

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08422

研究課題名(和文)造血細胞移植における生着不全に対する新規治療戦略とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Therapeutic Strategies and Biomarkers for Graft Failure in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation

研究代表者

小川 一英(Ogawa, Kazuei)

福島県立医科大学・保健科学部・教授

研究者番号：40423800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：B6マウスをドナー、BALB/Cマウスをレシピエントとした同種移植マウスに疑似ウイルス感染(poly I:C投与)処置を行い、生着不全が誘導できるか否かを検討した。poly I:Cは生着不全を誘導した。生着マウス骨髄で造血巣の細胞密度が明らかに低下した。生着不全マウスの骨髄では骨髄ROS産生は明らかに増加した。血球貪食の原因となるM1型活性化マクロファージが増加した。さらに、プロテインCの補因子gas6をリガントとする受容体型チロシンキナーゼMerの阻害剤UNC2250は生着不全の発現を有意に抑制した。生着不全の発症メカニズムにおいて、Mer受容体は重要な役割を演じている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種造血幹細胞移植(HSCT)は抗癌剤抵抗性の造血器悪性腫瘍の唯一の根治治療である。HSCT患者の生命予後を左右する合併症に生着不全(graft failure, GF)がある。GFのリスク因子はHLA適合度、ドナー低CD34+細胞数、骨髄非破壊的前処置、再生不良性貧血等の非腫瘍性疾患、脾腫、骨髄線維症の有無、ウイルス感染等が挙げられる。GFの発症機序の詳細は未だ明らかではない。本研究成果は生着不全の発症機序を明らかにし、HSCTの成功率や治療成績の向上に寄与する。

研究成果の概要(英文)：To generate the mice with graft failure after AHST, we performed experimental AHST using B6 donor mice and BALB/C recipient mice. Despite the different MHC classes and leukocyte allotypes, graft failure (GF) was not induced. Thus, we examined whether pseudoviral infection (administration of poly I:C) could induce the graft failure. In the bone marrow of mice with GF histological analysis showed that the cell density of hematopoietic nests was significantly decreased. The levels of ROS production were in the bone marrow significantly increased. In addition, M1-type activated macrophages, which contribute to hemophagocytosis, were significantly increased in the bone marrow of the mice with GF. TAM family Mer inhibitor significantly suppressed the onset of GF, suggesting that Mer may play an important role in the pathogenesis of GF.

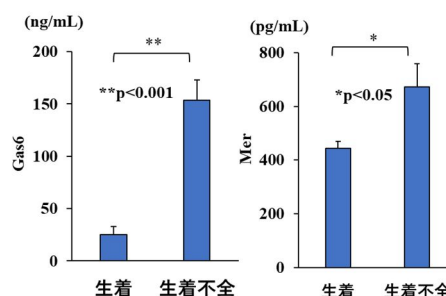
研究分野：血液内科学

キーワード：同種造血幹細胞移植 生着不全 Mer Gas6

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植 (HSCT)は治療抵抗性の造血器悪性腫瘍や造血不全の唯一の根治治療である。HSCT 患者の生命予後を左右する早期合併症の一つに生着不全がある。生着不全のリスク因子はHLA 適合度、ドナー低 CD34+細胞数、骨髄非破壊的前処置、再生不良性貧血等の非腫瘍性疾患、脾腫、骨髄線維症の有無、ウイルス感染等が挙げられる。HSCT の早期合併症の中でも、生着不全は HSCT 患者の生命予後を決するため、生着不全の予防や新規治療が求められている。しかしながら、生着不全の発生メカニズムの詳細は未だ明らかではない。TAM family である Mer 受容体はプロテイン C の補因子である growth arrest-specific gene 6 (Gas6) をリガントとする受容体型チロシンキナーゼであり、Mer 受容体シグナルは造血器腫瘍や炎症性疾患、血栓性疾患の病態に関与することが知られている。我々は以前、HSCT 後の重症移植片対宿主病 (GVHD)と移植後血栓性微小血管障害症 (TA-TMA) 症例で血漿 Gas6 が有意に高値であること、Mer 受容体の選択的阻害剤が重症 GVHD と TA-TMA の進展を抑制することを報告した (Blood Adv. 2019;3:1303-17.)。我々は予備実験で、HSCT 後の生着不全症例で血漿 Gas6 及び可溶性 Mer 濃度が有意に増加する興味深い結果を得た (図 1)。この結果は生着不全の発症メカニズムに Mer 受容体シグナルが関与している可能性を示唆すると考えた。

