

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08089

研究課題名（和文）臍帯血繊維芽細胞移植による放射線曝露個体の自己造血回復を目指した新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic method to achieve recovery of self-hematopoietic function of radiation-exposed individuals by cord blood-derived fibroblast 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） 3,300,000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、事故で失われた自己造血機能の回復を目指した新たな治療法の開発に取り組む。申請者はこれまでに混合臍帯血移植による自己造血機能回復の有効性を証明してきたが、本研究ではさらに新たな治療選択肢として、臍帯血に含まれる造血幹細胞ではなく、繊維芽細胞を用いた移植法の有効性を検討する。繊維芽細胞は容易に培養増殖が可能ことから、供給面でより安定した移植ソースと成り得る。本研究は、被ばく医療の中でも最悪の事態に対応する治療法の確立と位置づけられる。

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の核分裂生成物の環境への漏洩事故以降、日本の原子力政策は原発再稼働と廃炉作業が同時に進行することから、その作業過程で生じうる大量放射線被ばく事故に対する万全な医療体制の確立は安心・安全な社会構築に不可欠である。本研究課題は、臍帯血に含まれる繊維芽細胞を放射線曝露個体の自己造血機能回復のための新たな移植ソースとして用いることを目標としており、これまでに無い試みと言えることからその学術的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, the applicant assumed a large-scale radiation exposure accident for employees of nuclear-related facilities, and works on the development of a new treatment method aiming at recovery of the self-hematopoietic function lost in the accident. We have previously demonstrated the effectiveness of mixed umbilical cord blood transplantation to recover self-hematopoietic function. In this study, we examined the effectiveness of a transplantation method using fibroblasts contained in umbilical cord blood. Since fibroblasts can be easily cultured and proliferated, they can be a more stable source for transplantation in terms of supply. This research is positioned as the establishment of a treatment method that responds to the worst of radiation emergency medicine.

研究分野：免疫学

キーワード：放射線曝露 被ばく医療 マウス臍帯血 繊維芽細胞移植 造血系サイトカイン 造血機能回復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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。この解決法の1つとして臍帯血移植がある。現在、臍帯血移植では十分な移植細胞数を確保するため、2つの臍帯血を混合して移植するが多い。これまで申請者は、被ばく医療に特化した混合臍帯血移植について検証し、次のような興味深い結果を得た。通常、移植では組織適合性抗原 (MHC) の一致が移植片生着に繋がることから、当初、致死量放射線照射マウスと MHC が一致した同系統マウス由来臍帯血を半分含んだ混合移植の方が高い救命効果 (生存率) を示すと予想していた。しかし実際には、照射マウスと MHC が全く異なる2系統のマウス由来臍帯血を混合移植 (混合アロ臍帯血移植) した方がはるかに高い救命効果が得られ、しかもその生存マウスの造血機能はその生存マウス自身のもので回復していた。この混合アロ臍帯血移植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、この効果にはアロ移植ソース自身の造血幹細胞生着は関わっていないことになる。

申請者はこの結果に着目し、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と考えた (引用文献参照)。本研究では、具体的な候補細胞として臍帯血に含まれる接着能を有する繊維芽細胞を想定し、これら細胞を移植することで放射線曝露個体自身の造血機能回復が達成できるか検証した。

2. 研究の目的

本研究では、致死量放射線曝露個体の自己造血機能回復を培養により誘導した臍帯血由来繊維芽細胞移植で達成すると共に、その移植による自己造血機能回復の作用機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 繊維芽細胞の誘導

BALB マウスおよび C3H マウスの各雌雄を一晩交配し、交配 18 日後に無菌環境下で妊娠マウスより胎児を摘出した。37℃ に保温したヘパリン添加培養液中で胎児の臍帯を切断して放血し、臍帯血を回収した。回収した臍帯血細胞を 10%FBS-RPMI 1640 培養液に浮遊させ、培養フラスコに播種し、37℃、5%CO₂ 培養器で培養した。培養 2 日後、浮遊細胞を除去し、付着性の繊維芽細胞が培養フラスコ一面に増殖するまで継続培養した。

