

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10101

研究課題名(和文) CIK細胞と培養肥満細胞を併用し人為的抗腫瘍効果を増強させた造血幹細胞移植の開発

研究課題名(英文) Research for hematopoietic stem cell transplantation with enhanced antitumor effect by combination of cytokine induced killer cells and cultured mast cells

研究代表者

荒木 来太 (Araki, Raita)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60768779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植は血液悪性腫瘍の治療法として普及しているが、免疫の攻撃から腫瘍細胞が逃避することや副作用である移植片対宿主病の克服といった解決すべき問題点を抱えている。我々はマウスの骨髄移植モデルを用いて抗腫瘍効果を増強し、移植片対宿主病のリスクを軽減した移植法の開発を目指している。本研究では培養肥満細胞が同種免疫反応に対し抑制的に作用することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植には移植片対宿主病という重大な副反応があり、移植療法の大きな障壁となっている。本研究において移植後免疫反応を修飾する細胞群の解析を行い、従来はアレルギーに関与する細胞とされていた肥満細胞が移植後の免疫応答に対して抑制的に作用することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cell transplantation has been used in the treatment for hematological malignancy. The escape of tumor cells from immune attack, and graft-versus-host disease are unsolved problems. The aim of our study is development of transplantation with enhanced anti-tumor effect and reduced risk of graft-versus host disease. In this study, we have found that cultured mast cells suppress the allo-immune response.

研究分野：小児血液がん

キーワード：造血幹細胞移植 肥満細胞 小児がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は血液悪性腫瘍に対する免疫療法として普及しているが、その成績は十分に満足できるものではない。造血幹細胞移植による抗腫瘍効果(graft-versus-tumor effect: GVT)はドナー由来の免疫細胞がレシピエントの腫瘍細胞を非自己と認識することで発揮されるが、種々の機構により腫瘍細胞が免疫による攻撃から逃避することによって抗腫瘍効果が減弱されることが知られている。また、ドナー由来の免疫細胞がレシピエントの非腫瘍細胞(皮膚、肝臓、腸管など)を非自己と認識し攻撃することで移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GVHD)と呼ばれる臓器障害を生じ重篤な場合には致死的となる為、造血幹細胞移植を実施する上での最大の障壁となっている。造血幹細胞移植後には致死的なGVHDを予防する為免疫抑制剤が必須となっているが、現状ではGVHDとGVTを独立して制御することはできていない。その為我々の研究グループでは人為的に抗腫瘍効果を増強し、かつ移植片対宿主病を独立して制御した理想的な移植法の開発を目指している。

我々の研究グループでは抗腫瘍効果を増強する手段として、Cytokine-induced killer cells (CIK細胞)を用いた移植法に着目して来た。CIK細胞はマウス脾細胞をIFN- γ 、抗CD3抗体、IL-2で刺激し得られる細胞群の総称で、T細胞とNK細胞マーカーを共発現しており、NK細胞の活性化レセプターであるNKG2Dを介した強力な抗腫瘍効果を発揮することが分かってきた(Nishimura R, et al. Blood 2008;112:2563-74)。CIK細胞は自家腫瘍細胞のみならず、担癌マウスを用いた同種骨髄移植モデルにおいても重篤なGVHDを誘発せずにGVT効果を得られたが、軽度ながらも慢性GVHDを発症する場合もあり、より一層GVHDを制御する手段との併用が望ましく研究を継続している。

我々はマウス骨髄移植モデルを用いて移植後の免疫反応を修飾している様々な細胞群を同定していく過程で多くの臓器・組織に広く分布している肥満細胞に着目した。肥満細胞は一般的にはIgE依存性アレルギー反応のエフェクター細胞として知られており、アレルゲンの刺激により脱顆粒しヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターを放出することでアレルギー反応を惹起する。近年、肥満細胞はアレルギーにおける役割だけでなく、感染防御、血管新生、T細胞性免疫、免疫寛容、腫瘍免疫など様々な生体反応へ関与していることが判明してきている。我々はマウス骨髄移植モデルにおいてGVHD病変の程度に関連して浸潤している肥満細胞の数が大きく異なる現象に気づいた。実際にヒトGVHDの皮膚病変においてもGVHDのgradeが高いほど浸潤している肥満細胞数が多いという報告があるが、その意義は不明であった。そこで、マウス骨髄移植モデルを用いて肥満細胞の有無とGVHDの重症度を検討したところ、肥満細胞欠損マウスでは野生型と比較し重度のGVHDを発症することを見出した。また、同種細胞間でのリンパ球混合反応へ培養肥満細胞を加えるとリンパ球増殖反応が用量依存的に有意に抑制されることが判明した。その為、肥満細胞が同種免疫反応に対し抑制的に作用していると考え、その機序の解明及び細胞療法としての発展を研究テーマとした。

2. 研究の目的

肥満細胞による同種免疫の抑制機序を解明し、細胞療法としての基礎的検討を行う。肥満細胞やCIK細胞は骨髄あるいは脾細胞から大量に培養することが可能であり、これらの細胞群をその役割に応じて用いることで、抗腫瘍効果と副反応である移植片対宿主病を独立して制御した新たな細胞免疫療法への発展が期待できる。

3. 研究の方法

特定のサイトカイン欠損マウスを含む多系統のマウスから目的の細胞群(培養肥満細胞、CIK細胞)を高純度で作成する培養系を確立する。個々の細胞群の機能解析は *in vitro* での実験系(リンパ球混合反応、細胞障害活性測定、表面抗原解析)において実施した。細胞療法の基礎的検討としての輸注細胞の体内動態、分布、生存期間などの評価は、ヒトでの造血幹細胞移植を再現した同種マウス間での骨髄移植モデルを用いて行なった。

4. 研究成果

(1) 細胞培養系の確立

Cytokine-induced killer cells (CIK細胞): マウス脾細胞を IFN- γ 、抗 CD3 抗体、IL-2 存在下で 2~3 週間培養し CIK 細胞を作成した。作成した CIK 細胞は表面抗原発現及び、マウス白血病・リンパ腫細胞に対する細胞障害活性を測定し機能を確認した。骨髄由来培養肥満細胞: マウス骨髄細胞を IL-3 存在下で 8 週間培養することで、95%以上の純度の培養肥満細胞を作成した。培養肥満細胞は形態、顆粒の染色態度、表面抗原発現を確認した。

(2) 肥満細胞の同種リンパ球増殖反応における検討

同種細胞間でのリンパ球混合反応を利用し、培養肥満細胞による同種免疫反応抑制の機序を検討した。リンパ球混合反応槽と培養肥満細胞槽を小孔付きポリカーボネート膜で区画すると、培養肥満細胞を刺激・脱顆粒誘導しても同種免疫抑制効果が消失した。このことから肥満細胞による同種免疫抑制効果の発現には細胞間接触が必須であることが示唆された。

(3) マウス同種骨髄移植モデルでの検討

レシピエントに肥満細胞欠損マウスを用いて同種骨髄移植を行い、ドナー由来の免疫再構築を検討した。その結果、肥満細胞欠損マウスにおいても GVHD を誘導した場合に限りドナー由来の肥満細胞が標的臓器において検出された。このことから肥満細胞は炎症病態に応じて分化・動員される可能性が高いと考えられた。

(4) 培養肥満細胞の細胞療法としての検討

GFP (green fluorescent protein) 蛍光標識されたマウス骨髄細胞を IL-3 存在下で 8 週間培養することで、95%以上の純度で培養肥満細胞 (Fc γ RI $^{+}$, c-kit $^{+}$) が作成できることを確認した。マウス骨髄移植モデルにおいてドナーと同系統の GFP 標識マウスから作成した培養肥満細胞を経静脈的に単回投与し、経時的に体内動態を検討した。その結果、移植後比較的早期から脾臓において GFP 陽性の培養肥満細胞が検出され、その後経時的に減少するものの移植後 100 日を超えて長期に検出可能であった。このことから輸注した培養肥満細胞が移植後長期に渡ってリンパ装置で機能し続ける可能性が示唆された。

(5) まとめ

以上から肥満細胞は炎症病態に応じて分化・動員され、移植後免疫応答に対して抑制的に作用していると考えられた。また骨髄移植の状況下でも培養肥満細胞を養子移植するとリンパ装置において長期に生存し機能を発揮しうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Raita Araki, Ryosei Nishimura, Rie Kuroda, Toshihiro Fujiki, Shintaro Mase, Kazuhiro Noguchi, Yasuhiro Ikawa, Hideaki Maeba, Akihiro Yachie	4. 巻 108
2. 論文標題 A characteristic flow cytometric pattern with broad forward scatter and narrowed side scatter helps diagnose immune thrombocytopenia(ITP)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 151-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-2454-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Raita Araki, Ryosei Nishimura, Anri Inaki, Hiroshi Wakabayashi, Yasuhiro Imai, Yoshikazu Kuribayashi, Kenichi Yoshimura, Toshinori Murayama, Seigo Kinuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Feasibility of high-dose iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy for high-risk neuroblastoma preceding myeloablative chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation: a study protocol	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asia oceania journal of nuclear medicine and biology	6. 最初と最後の頁 161-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22038/aojnmb.2018.29845.1203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木来太、西村良成、馬瀬新太郎、野口和寛、藤木俊寛、黒田梨絵、前馬秀昭、谷内江昭宏
2. 発表標題 末梢血幹細胞動員不良例におけるG-CSF単独動員法の成功経験
3. 学会等名 日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	前馬 秀昭 (Maeba Hideaki) (10419335)	独立行政法人国立病院機構(金沢医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他 (83301)	
研究 分担者	西村 良成 (Nishimura Ryosei) (50324116)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究 協力者	黒田 梨絵 (Kuroda Rie)		
研究 協力者	馬瀬 新太郎 (Mase Shintaro)		