

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591427

研究課題名(和文) HHIP KOストローマ細胞を用いたドナー由来リンパ球インビトロ増幅法の開発

研究課題名(英文) Development of the lymphocyte in vitro amplification method using HHIP KO stromal cells.

研究代表者

井山 諭 (Iyama, Satoshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50398319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は、ヒト骨髄間質細胞を用いた臍帯血および末梢血CD34陽性造血細胞が増幅できたことを報告したが、同システムを用いて骨髄CD34陽性造血細胞を共培養した場合、ほとんどの細胞が顆粒球・マクロファージ系列に分化し、リンパ球を得ることができなかった。そこで、まずヒト骨髄ストローマ細胞を用いた骨髄CD34陽性造血幹細胞の長期培養法を確立した。培養液中のサイトカイン等(SCF, TPO, flt3-ligand, DLL4, GSK inhibitor)を調整することで、CD34陽性造血幹細胞の増幅は確立できた。しかし本研究の最終目的はリンパ球増幅を得ることであり、今後も研究の継続を要すると思う。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that it was difficult to evaluate 5 weeks CA-forming cells (CAFC) which is a surrogate indicator of hematopoietic stem cells because human stromal cells could not survive more than 4 weeks. In this study, we optimized serum free media, combination of cytokines and chemical agents such as stem cell factor, thrombopoietin, flt3 ligand with or without delta like protein 4 (DLL4) and GSK inhibitor. By using this media, bone marrow CD34+ cells could be cocultured for 8 weeks without disruption of the human stromal layer. Five week CAFC could be observed in all condition of cytokine combination with or without chemical inhibitor. However, because cytoplasmic appearance of cells in some CAs is quite irregular without DLL4 or GSK inhibitor, we conducted immunohistochemical staining. We found that CD34+CAFCs were exclusively observed in the presence of DLL4 or GSK inhibitor. Moreover, NOD/SCID repopulating cells were detected in the coculture containing CD34+CAFCs.

研究分野：血液学

キーワード：リンパ球増幅 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、血液腫瘍に対する化学療法や分子標的療法は目覚ましい進歩をとげ、悪性リンパ腫や白血病の一部に長期生存が得られる症例が見られるようになった。しかしながら高リスクの血液腫瘍疾患においては標準的化学療法で腫瘍細胞を根絶することが困難で、最終的に骨髄移植が行われる頻度が増えてきた。しかしながら、移植後に再発する症例も少なからず認められ、そのようなケースではリンパ球輸注法が有効性を示すことが知られている。しかしながら、少子化が進む我が国では、血縁者ドナーからの骨髄移植が減少し、臍帯血やバンクドナーを利用した骨髄移植が増加すると予測される。この場合、臍帯血移植の場合にはリンパ球を得ることが不可能であり、骨髄バンクから得た骨髄移植後再発においても、リンパ球を必ずしも得られるとは限らず、得られたとしても1回のみに限られている。またリンパ球採取に際してのドナーの負担も少なくない。したがって、少量の造血幹細胞から機能性リンパ球を *in vitro* で大量産生可能となれば、造血幹細胞移植を施行された全ての症例に対してドナーリンパ球輸注が繰り返し可能となり、造血幹細胞移植の治療戦略が大幅に進展する可能性が高いと想定される。最近、申請者はヒト骨髄間質細胞の株化に成功し (Iyama S, Exp Hematol. 2008, Kobune, Blood, 2003) それらにおける遺伝子の発現を解析した。その結果、Indian hedgehog (Ihh) が造血前駆・幹細胞の生存および増殖を支持することを見出した (Kobune, Blood, 2004)。さらに申請者は、Hedgehog (Hh) シグナルが造血幹細胞からリンパ球への初期分化に不可欠であることを *in vivo* で明らかにした (Kobune, Stem cells, 2008)。さらに、樹立した骨髄間質細胞における内因性 Hedgehog 抑制因子 (Human Hh-interacting protein, HHIP) の発現量を解析したところ、一部のヒト骨髄間質細胞クローンで低発現しており (図1) これらのクローンでは強力にリンパ球分化をサポートすることを preliminary ながら見出した (図2)。さらに HHIP KO ストローマと CD34 陽性細胞共培養下に SCF、delta-like protein4 および interleukin-7 を添加することで、T リンパ球を劇的に増幅可能であることを preliminary ながら見出した。このシステムではストローマを8週以上にわたり培養可能であり、産生されたリンパ球には CTL 活性が確認された (図3)。さらに preliminary ながらもストローマの下層に形成された cobblestone area から毎週多量のリンパ球産生が可能であった (図4)。本研究では、このシステムを利用した増幅リンパ球によるドナーリンパ球輸注法を確立することを目的とする。

