

研究成果の概要（和文）：移植片対宿主病や移植片対白血病効果の機序を解明するために同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の動態を非侵襲的に観察できる生体内蛍光イメージング法を確立した。蛍光蛋白質遺伝子導入マウス由来のドナー細胞を単一細胞レベルでリアルタイムに耳介で非侵襲的に観察することができた。さらには非侵襲性の生体内蛍光イメージングは同種造血幹細胞移植に対する免疫制御薬剤の効果判定に有益な手法であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established non-invasive *in vivo* fluorescence imaging which enable understanding the process of the graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The localization and movement of donor cells from fluorescent protein transgenic mice were non-invasively visualized in the ear pinna. Furthermore, this imaging is very useful tool for evaluation of immunomodulatory drugs for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：同種造血幹細胞移植、移植片対宿主病、生体内蛍光イメージング、GFP

1. 研究開始当初の背景

（1）近年の生体イメージング技術の飛躍的な発展は生命現象を可視化し、時空間的な情報を高精度に検出することが可能となった。生

体イメージングは生命現象の解析に必要な不可欠な技術の一つである。

（2）生体イメージングの中でも蛍光イメー

ジングは動的な観察に最適で、リアルタイムに高感度に標的（細胞や蛋白質）をイメージングすることができる。さらには、多くの種類の蛍光蛋白質や蛍光色素があることから、それらを組み合わせで、複数の標的を同時にイメージングすることができる。

（3）蛍光イメージングは多くの利点がある反面、組織の表面の観察のみで、深部の観察に適さないことから、外科的な侵襲が伴う場合が多い。また同一個体を経時的に観察することに不向きである。

（4）多光子レーザー顕微鏡を用いて深部（0.5mm 以下）のイメージングも可能であるが、侵襲を伴う場合も多い。さらに深部を観察するには新しい蛍光蛋白質、色素や検出器等の開発が待たれる。

（5）同種造血幹細胞移植は白血病の有効な治療法の一つである。しかし、重篤な副作用である移植片対宿主病（GVHD）が問題となり、治療成績の向上には GVHD の制御が重要な課題である。

（6）GVHD は宿主の主要組織適合遺伝子複合体抗原に反応するドナーT 細胞によって惹起される。同種造血幹細胞移植後は、GVHD の他にドナー免疫細胞による移植片対白血病効果（GVL）やドナー造血幹細胞による造血・免疫系の再構築などが起きてくる。

（7）同種造血幹細胞移植後、ドナー細胞は宿主との相互作用により、その局在や増殖が刻一刻と変化する。ドナー細胞の時空間的な動態を包括的に観察することは同種造血幹細胞移植後の生体内での GVHD や GVL などの免疫応答や造血・免疫系の分化・再生の機序の解明には必要である。

2. 研究の目的

（1）同種造血幹細胞移植は GVHD、GVL や造血・免疫系の再生など、複数のドナー細胞サブセットと宿主との相互作用によって、病態の形成、抗腫瘍効果や造血・免疫系の再構築などが起きる。これらの機序を解明するためには、ドナー細胞の動態を包括的に解析する必要があると考えられる。

（2）同種造血幹細胞移植後の生体内での複雑なドナー細胞の動態を解析するには生体蛍光イメージングは有効な手法であると考えられる。しかしながら、蛍光を用いた生体イメージングでは外科的侵襲を伴う。本研究では蛍光イメージングの長所を活かしながら、経時的にドナー細胞を観察することができる非侵襲性の生体蛍光イメージング法を

確立することが目的である。

（3）非侵襲性の生体蛍光イメージングを確立するために、GVHD の標的組織の一つである皮膚に着目した。皮膚は侵襲を与えることなく観察できる組織である。同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の動態を皮膚で非侵襲的に蛍光イメージングすることを目標として、以下のことを明らかにする。

①GFP、DsRed などの蛍光蛋白質遺伝子導入（Tg）マウスをドナーとして同種造血幹細胞移植を行い、マウスに侵襲を与えないでドナー細胞をイメージングすることができるか明らかにする。また、観察に最適な皮膚の場所を明らかにする。

