

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06873

研究課題名(和文)線維細胞に着目した同種造血幹細胞移植後臓器線維化メカニズムの解明と制御法の開発

研究課題名(英文)Improvement of the organ fibrosis after Hematopoietic stem cell transplantation focus on fibrocyte

研究代表者

伊野 和子 (Ino, Kazuko)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60775568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(Graft vs Host Disease, GVHD)は、移植医療における重要な課題である。特に慢性GVHDは、臓器・組織線維化から生活の質を低下させる。本研究では、組織線維化に關与する筋線維芽細胞の前駆細胞となる線維細胞に着目しこの病態解明を行った。GVHDモデルマウスを用いた検討では、移植後2週の早期において、活性化単球の末梢血中への出現を認め、また、ヒト臨床検体を用いた検討でも、移植後day 30の早期において、末梢血中に同様の活性化単球の出現を認めた。こうした細胞は、比較的長期において末梢血中から検出され、免疫細胞と關連することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has become the curable treatment for the patient of hematological malignancy. Graft versus host disease (GVHD) after HSCT is the most important problem. The pathology of chronic GVHD is the organ fibrosis. It declines the Quality of life after HSCT. In this study, we focused on the fibrocyte, it was precursor of fibroblast, analyzed the pathophysiology of chronic GVHD. In the study of mice model, activated monocytes were appeared to peripheral blood after 2 weeks. On the contrary, immunocompetent cells, T cell, B cell and NK cell, were appeared after 4 to 6 weeks. In the study of human, activated monocytes were appeared peripheral blood about day 30 after HSCT and these cells were detectable long time. These data suggest that activated monocytes were appeared after HSCT in early stage and the interaction of these cells to immunological cells may be related to chronic GVHD after HSCT. Further experiments are needed for more detail analysis.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：造血幹細胞移植 慢性GVHD 線維細胞

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は、難治性血液疾患に対する根治的治療法であるが、移植片宿主病 (Graft-vs-Host Disease, GVHD) や感染症などの合併症、原病の再発など、臨床的課題が多く残されている。移植方法の多様化により患者の年齢層は拡大し、移植件数は年々増加、支持療法の進歩も加わり、移植後長期生存患者は増加を認めている。これに伴い慢性 GVHD を有する患者も増加を認め、慢性 GVHD による組織・臓器線維化が、患者の生活の質 (Quality of Life, QOL) を低下させる要因となっている。急性 GVHD は、ドナー免疫応答による同種免疫反応が病態の主体であるのに対し、こうした慢性 GVHD の病態は、免疫反応のみで説明できるものではなく、その発症機序は未だ不明な点が多い。

また、通常、組織線維化の過程においては、筋線維芽細胞が病変部位に集積し、コラーゲン等の細胞外基質を産生することでその病態を形成している。こうした筋線維芽細胞の前駆細胞として末梢血中の線維細胞が知られており、こうした末梢血線維細胞は単球から分化するとの報告があるが、同種造血幹細胞移植後末梢血単球および線維細胞の動態と組織線維化との関連は明らかになっていない。あわせて、活性化単球においては、細胞表面抗原として Ly6C の発現増強、Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 (SLAMF7) 発現の増強が報告されているが、これらについても詳細な検討は行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、組織線維化に關与する筋線維芽細胞の前駆細胞となる線維細胞、また、末梢血中の単球系細胞に注目し、慢性 GVHD 患者の QOL を低下させる同種造血幹細胞移植後臓器線維化メカニズムの解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト慢性 GVHD に類似したマウスモデル、及び同種造血幹細胞移植施行後のヒト末梢血臨床検体を用いて、末梢血中の単球および線維細胞に注目し、その動態と線維化、慢性 GVHD との関連について検討を行った。

(1) ヒト慢性 GVHD に類似したマウスモデルを用いた検討では、レシピエントマウスに全身放射線照射を施行した後、異なる系統のマウスより T 細胞除去骨髄および脾臓由来の (末梢血成熟) T 細胞を移植し GVHD モデルマウスを作製した (図 1)。対象群には、同線量の全身放射線照射を行ったレシピエントへ、T 細胞除去骨髄のみの移植を行った。この際、主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex) 不一致、マイナー組織適合抗原 (Minor Histocompatibility Complex) 不一致、それぞれのマウスモデルを作製し検討を行

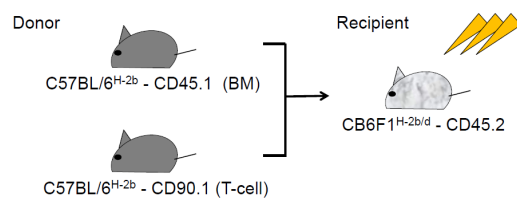
った。以後、ドナー特異的マーカーを認識する抗体を使用したフローサイトメトリー法により、末梢血のドナー由来単球及び線維細胞の数、また、リンパ球、NK 細胞などの免疫担当細胞について経過を確認した。移植後 2 週から 6 週にかけて、それぞれの群におけるマウス末梢血の採血を行うことで、継時的に検討を行った。

(2) 同種造血幹細胞移植後ヒト末梢血臨床検体を用いた検討では、三重大学倫理委員会の承認後より、三重県内の造血幹細胞移植施設において、同種造血幹細胞移植施行後のヒト末梢血中の単球細胞と活性化単球系細胞数について、フローサイトメトリー法を用いて継時的に検討を行った。

図 1. GVHD マウスモデル作製

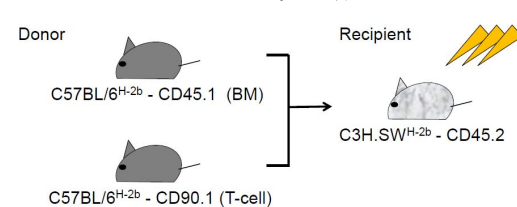
(1) Major Histocompatibility Complex

不一致マウスモデル



(2) Minor Histocompatibility Complex

不一致マウスモデル



骨髄由来細胞 CD45.1、
グラフト由来細胞 CD90.1

4. 研究成果

(1) GVHD マウスモデルを用いた検討においては、移植後 2 週間を経過した比較的早期の段階から、末梢血中に Ly6C^{high}Ly6G^{low} の活性化単球の出現を認めた。これらの出現頻度については、GVHD を生じた群と生じていない群において統計的な有意差は認めなかった (図 2)。一方で、同様に移植後 2 週間の比較的早期の段階において認められる Ly6C^{high}Ly6G^{low} の活性化単球では、特に Minor Histocompatibility complex 不一致移植群において、有意に SLAMF7 発現強度の増強を認めた (図 3)。

図 2. マウス末梢血 Ly6C^{high}Ly6C^{low} 単球 (%)

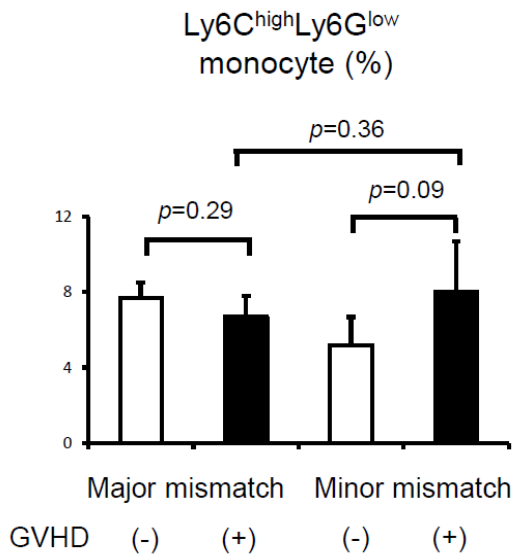
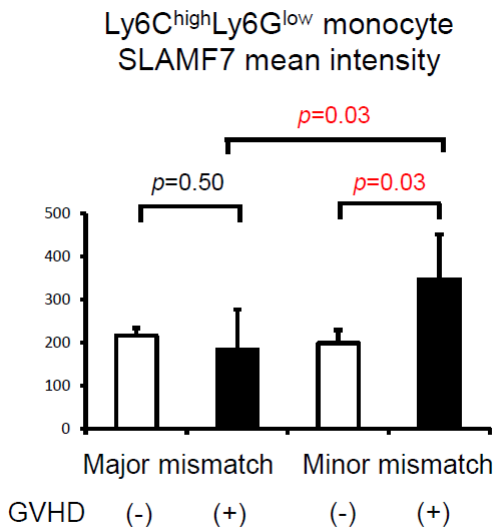


図 3. マウス末梢血 Ly6C^{high}Ly6C^{low} 単球 SLAMF7 mean intensity



(2)同種造血幹細胞移植後のヒト末梢血臨床検体を用いた検討においては、移植後 day 30-60 の比較的白血球数が安定した頃を目安に、多くの症例において、CD45⁺CD14⁺SLAMF7 陽性単球の著明な増加を認めた(図 4)。また、こうした CD45⁺CD14⁺SLAMF7⁺陽性単球は、移植後の経過と共に経時的に低下を認め、これら活性化単球における SLAMF7 発現強度についても、移植後の経過と共に継続的に低下を認めた(図 5)。一方で、こうした CD45⁺CD14⁺SLAMF7 陽性単球は、移植後 5 か月経過した時点、また、1 年経過した時点でも移植患者の末梢血中から検出され、比較的長期に渡って移植患者の末梢血中に存在することが確認された。

図 4. ヒト末梢血 CD45⁺CD14⁺SLAMF7⁺単球 (%)

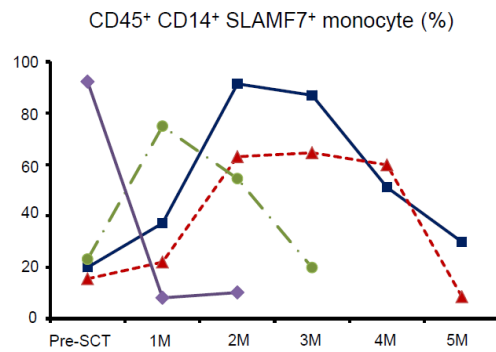
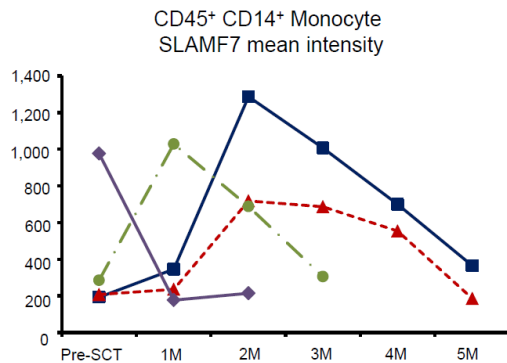


図 5. ヒト末梢血 CD45⁺CD14⁺単球 SLAMF7 mean intensity



ヒト慢性 GVHD に類似したマウスモデルを用いた検討、また、同種造血幹細胞移植後のヒト末梢血臨床検体を用いた検討、いずれにおいても、移植後比較的早期から、活性化単球の末梢血中への出現を認めた。また、こうした活性化単球は移植後比較的長期にわたって末梢血中に検出されることが確認された。加えて、同様の GVHD マウスモデルを用いた検討においては、移植後 4 週にかけて、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の回復を認め、移植後 6 週にかけて、B220 陽性 B 細胞、NK1.1 陽性 NK 細胞といった免疫担当細胞の回復をそれぞれ認めており、移植後早期にみられる活性化単球の増加とあわせて、こうした免疫担当細胞との相互作用が、以後の慢性 GVHD 病態に関連することが考えられた。

現時点での解析においては、GVHD マウスモデルを用いた検討、同種造血幹細胞移植後ヒト末梢血臨床検体を用いた検討、いずれも比較的少数となっており、今後、さらに移植モデルマウス件数、同種造血幹細胞移植後ヒト末梢血臨床検体数を増やし、詳細な検討を行うことで、同種造血幹細胞移植後の慢性 GVHD における臓器線維化メカニズム解明に至ることを目指している。

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 2 件)

- (1) Ino K, Fuji S, Tajima K, Tanaka T, Okinaka K, Inamoto Y, Kurosawa S, Kim SW, Katayama N, Fukuda T.
Clinical Utility of Wilms' Tumor 1 Monitoring in Patients with Myeloid Malignancy and Prior Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.
Biol Blood Marrow Transplant. 2017;23:1780-1787. (査読あり)
- (2) Ino K, Nakase K, Nakamura A, Nakamori Y, Sugawara Y, Miyazaki K, Monma F, Fujieda A, Sugimoto Y, Ohishi K, Masuya M, Katayama N.
Management of Pulmonary Mucormycosis Based on a Polymerase Chain Reaction (PCR) Diagnosis in Patients with Hematologic Malignancies: A Report of Four Cases.
Intern Med. 2017;56:707-711. (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊野 和子 (INO, Kazuko)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 60775568