

令和元年6月18日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10338

研究課題名(和文) 混合臍帯血移植による大量放射線被ばく個体の救命機序に関する総合的検証

研究課題名(英文) Comprehensive verification on life-saving mechanism of lethal dose radiation exposed individual by mixed umbilical cord blood transplantation

研究代表者

伊藤 巧一 (Ito, Koichi)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90398579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核関連施設従業員の大量放射線被ばく事故を想定し、事故で失われた造血機能回復に有効な混合臍帯血移植法の確立をマウスモデルで検証した。これまでと同様に、組織適合性抗原(MHC)が異なる2つの異系臍帯血の混合移植が放射線照射マウスに対する高い救命効果と自己造血機能回復を誘導することが再確認できた。さらに、この自己造血機能回復という放射線曝露個体にとって有益な特性が、移植臍帯血中に含まれる接着性細胞の分泌する造血系サイトカインによって誘導されている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東日本大震災に伴う東京電力・福島第一原子力発電所から核分裂生成物の環境への漏洩は放射能汚染や放射線被ばくという深刻な問題を生み出した。この事故を教訓に、放射線被ばく医療の確立が求められている。本研究課題は被ばく医療の中でも最悪の事態に対応する移植医療を確立するもので、その社会的意義は大きい。

また、学術的にも混合臍帯血移植が示す生着特性については未知な部分が多かったが、MHC不適合の異系混合臍帯血移植が放射線曝露個体の自己造血機能回復に適しているという新知見を得た。加えて、この自己造血機能回復効果が臍帯血中に含まれる接着性細胞によって誘導されているという新たな造血調節機構の発見に至った。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cell transplantation is a powerful treatment that can be used to reconstitute hematopoietic systems damaged in total body irradiation exposure accidents. As previous results, allogeneic double-unit UCBC transplantation (dUCBC Tx) showed a high survival rate with self-hematopoietic recovery in all X-ray-irradiated recipients even in increased number of transplants. These results indicate the usefulness of allogeneic sources for dUCBC Tx for restoration of a patient's hematopoietic system after a radiation exposure event. Furthermore, it was suggested that hematopoietic cytokines secreted by adherent cells contained in umbilical cord blood may induce the self-hematopoietic recovery in all recipients.

研究分野：免疫学

キーワード：臍帯血移植 放射線被ばく医療 造血幹細胞 組織適合性抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高線量被ばく事故では曝露個体の失われた造血機能を早急に回復させ、救命を図ることが最大の課題となる。多くの放射線被ばく医療に関する研究が実施されているが、その中心は被ばく線量のモニタリング法の開発である。高線量被ばくに特化した治療法の確立についてはあまり積極的に実施されていない。1999年東海村 JOC 臨界事故では、3名のうち2名の従業員が大量放射線被ばくし、緊急的に家族から提供された骨髄を移植したが最終的に多臓器不全で亡くなっている。

もう1つの移植ソースの候補として臍帯血がある。臍帯血は成熟 T 細胞をほとんど含まないことから拒絶反応が起こり難いというメリットがある反面、一人の妊婦から得られる臍帯血では一人の患者の需要を満たせないというデメリットがある。そこで、この数的限界を克服するために考案されたのが2つの臍帯血を混合して移植する方法である。この混合臍帯血移植については、すでに臨床試験が国内外で実施されているが、移植後の解析は患者の臨床的な経過観察にとどまり有効性に関する学術的検証は行われていないのが現状である。これまでに混合臍帯血移植を被ばく医療に取り入れた試みはない。

2. 研究の目的

東日本大震災に伴う東京電力・福島第一原子力発電所事故以降、国内に存在する原発は再稼働または廃炉の二者択一が迫られている。いずれにせよ、その作業過程で生じうる不慮の放射線被ばく事故に対する医療体制の確立は、核施設周辺住民はもとより核施設従業員に対する安全対策の備えとして国家レベルで取り組むべき最重要課題である。本研究では、核関連施設の従業員が全身大量被ばくした場合に救命効果が発揮できる混合臍帯血移植法の確立を目指すと共に、この移植により誘導される救命効果の作用機序について検証した。

3. 研究の方法

(1) 臍帯血移植: 致死量 X 線照射 (7.25Gy) B6 レシピエントマウスに組織適合性抗原 (H-2) が同系 (B6: H-2^b) および異系 (BALB: H-2^d と C3H: H-2^k) の3種類の胎児から採取した臍帯血細胞 0.25×10^6 個を1単位とし、すべてのコンビネーションで合計2単位になるよう等量混合移植 (B6+B6 群, BALB+BALB 群, C3H+C3H 群, B6+BALB 群, B6+C3H 群および BALB+C3H 群) した。

(2) 移植後の生存率および免疫系再構築に関する解析: 移植後4週毎に16週まで、生存率の観察と共に、移植した2単位のどちら側のユニットで免疫系細胞が構築されているかを蛍光標識抗体染色によるフローサイトメトリーで経時的に解析した。

(3) 臍帯血由来接着細胞の分離と解析: 致死量 X 線照射 B6 レシピエントマウスに自己造血機能回復を誘導した混合臍帯血移植 (BALB+C3H) について、その回復に関わる機構解明を培養実験で試みた。BALB および C3H 胎児より採取した各臍帯血を 1×10^6 個/mL になるように培養液で調整し、24 ウェル細胞培養プレートに単独培養では各臍帯血を1ウェルあたり 2×10^6 個播種、混合培養では各臍帯血を1ウェルあたり 1×10^6 個ずつ等量混合したものを播種し、2日後、浮遊細胞を除去して培養プレートに残った接着性細胞だけをさらに3日間培養した。単独および混合培養1, 3, 5日後、回収した接着性細胞から RNA を抽出し、cDNA を逆転写酵素で合成した。この合成した cDNA を10種類のサイトカイン特異的 (TGF- β , IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-3, IL-7, IL-6, GM-CSF, SCF) プライマーを用いて PCR 増幅し、それらサイトカイン産生を評価した。5日間培養後の一部の接着性細胞については、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析に用いた。

4 . 研究成果

(1) 生存率と免疫系再構築：移植後 16 週までの生存率は、同系 2 単位単独移植した生存率が 100%であったのに対し、同系および異系臍帯血を混合移植した B6 + BALB 群および B6 + C3H 群の生存率は共に 50%前後と低下が見られ、異系臍帯血による移植細胞数の補助は生存率を低下させる結果となった。このことから同系臍帯血に対する異系臍帯血の数的補充は生存率向上の観点から有益でないことが示唆された。しかし注目すべき結果として、異系同士の混合である BALB + C3H 群では生存率が 90%と明らかな救命効果が認められた。BALB および C3H の各単独 2 単位移植 (BALB + BALB 群および C3H + C3H 群) での生存率はそれぞれ 26%と 14%であることから、異系臍帯血同士を混合することの重要性が示された。これらの結果は、以前に同じコンビネーションで実施した検証結果を再現するもので、移植数を増加しても同様であった。次に移植マウス末梢血中の免疫系細胞を解析したところ、B6 + BALB 群および B6 + C3H 群では同系 B6 臍帯血由来の免疫系細胞再構築は認められたが、異系 BALB ならびに C3H に由来する再構築は低頻度であった。一方、BALB + C3H 群では、すべての生存 B6 レシピエントで自己造血系回復による免疫系細胞再構築が認められたことから、放射線被ばくに対する異系混合臍帯血移植の高い救命効果と自己造血機能回復促進という理想的な特性が見出された。この混合臍帯血移植 (BALB + C3H 群) は放射線曝露個体に対して高い救命効果と自己造血機能回復という理想的な効果を発揮したが、この効果には両移植ソースに含まれる造血幹細胞生着は関わっていないことになる。この結果に着目し、放射線曝露個体の自己造血機能回復には臍帯血に含まれる造血幹細胞以外の何らかの細胞が関与する可能性がある。具体的な候補細胞として臍帯血に含まれる接着性細胞を考えた。接着性細胞の 1 つであるマクロファージ (Mφ) は異物貪食能にとどまらず、造血機能制御に関わっていることが知られている (引用文献参照)。

(2) 臍帯血由来接着性細胞のサイトカイン産生：そこで、BALB および C3H 胎児より採取した臍帯血中の接着性細胞を 5 日間単独または混合培養し、5 日後の接着性細胞のサイトカイン産生を RT-PCR で検出した。その結果、単独および混合培養の両接着性細胞ともにサイトカイン産生が見られたが、混合培養群の接着性細胞で IL-3, IL-7, IL-6, GM-CSF, SCF の造血系サイトカイン産生が増強していた。2 つの異系混合臍帯血移植が高い生存率を誘導した理由とも考えられる。すなわち BALB + C3H 混合臍帯血移植では、両臍帯血に含まれる造血幹細胞の生着は無かったが、これら接着性細胞の産生する造血系サイトカインが放射線照射マウスの自己造血機能回復に寄与した可能性がある。また、これら接着性細胞は Mφ が特異的に有する細胞表面マーカーを発現していた。今後の被ばく医療への導入が期待できる。

< 引用文献 >

Yi Luo, et al. M1 and M2 macrophages differentially regulate hematopoietic stem cell self-renewal and ex vivo expansion. *Blood Advances*, 2018, 2(8), 859-870.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Manabu Nakano, Koichi Ito, Takeo Yuno, Nobuyuki Soma, Syun Aburakawa, Kosuke Kasai, Toshiya Nakamura, Hideki Takami, UDP/P2Y6 receptor signaling regulates IgE-dependent degranulation in human basophils, *Allergology international*, 査読有, 2017, 66, 574-580.
DOI:10.1016/j.alit.2017.02.014

Hiroshi Maeda, Hideaki Sato, Mika Araya, Kyoko Ito, Ken-ichiro Terui, Eiki Tsushima, Manabu

Nakano and Koichi Ito, In vivo functional adaptive immune responses in mice subjected to allogeneic umbilical cord blood cell transplantation, *The Hirosaki Medical Journal*, 査読有, 2016, 66, 162-175. <http://hdl.handle.net/10129/5812>

〔学会発表〕(計 10 件)

牧 優治、川島 健太郎、伊藤 京子、伊藤 巧一、致死量放射線曝露個体の自己造血機能回復に対する混合アロ臍帯血移植の有効性、第7回日臨技北日本支部医学検査学会、2018

川島 健太郎、牧 優治、伊藤 京子、伊藤 巧一、臍帯血および骨髄由来造血幹細胞の造血系再構築に関する比較検証、第7回日臨技北日本支部医学検査学会、2018

川島 健太郎、牧 優治、伊藤 京子、伊藤 巧一、臍帯血および骨髄由来Side population (SP) 細胞の血球分化能に関する研究、第13回日本臨床検査学教育学会学術大会、2018

牧 優治、川島 健太郎、伊藤 京子、伊藤 巧一、混合アロ臍帯血移植は致死量放射線曝露個体自身の造血機能を優位に回復する、第13回日本臨床検査学教育学会学術大会、2018

坂本 倭、辻口 貴清、伊藤 巧一、山内 可南子、放射線曝露マウスの腸内細菌叢及び腸管上皮組織の変化、第13回日本臨床検査学教育学会学術大会、2018

工藤 浩揮、高屋 絵美梨、伊藤 京子、伊藤 巧一、臍帯血および骨髄 Side population (SP) 細胞の生着能に関する比較検討、第12回日本臨床検査学教育学会学術大会、2017

高屋 絵美梨、工藤 浩揮、伊藤 京子、伊藤 巧一、大量放射線曝露個体に対する混合臍帯血移植の有効性とその特性に関する研究、第12回日本臨床検査学教育学会学術大会、2017

Ken-ichiro Terui, Sena Yamakawa, Kyoko Ito, Manabu Nakano and Koichi Ito, Effect of allogeneic source in double-unit umbilical cord blood transplantation, 第45回日本免疫学会学術集会、2016

照井 健一郎、前田 浩志、佐藤 英明、伊藤 京子、中野 学、伊藤 巧一、マウス同種異系臍帯血移植による機能的免疫細胞再構築に関する検証、第100回弘前医学会総会、2016

Ken-ichiro Terui, Sena yamakawa, kyoko Ito, Manabu Nakano and Koichi Ito. Allogeneic double-unit umbilical cord blood cell transplantation facilitates hematopoietic recovery in an irradiated host. 3rd Educational Symposium on Radiation and Health by Young Scientists, 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中野 学

ローマ字氏名：Nakano Manabu

所属研究機関名：弘前大学

部局名：保健学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：10436016

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。