2. 研究の目的

難治性白血病などの血液疾患では、骨髄移植療法を行っても腫瘍が根絶されず、再発する症例が認められる。そのような症例に対してドナーリンパ球輸注法 (DLI) が有効であることが知られているが、臍帯血移植の場合にはリンパ球を得ることは通常不可能である。骨髄バンクドナーからもリンパ球を得ることは1回のみに限定されており、採取可能であってもドナーの負担は少なくない。また治療上複数回の DLI が要求されることもしばしばである。本研究では、HHIP KO ストローマ細胞を用いることで、少量の造血前駆・幹細胞から大量の機能的リンパ球を増殖・採取し、繰り返し DLI を可能とする新規移植法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) HHIP KO ヒト・ストローマ細胞を用いた T リンパ球産生系の確立

ヒト骨髄 CD34 陽性細胞は宝酒造などから購入したものを使用した。ヒト hTERT ストローマ細胞と骨髄 CD34 陽性細胞の共培養は既報のごとく行った (Iyama S, Exp Hematol. 2008)。以下にその概略を示すが、ヒト hTERT ストローマ細胞を、25cm² flask に播きなおし、サブコンフルエントになった時点でストローマ細胞用の培地 (Dexter-type medium: MEM- α modification, 12.5% horse serum, 12.5% fetal calf serum, 1 x 10⁻⁶ M hydrocortisone, 1 x 10⁻⁴ M b-mercaptoethanol) を除いた後に、1xPBS により3回洗浄し、ストローマ培地に含まれていた血清を取り除く。引き続き、無血清培地に TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml) および Notch ligand を添加し、あらかじめ無血清培地中に調整した CD34 陽性細胞 20,000 個を、ヒト hTERT ストローマ細胞層上に添加した。この後、骨髄 CD34 陽性細胞とヒト hTERT ストローマ細胞を5~6週間共培養した。

2) 増幅リンパ球のNKおよびADCC活性の解析

Ex vivo 増幅リンパ球の表面抗原として、HLA class I/II および CD3、CD4、CD25 および CD8、CD56 を解析することでリンパ球のサブセットを解析した。NK 活性は K562 を用いた Calcein release アッセイで検討した。また、ADCC 活性は Daudi 細胞を標的とした Calcein release アッセイで解析した。また腫瘍細胞のアポトーシスは AnnexinV-PI アッセイでオートファジーは特異抗体の蛍光免疫染色で解析した。

3) 免疫不全マウス (SCID マウス) を用いた *in vivo* リンパ球移植系の確立

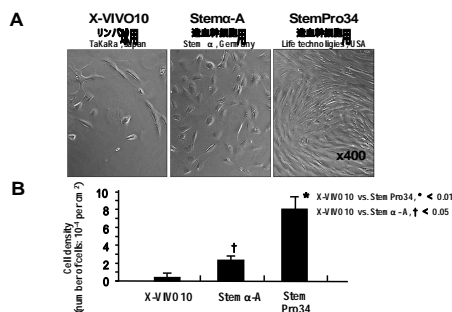
増幅リンパ球の移植にあたっては、SCID マウスあるいは NOD/SCID マウスに移植することで T リンパ球の正着を flow cytometry で解析した (Iyama S, Exp Hematol. 2008)。生着した T リンパ球のフェノタイプは CD4、CD25、CD122 および Foxp3 を解析することで行った。また、マウス体内のヒトリンパ球の分布 (胸

腺・脾臓・骨髄・皮下および腸管) に関しては蛍光免疫染色を用い詳細な検討を行った。さらに、GFP で標識した腫瘍細胞株(K562 あるいは Kasumi-1) と同時移植系の確立を行った。GFP に対する RCR および real time PCR で MRD を検出するシステムを構築した。

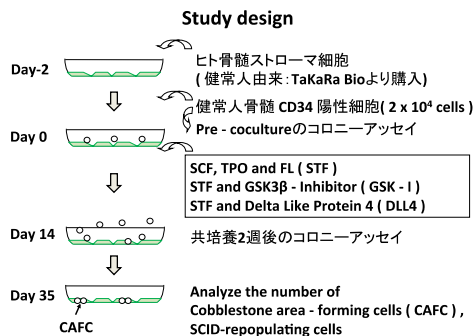
4. 研究成果

これまで我々は、ヒト骨髄間質細胞を用いた臍帯血および末梢血 CD34 陽性造血細胞の増幅できたことを報告したが、同システムを用いて骨髄 CD34 陽性造血細胞を共培養した場合、ほとんどの細胞が顆粒球・マクロファージ系列に分化し、リンパ球を得ることができなかった。そこで、まずヒト骨髄ストローマ細胞を長期間培養可能にする方法を検討した。StemPro34 を用いることで、長期間の培養が可能となった。

