

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）
分担研究年度終了報告書

間葉系幹細胞を介する免疫再構築と造血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）

石谷 昭子（奈良県立医科大学医学部 法医学教室 非常勤講師）

下嶋 典子（奈良県立医科大学医学部 細菌学教室 助教）

研究要旨

骨髄内骨髄移植法は造血幹細胞/前駆細胞（hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC）と間葉系幹細胞（mesenchymal stem/stromal cells）が同所的に移植されることを最大の特徴としており、移植された MSC は多様なメカニズムを介して、同種免疫応答の制御や HSPC の増幅に関与することが知られている。本研究では、骨髄内骨髄移植の臨床応用に向けて、MSC の機能を薬理的に賦活化することを目指して、（1）MSC の免疫調節作用における非古典的 HLA クラス Ib 分子の関与についての検討；（2）In vitro で薬理的に活性化された MSC が骨髄 CD34 陽性細胞の増幅能に与える影響の検討；（3）MSC が HSPC の系列特異的な分化能に与える影響についての検討を行った。

A. 研究目的

間葉系幹細胞（mesenchymal stem/stromal 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。また、体外で培養されたヒト MSC は造血幹細胞/前駆細胞（hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC）の増殖を促進することや、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抑制することが報告されており、造血幹細胞移植後の生着の促進や移植片対宿主病（graft-versus-host disease, GVHD）の治療などを目的として、実際に MSC の移植を行う臨床試験が国内外において実施されている。しかし、ヒト MSC の造血促進作用や免疫調節作用がどのような

分子機構によって担われているのかに関しては、いまだに十分な知見が得られていない

灌流法によって採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法では、HSPC と MSC が骨髄外臓器にトラップされることなく直接同所性に移植されるため、MSC の造血支持能力や免疫調節作用が従来の移植法よりも発揮されやすくなる可能性が想定される。また、骨髄内骨髄移植による MSC 生着率の向上は、移植後に出現する組織障害や免疫学的合併症の軽減にも寄与する可能性がある。本研究では、骨髄内骨髄移植法のヒトへの応用の際に、これらの MSC の潜在機能を有効に活用するための薬理的手法を開発することを目的として、以下の3つの課題についての検討を行った。

平成 22 年度： MSC の免疫調節作用における非古典的 HLA クラス Ib 分子の関与についての検討（下嶋、石谷、一戸）

平成 23 年度： In vitro で薬理的に活性化された MSC がヒト CD34 陽性細胞の増幅能に与える影響の検討（三浦、一戸）

平成 24 年度： MSC が造血前駆細胞の B 細胞分化能に与える影響についての検討（三浦、平位、一戸）

B. 研究方法

(MSC の免疫調節機能についての検討)

ヒト骨髄由来 MSC 株は Lonza 社より入手した。RT-PCR 法による HLA クラス Ib (HLA-E, HLA-F, HLA-G) mRNA の検出は国際ワークショップで規定された方法に準拠して行った。HLA-G の ELISA 法による HLA-G の測定には、HLA-G に対する単クローン抗体として、MEM-G/9 および G233（いずれも EXBIO 社）を使用し、種々の濃度に調整した精製 HLA-G 分子を含む検体により検量線の作成を行った。また、HLA-F の細胞表面における発現の検討には、D. Geraghty 博士（Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA）より供与された 3 種類の単クローン抗体を用いた。

(MSC が HSPC 増幅能に与える影響についての検討)

SCF、FLT3-ligand、TPO、IL-3 存在下に CD34 陽性細胞と MSC との共培養を行い、CD34 陽性細胞の増幅率を検討した。次いで、あらかじめパラサイロイドホルモン(PTH)により in vitro で機能を賦活化した MSC を用いて同様の検討を行った。

(MSC が B 細胞分化支持能に与える影響についての検討)

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・奈良県立医科大学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遺伝子組み換え生物を用いた実験は京都大学組み換え DNA 実験安全管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

1) MSC における HLA-G の発現の検討

RT-PCR 法を用いた MSC における HLA クラス Ib 遺伝子の発現に関する検討を試みたが、HLA-G あるいはその可溶性アイソフォームの mRNA は、今回用いた MSC 株のいずれにおいても検出することはできなかった。一方、HLA-E, HLA-F については mRNA レベルでの発現が確認された。

次いで、定常状態の骨髄由来 MSC 株の培養上清・細胞溶解物中を用いて HLA-G のタンパク質発現を検討したが、いずれにおいても HLA-G タンパク質を検出することはできなかった。そこで、HLA-G の発現を亢進させることが報告されている液性因子として IL-10 の存在下で骨髄由来 MSC 株の培養を行ったが、IL-10 添加後 6 日目までの時点における検討では、HLA-G mRNA、HLA-G タンパク質のいずれも検出することはできなかった。

次いで、MSC における HLA-F の細胞表面における発現量を検討するため、成人 T 細胞白血病の細胞株を用いて HLA-F に対する単クローン抗体の検定を行った。成人 T 細胞白血病由来の細胞株においては、HLA-F の細胞表面への発現が確認可能であることが判明したが、MSC 表面におけるその発現の確認には至らなかった。

2) MSC が CD34 陽性細胞増幅能に与える影響についての検討

CD34 陽性細胞と MSC を *in vitro* で共培養すると CD34 陽性細胞分画が約 15 倍に増加した。一方、あらかじめ PTH で刺激した MSC と共培養する CD34 陽性細胞分画が約 24 倍に増加した。一方、CD34 陽性細胞を MSC 非存在下で培養した場合には、約 1.6 倍の増加にとどまった。MSC による CD34 陽性細胞の増幅には MSC の発現するケモカインなどの液性因子と接着分子などの細胞表面分子の双方が関与していたが、PTH 刺激によるその増強効果には接着分子などの細胞表面分子のみが関与していた。

3) MSC が B 細胞分化支持能に与える影響についての検討

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. 健康危険情報

特記すべきことなし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda J, Ichinohe T, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Ichiyama S, Uchiyama T. Impact of discontinuing fluoroquinolone prophylaxis after allogeneic marrow or peripheral blood SCT with myeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45(8):1369-1371.
- 2) Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2010; 116(8):1369-1376.
- 3) Ichinohe T. Long-term fetal-maternal microchimerism revisited: microchimerism and tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. *Chimerism.* 2010; 1(1):39-43.
- 4) Nagafuji K, Matsuo K, Teshima T, Mori S, Sakamaki H, Hidaka M, Ogawa H, Koderia Y, Kanda Y, Maruta A, Mori T, Yoshida F, Ichinohe T, Kasai M, Takatsuka Y, Kubo K, Sao H, Atsuta Y, Suzuki R, Yoshida T, Tsuchida M, Harada M. Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry. *Int J Hematol.* 2010; 91(5): 855-864.
- 5) Kanda J, Mizumoto C, Ichinohe T, Kawabata H, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Takakura S, Ichiyama S, Uchiyama T, Ishikawa T. Pretransplant serum ferritin and C-reactive protein as predictive

- factors for early bacterial infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46(2):208-216.
- 6) 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.* 2011; 93(4):532-541.
- 7) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood.* 2012; 119(9):2141-2148.
- 8) 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 autoimmune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53(11):2307-2309.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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):109-116, 2013.
- 13) 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) 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、東京、2010 年 9 月 17 - 19 日.
- 2) 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 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、静岡、2011 年 8 月 28 - 30 日.
- 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. 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.
- 4) Ichinohe T. Microchimerism-associated tolerance to noninherited maternal antigens (NIMAs) 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. Busan, Korea, August 19, 2011.
- 5) Ichinohe T. Emerging roles of non-inherited maternal alloantigens (NIMAs) and inherited paternal alloantigens (IPAs) in HLA-mismatched hematopoietic cell transplantation. The Joint Meeting of the 17th International Symposium on Gnotobiology and the 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Japan, November 21, 2011.
- 6) Iida M, Kanda Y, Toubai T, Nakase K, Mitamura M, Kanda J, Fukuda T, Miyamura K, Kanamori H, Mori T, Iida H, Atsuta Y, Morishima Y, Sakamaki H, Ichinohe T: on behalf of the Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors: Current Status in Japan. 16th Congress of Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation, October 30-31, 2011, Sydney, Australia.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

