

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890027

研究課題名（和文） 造血幹細胞移植におけるNotchシグナルとNK細胞の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of Notch signal of NK cell in hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者 栗田 尚樹 (KURITA NAOKI)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：3055561

研究成果の概要（和文）：

造血幹細胞移植後の移植片対宿主病（GVHD）におけるNK細胞とNotchシグナルの関係を明らかにする目的で研究を行った。ヒト臍帯血中のCD34陽性細胞をNotchリガンドで刺激することにより、機能的に成熟したNK細胞を誘導した。また同種移植GVHDマウスモデルを構築し、Notch刺激で誘導したマウスNK細胞を輸注することにより、GVHDが軽減される傾向を見出した。造血幹細胞移植後患者のNK細胞上にNotch1分子が強く発現し、また移植片対宿主病の標的である腸管にはNotchリガンドであるJagged1が発現していた。これらの結果から、Notchシグナルを介して成熟したNK細胞がGVHDの制御に関わる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of our study is to clarify roles of Notch signal of NK cell in graft-versus-host disease (GVHD) after hematopoietic stem cell transplantation. Functionally mature NK cells were induced from human cord-blood CD34-positive cells by stimulation with Notch ligand. We established allogeneic stem cell transplantation GVHD model. Diminishment of GVHD was observed when Notch-induced NK cells were transfused into the recipient. It is revealed that NK cells of patients after hematopoietic stem-cell transplantation expressed Notch1 and intestinal epithelial cells, which are targets of GVHD, expressed Notch ligand, Jagged1. This result suggests the relation between Notch signal of NK cell and GVHD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：血液内科学

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：Notch1, GVHD, NK細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対して現在確立している唯一の幹細胞療法であり、最も強力な治療である。造血幹細胞移植の際、ドナーNK細胞上の抑制性受容体 (KIR) とレシピエント細胞上のMHC class Iの不適合によりドナーNK細胞に同種免疫反応が惹起できた場合、レシピエント腫瘍細胞に対するドナーNK細胞の移植片対腫瘍 (GVT) 効果により移植後の再発が抑制される。またドナーNK細胞がレシピエント抗原提示細胞を破壊することにより移植片対宿主病 (GVHD) の発症が抑制されると考えられている。NotchシグナルカスケードがGVT効果およびGVHDの制御に重要な役割を担っている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、同種造血幹細胞移植後のGVHDにおける、NK細胞とNK細胞のNotchシグナルの役割を、同種造血幹細胞移植マウスモデルを用いて明らかにする。さらにGVHDを発症したヒト検体を用いて、NK細胞とNotch分子の関連を確かめる。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯血よりCD34陽性細胞をフローサイトメトリー法により分離し、NotchリガンドであるDelta4を用いて同細胞を刺激し、Stem cell factor, Flt3-kinaseリガンドおよびCD17の存在下に培養することで、NK細胞の分化誘導を行った。またそれらの誘導されたNK細胞を用いて、K562細胞株およびJurkat細胞株に対する細胞傷害活性を定量化することで、誘導されたNK細胞の機能的解析を行った。

(2) 致死量の放射線を照射したBALB/Cマウスをレシピエントとし、C57BL6マウスをドナーとして造血幹細胞を移植することで、同種造血幹細胞移植マウスモデルを作成し、GVHDを観察できる系を構築した。更にそれらのマウスモデルを用いて、ドナーマウスのCD34陽性細胞からNotch刺激を用いて誘導したNK細胞をレシピエントマウスに輸注した後にGVHDの程度の変化を観察し、コントロールマウスと比較した。

(3) フローサイトメトリー法によるマルチカラー解析を用いて、造血幹細胞移植後にGVHDを発症した患者末梢血中のNK細胞に対し、それらの細胞表面上に発現するNotch分子の発現を解析した。またGVHDの主な標的組織である皮膚、肝臓、腸管において、Notchリガンドの発現を免疫組織染色の手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト臍帯血CD34陽性細胞からの、Notchシグナルを用いた成熟NK細胞の誘導

ヒト臍帯血からフローサイトメトリー法を用いてCD34陽性細胞を分離し、NotchリガンドであるDelta4をプレートコートし、Stem cell factor, Flt3-kinaseリガンドおよびCD17を添加して培養したところ、3週間後にCD56陽性分画であるNK細胞が分化誘導された (Fig. 1)。

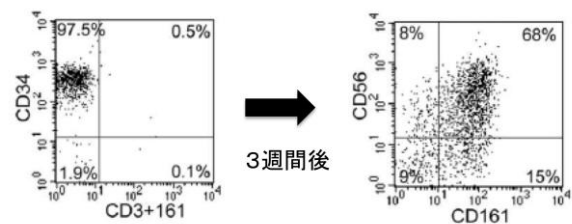


Fig.1 ヒト臍帯血CD34陽性細胞からのNK細胞の誘導

また臍帯血から誘導されたNK細胞は、細胞傷害活性の解析を行ったところ、K562およびJurkat細胞株に対して、ヒト末梢血から採取したNKと同程度の細胞傷害活性を有しており、機能的にも成熟したNK細胞であることが示された (Data not shown)。

以上のことから、NK細胞の分化成熟にはNotchシグナルが重要であることが示唆された。これらの結果は、将来的にNotchシグナルを用いてドナーよりヒトNK細胞を誘導し、同種移植後のレシピエントに輸注することでGVHDやGVT効果を制御することを可能とする重要な基礎データとなると考えられる。

(2) マウスGVHDモデルの構築および, N o t c hで誘導されたマウスNK細胞によるGVHDの制御

同様の手法を用いてマウスCD34陽性細胞にN o t c hシグナル刺激を行い, マウス成熟NK細胞を誘導した.

次に同種異型マウス造血幹細胞移植モデルを構築した. 致死量放射線を照射したBALB/Cマウス (H2-d) をレシピエントとし, ドナーとしてC57BL/6マウス (H2-b) の大腿骨から骨髓細胞を採取し, 骨髓細胞中のT細胞を抗CD3抗体を用いた磁気ビーズにより除去し, フローサイトメトリーを利用したセルソーティングにより高度に純化した造血幹細胞であるCD34陰性c-kit陽性Sca-1陽性Lin陰性細胞を尾静脈より移植する系を作成した. この系では主要組織抗原が異なる系である為, 急性GVHDが引き起こされマウスは死亡する系であるが, T細胞除去を行うことにより急性GVHDの程度は軽減され観察期間は延長する. この系に試験管内でN o t c hリガンド (Delta 4-Fc) の刺激により分化誘導したNK細胞を投与した. この系においてドナー細胞と投与したT細胞をレシピエント中で区別する為, Ly5コンジュニクマウスの系を用いた (ドナー骨髓細胞: Ly5. 2, T細胞またはT前駆細胞: Ly5. 1). これにより移植後のT細胞系の再構築の過程をFACS解析によりリアルタイムで観察する事が可能となった.

この系において, レシピエントにN o t c hシグナルを用いて誘導したドナーNK細胞を輸注したレシピエントマウス, およびコントロールとして, NK細胞を輸注しなかったレシピエントマウスのGVHDの程度を比較した. その結果, NK細胞を輸注したレシピエントマウスにおいて, GVHDが軽減される傾向にあった (Data not shown). 今後はマウスの匹数を増やして結果の再現性を検討し, またNK細胞を輸注したレシピエントマウスに対し, N o t c hに対する中和抗体を投与することで, NK細胞によるGVHDの軽減が相殺されるか否かを解析する.

またマウス悪性腫瘍細胞であるB6RV2をマウス皮下へ移植し, 腫瘍径の経時的計測することにより移植片対腫瘍効果を観察するモデルを構築した. 将来的には, この系に対し, N o t c hシグナルにて誘導されたNK細胞を投与した後に腫瘍の大きさを観察し, N o t c hシグナルで誘導されたNK細胞によるGVHD効果を解析する予定である.

(3) ヒト同種移植後の検体を用いたNK細胞上のN o t c h分子の発現解析およびGVHD標的組織上のN o t c hリガンドの発現解析

造血幹細胞移植後の患者末梢血検体を用い, フローサイトメトリーを用いてN o t c h分子の発現を解析した. その結果, 造血幹細胞移植後患者のNK細胞上にN o t c h1が発現していることを見出した (Fig. 2).

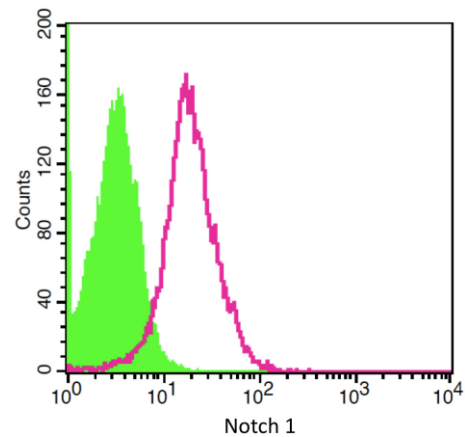


Fig. 2 同種移植後の患者末梢血NK細胞におけるN o t c h1分子の発現

またマウスおよびヒトの腸管上皮細胞において, N o t c hリガンドであるJ a g g e d1が発現することを, 免疫染色の手法を用いた解析により見いだした (Fig. 3). しかし他のN o t c hリガンド (Delta 1, 4およびJ a g g e d2) の発現を認めなかった (data not shown). また, 免疫組織学的な解析で, GVHDを生じている組織において, NK細胞が集簇している像を観察した.

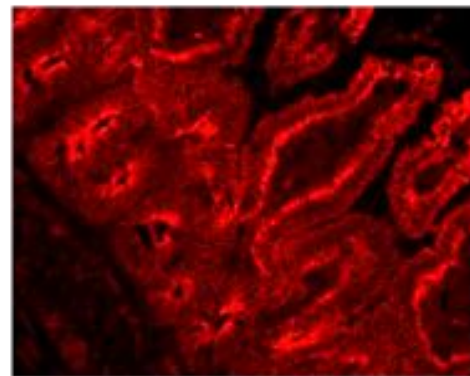


Fig. 3 同種移植後の腸管上皮におけるJ a g g e d1の発現

これらの結果より，造血幹細胞移植後のNK細胞が，N o t c h分子を介して分化成熟し[研究（1）]，標的臓器の細胞とのインタラクションを経て[研究（3）]，GVHDを制御している[研究（2）]可能性が示唆された。

今後は，NK細胞によるGVHD制御の分子学的機構，およびGVT効果に対するNK細胞およびN o t c hシグナルの役割の解明を目的として解析を続ける予定である。

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）

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 尚樹 (KURITA NAOKI)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号：30555561

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：