

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460498

研究課題名(和文)再生胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法による癌治療

研究課題名(英文) Treatment of cancer by a new BMT method using co-transplantation of regenerated thymus

研究代表者

保坂 直樹 (HOSAKA, Naoki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30388459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法を開発した。本法は担癌宿主に有効であるが、再生された移植胸腺組織が必要である。マウス多能性幹(induced Pluripotent Stem, iPS)細胞から胸腺上皮細胞(Thymic epithelial cells, TEC)を誘導し、その機能を調べた。造血幹細胞(hematopoietic stem cells, HSC)との共培養では、TEC非存在下ではサイトカインの有無に関わらずT前駆細胞は増殖しなかったが、存在下では増加した。サイトカインを加えるとより増殖したが、成熟T細胞のマーカーであるCD4或いはCD8を発現した細胞は殆ど見られなかった。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new bone marrow transplantation (BMT) method, BMT with thymus transplantation. Although it is effective on cancer, it requires a regenerated thymus graft. We investigated the functions of thymic epithelial cells (TEC) induced from murine induced pluripotent stem (iPS) cells using the method reported previously. The ability to produce T cells was analyzed using a co-culture system of TEC with hematopoietic stem cells (HSC). Some experiments were carried out in the presence of cytokines (IL-2 and IL-7). HSC did not proliferate well in the absence of TEC. However, they proliferated in the presence of TEC, and addition of the cytokines showed more induction. Although precursors of T cells were observed, we found little expression of the mature T cells markers, CD4 and CD8. We need a further searching to regenerate thymus graft using iPS cells.

研究分野：病理学、免疫学

キーワード：胸腺 再生 T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) アロBMT法は、宿主(host)に致死量の放射線照射を行い造血および免疫能を破壊した後、供与者(donor)の骨髄細胞(bone marrow cells, BMC)を移植し造血および免疫機能を回復させる方法である。白血病、自己免疫疾患等種々の疾患に効果があるが、癌を含め効果の少ない疾患も存在する。我々は、胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法を開発した。本方法は、移植胸腺から弱い宿主反応を示すT細胞が産生され、従来のBMT法では治療困難であった疾患にも効果を示す。担癌宿主においては、強い移植片対腫瘍(graft versus tumor, GVT)効果を呈するが、宿主へは弱い移植片対抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)を示すのみであった(Miyake, Hosaka et al, Immunology,2009)。

(2) しかしながら、ヒトへの応用の場合移植胸腺組織の入手が難しい。また胸腺は年齢によって機能が大きく異なり、GVT効果は新生児期がもっとも高い(Zhang, Hosaka et al, Stem Cells Dev, 2011)。よって、ヒトへの応用は幹細胞から作製した再生胸腺を用いる必要がある。再生医療に使用する為の幹細胞は、現在組織幹細胞(tissue stem cells)、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells)、胚性幹細胞(embryonic stem, ES)、iPS細胞等があるが、最も倫理的に問題が少なく、かつ機能性が高いのは成熟組織から作製されるiPS細胞と考えられる。

2. 研究の目的

(1) マウス iPS 細胞から TEC への誘導

まず T 細胞の分化に必要な TEC を、過去に記載された方法を用いて誘導する。TEC の分化に関わる転写因子や蛋白を調べ、またどの時点で増殖が終わり分化したのかも調べる。

(2) HSC からの T 細胞誘導能の解析

TEC の分化が終了した時期に、BMC から精製した HSC と共培養させ、T 細胞の産生能を調べる。一部の系にはサイトカインも加える。

3. 研究の方法

(1) マウス iPS 細胞から TEC への分化

既存のマウス iPS 細胞を理化学研究所から購入し、過去に報告された方法を参考に TEC に分化させる(Inami et al, Immunology and Cell Biology: 89, p314-321, 2011)。概略は、collagen type IV をコートした培養皿にて iPS 細胞 2×10^5 個を Lithium chloride, 2-mercaptoethanol(ME) 存在下に培養する。適宜 Activin A, Fibroblast growth Factor (FGF)7, FGF8, FGF10, bone morphogenetic protein (BMP)4 を、内中胚葉及び胚体内胚葉を経由して TEC を誘導させるように加える。培養後経時的に形態、細胞数を調べ、TEC の分化時に発現する転写因子や蛋白の mRNA も RT-PCR にて調べる。

(2) HSC の精製

C67BL/6 マウスの骨髄細胞を大腿骨と腓骨から採取し、Ficoll 密度勾配遠心法にて多核白血と RBC を除外し、単核球を回収する。次に lineage markers(CD3, CD4, CD8, Gr-1, CD11b, B220, CD71, NK1.1)を発現する細胞を精製抗体にて反応させた後、マグネチックビーズ法にて除去する。最終的に回収した lineage markers 陰性細胞を、HSC として使用する。

(3) HSC と TEC の共培養

(1)における 2 週目の TEC 誘導培養皿に、(2)の HSC 1×10^5 個を 2ME の存在下に培養した。実験系としては、HSC のみ、HSC+サイトカイン(IL-2 + IL-7)、HSC+TEC、HSC+TEC+サイトカイン(IL-2 + IL-7)の 4 系を行った。経時的にリンパ球様の浮遊細胞数と、T 細胞に発現する表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞からの TEC の誘導

培養後 4 日目には、内中胚葉様の類円形の細胞集塊を認め、7 日目以降には上皮様の紡錘形細胞が見られた。以降紡錘形細胞数は増加したが、3 週目の細胞数は2週目とほぼ同じであった。よって、ほぼこの時期に分化が終了したと考えられた。RT-PCR による解析では、胸腺原器となる鰓弓形成の転写因子である Pax1/Pax9, 第3鰓弓への転写因子である Hoxa3, TEC 分化への転写因子である FoxN1 が発現し、上皮細胞に発現する E-cadherin, TEC 分化時に発現する Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 2, 初期の TEC の前駆細胞に発現する Plet1, 胸腺髄質上皮細胞に発現する Keratin 5, 胸腺皮質上皮細胞に発現する Keratin 8 も発現した。逆に、多能性幹細胞のマーカーである Nanog は消失した。よって形態的、マーカー的にも iPS 細胞から TEC 様の細胞が誘導された事が示唆された。

(2) TEC と造血幹細胞の共培養

(1)の結果から、誘導 2 週目の TEC と HSC との共培養をおこなった。浮遊細胞数は、TEC の非存在下ではサイトカインの有無に関わらず上昇しなかったが、TEC の存在下では増加した。サイトカインを加えるとより増殖した。フローサイトメトリーによる解析では、TEC 存在下において軽度の T cell receptor (TCR)βと CD3 の発現が見られた。しかし、サイトカインの有無に関わらず成熟 T 細胞のマーカーである CD4 と CD8 の発現は殆ど見られなかった。

まとめ

胸腺移植を併用した骨髄移植を行なう為に、iPS 細胞胸腺組織の再生を試みた。TEC 様の細胞が分化され、HSC との共培養をにて T 前駆細胞

が誘導されたが、成熟 T 細胞までは分化しなかった。その原因として、(a)培養形態、(b)サイトカイン、(c)支持細胞の不適或いは不足等が考えられた。引き続き培養形態の変更(例えば3-D化)、サイトカインの種類、量、添加時期の調整、或いは他の種類の細胞(例えば B 細胞、間質細胞、樹状細胞)の追加等を検討し、より適切な胸腺組織の再生を行っていく。

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 5 件)

Yanagimoto Y, Taniuchi S, Ishizaki Y, Nakano K, Hosaka N, Kaneko K, Eosinophilic gastritis caused by eating hens' egg: a case report, ALLERGOL INT, 査読有, in press doi: 10.1016/j.alit.2017.02.007.

Hosaka N, Ohe C, Miyasaka C, Nakano Y, Sakaida N, Uemura Y, Saito Y, Ikehara S, Tsubura A, Takahashi H. The role of CD5 expression in thymic carcinoma: possible mechanism for interaction with CD5+ lymphoid stroma (microenvironment), HISTOPATHOLOGY, 査読有, 68, 2016, 450-455 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/his.12742/abstract>

Fujisawa S, Muraji T, Sakamoto N, Hosaka N, Matsuda S, Kawakami H, Hirai M, Yanai T, Positive C4d staining of the portal vein endothelium in the liver of patients with biliary atresia: a role of humoral immunity in ongoing liver fibrosis, PEDIATR SURG INT, 査読有, 30, 2014, 877-881

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00383-014-3553-3>

Hosaka N, New Allogeneic hematopoietic Stem Cell Transplantation Method for Treatment of Malignant Tumor: Hematopoietic Stem Cells + Thymus Transplantation. ANN CLIN PATHOL、査読有, 2, 2014, 1005-1007
<https://www.jscimedcentral.com/Pathology/Articles/pathology-2-1007.php>

Ohe C, Kuroda N, Matsuura K, Kai T, Moriyama M, Sugiguchi S, Terahata S, Hosaka N, Hes O, Michal M, Matsuda T, Uemura Y. Chromophobe renal cell carcinoma with neuroendocrine differentiation/morphology: a clinicopathological and genetic study of three cases. Human pathology: Case reports, 査読有, 1, 2014, 31-39
[http://www.humanpathologycasereports.com/article/S2214-3300\(14\)20017-4/fulltext?cc=y](http://www.humanpathologycasereports.com/article/S2214-3300(14)20017-4/fulltext?cc=y)

[学会発表] (計 3 件)

Hosaka N, New Method of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Hematopoietic Stem Cell Transplantation Plus Thymus Transplantation For Intractable Diseases, 第16回国際免疫学会議、2016年8月24日、メルボルン(オーストラリア)

Hosaka N, Ikehara S, Tsubura A, CD5 expression in thymic carcinoma: possible mechanism for interaction with CD5+ lymphoid stroma (microenvironment), 第74回日本癌学会、2015年10月10日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

保坂直樹, 大江知里, 宮坂知佳, 坂井田紀子, 植村芳子, 齊藤幸人, 池原進
2014/4/24, 胸腺上皮性腫瘍におけるリンパ球マーカーの発現意義, 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24日、広島国際会議場(広島県、広島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

保坂 直樹(HOSAKA, Naoki)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号:30388459

(2)研究分担者

神田靖士(KANDA Seiji)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号:70295799

(3)研究分担者

下埜敬紀(SHIMONO Takaki)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号:40632625

(4)研究分担者

池原進(IKEHARA Susumu)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号:90108986
平成 28 年辞退

(5)研究分担者

大江知里(OHE Chisato)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号:40469242
平成 27 年辞退

