

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23年 6月 1日現在

機関番号 : 34417

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590413

研究課題名 (和文) 並体結合マウスを用いた骨髄内骨髄移植の有効性の検証

研究課題名 (英文) Study in the effects of IBM-BMT using parabiotic mice

研究代表者 稲葉 宗夫 (INABA MUNEO)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号 70115947

研究成果の概要 (和文) : 並体結合マウスの作出は定常循環動態下における細胞のリクルート／ホーミングを検討する有効な手段である。GFP マウスより IBM-BMT した宿主[GFP→C57BL/6]を正常 C57BL/6 と並体結合し ([GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT}+C57BL/6 と標記)、GFP マウス由来の各血液細胞の分化を GFP マウスより IV-BMT した宿主[GFP→C57BL/6]を正常 C57BL/6 と並体結合したマウス ([GFP→C57BL/6]^{IV-BMT}+C57BL/6 と標記) と比較検討した結果、造血前駆細胞の頻度は[GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT}+C57BL/6 マウスにおいて優位に高いことが判明し、並体結合により構築された正常生理的条件下においてドナー由来細胞の生着が IBM-BMT により促進されていることが推定された。

研究成果の概要 (英文) : We have prepared the parabiotic mice to compare the efficiency of donor cell engraftment by IBM-BMT with that by IV-BMT in the physiological condition. BMCs from GFP mice were transplanted into C57BL/6 mice by IBM-BMT ([GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT}), and the parabiotic mouse was made up of the ([GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT} mouse and normal C57BL/6 mouse ([GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT} + C57BL/6). In this mouse, the frequency of hemopoietic progenitor cells, defined as Lin⁻/c-kit⁺ cells, was significantly higher than that determined in the ([GFP→C57BL/6]^{IV-BMT} + C57BL/6 mouse, indicating the efficiency of donor cell engraftment by IBM-BMT.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・実験病理学

キーワード : 並体結合マウス、骨髄移植、樹状細胞、造血幹細胞、循環動態

1. 研究開始当初の背景

骨髄移植による自己免疫疾患の治療を目的とする一連を行う過程で申請者らは骨髄移植のルートを従来の経静脈的投与から直接骨髄腔内に投与する方法（骨髄内骨髄移植、intra-bone marrow bone marrow transplantation: IBM-BMT）を確立した。IBM-BMT はドナー細胞の早期生着を促進し、ドナー由来細胞の置換において優れた方法。しかしながら、IBM-BMT 後に回復してきた免疫担当細胞（T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなど）が生理的条件下においてその機能を発揮するかを検証することは難しい。当然のことながら骨髄移植に際しては骨髄破壊的（myeloablative）あるいは非破壊的（nonmyeloablative）を問わずいずれもレシピエントに対する前処置は必須であり、定常状態に見られる造血系サイトカイン環境あるいは循環動態とは異なる条件下において免疫担当細胞は分化成熟を遂げる。これらの細胞をレシピエントより精製し正常個体に移入してその機能を検討し、従来の経静脈的骨髄移植と骨髄内骨髄移植をこの観点から比較することは可能であるが、（1）生理的条件下においては不断に供給される免疫担当細胞を限定した数量移入することに過ぎず、（2）また経静脈的による循環動態も本来の生理的循環によるリクルートとは異なることになる。

これらの問題を解決し、生理的な定常状態に最も近似させた形で新たに分化してきた免疫担当細胞の機能を探る方法として並体結合マウスを作製し解析することを考え研究を開始した。

2. 研究の目的

並体結合（parabiosis）マウスの作出は定常循環動態下における細胞のリクルート／ホーミングを検討する有効な手段である。本研究課題においては並体結合マウスと骨髄移植を組み合わせ、（1）生理的条件下において骨髄移植後に回復してくる免疫担当細胞（T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなど）がその機能を発揮するかを検証し、（2）このモデル系を用いて従来の経静脈的骨髄移植と新たに開発した骨髄内骨髄移植の有効性を比較検討することである。

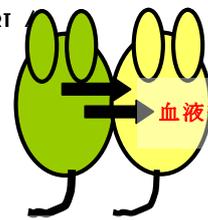
3. 研究の方法

（1）骨髄移植：GFP マウス骨髄細胞より Lin⁻/c-kit⁺細胞を精製し、放射線照射（5 Gy x 2 回）を行った同系 C57BL/6 マウスに骨髄内骨髄移植（IBM-BMT、[GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT}）を行い、さらにこれらを正常 C57BL/6 と並体結合する [GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT} + C57BL/6 と標記）。同様に GFP マウスより従来の経静脈的骨髄移植（IV-BMT）を行った宿主（[GFP→C57BL/6]^{IV-BMT}）を正常 C57BL/6 と並体結合したマウス（[GFP→C57BL/6]^{IV-BMT} + C57BL/6 と標記）を作製し、GFP マウス由来の各血液細胞の分化をフローサイトメトリーにより比較検討した。

[GFP→C57BL/6]^{IBM-}

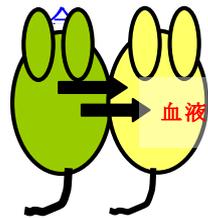
BMT⁺/C57BL/6

骨髄内
骨髄移植
マウス



並体結
合

静脈内
骨髄移植
マウス



[GFP→C57BL/6]^{IV-}

BMT⁺/C57BL/6

（2）マイトゲン反応により B 細胞機能を測定し、また、異系混合白血球反応（MLR）における刺激細胞活性を測定することで樹状細胞の抗原提示機能を評価した。

4. 研究成果

（1）研究期間を通じて循環動態の安定した並体結合マウスの作出は徐々に向上が認められたものの、並体結合後のマウスに与えるストレス等の関係から、実験に使用できる並体結合マウスは作製後約 30 日であった。

（2）GFP マウスより IBM-BMT した宿主 [GFP→C57BL/6] を正常 C57BL/6 と並体結合し（[GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT} + C57BL/6 と標記）、GFP マウス由来の各血液細胞の分化を GFP マウスより IV-BMT した宿主 [GFP→C57BL/6] を正常 C57BL/6 と並体結合したマウス（[GFP→C57BL/6]^{IV-BMT} + C57BL/6 と標記）と比較検討した結果、骨髄球系および B 細胞系の分化に関しては有意差を認めず、また樹状細胞のミエロイド系、リンパ球系各サブセットについて Gr-1 あるいは B220 の発現をもと

に分別し、その頻度を測定したが、両群において有意な差は認められなかった。

(3) さらに両並体結合マウス、[GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT} + C57BL/6 および [GFP→C57BL/6]^{IV-BMT} + C57BL/6、より分離精製した B 細胞の機能をマイトゲン反応により測定したところ正常マウスより調製した両細胞の反応性と変わらず、機能的な成熟に関しても同様であった。さらに樹状細胞機能を異系混合白血球反応 (MLR) による刺激細胞活性において評価したが、両並体結合マウスより調製した樹状細胞に有意差は認められなかった。

(4) しかし c-kit 陽性 Lin 陰性の造血前駆細胞の頻度は [GFP→C57BL/6]^{IV-BMT} + C57BL/6 マウスに比して、[GFP→C57BL/6]^{IBM-BMT} + C57BL/6 マウスにおいて有意に高いことが確認され、移植後早期の観察ではあるが、並体結合により構築された正常生理的条件下においてドナー由来細胞の生着が IBM-BMT により促進されていることが推定された。また T 細胞系はこの時点では検出されず、より長期の観察が必要と考えられた。

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 23 件)

1. Katashiba, Y., Miyamoto, R., Hyo, A., Shimamoto, K., Murakami, N., Ogata, M., Amakawa, R., Inaba, M., Nomura, S., Fukuhara, S., Ito, T.
Interferon- α and interleukin-12 are induced, respectively, by double-stranded DNA and single-stranded RNA in human myeloid dendritic cells. *Immunology*, 132: 165-173, 2011. (査読有)
2. Hasegawa-ishii, S., Takeii, S., Inaba, M., Umegaki, H., Chiba, Y., Furukawa, A., Kawamura, N., Hosokawa, M., Shimada, A.
Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse. *Brain Behav. Immunol.*, 25: 83-100, 2011. (査読有)
3. Hoshino, S., Inaba, M., Iwai, H., Ito, T., Li, M., Gershwin, M. E., Okazaki, K., Ikehara, S.
The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. *J. Autoimmunity*, 34: 380-389, 2010. (査読有)
4. Li, M., Inaba, M., Guo, K., Abraham, N. G., Ikehara, S.
Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Neuroscience Letters*, 465: 36-40, 2009. (査読有)
5. Mizokami, T., Hisha, H., Okazaki, S., Takaki, T., Wang, X., Song, C., Li, Q., Kato, J., Hosaka, N., Inaba, M., Kanzaki, H., Ikehara, S.
Preferential expansion of human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells on major histocompatibility complex-matched amnion-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica-The hematology Journal*, 94: 618-628, 2009. (査読有)
6. Kato, J., Hisha, H., Wang, X.-I., Mizokami, T., Okazaki, S., Li, Q., Song, C., Maki, M., Hosaka, N., Adachi, Y., Inaba, M., Ikehara, S.
Contribution of neural cell adhesion molecule (NCAM) to hemopoietic system in monkeys. *Ann. Hematol.*, 87: 797-807, 2008. (査読有)
7. Ando, Y., Inaba, M., Sakaguchi, Y., Tsuda, M., Guo, K., Omae, M., Okazaki,

- K., Ikehara, S.
Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats.
Inflammatory Bowel Diseases, 14: 826-838, 2008. (査読有)
8. Omae, M., Inaba, M., Sakaguchi, Y., Tsuda, M., Miyake, T., Fukui, J., Iwai, H., Yamashita, T., Ikehara, S.
Long-term maintenance of donor-derived hemopoiesis by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. Stem Cells and Development, 17: 291-302, 2008. (査読有)
9. Miyake, T., Inaba, M., Fukui, J., Ueda, Y., Hosaka, N., Kamiyama, Y., Ikehara, S.
Prevention of graft-versus-host disease by intrabone marrow injection of donor T cells: involvement of bone marrow stromal cells.
Clin. Exp. Immunol., 152: 153-162, 2008. (査読有)
10. Guo, K., Inaba, M., Li, M., An, J., Cui, W., Song, C., Wang, J., Cui, Y., Sakaguchi, Y., Tsuda, M., Omae, M., Ando, Y., Li, Q., Wang, X., Ikehara, S.
Long-term donor-specific tolerance in rat cardiac allografts by intrabone marrow injection of donor bone marrow cells.
Transplantation. 85: 93-101, 2008.
(査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. Inaba, M., Hoshino, S., Iwai, H., Ito,

- T., Li, M., Gershwin, M. E., Okazaki, K., Ikehara, S.
The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis.
14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, 神戸ポートピアホテルおよび神戸国際展示場 (神戸コンベンションセンター), Kobe, Japan.
2. Inaba, M., Hoshino, S., Okazaki, K., Ikehara, S.
The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis.
11th Annual International Symposium on Dendritic Cells “DC2010: Forum on Vaccine Science,” September 26-30, 2010, Lugano, Switzerland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 宗夫 (INABA MUNE0)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70115947

(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

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：