

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

分担研究者 品川 克至（岡山大学医学部 血液・腫瘍内科 講師）

A. 研究目的

「マウス移植モデルを使った造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較」

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS) は、移植後に感染症以外の原因により広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。診断基準は、a) 広範な肺胞障害の存在、b) 下気道感染症の否定、である。胸部 X-P、CT 上の多発浸潤影の出現、肺炎の臨床症状、肺機能障害（低 O₂ 血症、拘束性肺機能障害）が見られる。また、気管支鏡検査により、細菌、真菌、ウイルス感染を否定することが必要である。頻度は、同種移植では再生不良性貧血など非腫瘍性疾患では 3~7%、白血病など腫瘍性疾患では 7~10%、自己移植後では 6%といわれており、悪性腫瘍に対する同種移植後に多い。発症時期は移植後、中央値で 21 日といわれているが、2 ヶ月以降の発症もある。死亡率は 60~82%であり予後はきわめて不良である。発症に関与する危険因子として、前述の悪性腫瘍に対する同種移植の他、高齢、全身放射線照射 (TBI)、移植片対宿主病(GVHD)などが推定されている。

病態メカニズムは明らかでないが、TBI による組織障害によりサイトカインの誘導や、肺上皮細胞での MHC、補助シグナル、接着因子の発現上昇などが発生し、肺局所へのドナー細胞の流入と活性化がおこり、肺胞上皮とドナーT細胞の接触による免疫反応、および RT による肺障害の両者により発症することが推定されている。

ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植 (iv-BMT) 後では多くが肺へトラップさ

れるが、骨髄内骨髄移植 (intra-BMT) では少ないと考えられる。Ikehara らは、マウスモデルを用いて、intra-BMT では iv-BMT よりも GVHD が抑制されることを報告しているが、我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立てた。マウスモデルを用いて、IPS に対する intra-BMT の影響に関して iv-BMT と比較検討を行った。さらに、ドナーマウスに FVB/N lac+を用いた系で、移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して IV-SCT と IBM-SCT で比較検討した。

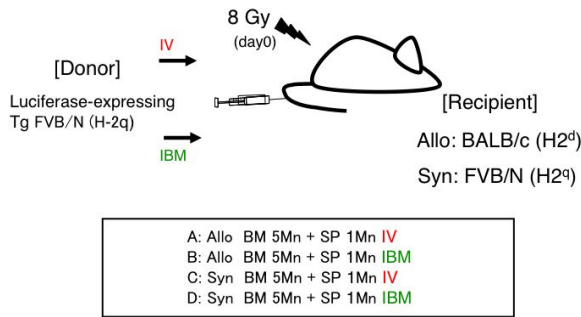
B. 研究方法

ドナーマウスに C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に IV-SCT と IBM-SCT を行い比較検討した。

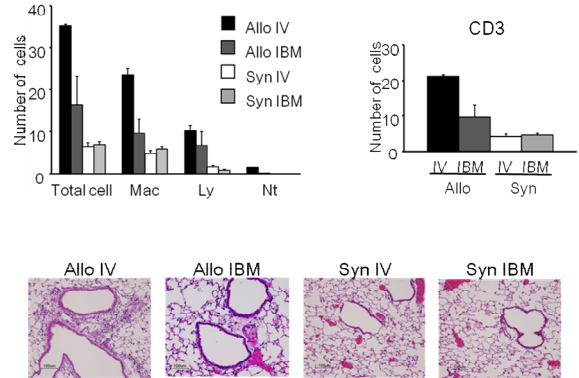
移植後の、体重および GVHD スコア、生存率を評価した。また移植後 6 週間後に、気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL)を行い、回収液中の細胞を解析した。また肺組織の病理所見を検討するとともに、肺組織から抽出した mRNA におけるサイトカイン発現レベルを測定した。次にドナーマウスに FVB/N lac+、レシピエントに BALB/c を用いた系で、*in vivo* bioluminescence imaging (BLI)分析により移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して IV-SCT と IBM-SCT で比較検討した。

(図 1)

(図 1)



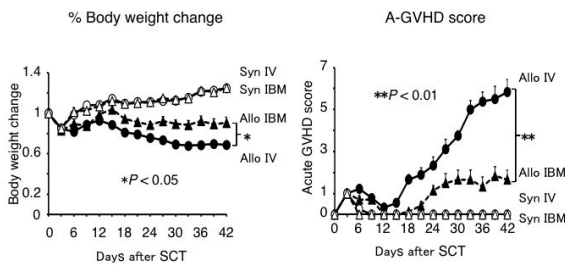
(図 4)



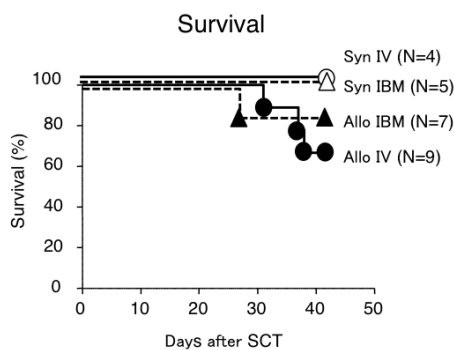
C. 研究結果

移植 6 週後において、IBM-SCT で体重減少が低く ($p < 0.05$)、また GVHD スコアも低く ($p < 0.01$)、生存率が高かった。(図 2 , 3)

(図 2)



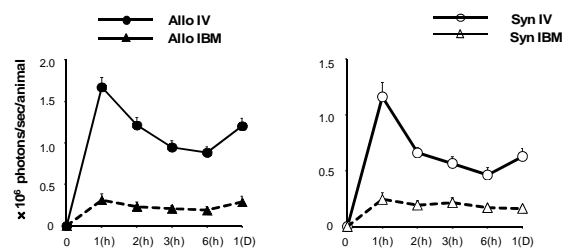
(図 3)



同じく移植 6 週後の BAL の解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、IBM-SCT において IV-SCT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも IBM-SCT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。(図 4)

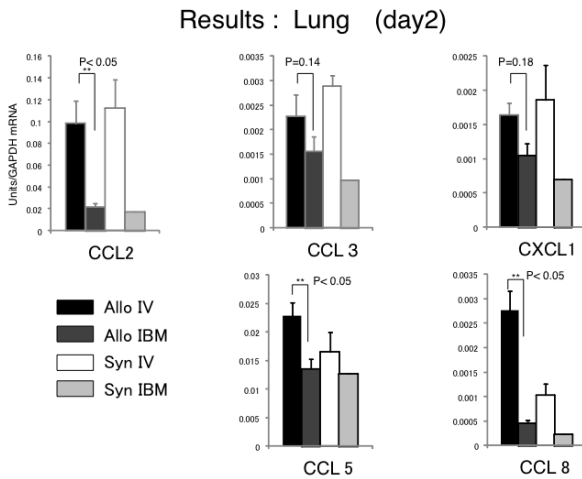
さらにルシフェラーゼによる発光反応を用いた *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) 分析による解析では、IBM-SCT では IV-SCT に比し移植後早期 (1-6 時間) の肺への移植細胞の集積が少なかった。移植後 1h では IV-SCT 群でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT 群では輸注下肢にとどまり肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった (3.1 ± 0.7 vs $16.7 \pm 1.1 \times 10^5$ photons/sec/animal, IBM-SCT vs IV-SCT; $p < 0.01$)。 (図 5)

(図 5)



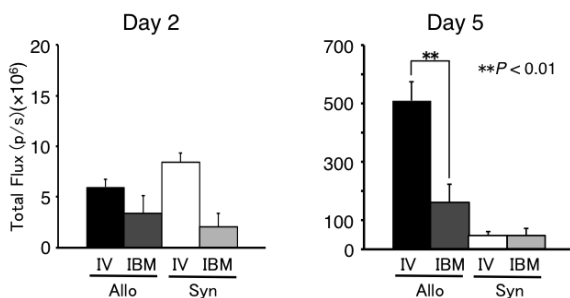
次に移植後 2 日目の肺組織から抽出した mRNA における各種ケモカインの発現レベルは、IV-SCT 群で高い傾向にあり、特に CCL2 では有意であった (0.098 ± 0.020 vs 0.020 ± 0.003 units/GAPDH mRNA ; $p < 0.05$)。 (図 6)

(図 6)



以上の 2 つの結果は syngeneic の系においても同様の結果が得られたため(2.4±0.6 vs. 11.6±1.3 ×10⁵ photons/sec/animal;p<0.01)、移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の輸注手技の違いによることが示唆された。移植後 2 日目と 5 日目の BLI 分析では、5 日目では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT 群と IBM-SCT 群で差はなかったが(4.8±1.1 vs. 4.6±2.5×10⁷ photons/sec/animal; p=0.94)、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した (50.9±6.6 vs 16.0±6.2×10⁷ photons/sec/animal;p<0.05) (図 7)

(図 7)



以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆された。また肺障害のメカニズムとして移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、各種ケモカイン mRNA 発現増加が allo 免疫反応を誘導していると考えられた。

評価

1) 達成度について

今回検討した IPS マウスモデルでは IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

IPS マウスモデルによる IV-SCT と IBM-SCT の比較研究は過去になく、今回肺局所のリンパ球の集積の差異が経時的に *in vivo* 観察され、その機序がケモカインレベルで証明された意義は大きいと思われる。IBM-SCT が移植後肺障害軽減の点からも有効であることが示唆され臨床応用が期待される。

3) 今後の展望について

今後さらに IPS 発症に関与する T 細胞を含めた細胞分画の同定と詳細な検討が課題である。

4) 研究内容の効率性について

マウスモデルの確立は習熟により達成された。また肺病変の解析システムも達成されており、今後研究は進捗するものと考えられる。

結論

今回検討した IPS マウスモデルでは IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆された。

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). H Nishimori, Y Maeda, T Teshima, H Sugiyama, K Kobayashi, Y Yamasuji, S Kadohisa, H Uryu, K Takeuchi, T Tanaka, T Yoshino, Y Iwakura and M Tanimoto. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17 Blood 119:285-295, 2012
- 2). Teshima T, Maeda Y, Ozaki K. Regulatory T cells and IL-17- producing cells in acute graft-versus-host disease. Immunotherapy. 2011; 3(7): 833-52

2. 学会発表

- 1). 山筋好子、前田嘉信、西森久和、杉山暖子、小林孝一郎、門久幸代、近藤英生、藤井伸治、品川克至、金蔵拓郎、谷本光音
「骨髄内骨髄移植は Idiopathic pneumonia syndrome の発症を予防する」
日本血液学会総会 2011/10/15
- 2). 西森久和、前田嘉信、杉山暖子、小林孝一郎、山筋好子、門久幸代、谷本光音、竹内賢吾
「ドナーの Th17 細胞と Th1 細胞が慢性 GVHD 発症に関与する」
第 33 回日本造血細胞移植学会総会 2011/3
- 3). Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Kadohisa, E Kondo, K Shinagawa, K Mominoki, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. 2011/2 ASBMT tandem meeting
- 4). Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, and Tanimoto M. Donor Th17 and Th1 contribute to chronic graft-versus-host disease 2011/2 ASBMT tandem meeting

- 5). Y Yamasuji, H Nishimori, H Sugiyama, K Kobayashi, S Okamoto, E Kond, N Fujii, K Shinagawa, T Kanekura, M Tanimoto and Y Maeda. Prevention of idiopathic pneumonia syndrome by intra-bone marrow injection of donor cells. 2011/12 American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition.
- 6). Hideaki Fujiwara, Koichiro Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Masaaki Nishinohara, Sachiyo Okamoto, Kenichi Matsuoka, Eisei Kondo, Nobuharu Fujii, Katsuji Shinagawa, Mitsune Tanimoto and Yoshinobu Maeda. B7H1 expression on recipient regulate the frequency of IL-17+ IFN γ + T cells and contribute to the pathogenesis of cGVHD. 2013 ASBMT tandem meeting.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきことなし。