②非侵襲性の生体蛍光イメージングと従来の免疫組織学的な解析法とを比較し、相違点（検出感度、定量性など）を明らかにする。

③マルチカラー（2 種類の蛍光蛋白質 Tg マウス由来の細胞を同時に観察）による非侵襲性の蛍光イメージングが可能か明らかにする。

④確立した非侵襲性の生体蛍光イメージングが GVHD の発症の解明あるいは制御する薬剤のスクリーニング等に有効であるか明らかにする。

3. 研究の方法

（1）同種造血幹細胞移植モデルとして、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウス（B6-GFP マウス）をドナーとし、その脾臓細胞および骨髓細胞を（C57BL/6 x DBA/2）F1 マウスに尾静脈より移植した。また、B6-GFP マウスに加えて、赤色蛍光蛋白質の Tg マウスである C57BL/6-Tg(CAG-DsRed) マウス（B6-DsRed マウス）をドナーとして用いた。

（2）移植後、マウスを経時的に屠殺し、解剖し小動物蛍光観察システム（OV110、オリンパス）を用いてマウス個体全身でのドナー細胞（GFP 陽性細胞）の局在の変化をイメージングにより解析した。

（3）マウスに侵襲を与えないで、ドナー細胞（GFP 陽性）をイメージングするために、マウスの体表を麻酔下で、OV110 で観察した。またマウスの体毛の一部を剃毛して観察した。

（4）非侵襲性の生体蛍光イメージングを用いて、同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の耳介での浸潤の経時的な変化を、マウスを麻酔下で、OV110 でイメージングした。

（5）移植後に耳介を採取し、凍結切片を作製しドナー細胞（GFP 陽性細胞）を蛍光顕微鏡で観察した。非侵襲的に OV110 を用いた観察

と凍結切片での GFP 陽性細胞の検出感度の相違等について比較、検討した。

(6) 本研究で確立した非侵襲性の生体蛍光イメージングが同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の応答を制御あるいは修飾する薬剤の影響を評価することができるか検討した。免疫修飾薬剤として、GVHD の増悪因子としてクロトンオイル (単純刺激物質)、抑制する薬剤としてデキサメサゾン (ステロイド) を用いた。

①移植後、3 時間あるいは 7 日目にマウスの右耳介にクロトンオイルあるいはデキサメサゾンをそれぞれ塗布した。左耳介にはコントロールとして溶媒のみを塗布した。経時的に耳介を、OV110 を用いて蛍光イメージングした。ドナー細胞の浸潤を定量 (単位面積当たりの GFP 陽性細胞を数えた。) あるいは半定量化 (単位面積当たりの蛍光量を算出した。) し、免疫修飾薬剤の及ぼすドナー細胞の浸潤に対する影響を評価した。

②免疫修飾薬剤による効果 (細胞浸潤の抑制あるいは促進) を従来の免疫組織学的な手法と蛍光イメージングによる定量法を比較するために、蛍光イメージング後、耳介を採取し、凍結切片を作成し、GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察し、数えてコントロールと比較した。

(7) 非侵襲性のマルチカラー蛍光イメージングは B6-GFP マウスに加えて B6-DsRed マウスの 2 種類をドナーとして移植した後に、マウスを麻酔下で耳介で、2 種類の細胞を、OV110 を用いてイメージングした。GFPA バンドパスフィルターあるいは RFP バンドパスフィルターをそれぞれ用いて、GFP あるいは RFP 陽性細胞をそれぞれ検出した。

4. 研究成果

(1) 同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の生体蛍光イメージングによって以下のことを明らかとした。

①OV110 を用いた生体蛍光イメージングはマウス個体全体のドナー細胞の局在から、単一細胞レベルまでドナー細胞をイメージングすることができる有用な方法であった。

②移植後、マウスを屠殺し、マウス個体全体のドナー細胞の局在を蛍光イメージングした結果、移植後の早期に主に 2 次リンパ組織 (リンパ節、脾臓など) に局在し、その後、2 次リンパ組織で増大し、全身へ浸潤あるいは増大していることが明らかとなった。

(2) 非侵襲性の生体蛍光イメージングによって以下のことを明らかとした。

①麻酔下で移植後、2 週間以上を経過したマウスの体表を生体蛍光イメージングした

結果、耳介、手足や剃毛された皮膚など、体毛の無い場所で緑色蛍光が観察された。つまりドナー細胞が存在することが確認された。

②特に耳介は表皮が薄いことや体毛が少ないことから、ドナー細胞 (GFP 陽性細胞) を単一細胞レベルでイメージングすることができる最適な組織であった。移植後 1 日目にはすでに少数の GFP 陽性細胞を検出することができた。その後、徐々に GFP 陽性細胞は増加し、耳介の先端を除き、全体が緑色蛍光をおびるまでドナー細胞が増加した。

③これまで、血管内での GFP 陽性細胞の観察にはスキンプラップ法を用いて、マウスに侵襲をあたえて、皮下の血管やリンパ管内のドナー細胞をイメージングしていた。しかし、耳介は細い血管内を移動する GFP 陽性細胞を、侵襲を与えることなく蛍光イメージングすることができた。血管内を早く動く細胞や非常にゆっくり動く細胞の両者が観察された。

④B6-GFP マウスおよび B6-DsRed マウスをドナーとして移植した後に、耳介で両者の細胞を同時に単一細胞レベルで検出することができた。また GFPA バンドパスフィルターあるいは RFP バンドパスフィルターをそれぞれ用いることによって、GFP 陽性細胞あるいは DsRed 陽性細胞をそれぞれ観察することができた。検出感度は GFP 陽性細胞の方が高かった。

⑤以上の結果から耳介は同種造血幹細胞移植後のドナー細胞を非侵襲的に観察する最適な組織であることが明らかとなった。

(3) 非侵襲性の生体蛍光イメージングを用いた同種造血幹細胞移植に対する免疫抑制剤の影響の評価

①クロトンオイルを耳介に塗布することによって、移植後 1 日目のドナー細胞の浸潤が促進することを非侵襲性の生体蛍光イメージングを用いることによって明らかにした。また、移植後 1 日目の凍結切片および蛍光イメージングによる浸潤するドナー細胞を比較した場合、同様にクロトンオイル塗布した耳介で多かった。蛍光イメージングの方が耳介の広範囲を観察することができるので、より多くのドナー細胞を数えることができた。

②デキサメサゾンを耳介に塗布することによってドナー細胞の浸潤が抑制されることが半定量的な非侵襲性の生体蛍光イメージングによって明らかになった。

③生体蛍光イメージングを用いて、GVHD を修飾する薬剤の及ぼす影響を評価するうえで、耳介は同一個体で経時的な観察や加え、片方の耳介がコントロールとなるために、同一個体で薬剤の効果を比較することができた。GVHD を制御する薬剤のスクリーニングに用

いることが可能であった。

(4) 本研究成果は蛍光イメージングの利点(高感度の検出、2種類の細胞を検出できるなど)を活用し、問題点である、侵襲性や経時的観察に不向きなどの点を克服するためにGVHDの標的臓器である皮膚に着目し、耳介を観察することによってドナー細胞を単一細胞レベルおよびリアルタイムに観察できるシステムを確立した。このイメージング法は同種造血幹細胞移植後のGVHDの発症機序やGVLの機序の解明に有用な方法である。これらの実験システムは同種造血幹細胞移植のみならず、腫瘍細胞の転移、臓器移植などにも活用できると考えられる。また、アポトシースや細胞周期などの機能をイメージングする技術を加えることによって、さらに生体での移植された細胞の運命を詳細に解析できる。

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2件)

- ① Takahiro Yamazaki, Yoshinori Ikarashi et al. (10名中10番目)、Real-time *in vivo* cellular imaging of graft-versus-host disease and its reaction to immunomodulatory reagents、*Immunology Letters*、査読有、144巻、2012、33-40
DOI:10.1016/j.imlet.2012.03.004
- ② Kenta Narumi, Yoshinori Ikarashi et al. (13名中6番目) *In vivo* delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance in reconstituted lymphopenic hosts、*Gene Therapy*、査読有、19巻、2012年、34-48
DOI: 10.1038/gt.2011.73.

[学会発表] (計5件)

- ① Yoshinori Ikarashi、NKT cell-ligand inhibits donor engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation、日本癌学会、2012年9月20日、札幌市
- ② Takeshi Udagawa、Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses immunotolerant environment in tumors、日本癌学会、2011年10月5日、名古屋市
- ③ Yoshinori Ikarashi、The effect of NKT cell ligand for donor cell engraftment by *in vivo* fluorescence imaging in Allogeneic HSCT、日本癌学会、2011年

10月3日、名古屋市

- ④ Yoshinori Ikarashi、Screening of immunomodulating drugs for graft-versus-host disease by *in vivo* fluorescence imaging、ISCT Asia-Pacific Regional meeting、2010年10月18日、宮崎市
- ⑤ Yoshinori Ikarashi、Differential chimerism of Langerhans cells, dermal dendritic cells and dendritic epidermal T cells after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation、International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology、2010年9月29日、ルガーノ スイス
- ⑥ Yoshinori Ikarashi、Noninvasive monitoring of donor cell infiltration in mouse graft-versus-host disease using *in vivo* fluorescence imaging、日本癌学会、2010年9月24日、大阪市

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 美德 (IKARASHI YOSHINORI)
(独) 国立がん研究センター・研究所・主任研究員
研究者番号: 70280782

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: