

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460509

研究課題名(和文)ドナー細胞の機能的な生体蛍光イメージングによる移植片対宿主病の病態形成の解明

研究課題名(英文)Functional in vivo cellular imaging of graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice

研究代表者

五十嵐 美徳 (Ikarashi, Yoshinori)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：70280782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(GVHD)の病態形成を解明するために、GFP陽性ドナー細胞の機能(細胞増殖及びアポトーシス)を可視化できる蛍光イメージングの確立は重要と考えられる。生体蛍光イメージングによって、生体内でアポトーシス細胞を検出することはできなかった。しかし、蛍光免疫組織染色により2次リンパ組織において宿主由来の単核球細胞のアポトーシスを検出することができた。また、増殖マーカーとしてKi-67を用いることにより、移植後早期にドナー細胞の著しく増殖することが明らかとなった。生体蛍光イメージングにより細胞機能情報の可視化は、今後さらに検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Visualizing the function of donor cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) will enable understanding of the process of graft-versus-host disease (GVHD). In this study, we visualized the proliferation and apoptosis of green fluorescent protein (GFP) donor cells using immunofluorescence staining and in vivo fluorescence imaging. Immunofluorescence staining revealed that a large fraction of donor cells were cell proliferation marker, Ki-67 positive and a few host but not donor mononuclear cells were apoptotic cell marker, cleaved Caspase-3 positive in the secondary lymphoid organ at early phase after HSCT. We could not visualize apoptotic cell using in vivo fluorescence imaging. However, it is very important for visualizing cellular proliferation and apoptosis in vivo to understand the process of GVHD.

研究分野：免疫学

キーワード：イメージング 同種造血幹細胞移植 移植片対宿主病 GFP

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 生体蛍光イメージング

生体蛍光イメージングは生体内での生命現象を可視化することにより、生命現象の理解に必要な不可欠な技術の一つである。生体蛍光イメージングは緑色蛍光タンパク質 (GFP) をはじめとする新規の蛍光タンパク質、蛍光プローブ等の開発、及び高感度の検出システムの開発により、さらに発展している。生体内での細胞の挙動を生きたまま可視化できることから、移植・再生医療の研究分野においては、移植された細胞の運命 (細胞遊走、局在等) を追跡する最適な技術である。

### (2) 同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (GVHD)

同種造血幹細胞移植は有効な白血病の治療法の一つであるが、重篤な副作用である GVHD の克服が課題である。GVHD は宿主の組織適合抗原に反応するドナー T 細胞の活性化・増殖に引き続く標的臓器への浸潤、組織傷害等が GVHD の病態形成に関与していると考えられるが、ドナー T 細胞の移植後の運命については不明な点が多く残されている。今後、これらを、解決することは、より安全で有効な同種造血幹細胞移植療法の開発において重要な課題である。

### (3) 生体蛍光イメージングによる GVHD の発症機序の解明とこれまでの成果

GVHD の発症機序を解明するためには、ドナー細胞の生体内での挙動を明らかにするために、研究代表者は、以下の研究成果を得てきた。

GFP トランスジェニック (Tg) マウスをドナーとして、ドナー細胞をリアルタイムにシングル細胞レベルで生体内のドナー細胞の挙動を可視化する蛍光イメージングの確立

新規に赤色蛍光タンパク質である DsRed2 の Tg マウスを作製し、GFP-Tg マウスと同時

に用いることにより、2種類のドナー細胞の挙動を可視化できる蛍光イメージングの確立

マウス個体レベルでの各臓器へのドナー細胞の動態を蛍光イメージングにより GVHD を制御する薬剤のスクリーニングシステムの構築 (Yamazaki T and Ikarashi Y et al. Immunol Lett. 2013)

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、生体蛍光イメージングを用いて、同種造血幹細胞移植後の GFP 陽性ドナー細胞の時間経過に伴う、各組織への局在や増大の変化を明らかにしてきた。本研究において、同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の細胞増殖、アポトーシス等の細胞自身に起きている機能情報を蛍光イメージングにより明らかとし GVHD 病態形成の機序の解明が目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 同種造血幹細胞移植モデル

C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) (B6-GFP) マウスをドナーとし、脾臓及び骨髓細胞を (C57BL/6 x DBA/2) F1 (BDF1) マウスに尾静脈より移植した。