(2) フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析

BALB および C3H 胎児から誘導した繊維芽細胞を回収し、細胞表面マーカーを蛍光標識抗体染色によるフローサイトメトリーで解析した。抗 CD3 抗体、抗 B220 抗体、抗 Mac-1 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 Nkp46 抗体、抗 CD29 抗体、抗 CD31 抗体、抗 CD41 抗体、抗 CD44 抗体、抗 CD48 抗体、抗 CD68 抗体、抗 CD90 抗体、抗 CD105 抗体、抗 CD106 抗体、抗 CD119 抗体、抗 CD150 抗体、抗 CD197 抗体、抗 Sca-1 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD45 抗体および抗 c-kit 抗体を染色抗体として用いた。

(3) RT-PCR によるサイトカイン産生の検出

繊維芽細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素法で cDNA を合成した。これを鋳型として 10 種のサイトカイン特異的プライマー (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-7) を用いて PCR 法で増幅し、その増幅産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動法により検出した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。PCR は初期熱変性 95℃、2 分後に、熱変

性 95 ， 15 秒、アニーリング 55 （ IL-7 のみ 63 ）, 15 秒、伸長反応 72 ， 1 分を 35 サイクル行った。

(4) 細胞成長因子添加による繊維芽細胞増殖の測定

10%FBS-RPMI1640 培地に浮遊した繊維芽細胞を 96 穴平底プレートに播種し、37 、5%CO₂ インキュベーターで 2 日間培養した。培養後、13 種類の分化・成長因子（IL-6, TGF- β , IL-4, INF- γ , GM-CSF, TPO, SCF, FLT-lig3, M-CSF, IL-3, b-FGF, IL-7, G-CSF）を添加して一晩培養した。その後 ³H-thymidine を添加し、さらに 16 時間培養した後に ³H-thymidine の繊維芽細胞 DNA 取込み（増殖度）をシンチレーションカウンターで測定した。

(5) 放射線曝露マウスに対する繊維芽細胞移植

培養により誘導した BALB および C3H 臍帯血由来繊維芽細胞を回収し、等量混合して致死量放射線照射 B6 マウスの尾静脈より移植した。移植後、体重の推移および生存日数から延命効果を評価した。コントロールとして同量の放射線照射のみを行った B6 マウスを用意した。

4 . 研究成果

(1) 繊維芽細胞の誘導と形態学的特徴

培養により誘導された BALB および C3H 臍帯血由来繊維芽細胞の光学顕微鏡での観察像をそれぞれ図 1 と 2 に示した。BALB および C3H 臍帯血由来繊維芽細胞の両者において突起を進展させた繊維芽様細胞と、やや小型で丸みを帯びたマクロファージ様の形態を示す 2 種類の接着細胞のみが生き残っていた。BALB では線維芽様細胞とマクロファージ様細胞の割合が均一に存在し

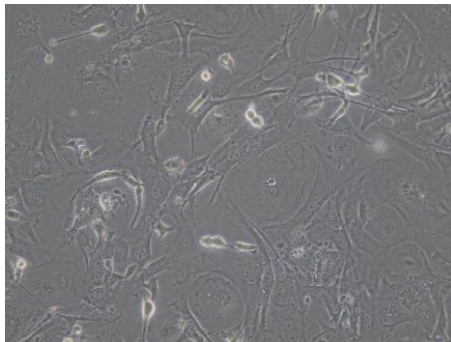


図 1 . BALB 由来繊維芽細胞

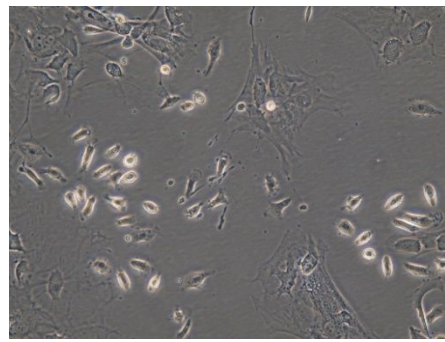


図 2 . C3H 由来繊維芽細胞

ているのに対し、C3H ではマクロファージ様細胞がほぼ全体を占めていた。この結果より、臍帯血中には長期間生存・増殖できる 2 種類の接着性を有する繊維芽細胞が存在することが明らかとなった。

(2) 繊維芽細胞の細胞表面マーカーから見た分類

BALB および C3H 臍帯血由来繊維芽細胞上に発現する 22 種類の表面マーカーの解析を行った。臍帯血由来繊維芽細胞では、BALB と C3H で共通して間葉系幹細胞マーカーである CD29 および CD90、造血幹細胞マーカーである Sca-1、マクロファージ系マーカーである Mac-1 および F4/80 の発現が認められた。この結果から、臍帯血由来繊維芽細胞は間葉系幹細胞の特性を残した未熟な段階にある細胞であることが示唆された。

(3) 繊維芽細胞のサイトカイン産生

培養 21 日目の BALB および培養 35 日目の C3H 由来繊維芽細胞のサイトカイン産生を RT-PCR で解析した結果、両者ともに長期培養にも関わらず SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-7 といった造血系サイトカインの産生が認められた（図 3）。臍帯血中に含まれるこれら繊維芽細胞が造血

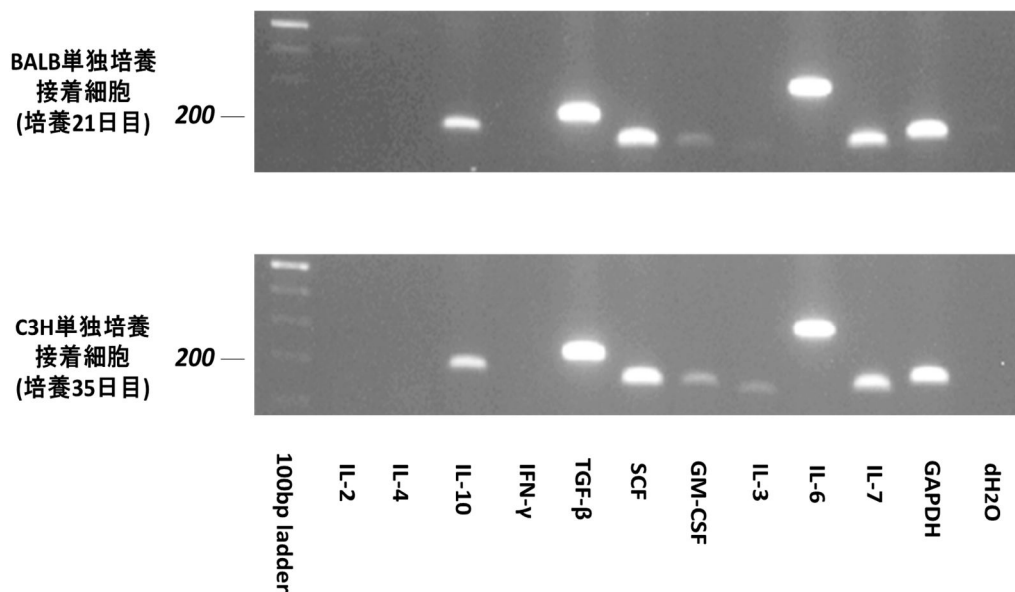


図3．繊維芽細胞のサイトカイン産生

系サイトカインを分泌し、その個体の造血系を維持しているのかも知れない。したがって、以前、申請者が示した致死量放射線曝露 B6 マウスに対する異系 BALB および C3H 由来臍帯血の混合移植が B6 マウス自身の造血機能を回復した原因として臍帯血に含まれるこれら繊維芽細胞が関与した可能性がある。

(4) 細胞成長因子添加による繊維芽細胞の増殖促進

臍帯血由来繊維芽細胞の迅速増殖誘導を試みるため、13種類の分化・成長因子を添加し、³H-thymidine 取り込みを行うことでどの因子が迅速増殖に最適な因子かを検証した。増殖度は非添加コントロールを1とした時の相対値で表した。その結果、M-CSF および b-FGF の添加で非添加に比較して約2倍の増殖が認められた。また、増殖後の繊維芽細胞の造血系サイトカインの産生能は維持されたままであった。このことから臍帯血由来繊維芽細胞は迅速増殖が可能であることから、移植ソースとしての有用性が示された。

(5) 繊維芽細胞移植による延命効果

移植後28日までの生存率を Kaplan-Meier 法により算出した(図4)。その結果、移植 B6 マウスの生存率は放射線照射コントロール (n=3) の33%に対して BALB + C3H 繊維芽細胞移植群 (n=2) では100%を維持していた。このことから、移植繊維芽細胞から分泌される造血系サイトカインが放射線曝露 B6 自身の造血機能回復に寄与していると考えられる。生存率と共に移植後25日までの体重変動を調べたところ、移植後18日において繊維芽細胞移植群2個体では両者とも体重が減少したが、移植後25日では両者とも徐々に体重が増加に転じる傾向を示した。

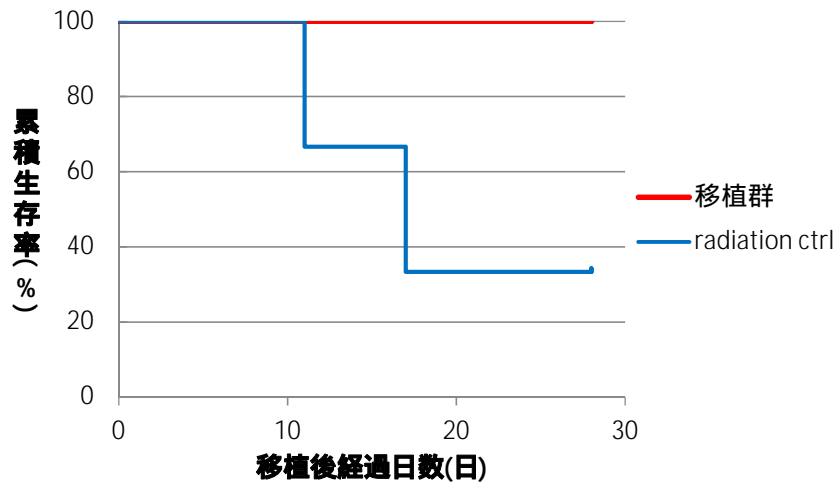


図4. 移植マウスの生存率

(結論)

致死量放射線曝露個体の自己造血機能回復に対する臍帯血由来繊維芽細胞移植の有効性が認められた。この回復には繊維芽細胞から分泌される造血系サイトカインが関わっていると考えられる。今後、移植数を増やすことで被ばく医療としての確立を目指したい。さらに、いつ何時でも迅速に繊維芽細胞を準備できるシステムを構築したい。

<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3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makita Eiko, Matsuzaki Yasushi, Fukui Tomohisa, Matsui Akinobu, Minakawa Satoko, Nakano Hajime, Ito Koichi Kijima Hiroshi, Sawamura Daisuke	4. 巻 4
2. 論文標題 Autoantibodies to BPAG1e Trigger Experimental Bullous Pemphigoid in Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1167-1176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.08.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamanouchi Kanako, Tsujiguchi Takakiyo, Ito Koichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Short-term follow-up of intestinal flora in radiation-exposed mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 328-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrz002	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 Sakamoto Yamato, Tsujiguchi Takakiyo, Ito Koichi, Yamanouchi Kanako	4. 巻 184
2. 論文標題 Determination of gut bacterial metabolites in radiation exposed mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 493-495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncz094	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部 希春、櫻野 実結、坂本 愛実、伊藤 京子、伊藤 巧一
2. 発表標題 混合アロ臍帯血移植による致死量放射線曝露個体の自己造血機能回復に関わる機序解明
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 学, 菊池 穂菜, 時田尚文, 伊藤京子, 高見秀樹, 伊藤巧一
2. 発表標題 好塩基球活性化に対するE-NTPDaseの影響
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakano Manabu, Kikuchi Marina, Yoshioka Airi, Wahachi Misaki, Ito Kyoko, Takami Hideki, Ito Koichi
2. 発表標題 Effect of extracellular nucleotide hydrolysis on IgE-dependent activation of basophils
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関