図 1 生着不全症例ではGas6及び可溶性Merの血中濃度が増加していた



2. 研究の目的

本研究は生着不全のマウスモデルを作製することによって、生着不全の発症メカニズムを検証するとともに、その発症メカニズムにおける Mer 受容体シグナルの役割を明らかにする。さらに、Mer 受容体の選択的阻害剤が生着不全の予防薬として有用か否かを検証する。

3. 研究の方法

B6.SJL-PtprcaPEP3b/BoyJ マウス (H2b, CD45.1)をドナーとして、主要組織適合抗原 (MHC)と白血球アロタイプ共に異なるBALB/C マウス(H2d, CD45.2)をレシピエントとする同種移植マウスを作製する。全身放射線照射全身照射 (TBI:4Gy,day-1)を行った後、ドナーマウスからの FACS 精製造血幹細胞 (HSC:cKIT+Thy1.1loSca1+Lin-) を移植する (Blood. 2017;129:2570-80.)。移植後のマウスにpoly I:Cを腹腔内投与にすることによって疑似ウイルス感染状態を引き起こし、それによって生着不全が誘導されるか否かを検討する。移植マウスの生着効率は末梢血細胞数及び骨髄細胞のフローサイトメトリーにて検証する。生着不全が誘導されたマウスの骨髄造血巣の細胞密度や細胞動態を組織学的解析で検証

する。

貪食細胞であるマクロファージのマーカー抗F4/80抗体を用いて、生着不全を誘導されたマウスの骨髄内でのマクロファージの動態を検証する。

生着不全を誘導されたマウスの骨髄内での活性酸素種(ROS:reactive oxygen species)産生レベルはジヒドロエチジウムを用いた組織実験で検証する。

ドナーである B6 マウスを Mer 受容体阻害剤で前処置した群、レシピエントの BALB/C マウスを Mer 受容体阻害剤で前処置した群、ドナーとレシピエントの両方を Mer 受容体阻害剤で前処置した群で上記 ~ の実験を行い、生着不全の発症メカニズムにおける Mer 受容体の重要性を検証する。

4. 研究成果

HSCT 後の生着不全症例で血漿 Gas6 及び可溶性 Mer 濃度が有意に増加する興味深い結果を得た(図 1)。そこで、我々は B6 マウス(H2b, CD45.1)をドナー、BALB/C マウス(H2d, CD45.2)をレシピエントとした同種造血幹細胞移植実験を行い、生着不全マウスの作製を試みた。主要組織適合抗原と白血球アロタイプが異なるにかかわらず、生着不全はほとんど誘導されなかった。そこで、疑似ウイルス感染(poly I:C投与)によって生着不全が誘導されるか否かを検討したところ、疑似ウイルス感染は高い確率で生着不全を誘導した。組織学的解析では、生着不全が誘導されたマウス骨髄の造血巣の細胞密度は明らかに低下していた(図 2)。マクロファージのマーカーである抗 F4/80 抗体を用いて骨髄内のマクロファージの動態を観察したところ、生着不全が誘導されたマウスでは骨髄内のマクロファージが増加していた(図 3)。骨髄の活性酸素種(ROS:reactive oxygen species)産生レベルはジヒドロエチジウムを用いて測定した。生着不全が誘導されたマウスの骨髄では ROS 産生は明らかに増加していた(図 3)。これらの結果から、

図 2

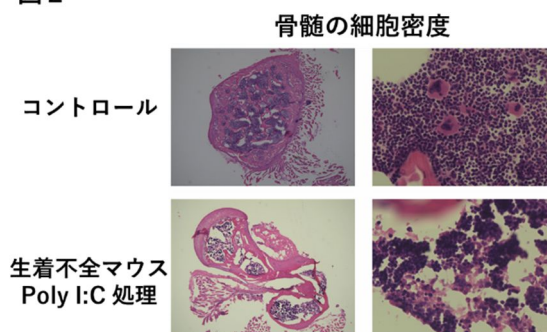


図 3

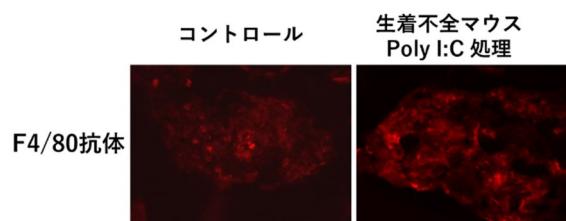
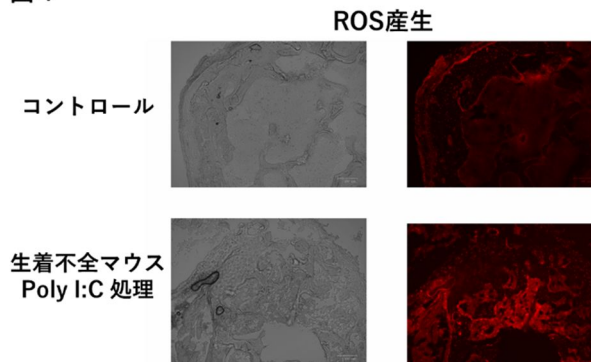


図 4

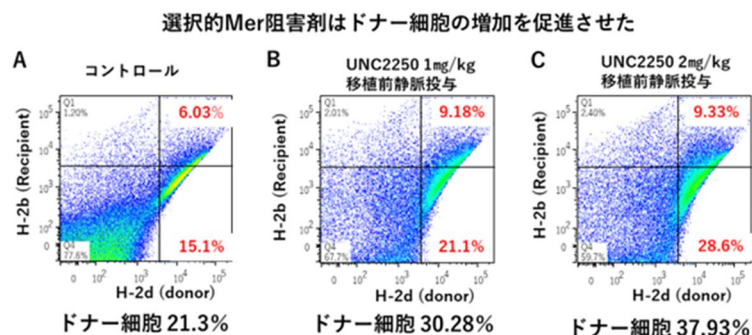


骨髄内のマクロファージ増加による貪食亢進及び ROS 産生増加が生着不全を誘導する可能性が示唆された。

移植後のレシピエントマウスに Mer 受容体の選択的阻害剤 UNC2250 を投与した群と非投与群の同種移

植マウスのキメリズム解析を比較したところ、UNC2250 投与群でドナー細胞の生着率が有意に高かった (図 5)。また、UNC2250 で前処理した B6 マウスをドナーとした同種移植マウスに疑似ウイルス感染で生着不全を誘導したが、生着不全が有意に抑制される結果が得られた。ドナー細胞の Mer 受容体阻害が生着不全を抑制する詳細なメカニズムは現在検証中である。これらの結果は生着不全の発症メカニズムにおいて、Mer 受容体が重要な役割を演じていることを示す結果であり、Mer 受容体が生着不全の新規治療ターゲットとなる可能性を示唆すると考えている。

図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大河原 浩 (Ohkawara Hiroshi) (10381360)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
研究分担者	深津 真彦 (Fukatsu Masahiko) (30827829)	福島県立医科大学・医学部・助手 (21601)	
研究分担者	池添 隆之 (Ikezoe Takayuki) (80294833)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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