

機関番号：82302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791017

研究課題名（和文） 好酸球抗腫瘍効果の臨床応用にむけての基礎検討

研究課題名（英文） A pilot study aimed at clinical application of anti-tumor effects of eosinophils

研究代表者 山田 佳之（YAMADA YOSHIYUKI）

群馬県衛生環境研究所・研究員

研究者番号：80309252

研究成果の概要（和文）：

白血球の一つである好酸球は腫瘍細胞に対して攻撃する能力（抗腫瘍効果）を持っている。その好酸球を使ってどのような腫瘍が攻撃できるのかを調べるための方法を研究した。また臨床応用に向けてマウスモデルを樹立するための検討を行った。今後の好酸球抗腫瘍効果の臨床応用につながる有用な結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Eosinophils are white blood cells that can attack against tumor cells, which is called “anti-tumor effects of eosinophils”. This study was aimed to determine the tumor cells that are easily weakened by eosinophils. In addition, the experiments to establish useful mouse models to check anti-tumor effects of eosinophils have done. This study may give useful information for clinical application of anti-tumor effects of eosinophils.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児科

科研費の分科・細目：小児腫瘍学

キーワード：小児腫瘍学、好酸球

1. 研究開始当初の背景

好酸球には抗腫瘍効果があることが報告されてきた（Munitz A, Levi-Schaffer F. *Allergy* 2004）。また Th2 サイトカイン（IL-4, IL-5 など）や IgE、好酸球遊走性ケモカイン（eotaxin など）を介してその効果が増強されることが報告されている。しかしながら好酸球自体、組織傷害作用が強くコントロールが困難なため臨床応用への取り組みはこれまでほとんど行われていない。好酸球による

抗腫瘍効果の臨床応用には①好酸球の活性化、②腫瘍への遊走、③腫瘍への接着、④不用になった好酸球の除去の4つのステップが必要である。そこで高度に活性化していると思われる慢性好酸球性白血病で見られる *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子陽性好酸球の利用を考えた。つまり *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子陽性好酸球の活性化はチロシンキナーゼ阻害薬の imatinib にて抑制することが可能であり、使用後の除去などコントロールが比較

的容易に行える可能性があると考えていた。また代表研究者らは骨髄移植を用いた *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子導入による好酸球増多症候群／慢性好酸球性白血病マウスモデルをこれまでに樹立しており (Yamada Y, et al. *Blood* 2006)、また本手法はヒトでの遺伝子導入にも応用可能であると考えていた。このことから基礎的検討を行える環境がと整っていると考え本研究を開始した。

2. 研究の目的

活性化好酸球はその強力な組織傷害作用のため生体内での増加は重篤な傷害につながる。好酸球抗腫瘍効果の臨床応用のためには、好酸球活性化をコントロールし、効率的かつ安全に利用することが必要である。そのための基礎的検討として (1) 好酸球抗腫瘍効果の腫瘍ごとの反応性の差異、(2) *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子陽性好酸球の活性、遊走、集積、生存、(3) また抗腫瘍効果検討のためのマウスモデルの作成、これらの検討のために研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞傷害性の検討

好酸球と腫瘍細胞 (細胞株、患者検体) を共培養し、好酸球による腫瘍細胞傷害性を *in vitro* にて検討した (Legrand F, et al. *Methods Mol Biol.* 2008 の方法を改変)。腫瘍細胞株 (EoL-1, A549 など) を PKH26 にて染色した後、ヒト末梢血から CD16 ネガティブセレクション法によって分離したヒト好酸球と共培養する。培養後、細胞を回収し、Annexin-V (FITC) を用いて染色し、フローサイトメトリーにて好酸球・腫瘍混合細胞と腫瘍細胞単独との PKH26 陽性/Annexin-V 陽性細胞の比率を比較することにより細胞傷害性を測定した。

(2) *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子発現の検討

上述の様に本研究では *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子陽性検体を用いることから、実際の患者検体を用いることが出来れば検討が容易である。そのため好酸球増多症候群が疑われる患者の骨髄検体を他施設からも受け入れ検討を行った。具体的には総 RNA を患者検体から抽出し、RT-PCR 法を用いて検討した。PCR 法は感度を上げるために nested PCR 法を用いた。

(3) *FIPIL1-PDGFR* 陽性モデルマウスの作成と好酸球機能解析

FIPIL1-PDGFR 融合遺伝子あるいはコントロ

ールのレトロウイルスベクターを野生株あるいは IL-5 トランスジェニックマウス骨髄幹細胞に導入し、致死量照射したレシピエントマウスに移植した。その後、マウスが *FIPIL1-PDGFR* 陽性好酸球増多を認めた (4-5 週を要する) 後、実際に好酸球が高度に活性化されているかどうかを判定するためモデルマウスから *FIPIL1-PDGFR* 陽性好酸球を分離し、好酸球生存をフローサイトメトリーにて、また遊走能はトランスウェルを用いて検討した。

(4) ヒト化好酸球増多症候群／慢性好酸球性白血病モデルの作成

マウス好酸球とヒト好酸球では脱顆粒の差異などその組織傷害性に違いがある。そのため、ヒト化モデルが本検討にもより有効と考えヒト化モデル樹立を検討した。ヒト CD34 陽性細胞に *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子あるいはコントロールのレトロウイルスベクターを用いて導入し、致死量よりやや低いレベルでの照射を行った NOD/SCID マウスに移植しドナー細胞の生着率を検討した。

4. 研究成果

本研究は的崎 尚 (現 神戸大学大学院医学研究科)、林 泰秀 (群馬県立小児医療センター)、黒岩 実 (現 東邦大学医学部) を研究協力者として、また Jose A. Cancelas (米国シンシナティ大学)、Marc E. Rothenberg (米国シンシナティ小児病院医療センター) を海外研究協力者として行った。

(1) 細胞傷害性の検討

PHK26 を用いた染色にて無染色細胞に対して 100 倍程度の FL-2 蛍光を示し、フローサイトメーターにて極めて容易に分画することができた。また好酸球は FL-1 あるいは FL-2 でとらえられる自家蛍光を持っていることが知られており、本検討への影響を考えたが、PHK26 陽性細胞の蛍光強度は強く、好酸球と腫瘍細胞を混合した場合にも完全に分画することが可能であった。さらに培養後のアポトーシス好酸球との分画に関しても検討した。好酸球と腫瘍細胞の混合培養細胞をフローサイトメーターにて Y 軸を PKH26、X 軸を Annexin-V-FITC として四分画することで分画が可能であった。好酸球と腫瘍細胞との混合培養後の PKH26⁺ 細胞中の PKH26⁺/Annexin-V-FITC⁺ 細胞比率から腫瘍細胞単独培養後の PKH26⁺ 細胞中の PKH26⁺/Annexin-V-FITC⁺ 細胞比率を引くことで抗腫瘍効果を測定した。数パーセント程度の違いからアポトーシス陽性細胞率を比較することが可能であった。好酸球抗腫瘍効果

に有用な方法であると考えられた。

(2) *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子発現の検討
好酸球数 $1,500/\mu\text{l}$ 以上の好酸球増多を認め、かつ明らかな原因が同定できなかった症例について RT-PCR 法を用いて検討した。6 例(論文 3, 9, 11) の検討を行った。しかしながら、いずれの患者も *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子は陰性であった。

(3) *FIPIL1-PDGFR* 陽性モデルマウスの作成と好酸球機能解析

既報のごとく *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子あるいはコントロール導入骨髄幹細胞を致死量照射したレシピエントマウスに移植しモデルマウスを作成した。好酸球増多を確認後、末梢血あるいは脾臓から白血球を分離し、*FIPIL1-PDGFR*⁺/Siglec-F⁺あるいは CCR3⁺細胞を *FIPIL1-PDGFR*⁺好酸球とし好酸球生存は Annexin-V と 7AAD を用いてフローサイトメーターにて検討し、トランスウェルを用いて eotaxin 類への遊走能を確認した。コントロールに比べ有意に好酸球生存は延長し、遊走能も増強されていた。

(4) ヒト化好酸球増多症候群/慢性好酸球性白血病モデルの作成

ヒト CD34 陽性細胞に *FIPIL1-PDGFR* 融合遺伝子あるいはコントロールのレトロウイルスベクターを用いて導入し、致死量よりやや低レベルでの照射を行った NOD/SCID マウスに移植し、生着を評価した。ドナー由来のヒト骨髄細胞あるいは末梢血白血球はわずかであり、好酸球増多を利用した検討を行うモデルとしてはいまだ十分でないと考えられた。

ヒト化マウスモデルの樹立にはもう少し基礎的検討が必要であると考えている。また今後さらに様々な腫瘍に対する効果を検討することにより、好酸球が抗腫瘍効果を発揮し易い腫瘍群を同定できる可能性があり、実際の応用につながると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, Kato M, Yamamoto H, Morita H, Nomura I, Matsumoto K, Hirato J, Hatakeyama SI *et al*: Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants: a Japanese case series. *Int Arch Allergy Immunol* 2011, 155 Suppl 1:40-45. (査読あり)
2. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y: Differential effects of

corticosteroids on serum eosinophil cationic protein and cytokine production in rhinovirus- and respiratory syncytial virus-induced acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2011, 155 Suppl 1:77-84. (査読あり)

3. Hosoki K, Nagao M, Iguchi K, Ihara T, Yamada Y, Higashigawa M, Kephart GM, Kita H, Fujisawa T: An 8-year-old boy with hypereosinophilic syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2011, 155 Suppl 1:117-122. (査読あり)
4. Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H: Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol* 2011, 22(1 Pt 2):e87-94. (査読あり)
5. 山田佳之: 専門医のためのアレルギー学講座 好酸球増多を主徴とする疾患 好酸球増多症候群に見られる遺伝子異常と分子標的治療薬. *アレルギー* 2011, 60(2):167-177. (査読なし)
6. Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T, Yachie A *et al*: Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr Int* 2010, 52(4):e196-199. (査読あり)
7. Yamada Y, Cancelas JA: FIP1L1/PDGFR alpha-associated systemic mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2010, 152 Suppl 1:101-105. (査読あり)
8. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y: Serum eosinophil cationic protein and 27 cytokines/chemokines in acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010, 152 Suppl 1:62-66. (査読あり)
9. 山田佳之: 【注目される好酸球関連疾患】好酸球性胃腸炎 好酸球性消化管疾患 (eosinophilic gastrointestinal disorders;EGID)について. *臨床免疫・アレルギー科* 2010, 54(4):459-464. (査読なし)
10. 山田佳之: 好酸球増多症 好酸球増多症候群での最近の知見. *日本小児血液学会雑誌* 2010, 24(2):77-84. (査読なし)

11. Shiihara T, Miyashita M, Yoshizumi M, Watanabe M, Yamada Y, Kato M: Peripheral lymphocyte subset and serum cytokine profiles of patients with West syndrome. *Brain Dev* 2010, 32(9):695-702. (査読あり)
 12. Shiihara T, Maruyama K, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S: A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings: pachygyria, subcortical-band heterotopia, and periventricular heterotopia. *Brain Dev* 2010, 32(6):502-505. (査読あり)
 13. Yamada Y, Cancelas JA, Rothenberg ME: Murine model of hypereosinophilic syndromes/chronic eosinophilic leukemia. *Int Arch Allergy Immunol* 2009, 149 Suppl 1:102-107. (査読あり)
 14. Kobayashi N, Yamada Y, Ito W, Ueki S, Kayaba H, Nakamura H, Yodoi J, Chihara J: Thioredoxin reduces C-C chemokine-induced chemotaxis of human eosinophils. *Allergy* 2009, 64(8):1130-1135. (査読あり)
- [学会発表] (計 19 件)
1. 山田佳之: 高好酸球血症のメカニズム、鑑別診断と好酸球性食道炎の最新知見. 平成22年度 第2回新生児-乳児アレルギー疾患研究会 2011.2.6. 東京
 2. 加藤政彦, 山田佳之: ライノウイルスおよびRSウイルスによる小児気管支喘息発作時の血清中サイトカイン/ケモカイン産生と好酸球活性化の相違. 第47回日本小児アレルギー学会. 2010.12.4. 横浜
 3. 山田佳之, 加藤政彦: 後方視的検討で発見された小児好酸球性食道炎. 第47回日本小児アレルギー学会. 2010.12.5. 横浜
 4. 加藤政彦, 山田佳之: 小児喘息と気道感染 ライノおよびRSウイルスによる小児気管支喘息発作時の血清中サイトカイン産生と好酸球活性化の相違について. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010.11.26. 東京
 5. 山田佳之, 加藤政彦: 小児消化管アレルギー 小児での食道好酸球浸潤に関する後方視的検討 小児好酸球性食道炎患者は存在したか. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010.11.26. 東京
 6. 山田佳之: 好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎症候群について. 第8回(平成22年度 第1回)新生児-乳児アレルギー疾患研究会 2010.8.6. 東京
 7. 山田佳之: 小児好酸球増多患者における末梢血CRTH2陽性Natural killer T細胞発現の検討. 第57回日本臨床検査医学会学術集会. 2010.9.11. 東京
 8. 山田佳之, 西明, 江原佳史, 加藤政彦, 林泰秀: 好酸球性胃腸疾患の4例. アレルギー好酸球研究会 2010.6.19. 東京
 9. 山田佳之: アスピリン喘息 疾患の紹介 好酸球性胃腸炎(ミニシンポジウム). 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2010.5.8. 京都
 10. 加藤政彦, 山田佳之, 丸山健一, 林泰秀: 気管支喘息発作時の原因ウイルスの同定とサイトカイン産生、好酸球活性化の検討(続報). 第113回日本小児科学会学術集会. 2010.4.23. 岩手
 11. 山田佳之, 江原佳史, 加藤政彦, 林泰秀: 新生児・乳児消化管アレルギーの3例. 第113回日本小児科学会学術集会. 2010.4.23. 岩手
 12. Yamada Y, Kourakata K, Kato M, Hayashi Y: Higher Frequency of Circulating CRTH2+ Natural Killer T Cells in Pediatric Patients with Eosinophilia. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology 2010 Annual Meeting. 2010.2.27. New Orleans, U.S.A.
 13. 江原佳史, 山田佳之, 中嶋直樹, 西明, 畠山信逸, 丸山健一, 林泰秀: 結腸狭窄を認めた新生児・乳児消化管アレルギーの一例. 第46回日本小児アレルギー学会. 2009.12.6. 福岡
 14. 山田佳之: 注目される好酸球関連疾患 好酸球性胃腸炎(ワークショップ). 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009.10.30. 秋田
 15. 山田佳之, 加藤政彦: 好酸球と臨床・アレルギー病態 好酸球炎症と好酸球増多 好酸球増多をともなった Baraitser-Winter 症候群の一例. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009.10.29. 秋田
 16. 山田佳之: 好酸球と炎症性疾患(教育講演). 第29回小児臨床検査研究会. 2009.10.17. 渋川(群馬)
 17. 山田佳之: 好酸球と炎症性疾患(特別講演). 第10回文翔館呼吸器研究会. 2009.9.8. 山形
 18. 山田佳之: 小児好酸球増多患者における

FIP1L1/PDGFR α 融合遺伝子発現の検討.
第 56 回日本臨床検査医学会学術集会
2009. 8. 27. 札幌

19. 山田佳之, Cancelas JA, Rothenberg ME:
FIP1L1/PDGFR α 陽性好酸球増多症候群/
好酸球性白血病 (HES/CEL) マウスモデル
における肥満細胞症. アレルギー好酸球
研究 2009. 2009. 6. 20. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 佳之 (YAMADA YOSHIYUKI)
群馬県衛生環境研究所・研究員