

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10135

研究課題名(和文) PUVa処理した制御性樹状細胞の更なる免疫抑制増強の試み：新たなGVHD治療戦略

研究課題名(英文) Improvement in making methods of PUVA-treated dendritic cells

研究代表者

前馬 秀昭 (HIDEAKI, MAEBA)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：10419335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PUVA処理(Psoralen+UVA照射2J)した樹状細胞(PUVA-DC)がin vitroにおいて、制御性樹状細胞の性質を獲得したことを報告してきた。その細胞をマウスGVHDモデルにて検討を行ったが、GVHD抑制作用が得られなかったため、PUVA-DCの作製条件の検討を行った。UVA照射の設定(0-2J)を探索したが、0.2-1Jでは免疫寛容を有していなかった。次にカスパーゼ阻害剤による処理を追加したが、PUVA-DCの24時間後の生存率は改善せず免疫寛容誘導能も有していなかった。PUVA-DCを、細胞治療に用いるためには、さらなる培養条件の検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植の合併症であるGVHDはHLA適合や免疫抑制剤の開発がなされてきた現在においてもII度以上のGVHDは非血縁者間で40%以上発症し、原疾患の治癒が得られても死亡する症例が存在する。我々は、マウス骨髄細胞からpsoralenと紫外線(UVA)を用いて、制御性樹状細胞(PUVA-DC)を開発し、その細胞はマウスモデルでMHC非依存性にTリンパ球に対し抑制性の作用を示した。この技術を人に応用し、HLAの壁を乗り越える安全な骨髄移植開発のため、PUVA-DCの至適作製条件の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We have reported that bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs), which are generated from bone marrow cells plus GM-CSF, acquired tolerogenicity by PUVA-treatment (psoralen +UVA 2J/cm²) in mice. The PUVA-treated DCs have tolerogenic function in a MHC-independent manner. But these cells did not have the inhibitory effects in the mouse GVHD model. We tried to improve the manufacture condition of PUVA-DC, to make these cells engraft effectively in vivo. At first, we researched the setting (0-2 J/cm²) of the UVA radiation, but did not have acquired tolerance in the UVA 0.2-1J/cm² setting. Next, we added caspase inhibitor to PUVA treatment for apoptotic suppression by the UVA radiation. The survival rate 24 hours after PUVA-treatment were not improved, and these cells did not have the acquired more tolerance than conventional PUVA-DC. The examination of the further culture condition is necessary to use PUVA-DC for cell therapy.

研究分野：小児血液

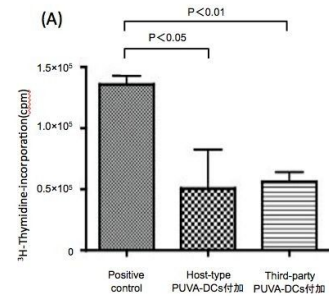
キーワード：GVHD psoralen UVA 制御性樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性造血器腫瘍の根治的治療法として造血幹細胞移植が確立されているが、急性 GVHD のために、十分な治療成績が得られていない現状がある。我々の作成した psoralen+紫外線照射(UVA) を利用した制御性樹状細胞 (PUVA-DCs) は、ドナータイプおよびサードパーティーからの作製でも混合リンパ球反応を抑える事が可能であった (図 A)。

しかしながら、ヒトへの臨床応用のためには、培養という特殊な条件に加え光毒性物質+紫外線照射という細胞にとっては厳しい条件が加わる。ヒトへの臨床応用のために、生体内で効率的に生着させるため、PUVA-DCs 作製条件の検討を行った。



2. 研究の目的

我々は、HLA の壁を乗り越える安全な造血幹細胞移植の開発を最終的な研究目標としている。その手段として、我々は、マウス骨髄細胞からpsoralen と紫外線(UVA)を用いて、制御性樹状細胞 (PUVA-DCs)を大量かつ安価に作製する技術を開発した。In vitro ではMHC 非依存性にT リンパ球に対し抑制性の作用を示すが、in vivo では、PUVA-DC が生体内で効率的に生着できないなどのいくつかの乗り越えるべき課題が残っている。作製法、安全性が比較的担保された技術から成り立っており、本助成を通じてこれらの点を克服して、造血幹細胞移植をはじめ、各種自己免疫疾患への臨床応用へと邁進したい。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞から、GM-CSF を用い10 日間かけて大量の未熟樹状細胞を作製する。その未熟樹状細胞に対して、psoralen (200ng/ml) を添加、その後UVA 照射 (2J/cm²) を施行し24 時間経過したものを、PUVA-DC として実験に用いる。まずは、至適UVA照射の設定 (0、0.2、0.5、1、2 J/cm²) の検索を行い、それぞれのPUVA-DCにてMixed Lymphocyte Reaction (MLR)を行った。次に、UVA照射によるアポトーシスを抑制させるため、カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMK それぞれ10uM、50uM) を用いて、PUVA-DCの至適作製条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 我々が過去に報告した PUVA-DCs を用いてマウス GVHD モデルにて骨髄移植を施行し、GVHD が抑制されるか検討を行った。

1 Balb/c C57BL/6 モデル

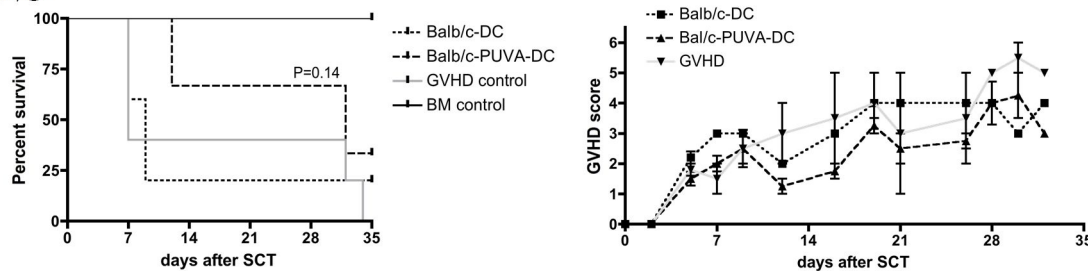
BM control Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6

GVHD control Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6

Balb/c-DC Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6 + C57BL/6-DC 5.0×10^6

Balb/c-PUVA-DC Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6 + C57BL/6- PUVA-DC 5.0×10^6

図 1



2 C57BL/6 Balb/c モデル

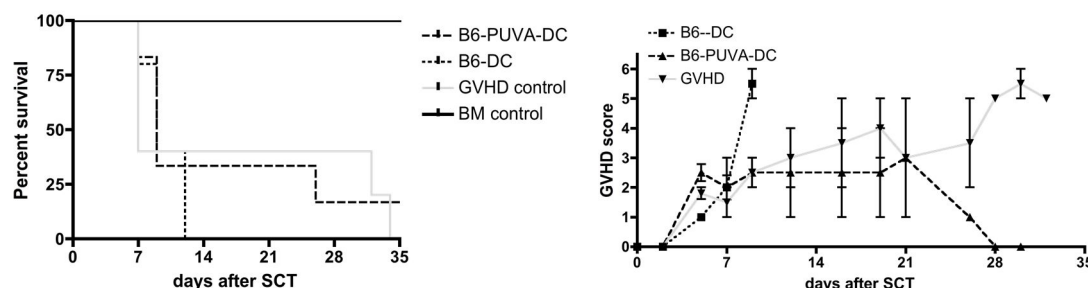
BM control Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6

GVHD control Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6

Balb/c-DC Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6 + C57BL/6-DC 5.0×10^6

Balb/c-PUVA-DC Balb/c 骨髄細胞 5.0×10^6 + 脾臓細胞 20×10^6 + C57BL/6- PUVA-DC 5.0×10^6

図 2



上記のマウス GVHD 移植実験に、我々が開発した PUVA-DC を GVHD 予防として細胞輸注を施行したが、図 1、図 2 の結果から、生存の延長や GVHD の改善しない事が判明した。原因究明の過程から、培養という特殊な条件に加え光毒性物質+紫外線照射という細胞にとっては厳しい条件が加わり、生体内投与後の PUVA-DCs の生存が不十分である可能性が示唆された。

(2) 紫外線照射による細胞毒性が、生体内投与後の生着および生存に影響を与えた事が示唆された事から、UVA 照射の設定 (0~2J/cm²) を変更し、どこまで UVA 照射が減弱できるかを、混合リンパ球反応 (MLR) を用いて検討を行った。

図 3 実験モデル responder: Balb/c-脾臓細胞 stimulator: C57BL/6-PUVA-DC (UVA 照射は 0J, 0.2J, 0.5J, 1J, 2J に振り分けた。)

図 4 実験モデル C57BL/6 PUVA-DC-脾臓細胞 stimulator: Balb/c-PUVA-DC (UVA 照射は 0J, 0.2J, 0.5J, 1J, 2J に振り分けた。)

図 3

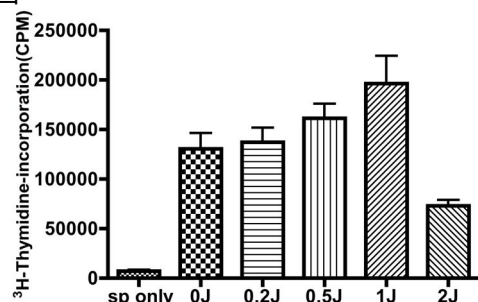
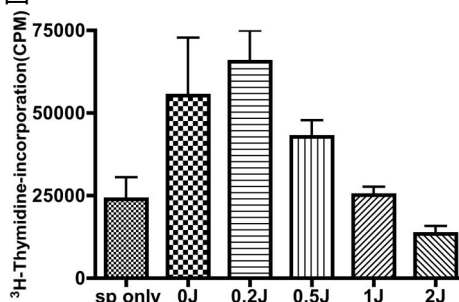


図 4



上記の混合リンパ球反応の実験結果より免疫寛容を誘導するためには、UVA の照射量は 2J/cm² 必要である事が判明した。

(3) 1 UVA 照射による細胞障害作用を阻害し生体内での生着の促進させるために、骨髄由来の樹状細胞に対して、抗アポトーシス作用をもつカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMK) を 10 μM および 50 μM にて 30 分間添加後、PUVA 処理 (psoralen 200ng/ml および UVA 照射 2J/cm²) を行い検討した。

図 5 C57BL/6 骨髄由来の樹状細胞にて PUVA 処理した PUVA-DC および PUVA 処理前にカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMK) を 10 μM および 50 μM にて 30 分間添加し、それぞれの細胞の生存割合を PUVA 処理のみ行った細胞を 100% として生存細胞数を比較した。

図 6 Balb/c 骨髄由来の樹状細胞にて上記と同じ様に比較した。

図 5

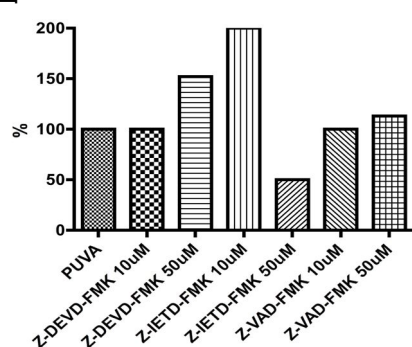
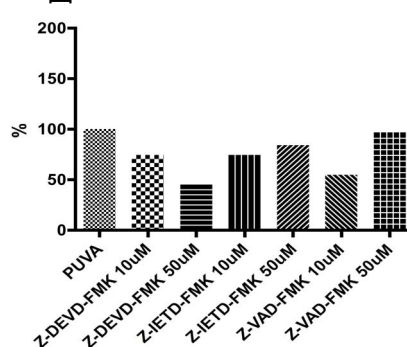


図 6



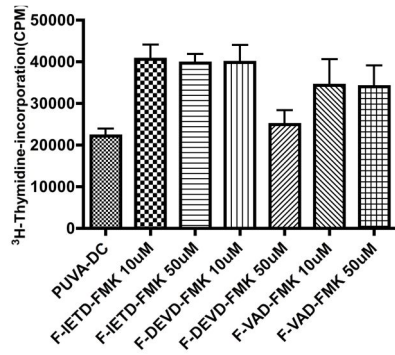
上記の検査結果から UVA 照射によるアポトーシス阻害のためにカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMK) を用い、添加濃度を 10 μM および 50 μM に振り分けても、カスパーゼ阻害剤による処理を行わなかった PUVA-DC に比べて優位に生存数が増加する事はなく、一部のカスパーゼ阻害剤では生細胞数の減弱が認められた。

(3) 2 上記の細胞を用いて混合リンパ球反応 (MLR) の検討を行った。

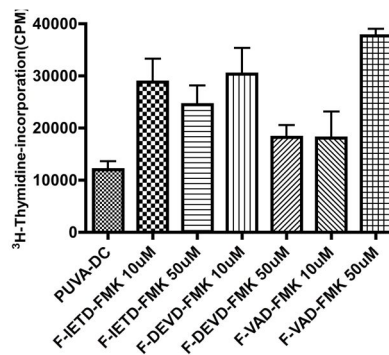
図 7 実験モデル responder: Balb/c-脾臓細胞 stimulator: C57BL/6-PUVA-DC (カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMK) を 10 μM および 50 μM にて処理)

図 8 実験モデル C57BL/6 PUVA-DC-脾臓細胞 stimulator: Balb/c-PUVA-DC (カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMK) を 10 μM および 50 μM にて処理)

☒ 7



☒ 8



上記の混合リンパ球反応の検査結果からカスパーゼ阻害剤を PUVA 処理 (psoralen 200ng/ml および UVA 照射 2J/cm²) の前に施行しても、免疫寛容を誘導する能力の増強も得られない事が判明した。

上記の実験結果より、PUVA-DC の生体内での効率的な生着のため、UVA 照射量の調整、カスパーゼ阻害剤の種類、添加濃度を設定では効率的な免疫寛容効果が誘導されにくい事が判明した。PUVA-DC を臨床応用するために、さらなる培養条件の改良のみだけでなく、移植時の定期的な PUVA-DC の投与の組み合わせ等を考慮した実験の計画を今後検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Toshihiro F, Ryosei N, Shintaro M, Rie K, Yasuhiro I, Raita A, Hideaki M, Akihiro Y	4. 巻 61
2. 論文標題 Accurate detection of renal leukemic involvement in children using 3-Dcomputed tomography modeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 679-687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro I, Ryosei N, Raita A, Kazuhiro N, Masaki F, Toshihiro F, Rie K, Shintaro M, Hideaki M, Akihiro Y	4. 巻 25
2. 論文標題 Nonallergic cutaneous pigmentation is commonly observed after methotrexate administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Oncol Pharm Pract	6. 最初と最後の頁 769-771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1177/1078155218815557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro Ikawa, Ryosei Nishimura, Hideaki Maeba, Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Kazuhiro Noguchi, Masaki Fukuda, Shintaro Mase, Raita Araki, Yusuke Mitani, Tomohiko Sato, Kiminori Terui, Etsuro Ito, Issay Kitabayashi & Akihiro Yachie	4. 巻 56
2. 論文標題 Deep spontaneous molecular remission in a patient with congenital acute myeloid leukemia expressing a novel MOZ-p300 fusion transcript	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 2497-2499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/10428194.2018.1434885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Raita Araki, Ryosei Nishimura, Rie Kuroda, Toshihiro Fujiki, Shintaro Mase, Kazuhiro Noguchi, Yasuhiro Ikawa, Hideaki Maeba, Akihiro Yachie	4. 巻 108
2. 論文標題 A characteristic flow cytometric pattern with broad forward scatter and narrowed side scatter helps diagnose immune thrombocytopenia (ITP)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 151-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s12185-018-2454-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiki Toshihiro, Nishimura Ryosei, Ikawa Yasuhiro, Noguchi Kazuhiro, Mase Shintaro, Kuroda Rie, Araki Raita, Maeba Hideaki, Yachie Akihiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Hearing impairment accompanied with low-tone tinnitus during all trans retinoic acid containing chemotherapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e26864 ~ e26864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/pbc.26864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前馬 秀昭, 野口 和寛, 福田 正基, 黒田 梨絵, 藤木 俊寛, 馬瀬 新太郎, 荒木 来太, 伊川 泰広
2. 発表標題 難治性リンパ系腫瘍に対する長期維持療法としての少量クロファラビン併用化学療法
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前馬 秀昭, 野口 和寛, 福田 正基, 黒田 梨絵, 藤木 俊寛, 馬瀬 新太郎, 荒木 来太, 伊川 泰広, 和田 泰三
2. 発表標題 造血幹細胞移植患者における高頻度に認めたMRワクチンに対する抗体産生不全
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前馬 秀昭, 酒井 清祥
2. 発表標題 縦隔リンパ管奇形を合併した多発限局性結節性過形成症候群の12歳女児例
3. 学会等名 日本血管腫血管奇形学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前馬 秀昭, 酒井 清祥, 野口 和寛, 福田 正基, 黒田 梨絵, 藤木 俊寛, 馬瀬 新太郎, 荒木 来太, 伊川 泰広, 和田 泰三
2. 発表標題 縦隔リンパ管奇形を合併した多発限局性結節性過形成症候群-12歳女児例-
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前馬 秀昭, 野口 和寛, 福田 正基, 藤木 俊寛, 黒田 梨絵, 馬瀬新太郎, 荒木 来太, 伊川 泰広, 谷内江昭宏
2. 発表標題 神経芽腫治療終了後、早期に肝臓に発症した限局性結節性過形成の2例
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前馬 秀昭, 西村 良成, 野口 和寛, 福田 正基, 藤木 俊寛, 黒田 梨絵, 馬瀬新太郎, 荒木 来太, 伊川 泰広, 谷内江昭宏
2. 発表標題 ダウン症候群における急性リンパ性白血病に対する骨髄非破壊的移植施行した2症例の検討
3. 学会等名 第40回造血幹細胞移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前馬 秀昭, 西村 良成, 野口 和寛, 福田 正基, 藤木 俊寛, 黒田 梨絵, 馬瀬新太郎, 荒木 来太, 伊川 泰広, 谷内江昭宏
2. 発表標題 HPV-B19感染後に生じた一過性後天性von Willebrand症候群
3. 学会等名 第59回 日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	西村 良成 (Ryosei Nishimura) (50324116)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究 協力者	藤木 俊寛 (Fujiki toshihiro)		
研究 協力者	黒田 梨絵 (Kuroda Rie)		