### (2) 生体蛍光イメージング

同種造血幹細胞移植後、マウスを経時的に安楽死させ、小動物蛍光観察システム (OV110、オリンパス社) を用いて GFP 陽性ドナー細胞の局在を観察した。

### (3) 免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー

同種造血幹細胞移植後、脾臓より単核球を調整し、抗 Ki-67 モノクローナル抗体及び抗 CD3 (T 細胞) 又は抗 CD19 (B 細胞) モノクローナル抗体を用いてフローサイトメーターにて、増殖期にある T 細胞及び B 細胞の比率を測定した。

#### (4) 蛍光免疫組織染色

移植後に経時的に、マウスを解剖し、組織を摘出し、凍結切片を作製した。抗 Ki-67 及び Cleaved Caspase-3 モノクローナル抗体を用いて、それぞれ増殖及びアポトーシス細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### (5) 生体内でのアポトーシスの検出

同種造血幹細胞移植後の、ドナー及び宿主細胞のアポトーシス細胞を生体蛍光イメージングにより、可視化するためにアポトーシスを検出する蛍光試薬を用いて生体内でのアポトーシス細胞の可視化を OV110 により検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス個体全身の生体蛍光イメージング

これまで、B6-GFP マウスの脾臓及び骨髄細胞を BDF1 マウスに移植後、経時的にマウス個体全身の生体蛍光イメージングを用いることにより容易にマウス個体全身の各臓器におけるドナー細胞の局在を可視化することが可能であった。移植後1日目にはドナー細胞が2次リンパ組織、肝臓等に存在し、その後、時間の経過に伴い、各組織において GFP 陽性細胞が増加していくことを明らかとしてきた (Yamazaki T, Ikarashi Y, et al. Immunol Lett. 2012; 144: 33-40)。

#### (2) 同種造血幹細胞移植後のドナー細胞の増殖

生体蛍光イメージングにより、ドナー細胞が増加していることが明らかとなったが、ドナー細胞の増殖について、増殖細胞のマーカーである Ki-67 及び T 又は B 細胞マーカーを免疫染色して、フローサイトメーターによる定量が解析を実施した。移植後3日目の脾臓において、ドナー及び宿主 T 細胞のそれぞれ約 90 及び 30% が Ki-67 陽性であった。ドナー B 細胞は約 8% と僅かであるが、約 35% は Ki-67 陽

性であった。ドナー T 細胞は移植後早期に著しく宿主で増殖していることが明らかとなった。蛍光免疫組織染色によっても、ドナー細胞が Ki-67 陽性であることが確認された。

#### (3) 同種造血幹細胞移植後の生体内でのアポトーシス細胞の検出

同種造血幹細胞移植後の2次リンパ組織において、宿主の免疫担当細胞が消失し、ドナー細胞に置き換わるが、宿主の免疫細胞の消失がアポトーシスによるか検討するために、Cleaved Caspase-3 を染色した結果、宿主由来のアポトーシス細胞が検出された。

#### (4) 生体蛍光イメージングによるアポトーシス細胞の検出

2次リンパ組織において、宿主の単核球細胞のアポトーシス細胞が検出されたことにより、生体内でのアポトーシス細胞を検出する蛍光試薬をマウスに投与し、OV110 によってイメージングを行ったが、アポトーシス細胞は検出することができなかった。今後は、他のアポトーシスを検出する試薬等を用いて、検討する必要がある。

#### (5) 今後の展望

生体内蛍光イメージングは、臓器の摘出、固定、組織切片作製、染色等の手間がかからないことから、迅速かつ容易に移植後にドナー及び宿主細胞の機能的な情報が得られることから本研究を計画したが、生体内蛍光イメージングによって検出することはできなかった。今後さらなる検討が必要になると考える。一方で、蛍光免疫組織染色は、組織の微細な構造が明らかであり、よりドナー細胞の局在を厳密に同定することができた。今後は生体内蛍光イメージングと蛍光免疫組織染色を組み合わせることによって、移植後の GVHD の発症の機序が解明できることが期待される。を可視化するシステムを確立する。

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)

[学会発表](計 1 件)

Takuya Matsuyama, Yoshinori Ikarashi et al.  
(8 名中 8 番目)、Inhibition of  
graft-versus-host disease by NKT  
cell-ligand is attributed to suppression  
of donor T cell proliferation. 日本癌学  
会学術総会、2013 年 10 月 3 日、横浜市

[その他]

ホームページ等

<http://www.nccri.ncc.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐美德 (Ikarashi Yoshinori)

(独) 国立がん研究センター・研究所・外来  
研究員

研究者番号：70280782

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )