

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）
分担研究報告書

間葉系幹細胞を介する B 細胞分化制御についての研究

分担研究者 一戸 辰夫（広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野
教授）
研究協力者 三浦 康生（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 助教）
平位 秀世（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 院内講師）
前川 平（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授）

研究要旨

間葉系幹細胞（MSC）は、骨髄微小環境において造血幹細胞（HSC）の自己複製や増幅に重要な支持機能を果たしており、骨髄内骨髄移植法では、MSC と HSC がいずれも同所的に移植されるため、経静脈法と比較して移植後の造血機能の回復が促進されることが期待されている。本研究では、分化系列特異的な造血制御過程への MSC の関与を明らかにすることを目的として、骨髄 B 細胞分画の減少が報告されている遺伝子改変マウスより骨髄 MSC を分離増幅し、その骨分化能・脂肪分化能、B 細胞造血にかかわる液性因子の産生能等について、正常同系マウスに由来する骨髄 MSC を対照群として比較検討を行った。遺伝子改変マウス由来の MSC は、正常同系マウス由来の MSC と比較して、骨芽細胞・脂肪細胞への分化能の低下を認め、stromal cell-derived factor 1 の発現量低下を介して正常マウス由来造血幹細胞の B 細胞分化を障害した。この結果より、今後、造血障害の新たな治療戦略として、異常な MSC の機能修復を目指した薬理学的手法の開発が有望な選択肢となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

間葉系幹細胞（mesenchymal stromal/stem cells, MSC）は骨髄微小環境において造血細胞ニッチを構成する重要な細胞である。最近、造血異常と骨髄微小環境異常の相関を示唆する知見が相次いで報告されており、われわれも昨年度の研究において、in vitro の培養下で薬理的に機能を賦活化されたヒト MSC がヒト CD34 陽性細胞の増幅を増強する可能性を報告した。本年度の研究においては、さらに MSC が系列特異的な造血過程の制御に関与している可能性を明らかにするため、B 細胞系列に造血異常を認めることが知られている遺伝子欠損マウスを用いて、MSC の機能と B 細胞分化能の関連について検討を行った。

B. 研究方法

骨髄 B 細胞分画の減少が報告されている遺伝子改変マウスより、骨髄 MSC を分離増幅し、その骨分化能・脂肪分化能、B 細胞造血にかかわる液性因子の産生能等について、正常同系マウスに由来する骨髄 MSC を対照群として比較検討を行った。また、この遺伝子改変マウスに由来する骨髄 MSC と正常同系マウスに由来する c-kit+Sca-1+lineage-細胞(KSL細胞)の共培養を行い、正常同系マウス由来の骨髄 MSC を支持細胞とした場合と B 細胞分化能の相違を検討した。さらに、この遺伝子改変マウスに由来する骨髄を正常同系マウスに移植し、遺伝子改変マウスに由来する造血幹細胞の正常 MSC 存在下での B 細胞分化能を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正)に準拠し、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を得て実施された。また、本研究における動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

遺伝子改変マウスに由来する MSC は、正常同系マウスと比較して、骨芽細胞・脂肪細胞への分化能の低下を認め、正常マウスに由来する KSL 細胞の B 細胞分化を障害していることが明らかとなった。また、そのメカニズムの一つとして遺伝子改変マウス由来 MSC においては、stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, CXCL12) の発現低下が関与していることが明らかとなった。一方、この遺伝子改変マウスに由来する骨髄を正常同系マウスに移植した場合には、B 細胞分化の異常は認められなかった。

D. 考察

本研究の結果により、骨髄 MSC の遺伝子欠損に伴う機能異常が、造血幹細胞の B 細胞分化障害に関与することが明らかとなり、今後、造血障害の新たな治療戦略として、異常な間葉系幹細胞機能の修復を目指したアプローチが選択肢となり得ることを示唆するものと考えられる。また、特に灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植は、ドナーに由来するより多数の正常な MSC を直接的に骨髄微小環境へ投与を行うため、レシピエント MSC に由来する異常な骨髄微小環境の改善にも有効である可能性がある。

E. 結論

MSC の機能異常が系列特異的な血球分化過程にも影響を与え得ることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itamura H, Fukushima N, Kondo S, Urata C, Tanaka-Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplant for fulminant hemophagocytic syndrome in an adult with preexisting rheumatoid arthritis and auto-immune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53(11):2307-2309.
- 2) 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 Y; on behalf of the 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*. 2013; 27(2):286-294.
- 3) Ito T, Akagi K, Kondo T, Kawabata H, Ichinohe T, Takaori-Kondo A. Splenic irradiation as a component of a reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation in myelofibrosis with massive splenomegaly. *Tohoku J Exp Med*. 2012; 228(4):295-299.
- 4) Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi 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*. 2013; 19(2):247-254.

5) Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Differing impacts of pre-transplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2013; 97(1):109-16, 2013.

6) Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, Ichinohe T, Ohashi K, Fukuda T, Koichi Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, Morishima Y. Impact of a single HLA allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol* [Epub 2013 Mar 4]

2. 学会発表

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、東京、2012 年 9 月 15 - 17 日.

2) Ichinohe T, Iida M, Kanda Y, Kimura F, Toubai T, Nakase K, Mitamura M, Kanda J, Fukuda T, Miyamura K, Kanamori H, Mori T, Iida H, Atsuta Y, Morishima Y, Sakamaki H; Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Outcomes of hematopoietic cell transplantation from overseas unrelated donors are comparable to bone marrow or cord blood transplantation from domestic unrelated donors: a retrospective matched-pair cohort Study. 17th

Congress of Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation, October 26-28, 2012, Hyderabad, India.

3) Ichinohe T, Kanda J, Inagaki J, Inoue M, Koh K, Kikuta A, Yabe H, Tanaka J, Atsuta Y, Kanda Y; on behalf of the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. Impact of parental donor type on outcomes after HLA-matched and HLA-mismatched T-cell-replete hematopoietic cell transplantation for patients with leukemia: A retrospective cohort study. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, U.S.A. December 9, 2012.

4) Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Hayashi Y, Tamura A, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. Expression of C/EBP β in bone marrow mesenchymal stem cells is mandatory for early stage B cell lymphopoiesis. The 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Atlanta, U.S.A., December 10, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

