

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590286

研究課題名(和文) 同種造血幹細胞移植後患者における遺伝子多型を用いた爪のキメリズム解析

研究課題名(英文) Chimerism analysis in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants by examining the patterns of the short tandem repeat.

研究代表者

今西 大介 (IMANISHI DAISUKE)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：30398169

研究成果の概要(和文)：

同種造血幹細胞移植はドナーの造血幹細胞を輸注し、患者造血をドナー造血に置換する治療法であるが、移植後の非造血組織にもドナー細胞が存在することが報告されている。しかし、爪に関しては検討されていないため、我々は移植後に爪を採取しドナーDNAの有無を調べた。その結果、非常に高率にドナーDNAが混在していることが明らかになった。この現象がおこる仕組みはまだ不明であり、今後のさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：

Allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation by infusion of donor HSC is a treatment to replace patient blood cells with donor-derived hematopoietic tissue. However, it has been reported that donor cell exist in the non-hematopoietic tissues after transplantation. However, the fingernails, which is non-hematopoietic tissue, has not been investigated. So, we examined whether donor DNA was in the fingernails after transplantation. The result showed that the donor DNA existed in the very high percentage. It is still unknown how this coexistence happens. Further examination is needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：移植・再生医療、再生医学、放射線

1. 研究開始当初の背景

21世紀の新しい治療として再生医療が注目されているが、その中心となるのが幹細胞である。幹細胞は多能性と自己複製能を兼ね備

えた細胞であり、組織の発生、修復、維持に重要な役割を担っている。組織幹細胞として最初に同定された造血幹細胞(HSC)は、骨髄移植という形で臨床応用され、現在では白血

病などの標準的治療法として確立している。患者の造血系は幹細胞提供者(ドナー)より採取したHSCによって再構築されるが、最近の研究によって、非造血組織である皮膚や消化管粘膜上皮の一部もドナー細胞で構成されていることが明らかになった。(図1; Korbling M. et al., N Engl J Med. 346(10), 738, 2002)。他にもいくつか同様の報告があり (Okamoto R. et al., Nat Med. 8(9), 1011,

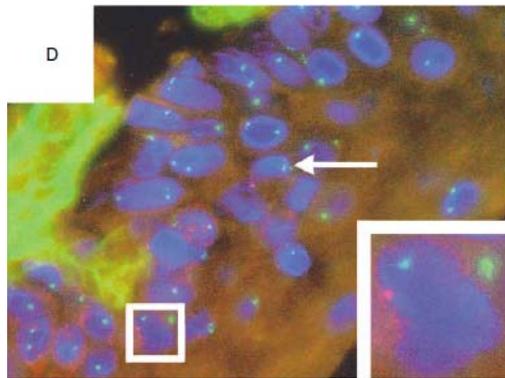


図1. 白枠部の拡大図を右下に示す。男性ドナーから移植を受けた女性患者の皮膚のFISH解析において、Yシグナル(赤)が認められた。

2002, Niino D. et al., Pathol Res Pract. 200(11-12), 775, 2005)、皮膚、消化管上皮などの再生能力の高い組織においてドナー細胞の混在が指摘されている。HSCの性質を考えると非常に興味深い現象であるが、その混在率は数パーセントと低値であり、組織修復への関与は明らかではない。また、組織採取時に侵襲を伴い、ドナー由来の血液細胞の混入を否定することが困難である。

図2左に示す通り、爪は爪根部に存在する爪母細胞が特異的に分化したものであり、生涯にわたって新生し続ける再生能力の高い組織である。移植時には前処置や移植片対宿主病(GVHD)によって爪の産生が障害され、図2下段に示す様に移植後の爪に境界線や段差が生じることがある。このように、同種造血幹細胞移植後には爪の再生が促され、それに伴ってドナー細胞が混入する可能性がある。また、爪は産生過程において血液細胞が混入する可能性は極めて低く、採取時の侵襲が少ないという利点も有している。しかし、移植後の爪におけるドナーDNAの有無については今までほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

我々は同種造血幹細胞移植が行われた21症例の爪について short tandem repeat (STR) 解析を行い、その結果を報告した (Imanishi D. et al., Blood 110(7), 2231, 2007)。図3にその一例を示すが、驚くべきことに21例中9例でドナーDNAが検出され、その混在率



図2 爪根部のシェーマ図(上段)とHE染色像(中段)、移植後の爪の肉眼的所見(下段)

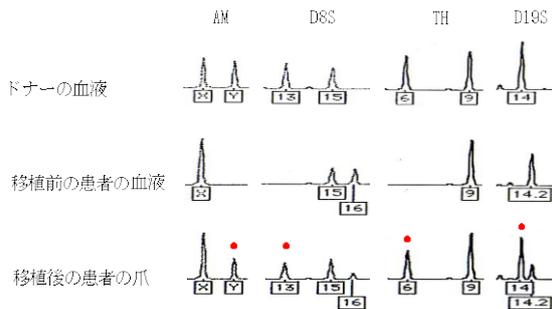


図3 STR解析の結果(赤のドットは移植後の爪におけるドナーDNAを示す)

は8.9%~72.9%と非常に高値であった。また、移植から爪採取までの経過日数は305日~2399日で、長期間経過した症例からもドナーDNAが検出された。この結果は、ドナー細胞が非造血組織へ分化し、移植後長期間にわたって患者の爪の構築に関与していることを示唆している。本研究では、同種造血幹細胞移植後患者の爪の構築に関与するドナー細胞を同定し、爪における恒常的キメリズムの成立機構を明らかにすることを目的とする。そのために、1) さらに多数例で解析を行い、臨床所見との関連について検討する、2) 臍帯血移植やCD34陽性細胞選択移植などの様々な移植方法について、爪の恒常的キメリズムの有無を調査する、3) マウスを用いた実験によって爪の構築に関与するドナー細胞を同定する。同種造血幹細胞移植後に多くの非造血組織でドナー細胞の混在が確認さ

れているが、爪における混在率は他の組織と比べて非常に高い。移植時の前処置や GVHD によって障害された爪母細胞はどのように再生されるのだろうか。一部は残存し自己再生するのか、完全に消滅するのか、その場合の補充機構はどうなっているのだろうか。移植後のドナー細胞の混在率が高いことは、爪母細胞の再生にドナー細胞が関与している可能性を強く示唆している。その機序は、ドナーの HSC から爪母細胞への分化転換なのか、間葉系幹細胞から爪母細胞への分化なのか。これらの疑問点の解明によって、同種造血幹細胞移植後の組織修復機構に関して、新たな一面を明らかにすることが可能である。爪を利用した本研究は患者への侵襲が少なく安全に施行できるが、それによって移植医療に貴重な情報を提供できる可能性があり、臨床的にも非常に有意義なものである。

3. 研究の方法

研究内容は以下の3点である

- (1) 同種造血幹細胞移植を受けた患者の爪に含まれるドナーDNAを定量する。
- (2) ドナー成分の混在率を算出し、臨床経過との関連を検討する。
- (3) マウスを用いた実験によって、爪に分化したドナー細胞の起源を同定する。研究目的(1)、(2)に関する対象患者、検体の種類、実験方法は下記の通りである。研究終了後、残存試料は廃棄する。

(対象患者) 同種造血幹細胞移植を受け、本研究への参加に同意した者。すでに移植を受けた者、今後移植を受ける者の両者を対象とする。

(検体の種類) 爪

(方法) ① 爪(0.1x0.3cm程度を3~5個)は、移植後の末梢血採取時と同じ時期に患者自身が採取し、主治医に提出して頂く。

② 爪からDNAを抽出し、Short tandem repeat (STR)解析を行う。

③ ドナーDNAの混在率を算出する。その結果と臨床所見との関連について解析する。臨床所見については、診断名、移植時年齢、ドナーのタイプ、幹細胞源、移植から爪採取までの経過日数や急性および慢性GVHDの程度について調査する。

研究目的(3)に関する実験方法は下記の通りである。

- ① マウスより骨髓細胞を採取し、セルソーター(Becton Dickinson FACS-Vantage)を用いて各群に分ける。
- ② 各細胞群を致死量放射線照射したマウスに移植する。
- ③ マウスの爪からDNAを抽出し、Short tandem repeat (STR)解析を行う。各群のマウスの爪におけるドナーDNAの混在率を解析する。

④ 移植した細胞群とドナーDNAの混在率との相関の有無について検討する。

4. 研究成果

同種造血幹細胞移植を行った患者の爪について short tandem repeat (STR)解析を行ったところ、ドナーDNAを非常に高率に検出した。また、移植後長期間経過した症例においてもドナーDNAの混在を認めた。この結果は、ドナー細胞が非造血組織へ分化し、移植後長期間にわたって患者の爪の構築に関与していることを示唆している。本研究の目的は、同種造血幹細胞移植後患者の爪の構築に関与するドナー細胞を同定し、爪における恒常的キメリズムの成立機構を明らかにすることである。そのために、同種造血幹細胞移植を受けた患者の爪からDNAを抽出し、STR解析によってドナーDNAの混在率を算出した。さらに、臨床所見との関連について検討した。同種造血幹細胞移植には骨髓移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植、ミニ移植など様々な方法が存在する。各々の移植を行った患者の爪のキメリズム解析を行うことによって、恒常的キメリズムの成立機構の解明につながることを期待される。我々は先の研究(Imanishi D. et al., Blood 110(7), 2231, 2007)において、骨髓移植、末梢血幹細胞移植後患者の爪には高率にドナーDNAが混在することを明らかにした。この結果は第30回日本造血細胞移植学会総会においても報告した。本研究ではドナーDNAの混在の有無が不明であった臍帯血移植後患者の爪について主に解析を行った。現在までに17症例より検体を採取し、解析が終了した5症例について第10回日本再生医療学会総会において報告した。

症例番号	診断	移植時年齢	aGVHD	cGVHD	移植~ドナーの爪採取(日)	ドナーの混在率(%)
22	ALL	31	none	none	128	58.8
23	ATL	59	II	none	247	76.6
24	ALL	25	none	none	434	5.5
25	ATL	58	none	none	245	46.5
26	MF	27	none	none	1038	30.5

上の表に示す通り、5症例ともドナーDNA陽性で、混在率は5.5~76.6%、移植から爪採取までの日数は128~1038日であった。代表例として症例番号26のSTRパターンを図4に示す。この結果から幹細胞源として骨髓、末梢血、臍帯血のいずれを用いて移植を行った場合も、移植後の爪にドナーDNAが高率に混在する症例が存在することが明らかになった。ドナーDNAの混在の有無と年齢や移植片対宿主病(GVHD)などの臨床所見に関連は認められなかった。ドナーDNAの混在の有無を

[学会発表] (計 3 件)

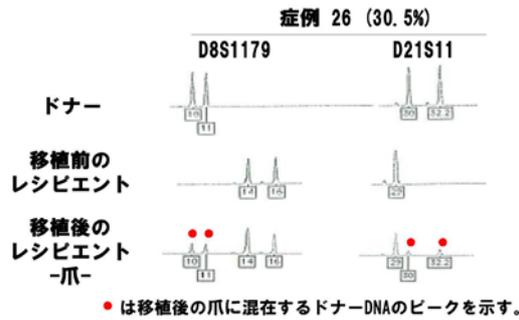


図 4. 症例番号 26 の STR パターン

左右する要因を明らかにすることによって、同種移植後の爪における恒常的キメリズムの成立機構の解明につながることを期待される。今後も、様々な同種移植が行われた多数の症例に関する解析が必要である。また、マウスを用いた動物実験によって、爪に分化したドナー細胞の同定を試みることも重要である。マウスの骨髄細胞を分別し、放射線照射したマウスにそれぞれ移植する。移植した細胞群に応じて移植後の爪におけるキメリズムに有意な差が認められれば、非常に重要な情報となる可能性が高い。細胞の分別や移植の系の確立に時間を要し、本研究期間中に報告に値する成果は得られなかった。今後の課題としたい。

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 4 件)

- ① Fukushima T, Imanishi D. Miyazaki Y, Tomonaga M et al. Successful cord blood transplantation for mycosis fungoides. *Int J Hematology*, 査読有, 88(5), 2008, pp. 596-598
- ② 森脇 裕司、宮崎 泰司、朝長 万左男 他、近距離被爆後 60 年を経て発症し、寛解期の骨髄細胞と末梢血 T 細胞に多彩な染色体異常を認めた急性骨髄性白血病、*広島医学*、査読無、61 巻 4 号、2008、363-366
- ③ Iwanaga M, Imanishi D. Miyazaki Y, Tomonaga M et al. Relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and radiation exposure in Nagasaki atomic bomb survivors. *Blood*, 査読有, 113(8), 2009, pp.1639-1650
- ④ Ando K, Imanishi D. Miyazaki Y, Tomonaga M et al. High expression of 67-kDa laminin receptor relates to the proliferation of leukemia cells and increases expression of GM-CSF receptor. *Experimental Hematology*, 査

- ① 発表者名：今西 大介
発表標題：同種造血幹細胞移植後患者の爪におけるドナーDNAの存在
学会等名：第 30 回日本造血細胞移植学会総会
発表年月日：2008 年 2 月 29 日
発表場所：大阪国際会議場
- ② 発表者名：今西 大介
発表標題：同種造血幹細胞移植後患者における爪のキメリズム解析
学会等名：第 4 回長崎障害者支援再生医療研究会
発表年月日：2009 年 9 月 29 日
発表場所：長崎大学医学部良順会館
- ③ 発表者名：今西 大介
発表標題：同種造血幹細胞移植後の爪のキメリズム解析
学会等名：第 10 回 日本再生医療学会総会
発表年月日：2011 年 3 月 1 日
発表場所：京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 大介 (IMANISHI DAISUKE)
長崎大学病院・助教
研究者番号：30398169

(2) 研究分担者

宮崎 泰司 (MIYAZAKI YASUSHI)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40304943
朝長 万左男 (TOMONAGA MASAO)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40100854

(3) 連携研究者

()

研究者番号：