

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590479

研究課題名(和文)多色細胞系譜追跡法による胸腺上皮細胞ネットワーク構築過程の解析

研究課題名(英文) Analysis of three dimensional architecture of thymic epithelial cells by the multicolor lineage tracing method

研究代表者

保坂 直樹 (HOSAKA, Naoki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30388459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺はT細胞の教育を担当する臓器で、その重要な機能を担う細胞が胸腺上皮細胞である。胸腺上皮細胞の3次元構造の意義を解析する為に、正常および免疫不全モデルマウスの胸腺上皮細胞の3次元構造について共焦点顕微鏡にて解析したが、これまで胸腺上皮細胞の構築異常を来している免疫不全モデルマウスは見いだされていない。又、骨髓移植、あるいは並体結合の系にて胸腺上皮細胞と血球細胞の細胞融合の有無を検討したが見いだされなかった。胸腺上皮細胞の発生過程の細胞融合の意義については今後の研究課題と思われる。又、胸腺移植を併用した新しい骨髓移植法を開発した。本方法は従来の方法では治療困難だった疾患にも有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：Thymus is an organ in which progenitors for T lymphocytes are educated. Cortical and medullary thymic epithelial cells are responsible for T lymphocyte education. We have investigated the significance of 3-D architecture of thymic epithelial cells by using immunodeficiency model mice. However, so far, no abnormality has been found in the model mice. My collaborator, Hiroo Ueno has found that some of thymic epithelial cells undergo cell fusion during development. Therefore, we have tested in this study if thymic epithelial cells undergo cell fusion after bone marrow transplantation, or in a physiological condition by parabiosis. However, no cell fusion was detected. The significance of cell fusion during development is now under investigation.

We have also developed a new allo-hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) method, allo-HSCT + thymus transplantation (TT). This method is effective in the treatment of several intractable diseases, for which conventional methods are ineffective.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：胸腺上皮細胞 細胞融合 骨髓移植 胸腺移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 胸腺は T 細胞の教育を担当する臓器であり、不要な T 前駆細胞の positive selection, negative selection が行われており、その重要な機能を担う細胞が胸腺上皮細胞である。胸腺上皮細胞はその存在位置から、皮質胸腺上皮細胞(c-Tec)と髄質胸腺上皮細胞(m-Tec)に分類され、前者が positive selection, 後者が negative selection を担当している。しかし双方ともマウス胎生期 e12.5 に出現する FoxN1 陽性細胞に由来すると考えられている。

(2) 皮質胸腺上皮細胞は非常に複雑な突起を有し、お互いに接触して3次元的なネットワークを形成している。この複雑な構築が上記 T 細胞の教育に関する意義についてはこれまで解析されて来なかった。

(3) 免疫異常モデルマウスにおいて上記胸腺上皮細胞ネットワークの3次元構造を正常マウスと比較して、その免疫異常、あるいは免疫調整機能における胸腺上皮細胞ネットワークの意義についてはよく分かっていなかった。

(4) 共同研究者の上野博夫は Cre マウスと LSL-GFP (loxp-stop-loxp-GFP) マウスのキメラマウスを解析した結果発生期における胸腺上皮細胞の細胞融合を見いだしており、その意義を解析する目的にて、細胞融合を起こした胸腺上皮細胞の詳細な解析が必要であった。

(5) 同種造血幹細胞移植(アロ hematopoietic stem cell transplantation; アロ HSCT)は、白血病、免疫不全症、あるいは固形腫瘍等の治療に有効である事が示されてきた。しかしながら、通常の HSCT では治療困難な疾患も存在する。より有効で安全性の高い HSCT 法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

(1) 皮質胸腺上皮細胞の構築する3次元的なネットワークについて共焦点顕微鏡を用いて立体

画像を取得しその特徴について解析する。また T 細胞前駆細胞と胸腺上皮細胞の位置関係について解析する。

(2) 免疫異常モデルマウスにおいて上記胸腺上皮細胞ネットワークの3次元構造を正常マウスと比較して、その免疫異常、あるいは免疫調整機能における胸腺上皮細胞ネットワークの意義について解析する。

(3) 上述の Cre マウスと LSL-GFP (loxp-stop-loxp-GFP) マウスのキメラマウスを用いて見いだした、発生期における胸腺上皮細胞の細胞融合について、免疫染色によって、胸腺上皮細胞と融合する相手方細胞の検索を行う。

(4) HSCT に同じ donor からの胸腺組織も移植(thymus transplantation, TT)する、新しいアロ HSCT (HSCT + TT)法をマウス用いて開発する。また、多種の難治疾患モデルにアロ HSCT + TT を行いその効果を調べる。

3. 研究の方法

(1) FoxN1-cre マウスと LSL-GFP マウスを交配すると胸腺上皮細胞のみが緑に光る胸腺を作成することができる。この系を用いて共焦点顕微鏡により胸腺上皮細胞の3次元ネットワークの立体像を解析する。また、FoxN1-Cre マウスとレインボーマウス(ホモ)を掛け合わせ胸腺上皮細胞の発生のクローナリティ解析を行った。

(2) 上記にさらに免疫不全モデルマウスを合わせ、同様に胸腺上皮細胞の3次元ネットワークの立体像を解析する。

(3) 免疫染色にて発生過程において細胞融合を起こした胸腺上皮細胞の相手方の細胞を同定するために種々の細胞マーカーを免疫染色によってより詳細な解析を行う。

(4) マウスにアロ HSCT を行い、同時に TT を行う群、或は donor lymphocyte infusion (DLI)を行う群を作製し、その効果を比較する。

多種の難治疾患モデルにアロ HSCT + TT を行い、その有効性と安全性を調べる。

4. 研究成果

(1) 皮質胸腺上皮細胞の構築する3次元的なネットワークについて共焦点顕微鏡を用いて立体画像を取得した。

(2) 免疫不全マウスの構築する3次元的なネットワークについて共焦点顕微鏡を用いて解析中である。現在までのところ、正常と比べて構築に以上のあるモデルマウスは見いだされていない。

(3) 発生過程の細胞融合について、Cre マウスと LSL-GFP (loxP-stop-loxP-GFP) マウスのキメラマウスを解析し、一部の胸腺上皮細胞に細胞融合を起こした GFP 陽性胸腺上皮細胞が出現する事を再現した。

(4) 骨髄移植後の細胞融合について、Rosa26-RFP マウスの骨髄を Rosa26-GFP マウスに骨髄移植し、成体において血球細胞と胸腺上皮細胞の間に細胞融合 (RFP/GFP 共発現細胞) が起こるか追試を繰り返して検討したが、今までのところ骨髄移植後、血球細胞と胸腺上皮細胞の間に細胞融合が起こるという明確な証拠は得られなかった。

(5) 生理的条件下での細胞融合の有無を検証するために Rosa26-RFP マウスと Rosa26-GFP マウスを並体結合して細胞融合 (RFP/GFP 共発現細胞) が起こるか検討した。また、Cre 発現マウスとレインボーマウスとの並体結合にて胸腺上皮細胞に細胞融合 (緑から赤、黄、青に変化) が起こっているかどうかを検討したが血球細胞と胸腺上皮細胞の間に細胞融合が起こるという明確な証拠は得られなかった。

(6) (3)で得られた細胞融合後の胸腺上皮細胞について免疫染色で解析したが、血球細胞マーカー (CD45 など) の発現は認められなかった。結果として胸腺上皮細胞の細胞融合は胸腺上

皮細胞と血球細胞の間において起こるのではなく、胸腺上皮細胞同士の間で起こる可能性が高いと考えられた。しかし血球細胞以外の細胞と胸腺上皮細胞の間において細胞融合が起こる可能性はいまだ否定できず、今後の研究課題と思われる。

(7) アロ HSCT+TT の原理

アロ HSCT+TT を行うと、アロ HSCT 単独法に比較して T 細胞機能が増強する。しかし、アロ HSCT+DLI 法に見られるような高度の graft versus host disease (GVHD)は誘導されない。

アロ HSCT+TT の難治疾患モデルへの応用種々の難治疾患に対しアロ HSCT+TT 法は、通常のアロ HSCT 単独或はアロ HSCT+DLI 法に比較し以下の様な効果を示した。

1)放射線抵抗性宿主における自己免疫性腎炎、あるいは老齢化に伴って発症する自己免疫性慢性膵炎・唾液腺炎へ治療効果を示した。

2)悪性腫瘍に対して早期では縮小効果、進期においては延命効果を認めた。白血病においては、高度の GVHD を伴わない長期の生存が可能となった。

3)老齢化宿主においてはT細胞機能の改善とともに、長期の生存が可能となった。

4)胸腺摘除或は胸腺機能の低下した宿主に限られるが、第3者からの胸腺移植によって、3種の major histocompatibility (MHC)への寛容を誘導できた。

5)移植条件が低放射線量或は低骨髄細胞数であっても生着率は向上し、又 GVHD は軽減していた。

6)過致死量放射線照射した宿主においては急性腸管障害が軽減し、高率に救済が可能となった。

7)II型糖尿病においてはdonor由来への置換が可能となり、糖尿病も軽減した。

まとめ

アロ HSCT+TT 法は従来のアロ HSCT 法よりも効果が高く、かつ副作用も少なく、種々の難治性疾患へ応用できる可能性がある。

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 6 件)

1, 保坂直樹、胸腺移植併用による新しいアロ造血幹細胞移植法の開発 - その機構と難治性疾患への応用 -、日臨免疫会誌、査読有、37 巻、2014、42-47

2, Hosaka N, New allogeneic hematopoietic stem cell transplantation method: hematopoietic stem cell transplantation plus thymus transplantation for intractable diseases. Clin Dev Immunol. 査読有 2013, doi: 10.1155/2013/545621.

3, Hisha H, Ueno H (7 名省略、1 番目), Establishment of a novel lingual organoid culture system: generation of organoids having mature keratinized epithelium from adult epithelial stem cells. Sci Rep. 査読有、2013, doi:10.1038/srep03224.

4, Odate S, Hosaka N (4 名省略、4 番目), Progressive thoracic myelopathy caused by spinal calcium pyrophosphate crystal deposition because of proximal junctional vertebral compression fracture after lumbopelvic fusion. Eur Spine J. 査読有、vol.21、2012、2436-2442

5, Zhang Y, Hosaka N (5 名省略、2 番目), Effects of Intrabone Marrow-Bone Marrow Transplantation Plus Adult Thymus Transplantation on Survival of Mice Bearing Leukemia. Stem Cells Dev, 査読有、vol.219, 2012, 1441-1448

6, Hosaka N (5 名省略、1 番目), Poorly

differentiated squamous cell carcinoma of the nipple: a unique case for marked exophytic growth, but little invasion with neuroendocrine differentiation. Med Mol Morphol. 査読有、vol.44, 2011,174-178

(学会発表)(計 7 件)

1, 保坂直樹、骨髄内骨髄移植と成体胸腺併用移植による白血病の治療II 第102回日本病理学会総会 2013年6月7日 札幌

2, Hosaka N, Prolonged survival in mice with advanced tumors treated with intra-bone marrow BMT plus fetal thymus transplantation with restoration of T cell functions. 第100回米国免疫学会 2013年5月5日 ホノルル

3, Hosaka N, Poorly differentiated squamous cell carcinoma of the nipple. A unique case for marked exophytic growth, but little invasion with neuroendocrine differentiation. The 12th Asia Society of clinical Pathology and Laboratory Medicine (ASCPaLM). 2012年12月1日 京都

4, Hosaka N, Effects of Allogenic Intrabone Marrow-Bone Marrow Transplantation Plus Adult Thymus Transplantation on Mice Bearing Leukemia. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日 札幌

5, 神田晃、上野博夫 フローサイトメトリーによる多色細胞系譜マウスを背景に持つ遺伝子改変マウスの解析 第22回日本サイトメトリー学会 2012年6月29日 大阪

6, 保坂直樹、胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法の悪性腫瘍に対する効果II:胎生、新生、成体期の造血幹細胞と胸腺の比較 第101回日本病理学会総会 2012年4月26日 東京

7, Hosaka N, Effects of IBM-BMT plus Adult Thymus Transplantation on Mice bearing Leukemia 第40回日本免疫学会 2011年11月29日 千葉

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/pathol1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保坂 直樹 (HOSAKA, Naoki)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30388459

(2) 研究分担者

比舎 弘子 (HISHA, Hiroko)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90151422

槇 政彦 (MAKI, Masahiko)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80297001

神田 晃 (KANDA, Akira)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70375244

(3) 連携研究者

()

研究者番号: