

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293277

研究課題名(和文)急性および晩発性放射線障害に対する包括的細胞治療法の開発

研究課題名(英文)Development of comprehensive cellular therapy for acute and late-onset radiation-induced injuries

研究代表者

一戸 辰夫(Tatsuo, Ichinohe)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：80314219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、放射線被ばく後の急性放射線症候群および晩発性放射線障害に伴う臓器障害全般に対して、造血幹細胞と間葉系幹細胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSC)を利用した包括的な新規細胞治療法を開発することを目的として行われた。その結果、放射線照射マウスモデルにおいて、造血幹細胞とMSCの共移植が、放射線や移植片宿主病による組織損傷を抑制する効果を有すること、その効果がMSCの培養液中に存在する細胞外物質によって再現可能であることを解明した。また、ドナーへの負担がないMSCバンクへの利用を目指し、ヒト臍帯血から高機能のMSCを樹立する方法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop comprehensive cellular therapy for acute syndrome and late effects associated with radiation-induced tissue/organ injuries by use of differential regenerative functions of hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). We found that dual transplantation of HSCs and MSCs ameliorates skin and large bowel injuries associated with acute radiation exposure and graft-versus-host disease compared with transplant of HSCs alone in an irradiated (8 Gy) mouse model. Intriguingly, such protective effect was reproducible in mice receiving HSCs with culture supernatant of MSCs instead of MSCs themselves. We also established a unique method to efficiently isolate MSCs from human umbilical cord blood for the future MSC banking system free from invasive procedures to the donors .

研究分野：造血幹細胞移植 細胞治療

キーワード：被ばく医療 組織再生治療 造血細胞移植 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日に発生した福島第一原子力発電所の事故は、あらためて放射線事故に対する現代社会の脆弱さを明らかにした。現在、高線量被ばくによる重篤な急性放射線症候群(acute radiation syndrome, ARS)に対する唯一の医学的救済方法は同種造血幹細胞移植とされているが、その成功率はきわめて低く、より確実に犠牲者を救済可能な治療法の確立が強くのぞまれている。また、造血幹細胞移植の直接的な目的は骨髄障害の救済であり、消化管障害や皮膚障害に対する有効性は期待できない。

間葉系幹細胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSC)は自己複製能と骨細胞・脂肪細胞・軟骨細胞などへの多分化能を有する体性幹細胞であり、骨髄や脂肪組織などから比較的容易に分離することが可能であるため、多様な組織の修復と再生を可能とする細胞ソースとして現在その臨床応用が精力的に進められている。また、体外で培養されたMSCはT細胞・NK細胞・B細胞・樹状細胞など広範な免疫担当細胞の機能を細胞接着非依存的に抑制することが報告されており、自己免疫疾患・造血幹細胞移植後の移植片対宿主病などの治療を目的としてMSCの免疫調節作用や抗炎症作用を活用しようとする臨床研究が国内外において実施されている。原子爆弾被爆後生存者の調査等より、ARSの病態は、電離放射線による直接的なDNA損傷と細胞のアポトーシスに加え、組織から遊離される炎症性サイトカインによって増強されていることが想定されており、MSCの有する組織修復作用と抗炎症作用は、高線量被ばく後に発生する全身組織の損傷と炎症の沈静化に有効である可能性がある。

また、急性放射線障害のみならず、近年では、悪性腫瘍等に対する放射線治療後の生存者に見られる晩発性放射線障害としての造血器腫瘍の発生も大きな医学的問題となっている。このような学術的背景のもと、申請者は、放射線による造血系・非造血系の障害を同時に修復可能な新た

な包括的細胞治療として、造血幹細胞(hematopoietic stem cells, HSC)とMSCを同時に移植する治療法の開発を着想し、その根拠となる前臨床データを得るための研究を構想するに至った。

2. 研究の目的

高線量被ばく後の急性放射線症候群や慢性低線量被ばくによってもたらされ得る放射線後障害に対する医学的救済方法の確立は、放射線影響医学においていまだに未解決かつ喫緊の課題である。また、悪性腫瘍の罹患率の増加に伴い、医療用放射線治療に対する晩発性放射線障害に対する医学的対策の確立も強く要請されている。そこで、本研究では、MSCとHSCの特性を最大限に利用し、それらの共移植法による組織再生治療のproof-of-conceptを確立し、急性ならびに晩発性放射線障害に対する包括的な細胞治療法に応用するための基盤的知見を得ることを目的とする。あわせて、緊急被ばく事故の際に有効性の高い細胞治療プログラムの開発を実現するため、組織修復能力の高いMSCを迅速に供給する新技術を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

全身放射線照射を行ったC57/B6マウスを用いて、急性放射線障害のモデルを作成し、十分な量のMSCとHSCの「デュアル移植」を行うことにより、HSC単独の移植と比較して、骨髄障害や全身の組織障害の修復が促進され得るかを検討した。また、放射線障害に対するMSCによる保護作用の分子機構を探索するために、HSC単独移植群、MSC単独移植群、HSC+MSC移植群の間で、障害組織におけるトランスクリプトームの網羅的な比較を行うことを計画した。さらに、さい帯血を利用して、自己複製能・多分化能を有するMSCを樹立するための適切な培養方法を検討した。

さらに、放射線事故による内部被ばくが存在する状況において体外から投与を行ったMSCに放射線が与える影響を検討するため、さまざまな線量および線量率で γ 線

照射を行った後に出現する MSC の増殖能・多分化能・造血支持能、血球系列決定能等に与える影響を検討した。加えて、MSCの有する CD34 陽性造血前駆細胞支持能、組織修復能を賦活化する生理活性物質の探索を行った。

なお、上記の研究は「人を対象にする医学系研究に関する倫理指針」に準拠して実施した。また、動物を使用する実験はすべて研究分担者の所属機関である京都大学で実施し、同学の動物実験委員会に研究計画の申請を行い、その妥当性に関する承認を受けた後に実施した。

4. 研究成果

全身放射線照射を行った B6 マウスに対して、骨髄由来 MSC と HSC の共移植実験を行い、特に前処置による皮膚や大腸の組織障害や同種 HSC を移植した際の急性移植片対宿主病に対して、MSC の投与が有効であることを見出した。また、このような MSC による組織修復作用・抗炎症作用は、MSC の細胞培養液中に含まれる特定の物質が担っていることを明らかにし、その物質を同定するとともに、組織修復作用・抗炎症作用とも用量依存的であることを明らかにした(論文投稿中)。

上記の検討と並行し、母親から本研究の利用への同意の得られたさい帯血を利用し、骨髄由来 MSC と同様の形態、細胞表面マーカーを有し、自己複製能・骨分化能・脂肪分化能・軟骨分化能を有する cord blood-derived MSC (CB-MSC) を樹立する技術を開発し、樹立効率は、凍結保存さい帯血よりも出産直後に入手したさい帯血において優れていたことを明らかにした (Yoshioka S, 2015; Fujii S, 2017)。

また、同一の線量率で 2 Gy, 4 Gy, 12 Gy の γ 線照射を行ったヒト BM-MSC を用いて、放射線被ばくが MSC の増殖能、分化能、造血前駆細胞支持能、血球分化系列決定能等に与える影響の検討を行い、線量依存的に増殖能・分化能の低下が見られること、一方、12 Gy 照射後にも CD34 陽性造血前

駆細胞の支持能は低下しないが、その B 細胞系列への分化が障害されていることを解明した(論文投稿中)。興味深いことにこのような放射線照射による骨髄由来 MSC の増殖能・分化能の低下は、100 mGy の低線量放射線照射によっても観察され、低線量照射時には CD34+CD38+造血前駆細胞の支持能はむしろ亢進することも明らかとした(論文投稿中)。さらに、副甲状腺ホルモン parathyroid hormone とビタミン K2 が BM-MSC の造血支持能を増強する生理活性物質であることを同定するとともに (Yao H, 2014)、MSC から骨芽細胞への分化過程において、特に造血前駆細胞に対する強い増殖支持作用を有する段階の細胞が存在することを見出した (Sugino N, 2016; Sugino N, 2017)。

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9件)

- 1) Iwasa M, Miura Y, Fujishiro A, Fujii S, Sugino N, Yoshioka S, Yokota A, Hishita T, Hirai H, Andoh A, Ichinohe T, Maekawa T. Bortezomib interferes with adhesion of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells through SPARC up-regulation in human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. **Int J Hematol.** 2017 May;105(5):704-5. (査読有)
- 2) Sugino N, Miura Y, Takaori-Kondo A, Ichinohe T, Maekawa T. Pharmacological targeting of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for the treatment of hematological disorders. **Inflammation and Regeneration.** EPub Apr 3, 2017. (査読有)
- 3) Fujii S, Miura Y, Iwasa M, Yoshioka S, Fujishiro A, Sugino N, Kaneko H, Nakagawa Y, Hirai H, Takaori-Kondo A, Ichinohe T, Maekawa T. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells.

- J Clinic Exp Hematop. EPub Apr 18, 2017.** (査読有)
- 4) Sugino N, Miura Y, Yao H, Iwasa M, Fujishiro A, Fuji S, Hirai H, Takaori-Kondo A, Ichinohe T, Maekawa T. Early osteoinductive human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells support an enhanced hematopoietic cell expansion with altered chemotaxis- and adhesion-related gene expression profiles. **Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jan22; 469(4):823-9.** (査読有)
 - 5) 一戸辰夫. 造血幹細胞移植におけるHLAの基礎知識. **臨床血液. 2015 Oct; 56(10): 2134-43.** (査読有)
 - 6) Miura Y, Ichinohe T, Maekawa T. Human Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Mediated Bone Marrow Organization. **Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy. 2015 Oct; 61(5): 489-90.** (査読有)
 - 7) Yoshioka S, Miura Y, Iwasa M, Fujishiro A, Yao H, Miura M, Fukuoka M, Nakagawa Y, Yokota A, Hirai H, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Maekawa T. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from small-volume umbilical cord blood units that do not qualify for the banking system. **Int J Hematol. 2015 Aug; 102(2):218-29.** (査読有)
 - 8) 一戸辰夫. 移植合併症への系統的アプローチ. **臨床血液. 2014 Oct; 55(10):2125-35.** (査読有)
 - 9) Yao H, Miura Y, Yoshioka S, Miura M, Hayashi Y, Tamura A, Iwasa M, Sato A, Hishita T, Higashi Y, Kaneko H, Ashihara E, Ichinohe T, Hirai H, Maekawa T. Parathyroid hormone enhances hematopoietic expansion via upregulation of cadherin-11 in bone marrow mesenchymal stromal cells. **Stem Cells. 2014 Aug;32(8):2245-55.** (査読有)
- [学会発表](計18件)
- 1) Aya Fujishiro, Yasuo Miura, Sumie Fujii, Tatsuo Ichinohe. Effects of acute exposure to low-dose radiation on the characteristics of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science-scientific underpinning for restoration from a radiation disaster, Hiroshima, February 21-22, 2017.
 - 2) Satoshi Yoshioka, Yasuo Miura, Masaki Iwasa, Aya Fujishiro, Noriko Sugino, Sumie Fujii, Yoko Nakagawa, Atsushi Sato, Asumi Yokota, Hideyo Hirai, Tatsuo Ichinohe, Akifumi Akifumi Takaori-Kondo, Taira Maekawa. Late adherent subpopulation in umbilical cord blood has the same characteristics and hematopoiesis-supporting capacity as mesenchymal stromal/stem Cells. 58th Annual Meeting & Exposition, San Diego, CA, U.S.A, December 4, 2016.
 - 3) 藤城綾, 三浦康生, 岩佐磨佐紀, 藤井紀恵, 杉野典子, 安藤朗, 前川平, 一戸辰夫. 低線量放射線が間葉系幹細胞の機能に与える影響. 日本放射線影響学会第59回大会, 広島県広島市, 2016年10月28日.
 - 4) 一戸辰夫. 高線量被ばく事故に対する救援治療の新たな可能性. 日本放射線影響学会第59回大会, 広島県広島市, 2016年10月27日.(シンポジウム)
 - 5) Aya Fujishiro, Yasuo Miura, Masaki Iwasa, Sumie Fujii, Noriko Sugino, Atsushi Sato, Asumi Yokota, Hideyo Hirai, Akira Andoh, Kaoru Tohyama, Tatsuo Ichinohe, Taira Maekawa. Vitamin K2 supports hematopoiesis through acting on human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. 第78回日本血液学会学術集会, 神奈川県横浜市, 2016年10月14日.
 - 6) Sumie Fuji, Yasuo Miura, Masaki Iwasa, Aya Fujishiro, Noriko Sugino, Atsushi Sato, Asumi Yokota, Hideyo Hirai, Akifumi Takaori-Kondo, Tatsuo Ichinohe,

- Taira Maekawa. Human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells modulate IMiDs-induced differentiation of HSPCs. 第78回日本血液学会学術集会, 神奈川県横浜市, 2016年10月13日.
- 7) 吉岡聡, 三浦康生, 岩佐磨佐紀, 藤城綾, 藤井紀恵, 杉野典子, 平位秀世, 一戸辰夫, 高折晃史, 前川平. さい帯血バンクの保存基準に満たない少容量さい帯血からの間葉系幹細胞の分離. 第38回日本造血細胞移植学会総会. 名古屋市, 2016年3月4日.
- 8) Masaki Iwasa, Yasuo Miura, Aya Fujishiro, Sumie Fujii, Noriko Sugino, Satoshi Yoshioka, Akihiro Tamura, Atsushi Sato, Asumi Yokota, Katsuyuki Kito, Akira Ando, Hideyo Hirai, Akifumi Takaori-Kondo, Tatsuo Ichinohe, Taira Maekawa. Bortezomib attenuates adhesion of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells to bone marrow mesenchymal stromal/stem cells via regulating SPARC expression. 57th Annual Meeting of the American Society of Hematology Orlando, FL, U.S.A., December 7, 2015.
- 9) Aya Fujishiro, Yasuo Miura, Masaki Iwasa, Sumie Fujii, Akihiro Tamura, Atsushi Sato, Asumi Yokota, Noriko Sugino, Hideyo Hirai, Akira Ando, Tatsuo Ichinohe, Taira Maekawa. Vitamin K2 supports hematopoiesis through acting on bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. 57th Annual Meeting of the American Society of Hematology Orlando, FL, U.S.A., December 5, 2015.
- 10) Aya Fujishiro, Yasuo Miura, Masaki Iwasa, Akihiro Tamura, Atsushi Sato, Asumi Yokota, Hideyo Hirai, Akira Ando, Taira Maekawa, Tatsuo Ichinohe. Effects of low-dose irradiation on the function of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. 第77回日本血液学会学術集会. 金沢市, 2015年10月17日.
- 11) Yasuko Honjo, Kenji Kamiya, Tatsuo Ichinohe. Analysis of radiation-induced responses during early embryonic development of zebrafish. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan, May 27, 2015.
- 12) Tatsuo Ichinohe. Recent advancement in stem cell transplantation for casualties of nuclear disaster. Kyoto, Japan, May 27, 2015.
- 13) 岩佐磨佐紀, 三浦康生, 藤城綾, 吉岡聡, 田村彰広, 佐藤淳至, 横田明日美, 平位英世, 安藤朗, 一戸辰夫, 前川平. 放射線照射が骨髄間葉系幹細胞の機能に与える影響. 第37回日本造血細胞移植学会総会, 神戸, 2015年3月6日.
- 14) Miura Y, Iwasa M, Fujishiro A, Hirai H, Maekawa T, Ichinohe T. Effects of irradiation on the functional characteristics of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. 5th International Symposium of RIRBM: Biological effects of low-dose radiation. Hiroshima, Japan, March 2, 2015.
- 15) Iwasa M, Miura Y, Fujishiro A, Tamura A, Sato A, Yokota A, Nakagawa Y, Yoshioka S, Hirai H, Andoh A, Ichinohe T, Maekawa T. Effects of irradiation on the functional characteristics of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. 56th Annual Meeting of the American Society for Hematology, San Francisco, CA, U.S.A. December 6, 2014.
- 16) 吉岡聡, 三浦康生, 八尾尚幸, 岩佐磨佐紀, 藤城綾, 東弥生, 横田明日美, 田村彰広, 佐藤淳至, 平井秀世, 一戸辰夫, 高折晃史, 前川平. さい帯血バンクの保存基準に満たないさい帯血からの間葉系幹細胞の樹立. 第76回日本血液学会総会, 大阪, 2014年11月1日.
- 17) 吉岡聡, 三浦康生, 八尾尚幸, 岩佐磨佐紀, 藤城綾, 東弥生, 横田明日美, 田村彰広, 佐藤淳至, 平井秀世, 一戸辰夫, 高折晃史, 前川平. さい帯血バンク保存事業に満たない小容量さい帯血ユニットを利用した間葉系幹細胞樹立の試み. 第23回日本組織適合性学会, 長崎, 2014年9月15日.

- 18) Ichinohe T. Differential impact of HLA matching on outcomes of unrelated marrow and cord blood transplantation. 19th Annual Summer Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. Busan, Korea, August 29, 2014.

〔図書〕(計1件)

- 1) 一戸辰夫. II臨床編 a.総論 HLA不適合移植の基礎的背景と臨床応用. 「みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床(改訂3版, 神田善伸・編)」, pp328-338, 医薬ジャーナル社, 2016年5月.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)
該当するものなし

○取得状況(計0件)

該当するものなし。

〔その他〕

ホームページ等

URL:

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/hematol/research-activities.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

一戸辰夫 (Tatsuo Ichinohe) (広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授)

研究者番号：80314219

(2)研究分担者

前川 平 (Taira Maekawa) (京都大学・医学研究科・教授)

研究者番号：80229286

三浦康生 (Yasuo Miura) (京都大学・医学研究科・助教)

研究者番号：70605146

(3)連携研究者

該当者なし

(4)研究協力者

該当者なし