骨髄ストローマ細胞培養における無血清培地の比較検討

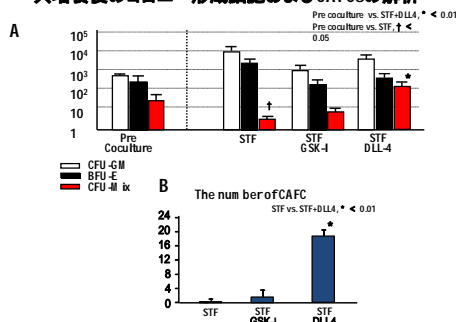


次にヒト骨髄ストローマ細胞を用いた骨髄 CD34 陽性造血幹細胞の長期培養法を確立した。以下に概略図を示す。



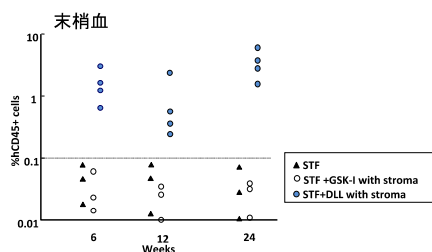
培養液中のサイトカイン等 (SCF, TPO, flt3-ligand, DLL4, GSH inhibitor) を調整することで、CD34 陽性造血幹細胞の増幅は確立できた。

共培養後のコロニー形成細胞およびCAFCsの解析



さらに、共培養後の造血細胞の造血再検能を確認する目的で、同細胞を SCID マウスに移植し、flowcytometry で解析した。その結果、下図に示すように、SCF, TPO, FL, および DLL4 の群において、末梢血中に CD45 陽性細胞の確認ができた。

共培養後の造血細胞のin vivo造血再建能 SCID-repopulating cells の解析



さらに、得られた CD45 陽性細胞の詳細を同じく flowcytometry にて検索した。結果、CD3 陽性細胞割合は 0.2%であった。また CD33 陽性細胞は 0.3%であった。本研究の最終目的はドナーリンパ球輸注に利用ができるレベルの数に増幅された CD3 陽性リンパ球を得ることである。今後はサイトカイン等の組み合わせ、投与量の調整をするなど、さらなる研究の継続を要すると考える。

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 4 件)

Iyama S, Murase K, Sato T, Hashimoto A, Tatekoshi A, Horiguchi H, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, Takada K, Kawano Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Mori S, Kato J, Yamashita T, Kato J. Narrowband ultraviolet B phototherapy ameliorates acute graft-versus-host disease by a mechanism involving in vivo expansion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. Int J Hematol 2014;99:471-476. DOI 10.1007/s12185-014-1530-1

Kobune M, Iyama S, Kikuchi S, Horiguchi H, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kamihara Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. Blood Cancer J 2012;2:e87. DOI:10.1038/bcj.2012.36

Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kaneko

Y, Miyanishi K, Sato Y, Hayashi T, Takimoto R, Kato J. Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. Free Radical Bio Med 2012;53:643-648. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.006>

Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Prognostic significance of serum ferritin level at diagnosis in myelodysplastic syndrome. Int J Hematol 2012;95:527-534. DOI 10.1007/s12185-012-1048-3

〔学会発表〕(計 4 件)

Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Jomen W, Murase K, Ibata S, Iyama S, Sato T, Kamihara Y, Miyanishi K, Sato Y, Hayashi T, Takimoto R, Kato J. Exosomes Derived from AML/MDS Cells Is Involved in Stromal Dysfunction and Bone Marrow Failure. 56th ASH Annual Meeting and Exposition : 2014 Dec 6-9 : San Francisco, U.S.A

Kobune M, Kikuchi S, Iyama S, Takada K, Murase K, Ono K, Horiguchi H, Kamihara Y, Hashimoto A, Tatekoshi A, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Iron Chelation Therapy Could Rapidly Reduce Oxidative DNA Damage In CD34+ Hematopoietic Cells Before Decrease Of Serum Ferritin Level. 55th ASH Annual Meeting and Exposition : 2013 Dec 7-10 : New Orleans, U.S.A

Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Iyama S, Takada K, Murase K, Ono K, Kamihara Y, Hashimoto A, Tatekoshi A, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Myelodysplastic Syndrome-Derived Stromal Cells Support Leukemia-Initiating Cells and Contradirectly Eliminate Normal CD34+ Clonogenic Cells. 55th ASH Annual Meeting and Exposition : 2013 Dec 7-10 : New Orleans, U.S.A

Kobune M, Iyama S, Kikuchi S, Horiguchi H, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kamihara Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid

neoplasms. 54th ASH Annual Meeting and Exposition : 2012 Dec 8-11 : Atlanta, U.S.A

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井山 諭 (IYAMA, Satoshi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：50398319

(2) 研究分担者

加藤 淳二 (KATO, Junji)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20244345

小船 雅義 (KOBUNE, Masayoshi)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90336389

神原 悠輔 (KAMIHARA, Yusuke)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：10624421

(3) 連携研究者

()

研究者番号：