

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09643

研究課題名(和文) 培養肥満細胞による胸腺機能回復：骨髄移植における致死性慢性GVHDの制御

研究課題名(英文) Recovery of thymus function using cultured mast cells: prevention of lethal chronic graft-versus-host disease

研究代表者

西村 良成 (Nishimura, Ryosei)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：50324116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：造血細胞移植により難治性の血液疾患が治療できるようになって久しい。しかしながらドナーから供給された骨髄細胞による負の側面、いわゆる移植片対宿主病(GVHD)は克服されていない。我々は、慢性GVHDに対して、マウス骨髄移植モデルと用いて新規治療の開拓を目指してきた。本研究は、慢性GVHD発症の元凶とも言える胸腺機能回復に肥満細胞が重要な役割を果たしていることが示唆される研究結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Refractory hematological malignancies have been cured by the progress of hematopoietic stem cell transplantation, however graft-versus-host disease (GVHD) is still an obstacle. We have studied the pathophysiology of GVHD using a rodent model to develop new treatments, especially focusing in chronic GVHD probably caused by functional impairments of thymus. In this study, we have indicated that host-typed mast cells are involved in the recovery of thymus function using mast cell deficient mice.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：慢性GVHD 肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

難治性血液腫瘍性疾患の根治的治療法として骨髄移植が始まり30年以上経過し広く普及した治療法となっているが、依然として移植片対宿主病 (Graft-versus-Host Disease: GVHD) のため命を落とすことがある。GVHDは、大きく急性と慢性の2種類に分けられる。慢性GVHDは、ひとたび発症すると経過が遷延し、原病が治癒しても慢性GVHDのため命を落とす場合もあり長期予後を見ると、造血細胞移植において最も克服すべき課題となっている。急性GVHDの病態研究は、移植片中に含まれるT細胞を中心に研究が進んでいる。慢性GVHDに関しては、長期に症状が持続することから、新たなT細胞の産生と教育という観点から胸腺機能の回復という観点からのアプローチが必要となってきた。

造血幹細胞移植には、前述したGVHDという最大の欠点が存在するが、また最大のメリットとして、免疫反応による自己・非自己の認識の違いから腫瘍細胞を排除する能力があり、これを移植片対腫瘍効果 (GVT: graft-versus-tumor effect) と呼ぶ。GVHDとGVTを人為的に制御することを目的に、我々はマウス骨髄移植モデルを用いて基礎的検討を行ってきた。特にGVT効果を著しく増大する新たな造血幹細胞移植の確立を目指してきた (Nishimura et al. Blood.2008;112:2563-74)。概要を述べるとマウス脾臓細胞をIFN- γ 、抗CD-3抗体、IL-2で14日から21日間培養するとT細胞とNK細胞マーカーを両方発現した細胞が大量に作製されCytokine-induced killer cells (CIK細胞)と呼ばれる。CIK細胞の特徴は、NK細胞の活性化レセプターであるNKG2Dを介して自家ならびに同種腫瘍細胞に対して著しい抗腫瘍効果を発揮する。T細胞マーカーを有することからマウス骨髄移植モデルにCIK細胞を輸注するとGVT効果以上に重篤な

GVHDが誘導されることが危惧されたが、実際には重篤な急性GVHDは発症せず強力な腫瘍除去能があることが証明された重篤なGVHDは発症しないものの慢性GVHDの発症も一部のマウスで認められることが今後の臨床応用に向けての課題となった。

近年炎症を増悪させる細胞群としてTh17細胞が同定され、まず我々はマウス骨髄移植モデルにてIL-17A欠損マウスを利用して、造血幹細胞移植とIL-17Aとの関連を明らかにしてきた。その過程で、慢性GVHD誘導群では、表皮内の肥満細胞が増多していること興味深い現象に気が付いた。肥満細胞はIgEとケミカルメディエータの放出の観点からアレルギー関連細胞群として認識されてきたが、近年の研究から免疫担当細胞の役割を演ずることが明らかとなってきた。肥満細胞欠損マウス (B6-Kit-Wsh/Wsh) を利用しGVHDの重症度を野性型と比較したところ肥満細胞欠損マウスではGVHDがより重症になり早期に死亡する。また混合リンパ球反応に培養した肥満細胞を添加するとリンパ球の増殖、活性化が抑制される。以上の結果から、造血幹細胞移植において肥満細胞は、GVHDを抑制する細胞群であることを示した。また肥満細胞欠損マウスに野生型骨髄と脾臓細胞を輸注したホストマウスの胸腺を詳細に検討した際に、多くの肥満細胞が胸腺に浸潤していることに気が付いた。GVHDの標的臓器としては、臨床の現場では肝臓、皮膚、腸が三大臓器となるが、動物実験では胸腺自身もGVHDの標的臓器と認識されている。我々は、これらの浸潤肥満細胞が胸腺GVHDを抑え、胸腺の再構成を促し、引き続き一連の流れとして誘導される慢性GVHDの発症を抑制しているのではと推定し、本研究の主たる課題とする。

2. 研究の目的

骨髄移植領域における肥満細胞の役割、特に胸腺機能にどのように影響を与えるかについて検討する。肥満細胞は、人為的な大量

培養も可能であり、もし肥満細胞に胸腺機能を回復させる作用があるならば、骨髄移植療法のみならず自己免疫疾患などにも肥満細胞を用いた臨床応用（細胞療法）が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

病態解析のためには、肥満細胞を欠損したマウスの導入が不可欠となる。c-kit 遺伝子を操作した遺伝子改変マウスでは従来から肥満細胞が欠損することが知られていたが、造血系への影響がでるため骨髄移植モデルへの導入は不可能であった。しかしながら同じ c-kit 遺伝子が自然変異した B6-Kit-Wsh/Wsh マウスは、造血系への影響がほとんどなく骨髄移植実験にも使用可能であると考えられている。

しかしながらリンパ球の再構成に関して、不明な点も多いことからこれらの点について注意深く基礎的実験を行っていく。

- (1) マウス骨髄細胞から、IL-3 と Stem cell factor (SCF) を利用して肥満細胞の大量培養系を確立する。
- (2) GFP 導入マウスより培養した肥満細胞を同系マウスに輸注し、胸腺に migration、定着することの証明。
- (3) 低用量放射線を用いた場合の胸腺機能回復の比較を肥満細胞欠損マウスと野生型マウス間で比較。
- (4) 放射線を用いた同種移植
放射線を照射した肥満細胞欠損マウスならびに野生型マウスにおける胸腺の再構成の比較を肥満細胞欠損マウス骨髄、または野生型マウス骨髄を輸注して骨髄移植を行う。

4. 研究成果

- (1) 肥満細胞の大量培養の確立
骨髄細胞から IL-3、stem cell factor など

を添加することにより肥満細胞が培養可能であることを確認した。

(2) 培養肥満細胞をそのまま同系マウスに輸注

上記培養により肥満細胞を作成し、放射線などの前処置を行わずにそのまま肥満細胞を輸注した。輸注後 2 1 日、胸腺を摘出して蛍光顕微鏡で確認したところ GFP 陽性細胞を確認した。この結果から、胸腺には肥満細胞がある程度定着しており、なんらかの機能を有していることが推定された。

(3) 非致死量の低用量放射線を用いた場合の胸腺機能回復の比較を行った。肥満細胞欠損マウスと野生型マウス間に低用量の放射線照射を行い経時的に胸腺機能の回復を観察した。基本的には、CD4 と CD8 の両者が発現した胸腺中の T 細胞の早期回復の指標となることを利用した。

放射線照射前の状態では、両群間の CD8+CD4+陽性細胞数に差異は認めなかったが、低用量の照射を行うことによりリンパ球減少状態を引き起こした後の回復状態を観察したところ肥満細胞欠損マウスで有意に胸腺機能回復の遅延が認められた。定常状態では、両群間に差異を認めないことから、胸腺機能回復に肥満細胞は深く関与していることが推定された。

(4) 放射線を用いた同種移植

次に致死量の放射線を用いて同種移植を行った。Host 側に肥満細胞を欠損したマウス、または donor 側を肥満細胞欠損マウス骨髄を用いたりしながら、肥満細胞欠損が host 側、ドナー側のどちらによりインパクトがあるのかも合わせて検討した。

低用量放射線照射実験の結果と同様に、host 側の肥満細胞が欠損していると、輸注する骨髄細胞の肥満細胞が欠失の有無に関わ

らず胸腺機能回復の遷延が認められた。このことから host 側の胸腺細胞の重要性が明らかとなった。確かにこれらの肥満細胞は、放射線に比較的耐性を示し、移植後も比較的長期間残存していた。

(5)まとめ

以上から、肥満細胞、特に host 側に残存する肥満細胞が胸腺回復に重要な役割を担っていることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Kazuhiro Noguchi, Masaki Fukuda, Shintaro Mase, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Akihiro Yachie, Masayuki Nagasawa, Ryosei Nishimura.

Prophylactic effects of recombinant thrombomodulin against sclerodermatous chronic graft-versus-host disease in a rodent model. 59th American society of hematology annual meeting. 2017年12月9日-12日. アトランタ(米国)

Rie Kuroda, Shintaro Mase, Hideaki Maeba, Toshihiro Fujiki, Masaki Fukuda, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie,

Ryosei Nishimura. Third party cytokine-induced killer cells eliminate highly activated T-cells, leading to protect from murine lethal graft-versus-host disease. 58th

American society of hematology annual meeting. 2016年12月3日-6日. サンディエゴ(米国)

Rie Kuroda, Shintaro Mase, Toshihiro Fujiki, Hideaki Maeba, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Masaki Fukuda, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie,

Ryosei Nishimura. Third party cytokine-induced killer cells protect from murine lethal graft-versus-host disease. 57th American society of hematology annual meeting 2015年12月5日-8日. オランダ(米国)

〔図書〕(計 0 件)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 良成 (NISHIMURA, Ryosei)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号: 50324116

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

荒木 来太 (ARAKI Raita)

黒田 梨絵 (KURODA Rie)

馬瀬 新太郎 (MASE Shintaro)

前馬 秀昭 (MAEBA Hideaki)