

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591061

研究課題名（和文）間葉系幹細胞における HLA クラス Ib 分子発現機構の解明と細胞移植療法への応用

研究課題名（英文）Functional expression of HLA class Ib molecules in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and its implication for cellular immunotherapy

研究代表者

一戸 辰夫（ICHINOHE TATSUO）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：80314219

研究成果の概要（和文）：本研究は、HLA クラス Ib 分子群（HLA-E, HLA-F, HLA-G）がヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)が有する免疫調節作用に関与する可能性を想定し、BM-MSC におけるそれらの発現様式を検討するとともに、その薬理的な制御方法を探索することを目的として実施された。HLA クラス Ib 分子の mRNA の発現を定性的・半定量的に評価する系を確立するとともに、高感度 ELISA やフローサイトメトリーによって HLA クラス Ib 分子の蛋白発現を評価する系を確立したが、今回の検討に用いた MSC においては HLA-E 以外の HLA クラス Ib 分子の細胞表面における蛋白発現を確認することはできなかった。今後、骨髄以外の組織に由来する MSC における HLA クラス Ib 分子の発現に関してもさらなる検討が望まれる。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the expression of HLA class Ib molecules in human bone marrow-derived mesenchymal stromal/stem cells (BM-MSCs) at mRNA and protein levels. HLA-E and HLA-F mRNA transcripts were detected in quiescent BM-MSCs but HLA-G mRNA and its alternatively spliced forms were hardly detectable. Treatment of BM-MSCs by IL-10 did not induce mRNA expression of HLA-G. At the protein level, although BM-MSCs were reported to express classical HLA class Ia molecules on their cell surface, we could not detect surface expression of HLA-F and HLA-G. Future research is warranted to evaluate the expression of HLA class Ib molecules in MSCs or MSC-like cells derived from tissues other than bone marrow.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：間葉系幹細胞、HLA クラス Ib 分子、免疫制御、造血幹細胞移植、再生医療

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (mesenchymal stromal/stem cells, MSC) は自己複製能と骨細胞・脂肪細胞・軟骨細胞などへの多分化能を有する体性幹細胞であり、骨髄・臍帯血・歯胚・脂肪組織などから比較的容易に分離することが可能であるため、多様な組織の修復と再生を可能とする細胞ソースとして現在その臨床応用が精力的に進められている。また、体外で培養されたヒト MSC は T 細胞・NK 細胞・B 細胞・樹状細胞など広範な免疫担当細胞の機能を HLA 非依存的に抑制することが報告されており、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の治療・自己免疫疾患の治療・移植片の生着率向上などを目的として MSC の移植を行う前臨床研究や実際の臨床試験がすでに国内外において数多く開始されている。しかし、MSC による免疫調節機構については未知の点が多く、現時点ではこれらの臨床研究の有効性も限定的なものにとどまっている。したがって、今後 MSC による細胞免疫療法の proof-of-principle を確立し、より適切な臨床応用を可能としていくためには、その免疫調節機能にかかわる分子機構を詳細に明らかにしていくことが必須と考えられる。

ヒト MSC は細胞表面に HLA-A, HLA-B などの HLA クラス Ia 分子を発現しており、サイトカイン刺激などによる機能の腑活化に伴いクラス II 分子も発現し得るが、MSC を介する免疫調節作用はこれらの古典的な HLA 分子には非依存的な機序によって発揮される。一方、HLA-E, HLA-F, HLA-G の三種類のクラス Ib 分子 (非古典的クラス I 分子) は、古典的 HLA 分子と異なり多型性に乏しく、抗原非特異的なユニークな免疫調節機能を有することが示唆されているが、それ

らの MSC における発現に関する知見はきわめて乏しい。これらの分子はクラス Ia 分子やクラス II 分子の発現を欠く胎盤トロホブラストに特異的に強い発現を認めることから、母免疫系から胎児を防御する機能を担っていることが想定されており、実際、HLA-E は CD94/NKG2A への結合を介して、HLA-G は ILT2 (あるいは KIR2DL4) への結合を介して、NK 細胞や一部の CD8 陽性 T 細胞の増殖応答や細胞傷害活性を強力に抑制する。また、HLA-E, HLA-G には分泌型のアイソフォーム (sHLA-E, sHLA-G) も存在しており、細胞接触に非依存的な免疫抑制効果への関与が示唆されている。HLA-F については、現時点ではリガンドも不明であり、その機能に関する研究がようやく端緒についたばかりであるが、胎盤トロホブラスト以外に、活性化したリンパ球や単球の細胞表面に発現することが報告されており、他の免疫制御性細胞群に何らかの抑制性シグナルを伝えている可能性が示唆されている。

これらの実験的観察は、特定の組織や細胞群への HLA クラス Ib 分子の発現がその周辺に存在する免疫担当細胞の過剰な活性化を抑制するための「免疫学的なシールド」として機能することを示唆しているが、最近、ヒト骨髄由来 MSC や ES 細胞から誘導した MSC 様の細胞において、再現性は確認されていないものの HLA-E や HLA-G が細胞表面に発現し得るとする報告がなされた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) ヒト骨髄由来 MSC および他のヒト組織由来 MSC における HLA クラス Ib 分子 (HLA-E, HLA-F, HLA-G) の発現を分子生物学的・細胞生物学的な手法を用いて可能なかぎり厳密に検討すること、(2) MSC に発現する HLA クラス Ib 分子の MSC

の発揮する免疫調節作用への関与を明らかにすること、またもし関与しているとすればどのような機序を介してであるのかを明らかにすること、(3) MSCにおける機能的タンパク質としての HLA クラス Ib 分子の発現量に影響を及ぼし得る薬理作用を有する物質(細胞機能賦活物質)を同定すること、を研究の目的とした。

3. 研究の方法

HLA-E, HLA-F, HLA-G, および HLA-G 可溶性アイソフォームの mRNA 発現のスクリーニングは、国際ワークショップで公表されている方法等を参考として RT-PCR 法で行った。また、HLA-G タンパクを検出する特異性の高い ELISA 法を開発し、MSC 細胞可溶物中及び培養上清中における HLA-G の発現量を IL-10 存在下、非存在下に検討した。またフローサイトメトリーを用いて HLA-E, HLA-F, HLA-G の細胞表面における発現を検討した。

4. 研究成果

ヒト骨髄由来 MSC, 歯髄由来 MSC, 造血器腫瘍細胞株等を用いて HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-G 可溶性アイソフォームの mRNA の発現を定性的・半定量的に検出する系を確立したが、MSC においては HLA-G, HLA-G 可溶性アイソフォームのいずれの mRNA も検出することはできなかった。また、MSC 細胞溶解物及び培養上清の高感度 ELISA による検討では、IL-10 非存在下・存在下のいずれの条件においても HLA-G タンパクを検出することは困難であった。

HLA-F の異なったエピトープを認識する 3 種類のモノクローナル抗体を入手し、特定の造血器腫瘍細胞株の細胞表面に HLA-F の構成的な発現を検出できることを確認したが、MSC においては HLA-F の細胞表面への発現を確認

することは困難であった。

これらの結果より、定常培養状態の骨髄由来 MSC における HLA クラス Ib 分子の発現はきわめて限定的であり、特に HLA-G の細胞表面への発現や細胞外への分泌が MSC の免疫調節機能に関与している可能性は乏しいと推測された。

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 3 件) 全て査読あり

- 1) Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda K; Donor/Source Working Group and HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Unrelated cord blood transplantation vs. related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia*. 27:286-294, 2013.
- 2) Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takahashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y; HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of the direction of HLA mismatch on transplantation outcomes in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 19:247-254, 2013.
- 3) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *Int J Hematol*. 93:532-541, 2011.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 吉岡聡、一戸辰夫、下嶋典子、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、石谷昭子、高折晃史. 成人 T 細胞白血病ウイルス感染者の末梢血 T 細胞における HLA-F の表面発現分画についての検討. 第 21 回日本組織適合性学会大会. 2012 年 9 月 15 日. 明治大学駿河台キャンパス(東京都).

- 2) Ichinohe T. Microchimerism-associated tolerance to noninherited maternal antigens reduces severity of GVHD after MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation by a CD4+CD25+ T-cell-dependent mechanism. The 16th Annual Summer Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. 2011年8月19日. Haeundae Grand Hotel (釜山市・韓国).
- 3) 吉岡 聡、一戸辰夫、下嶋典子、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、石谷昭子、高折晃史.他6名 成人T細胞白血病ウイルス感染者のT細胞表面におけるHLA-Fの発現についての検討. 第20回日本組織適合性学会. 2011年8月29日. ツインメッセ静岡 (静岡県).
- 4) 下嶋典子、吉岡 聡、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、一戸辰夫、石谷昭子. 成人T細胞白血病ウイルス感染細胞株におけるHLA-Fの発現解析. 第19回日本組織適合性学会. 2010年9月18日. 東京大学本郷キャンパス(東京都).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一戸 辰夫 (ICHINOHE TATSUO)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：80314219

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

石谷 昭子 (ISHITANI AKIKO)

奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40112544

三浦 晶子 (MIURA MASAKO)

京都大学・医学研究科・特定講師